

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2005～2008

課題番号：17591591

研究課題名（和文）再生医療技術を応用した殺細胞処理骨の再活性化に関する実験的研究

研究課題名（英文）Osteogenic capacity of devitalized autologous bone loaded with Cultured mesenchymal stem cells

研究代表者 田中 康仁(TANAKA YASUHIRO)

奈良県立医科大学・医学部医学科・講師

研究者番号:30316070

研究成果の概要：骨形成能の低下した自家骨に再生医療技術を使用して骨形成能を付与する基礎的研究を行った。実験にはラットを用い、予め放射線照射処理により活性を低下させた骨を作成した。その処理骨を基盤として、細胞培養により獲得した骨髄間葉系幹細胞を含む浮遊液を処理骨に注入・含浸し、同系ラットに移植した。その結果、移植した処理骨内部で組織学的に新生骨の形成が確認され、生化学的にも骨形成の活性が確認された。再生医療技術により生物活性の低下した骨の再活性化が実現化された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,300,000	0	1,300,000
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：自家骨移植、処理骨、放射線照射骨、間葉系幹細胞、骨形成、再生医療

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域に於ける悪性骨腫瘍に対する手術治療方法として現在、病巣の広範囲切除術が行われる。しかし、その際に生じる巨大骨欠損に対する対処方法には難渋する。切除部位によっては人工関節等の人工機器や人工骨による補填により解決されるが、骨に成長線が存在する青少年の骨腫瘍、腫瘍が皮質骨まで浸潤し人工骨の充填が困難な部位の骨腫瘍、関節近傍および靭帯・筋腱付着部での骨腫瘍では有効な人工材料が無く、再建

方法に特に難渋する。これを解決するべく、骨切除部位の構造をそのまま再建できる手術方法として、手術中、摘出した骨腫瘍組織に放射線照射処理、オートクレーブ処理やパステル処理等の各種熱処理などによる殺細胞処理を行い、処理後に切除した部位に戻すという自家処理骨移植法がある。

しかし、この自家処理骨移植では、殺細胞処理により腫瘍細胞のみならず正常細胞も死滅する為、骨組織は生物活性の低下した、強度的にも脆弱化した壊死骨に陥る。その結果、処理骨の移植後の圧潰や癒合不全が起

り、未だ満足すべき成績が得られていない。

2. 研究の目的

近年の人工関節や人工骨の開発により、骨・関節欠損に対する代替人工素材の機能性は飛躍的向上を遂げている。しかし、広範な病巣切除を要する骨欠損量が非常に大きな症例では、一般的に行われる自家骨移植では量的限界があり、また、その巨大欠損部を全て人工骨で充填移植するとなると、人工骨間隙の新生骨形成による充填に時間がかかるほか、強度的にも弱い。また、腫瘍が関節近傍、靭帯・筋腱附着部、有効な人工材料の開発がなされていない部位に存在する場合は尚更、機能再建の点で困難を極める。そこで、自家処理骨移植は手術切除部位における形状適合性、靭帯・筋腱を含めた既存組織の温存性の点からも非常に有効である。本研究の目的は、自家処理骨移植のこれらの有用性を生かすべく、自家処理骨移植の最大の短所とも言える自家処理骨の生物活性の低下の問題を解決することである。この問題の解決は、深刻な悪性骨腫瘍手術における運動器再建、自家処理骨移植の適応の拡大に大きく影響を与えるものである。

3. 研究の方法

殺細胞処理により低下した骨組織の生物活性の回復を本研究では再生医療技術に求めた。手法としては生物活性の失った殺細胞処理骨を scaffold として、細胞培養により増殖・獲得した自家骨髄由来間葉系幹細胞を自家処理骨に搭載させるというアイデアである。本手法が確立されれば、自家骨と同等か、それ以上の生物活性を付加することも可能性として予測される。

基礎動物実験には Fischer 344 ラットを用いた。処理骨に搭載する骨髄間葉系幹細胞の培養（初期培養）は、5 週齢ラット大腿骨より骨髄細胞を採取し、15%牛胎児血清（FBS）を含む α -MEM 培養液にて行った。約 10 日後、0.01%トリプシン溶液にて培養皿底面に接着した細胞を剥離し、細胞を MEM 培養液で $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調整して培養自家骨髄由来間葉系幹細胞の細胞含有液とした。

Scaffold となる骨組織は同系ラット大腿骨より作成した。8 週齢ラット大腿骨を採取し、骨鋸にて 4mm 長に裁断した。殺細胞処理方法としては、処理の簡便性および均一性から、放射線照射を選択した。照射線量は骨腫瘍の臨床治療を想定して 60Gy 一括照射した。

処理骨に対する骨髄由来間葉系幹細胞の搭載は、放射線照射を行った処理骨に、培養により獲得された骨髄間葉系幹細胞含有液を注射器にて注入し、細胞含有液内に 30 分間浸透させた。この搭載方法および搭載時間は、臨床応用を想定して決定した。骨腫瘍手術中に摘出した病巣骨組織に手術場という限られた場所、時間内で予め培養しておいた骨髄由来間葉系幹細胞を搭載することを想定すると、注射器による注入、細胞含有液への含浸、30 分程度の含浸時間が妥当と考えた。

実験群として放射線照射を行わず摘出した骨片を直接移植に用いた未処理骨群（Group 1）、培養細胞を搭載させず放射線処理のみを行った培養細胞非搭載処理骨群（Group 2）、骨髄間葉系幹細胞含有液を浸透させた培養細胞搭載処理骨群（Group 3）の 3 群とした。生物活性の評価はハイドロキシアパタイト等各種生体材料/培養骨髄由来間葉系幹細胞複合体の骨形成能の評価方法として既に確立されているラット皮下移植実験モデルを用いて行った。その手法に基づき、各実験群の骨片を 7 週齢同系ラットの背部皮下に移植した。

①測定項目：移植 2, 4 週後に移植した骨標本を摘出した。摘出後、各標本のアルカリフォスファターゼ（ALP）活性および摘出標本より総 RNA を抽出してリアルタイム PCR 法により骨芽細胞に特異的なオステオカルシン（OC）の遺伝子発現をハウスキーピング遺伝子（GAPDH）に対する割合として算出した。更に、ヘマトキシリンエオジン（HE）染色による組織学的評価も行った。

②移植骨で形成された新生骨の由来：本実験において、移植骨に認められた新生骨が、搭載させた培養骨髄由来間葉系幹細胞によるものか、レシピエントの組織に由来するものかを解析する必要がある。また、本解析はレシピエント内におけるドナー由来細胞（培養骨髄由来間葉系細胞）の動態を分析する上で重要である。

解析実験には初期培養のドナー細胞に Fischer 344 ラットのオスを用い、移植骨およびレシピエントにはメスを用いた。前述の実験手技に沿って移植後 4 週に摘出された骨標本からレーザーマイクロダイセクション法にて新生骨組織のみを選択採取した。採取した新生骨組織より骨細胞 DNA を抽出し、性染色体関連遺伝子（SRY gene; Sex-determining Region Y gene）の primer にて PCR 増幅させ、アガロースゲル電気泳動

後、UV 照射による検出を行った。これにより、新生骨がドナー細胞に由来するものであれば、電気泳動により SRY gene のバンドが検出されることになる。

4. 研究成果

結果①：培養により獲得した骨髄間葉系細胞を搭載させることで、骨形成のマーカーとなる ALP 活性および骨芽細胞が合成する骨基质蛋白 OC 遺伝子を測定した結果、移植後 2 週および 4 週ともに、ALP 活性の上昇および OC 遺伝子発現の上昇が未処理骨群 (Group 1) 及び培養細胞搭載処理骨群 (Group 3) で認められた (表 1, 2)。培養細胞非搭載処理骨群 (Group 2) と比較して Group 1, 3 では有意に高値を示し (Mann-Whitney test, $p < 0.05$)、経時間的に上昇していた。また、組織学的にも、移植後 2 週の組織像で Group 1 及び Group 3 共に骨芽細胞の配列、新生骨の形成を認め、移植後 4 週の組織像では Group 2 では既存骨組織が全て壊死に陥る一方、Group 1 及び Group 3 では共に顕著な骨改変傾向を認めた (図 1)。しかし、生化学的にも、組織学的にも、Group 3 の骨形成は Group 1 には及んでいなかった。

結果②：新生された骨組織が培養により得られたドナー細胞に由来するものかを検討した分子生物学的分析は、新生骨の形成を認めた Group 1 および Group 3 を対象として行った。未処理骨群 (Group 1)、搭載処理骨群 (Group 3) の新生骨組織の抽出 DNA 解析の結果、Group 3 の新生骨には電気泳動においてオス由来を示す SRY gene のバンドを認めた。Group 1 では SRY gene のバンドは認められなかった。このことから、Group 3 の新生骨の形成には、移植したオスからの細胞、所謂ドナー細胞に由来する組織が携わっていたことを示しており、少なくとも移植後 4 週の時点では培養骨髄由来間葉系細胞が新生骨の形成に携わっていることが確認された。

これらの結果、再生医療技術により培養骨髄間葉系細胞を自家処理骨に搭載することで、生物活性の失われた自家処理骨に、生物活性を付加することが可能となった。また、移植した培養細胞が、レシピエントにおいて、少なくとも 4 週時点では機能しうることも判明された。本手法での細胞搭載手技は臨床応用を想定して行っており、臨床応用には有用なテクニックと考えられる。

移植期間	Group 1	Group 2	Group 3
2 週	1.21 ± 0.01	0.26 ± 0.06	1.18 ± 0.01
4 週	4.97 ± 0.82	0.14 ± 0.04	4.37 ± 0.19

表 1: ALP activity (uM/30 min/implant)

移植期間	Group 1	Group 2	Group 3
2 週	5.87 ± 1.45	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.04
4 週	21.1 ± 12.2	0.13 ± 0.05	7.00 ± 2.02

表 2: Osteocalcin gene expression (fg/fg GAPDH)

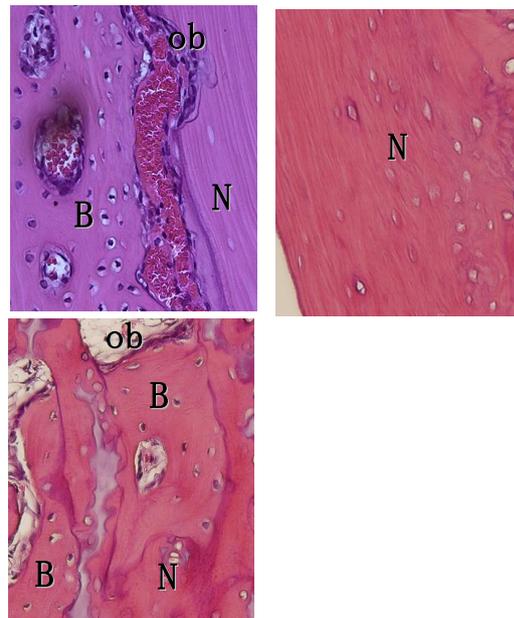


図 1: 移植 4 週後の摘出標本組織像 (左上) Group 1, (右上) Group 2, (左下) Group 3, (B; 新生骨, N; 壊死骨, ob; 骨芽細胞)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 藤間保晶、森下亨、大串始、朴木寛弥、高倉義典、培養骨髄間葉系細胞搭載放射線処理骨の基礎的研究、別冊整形外科 47:12-16、2005、査読無
- ② 藤間保晶、田所美香、大串始、森下亨、田中康仁、高倉義典、殺細胞処理骨に搭載した培養骨髄間葉系細胞の骨形成能の経時間的変化、日整会誌 80(8)954、2006、査読有

- ③ Tohma Y, Ohgushi H, Morishita T, Dohi Y, Tadokoro M, Tanaka Y, Takakura Y, Bone marrow-derived mesenchymal cells can rescue osteogenic capacity of devitalized autologous bone, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2(1): 61-68, 2008, 査読有
- ④ 藤間保晶、大串始、土肥祥子、田所美香、赤羽学、森下亨、田中康仁、高倉義典、再生医療技術を応用した骨移植（再生自家骨・同種骨）に関する基礎的研究、移植 44:143, 2008、査読無

[学会発表] (計 7 件)

- ① 藤間保晶、森下亨、大串始、土肥祥子、田中康仁、朴木寛弥、三井宣夫、高倉義典、培養骨髄間葉系細胞搭載放射線処理骨の基礎的研究、第 43 回日本癌治療学会総会、第 1 回癌治療への再生医療応用研究会、2005 年 10 月 25-27 日、名古屋市
- ② 藤間保晶、田所美香、大串始、森下亨、土肥祥子、田中康仁、朴木寛弥、高倉義典、殺細胞処理骨に搭載した培養骨髄間葉系細胞の骨形成能の経時間的变化、第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会、2006 年 10 月 19-20 日、長崎市
- ③ 藤間保晶、大串始、田中康仁、森下亨、土肥祥子、高倉義典、培養骨髄間葉系細胞搭載殺細胞処理骨の基礎的研究、第 13 回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス、2006 年 12 月 16 日、京都市
- ④ 藤間保晶、田中康仁、森下亨、高倉義典、培養骨髄由来間葉系細胞を搭載させた再生自家骨の基礎的研究、第 109 回中部日本整形災害外科学会、2007 年 10 月 4-5 日、奈良市
- ⑤ Tohma Y, Ohgushi H, Morishita T, Dohi Y, Tadokoro M, Tanaka Y, Takakura Y, Marrow Mesenchymal Cells Can Rescue Osteogenic Capacity of Devitalized Recycling Bone, 6th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2007 年 10 月 20-24 日, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑥ 藤間保晶、大串始、田中康仁、森下亨、土肥祥子、高倉義典、培養骨髄間葉系細胞を搭載させた再生骨の基礎的研究、第 14 回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス、2007 年 12 月 22 日、京都市
- ⑦ 藤間保晶、大串始、土肥祥子、田所美香、赤羽学、森下亨、田中康仁、高倉義典、再生医療技術を応用した骨移植（再生自家骨・同種骨）に関する基礎的研究、第 27 回日本運動器移植・再生医学研究会、2008 年 9 月 27 日岐阜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中康仁 (TANAKA YASUHIITO)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：30316070

(2) 研究分担者

大串始 (OHGUSHI HAJIME)
産業技術総合研究所・研究グループ長
研究者番号：80213669