

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390418

研究課題名（和文） 骨髄間葉系幹細胞を利用した巨大骨組織再生のための基礎技術の確立

研究課題名（英文） Development of bone regeneration methods for large bone defect using bone marrow derived mesenchymal stem cells.

研究代表者

四宮 謙一（SHINOMIYA KENICHI）

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20111594

研究成果の概要（和文）：

骨髄間葉系幹細胞(MSC)は、増殖させると分化能、骨形成能が低下してしまうだけでなく、分化能、骨形成能を抑制することを確認している。本研究では増殖とともに発現が亢進する、骨芽細胞分化、骨形成抑制因子の探求を行い、その候補をレセプターチロシンキナーゼであるEPHA5に絞ることができた。今後は、EPHA5が抑制因子であることの確認作業を進めていく。

サル骨欠損モデル（大腿骨、5cm長）を用い、MSCを使用した大型骨再生に成功した。この再生骨は、組織学的に骨が再生されたのではなく生体骨の重要な機能の一つである骨癒合能も有していることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) have pluripotent differentiation capability and are expected to be used for regenerative medicine. However, the differentiation capability decreases with their prolonged proliferation. Moreover, our previous studies showed that the such cells had not only less bone formation capability but also suppressed bone formation. In this study, we focused on EPHA5 as the suppressor candidate from microarray and co-culture study.

We achieved 5 cm long bone regeneration using MSCs in a monkey femur bone defect model. The regenerated bone proved its bone union capability that is one of the impossible characteristics of natural bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨再生、骨髄間葉系幹細胞、分化能、骨形成能、大型骨欠損

1. 研究開始当初の背景

(1) 整形外科や口腔外科領域における骨組

織欠損の治療では、患者自身の骨盤や腓骨を採取して移植を行う自家骨移植が広く行わ

れており、人工骨の開発が進んだ現在においてもゴールドスタンダードである。しかし採骨手術自体が健全な部分を損傷する上に、採骨部痛の長期残存や、神経・血管損傷、感染などの合併症の発生頻度が高く（数%~40%近くとの報告）、使用できる骨の量にも限りがあるなどの問題から、自家骨移植に代わる骨再建手技の開発が求められている。

MSC は骨髓穿刺で得られた骨髓液を培養することで容易に獲得できる。骨、軟骨、脂肪などへの多分化能を有しているため、この MSC を応用して骨や軟骨などの組織を再建しようという試みが 10 年以上にわたり世界中で行われてきた。中でも骨芽細胞系への分化能は高く、既に一部では骨組織再生への臨床応用が始められている。国外ではドイツにおいて下顎骨の再建に MSC を使用した報告 (Lancet 2004; 364: 766-70) がなされている。しかし、その経過は順調とは言えず、また多量の骨誘導性増殖因子である OP-1 (BMP-7: Bone Morphogenetic Protein-7) が併用されており、MSC がどの程度骨組織再生に寄与したかは不明である。また移植手術を受けた患者は術後 15 カ月で亡くなられてしまったが、剖検も行われなかったため、その再建骨組織の詳細は不明のままである (Biomaterials 2006; 27: 3163-3167)。また国内においても一部では臨床応用が行われているが、適応は小さな骨欠損に限られており、やはり MSC の骨再生に対する寄与度は不明である。

そもそも骨欠損を再生させる手段としては自家骨移植の他に、他家骨移植、人工骨移植などがあり、特に人工骨においては開発が進むにつれ性能が向上し近年急激にシェアを伸ばしている。また、我々は実際の臨床において、培養を行っていない新鮮骨髓穿刺液を人工骨に導入し自家骨の代わりに移植材として使用し、骨欠損の再生や脊椎固定手術に成功しており、培養などの複雑で高コストな手法を用いなくとも人工骨の性能を向上させ、ある程度の大きさの骨組織を再建できることを確認している。また、人工骨に骨形成能を付加する薬剤として強力な骨誘導能を有する Bone Morphogenetic Proteins(BMP) がある。米国ではすでに臨床応用されており、国内に導入される日も近く、比較的大きな骨欠損が細胞培養など行わなくても実現できるようになると考えられる。

これらの現状を踏まえると、培養 MSC を使用した骨再生は複雑な手技、高コストを要することから、本当に培養 MSC が必要となるのは巨大な骨組織の再生である。(BMP を使用する場合でも骨組織を作り出すためには細胞が必要であり、BMP とそのキャリアーの組み合わせだけでは巨大な骨組織を再生することは困難であると考えられる。) しか

し、巨大な骨組織を再生するためには十分な骨形成能を有した MSC が大量に必要となる。また、我々は過去の検討において、継代培養を繰り返した MSC は骨形成能が低下するだけでなく、骨形成を抑制する働きを有していることを確認している(データ未公表、後述)。従って、移植に用いる MSC からは、そのような骨形成を抑制する働きのある MSC を排除する必要があると考えられる。現在のところ、MSC の骨形成能 (in vitro での分化能ではなく) を移植前に評価できる指標は明らかではなく、また、MSC による骨形成抑制のメカニズムも明らかではない。そのため骨再生に最適な MSC を得るための培養法の開発も進展していないのが現状である。

(2) 骨には体の支持や造血器官としての働きのほかミネラルや増殖因子の貯蔵庫としての働きがある。また、自己治癒能力を有しており、骨折しても比較的容易に再び骨癒合させることができる。MSC を使用した骨再生で大型の骨組織を再建した例はほとんどなく、再建された骨組織の評価も行われていないため大型骨組織再建において初めて直面するであろう課題は明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 骨形成能の指標を明らかにするとともに、MSC による骨形成抑制のメカニズムを明らかにし、巨大骨組織再生に適した MSC の培養法の開発につなげることである。

(2) 大型骨再生モデルを使用して再生骨組織の評価、解析を行い、大型の再生骨組織における問題点、課題などを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 巨大骨再生に使用する MSC を選択・評価する手法の開発

[骨形成能の指標および骨形成を抑制する因子の候補の探索]

骨形成能を規定する因子、または骨形成を抑制する因子を探索するために、マイクロアレイやリアルタイム PCR、フローサイトメトリーなどの手技を用いて骨分化能の高い MSC と低い MSC の比較し、遺伝子発現の違いや表面抗原の違いをヒト MSC を用いて探索する。比較する MSC は以下を想定している。

①継代数の影響

MSC の分化能、骨形成能を低下させる因子として培養期間があげられる。この原因としては分裂回数の増加に伴う個々の細胞の分化能、骨形成能の低下によるメカニズムや、個々の細胞のダブリングタイムや寿命の違いによる heterogenous な MSC のポピュレーションの変化 (分化能の低い細胞が相対的に増加する) などが考えられる。いずれにして

も多量の MSC を要する場合、増殖に伴う分化能低下は重大な問題である。そこで、継代数の低い（分裂回数の少ない）MSC と継代を重ね分化能の低下した MSC の比較を行う。前述の予備実験のデータを考慮すると、特に継代とともに発現が増加する遺伝子や表面抗原が確認されれば、それらが前述の骨形成抑制因子の候補となる。

②薬剤の影響

我々の過去の検討から、MSC の培養開始当初からデキサメサゾンを経続的に添加し続けて培養することで多分化能の高い MSC が得られることが分かっている。（in vivo での骨形成量は約 2 倍になる）そこで、デキサメサゾンを経続的に添加して得られた MSC と添加せずに培養して得られた MSC の比較を行う。これらの結果を比較、解析することで、骨形成能の指標、および骨形成抑制因子の候補を絞ることができると考えられる。

[共培養系を用いた継代 MSC の骨分化抑制効果についての検討]

継代を重ねた MSC が骨分化を抑制する効果を及ぼす経路として可溶性因子による経路と、細胞間接触によるものが考えられる。そこで非接触系と接触系にて継代数の少ない MSC と継代数の多い MSC の共培養を行い、継代数の少ない MSC の骨芽細胞系の分化能を解析する。この結果、接触系で分化抑制効果が大きければ細胞表面に発現する因子が骨形成抑制因子の候補となり、非接触系でも抑制効果が確認されれば可溶性因子が候補となる。上記実験と本実験の結果により、骨形成抑制因子のさらなる絞り込みが得

(2) 大型再生骨組織の評価

これまでに我々は組織工学的手法を用いてサル大腿骨において 5cm という比較的大きな骨欠損の再建に成功している。ここでは、この技術を使用して、大型の骨欠損の作成と再建し評価を行う。

サルの大腿骨に 5cm の骨欠損を作成し、足場材である β TCP のみを移植する。移植した材料が吸収されてしまうか、骨の再生が確認された時点で組織の摘出を行い、MSC を移植しなかった場合の骨再生の評価を行う。摘出した部位には、培養 MSC を導入したインプラントを移植し経時的にレントゲン評価を行う。骨再生が確認された時点で、再生骨の中央部の骨組織を摘出し組織学的評価を行うとともに、摘出した部分を短縮させ、再固定することで、再生骨の骨癒合能評価を行う。

4. 研究成果

(1) 巨大骨再生に使用する MSC を選択・評価する手法の開発

骨髄液を穿刺し、MSC の培養を行った。継代培養を行うことで第 5 継代までの MSC を得

て、第 1 継代と第 5 継代の MSC の分化能の比較を定量的 PCR、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、石灰化の評価を用いて行った。21 検体について検討を行ったが、当初の予想通り、第 1 継代では分化能が高く、第 5 継代で極端に分化能が低下する検体や、第 1 継代、第 5 継代とも比較的分化能が維持されている検体、第 1 継代、第 5 継代とも分化能が低い検体などがあることが確認されたが、第 5 継代で分化能が向上する検体は認めなかった。この結果、通常の培養法では、ほとんどの MSC は継代用とともに分化能が低下することが確認された。

継代培養後によって MSC の遺伝子発現の変化を検討することは、培養法を改良するうえで重要である。そこで、上記検体のうち 14 検体について、第 1 継代と第 5 継代の MSC の遺伝子発現に関して、マイクロアレイで比較を行った。その結果、ほぼ全検体で共通して継代とともに増加する遺伝子と低下する遺伝子を確認できた。

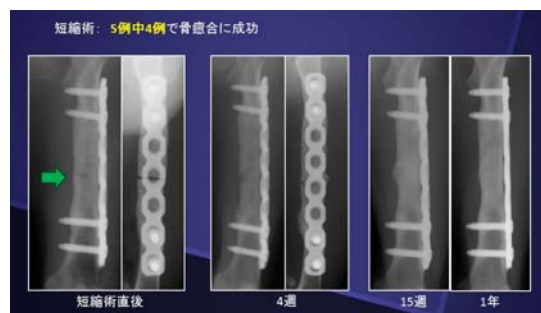
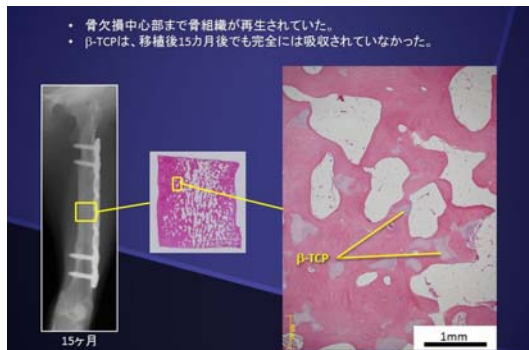
また、継代数の少ない MSC と継代数の多い MSC の共培養では、非接触系では継代数の少ない MSC の分化能に影響はないが、接触系では分化能が低下していることが確認され、分化抑制因子が膜タンパク質であることが確認された。

これらの結果をもとに、分化抑制因子、骨形成抑制因子の候補としてレセプターチロシンキナーゼのひとつである EPH receptor A5 (EPHA5) に注目し検討を進めた。その結果、EPHA のサブタイプのうち EPHA2 と 4 は MSC において恒常的に発現しており、継代を重ねても発現に大きな変化を認めないのに対し、EPHA5 は培養初期ではほとんど発現していないが、継代を重ねるとともに数十倍にまで発現が亢進していることが確認された。また、複数種類の siRNA により EPHA5 をノックダウンすると短期的にはアルカリフォスファターゼの発現が亢進することが確認された。また、骨芽細胞分化を促進するデキサメサゾンの添加により EPHA5 の発現が抑制されることも確認された。今後は shRNA などを用いて、より長期間、EPHA5 をノックダウンしたり、逆に遺伝子導入を行い EPHA5 を過剰発現させるなどして、EPHA5 が分化抑制因子としての確認を進める必要がある。

(2) 大型再生骨組織の評価

カニクイザル大腿骨の 5cm の巨大骨欠損モデルを作成し、MSC を使用して 5cm の骨再生を試みた。再生に使用した MSC は通常の培養法とは異なり、デキサメサゾンで初期培養時より継続的に添加して培養し、自己血漿に浮遊させて、低圧下導入法を用いて多孔質 β TCP に導入し移植材料とした。9 例実施した結果、7 例中 5 例で骨再生に成功した。また、再生

した骨は、組織学的に骨組織であることが確認され、また再生骨の短縮術（14mm）を実施した結果、5例中4例で骨癒合に成功し、生体骨が本来持ち合わせている自己治癒（癒合）能力を再生骨も持ち合わせていることを確認した。



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9件)

- ① Yamada T, Yoshii T, Sotome S, Yuasa M, Kato T, Arai Y, Kawabata S, Tomizawa S, Sakaki K, Hirai T, Shinomiya K, Okawa A. Hybrid Grafting using Bone Marrow Aspirate combined with Porous beta-Tricalcium Phosphate and Trepine Bone for Lumbar Posterolateral Spinal Fusion: A

Prospective, Comparative Study -Versus Local Bone Grafting. *Spine* (査読あり) in press.

- ② Sugata Y, Sotome S, Yuasa M, Hirano M, Shinomiya K, Okawa A. Effects of the systemic administration of alendronate on bone formation in a porous hydroxyapatite/collagen composite and resorption by osteoclasts in a bone defect model in rabbits. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* (査読あり) 93(4), 510-516, 2011
- ③ 早乙女進一、生駒俊之「最新用語解説 基礎(第35回) ハイドロキシアパタイト」骨粗鬆症治療 (査読なし) 10(2), 53-55, 2010
- ④ Maehara H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Kawasaki Y, Sugata Y, Yuasa M, Hirano M, Mochizuki N, Kikuchi M, Shinomiya K, Okawa A. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *Journal of Orthopaedic Research* (査読あり) 28(5), 677-686, 2010
- ⑤ 早乙女進一、四宮謙一、大川淳【すべての医師のための骨粗鬆症診療ガイド2010】「骨のバイオマテリアル 人工骨」総合臨床 (査読なし) 59(4), 544-547, 2010
- ⑥ 大串始、服部耕治、牛田多加志、星和人、関矢一郎、早乙女進一、脇谷滋之、名井陽、安達伸生、加藤幸夫、河口浩之、黒田良祐、木下靱彦、梅澤明弘、田中康仁、山田陽一、袴塚康治、山我美佳、菅原桂、中島武彦「臨床研究の活性化と再生医療産業化の促進 骨・関節領域(整形外科、歯科・口腔外科)の実施者からの提言」再生医療 (査読なし) 9(3), 393-400, 2010
- ⑦ Yoshii T, Sotome S, Torigoe I, Maehara H, Sugata Y, Yamada T, Shinomiya K, Okawa A. Isolation of osteogenic progenitor cells from trabecular bone for bone tissue engineering. *Tissue Engineering Part A* (査読あり) 16(3), 933-942, 2010
- ⑧ Kawasaki Y, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Maehara H, Sugata Y, Hirano M, Mochizuki N, Shinomiya K, Okawa A. Effects of gamma-ray irradiation on

mechanical properties, osteoconductivity, and absorption of porous hydroxyapatite/collagen. *Journal of Biomedical and Materials Research B Applied Biomaterials* (査読あり) 92(1), 161-167, 2010

- ⑨ Torigoe I, Sotome S, Tsuchiya A, Yoshii T, Maehara H, Sugata Y, Ichinose S, Shinomiya K, Okawa A.. Bone regeneration with autologous plasma, bone marrow stromal cells, and porous beta-tricalcium phosphate in nonhuman primates. *Tissue Engineering Part A* (査読あり) 15(7), 1489-1499, 2009

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 早乙女進一、阿江啓介、若林良明、四宮謙一、平野昌弘、石突正文、森岡秀夫; 松本誠一、中村孝志、阿部哲士、別府保男「骨移植治療の歴史と進歩 多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体 (HAp/Col) の開発と臨床応用」第 84 回日本整形外科学会学術集会, 2011 年 5/12-15, 東京
- ② 早乙女進一、湯浅将人、山田剛史、正岡智和、吉井俊貴、四宮謙一、大川淳「骨髄間葉系細胞を用いた骨再生法の大型骨欠損再生に対する有効性 ーサル大腿骨大欠損モデルを用いた検討」第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011 年 10/20-21, 群馬
- ③ 正岡智和、湯浅将人、山田剛史、大川淳、森田定雄、早乙女進一「 β -TCP/bone marrow hybrid の骨形成能に対する dexamethasone の効果」第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011 年 10/20-21, 群馬
- ④ 湯浅将人、早乙女進一、吉井俊貴、富沢将司、加藤剛、川端茂徳、四宮謙一、大川淳「BMP とデキサメサゾン併用による骨形成能に関する検討」第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010 年 10/14-15, 京都
- ⑤ 小柳広高、阿江啓介、早乙女進一、前原秀二、菅田祐美、湯浅将人、山田剛史、正岡智和、船内雄生、四宮謙一、大川淳「温熱処理骨と骨髄由来間質細胞導入 β -TCP を用いた大型犬の骨欠損モデルにおける再生能」第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010 年 10/14-15, 京都

- ⑥ 早乙女進一、土谷明男、前原秀二、菅田祐美、阿江啓介、若林良明、四宮謙一、上坂優子、高山知士、望月直美、塩谷慎吾、平野昌弘、石突雅文、森岡秀雄、松本誠一、中村孝志、阿部哲、別府保男「多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体 (HAp/Col) の開発と臨床応用」第 27 回日本骨代謝学会, 2009 年 7/23-25, 大阪

- ⑦ 菅田祐美、早乙女進一、前原秀二、川崎雄一、湯浅将人、望月直美、平野昌弘、四宮謙一、大川淳「ビスフォスフォネートが生体吸収性骨補填剤に吸収と骨形成に与える影響 (第 2 報)」第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009 年 11/5-6, 横浜

- ⑧ 小柳広高、阿江啓介、早乙女進一、前原秀二、菅田祐美、湯浅将人、正岡智和、山田剛史、船内雄生、四宮謙一、大川淳「温熱処理骨と骨髄由来間質細胞導入 β -TCP を用いた大型犬の骨欠損モデルにおける骨再生」第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009 年 11/5-6, 横浜

- ⑨ 前原秀二、早乙女進一、菅田祐美、湯浅将人、正岡智和、山田剛史、平野昌弘、望月直美、四宮謙一、大川淳「多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体 (HAp/Col) の osteogenic protein-1 (OP-1) 担体としての有用性に関する検討」第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009 年 11/5-6, 横浜

- ⑩ 早乙女進一、川崎雄一、吉井俊貴、鳥越一郎、前原秀二、菅田祐美、望月直美、平野昌弘、四宮謙一、大川淳「 γ 線滅菌による多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体 (HAp/Col) の機械的強度、吸収性、および骨形成能への影響」第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009 年 11/5-6, 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

四宮 謙一 (SHINOMIYA KENICHI)
東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：20111594

(2) 研究分担者

早乙女 進一 (SOTOME SHINICHI)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・
寄付講座教員
研究者番号：20401391

榎本 光裕 (ENOMOTO MITSUHIRO)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・
寄付講座教員
研究者番号：20451971

(3) 連携研究者

阿江 啓介 (AE KEISUKE)
東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：20376726