

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 3 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390419

研究課題名（和文）バイオリアクターを用いた骨形成促進治療の研究—臨床使用可能な器材の開発—

研究課題名（英文）The Research of the bioreactor that can promote the cell differentiation from bone marrow stem cells to osteogenic cells

研究代表者

石黒 直樹 (ISHIGURO NAOKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20212871

研究成果の概要（和文）： ATDC5 細胞あるいは骨髄間葉系細胞では、軟骨細胞、骨芽細胞に分化・増殖する過程での機械的刺激の付加条件により、軟骨細胞分化指標である SOX9mRNA 発現量、骨芽細胞分化指標である RUNX 2mRNA 発現量は共に変化することが確認された。過度な機械的刺激を加えると基質合成能が低下すると共に軟骨細胞分化から骨芽細胞への分化が遅延した。分化能遅延は運動負荷の軽減により回復した。基質産生能と細胞分化は平行しなかった。血管内皮細胞分化の検討は低酸素状態での静置培養系を確立する検討を進めたが、単なる低酸素状態と機械的刺激では達成が困難であった。

研究成果の概要（英文）： We used ATDC5 cell and bone marrow stem cells (BMC) in the experiments. The expression of SOX9mRNA (chondrogenic marker) and RUNX2mRNA (osteogenic marker) was respectively demonstrated in the process of cell differentiation with suitable condition. The both mRNA expression were increased with the mechanical stimuli applied in this process of cell differentiation. The strength and cyclic rate were important for this process. The cell differentiation and matrix synthesis was exaggerated when the strong stimuli were applied. We could not obtained the VEGF producing cells from BMC with the hypoxia condition and mechanical stimuli.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

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：SOX9, VEGF, ATDC5, バイオリアクター

1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系細胞の増殖・分化を制御する事

により骨芽細胞様細胞を多量に作り出し、生体に移植して、組織再生（骨形成促進）を可能とする治療は理想とも言うべき治療である。骨欠損や脚延長など骨形成促進が必要な治療を進歩させる事が期待される。脚延長は、組織再生を目指す再生医療の非常によいモデルで、延長により生じる組織不足（骨、筋などの組織）を早く確実に再生させる方法の検討は、広く組織再生医療に応用可能と考えられる。培養骨髄細胞を骨芽細胞に分化、ラット脚延長モデルに使用する方法は細胞治療による骨形成促進効果を証明した（CORR 399:240-246,2002）。安全性を確認後、2002年に倫理委員会の承認を得てヒト脚延長に対する分化誘導骨芽細胞治療を開始し（日本経済新聞他 2003）、従来に比較して治療期間を 2/3 に短縮した（Bone 2004）。骨形成を目的とした骨髄幹細胞治療で臨床研究段階に到達したものは、世界的にも散発的な研究しか無い。臨床研究では、80 肢以上の治療を経験し軟骨無形成症を始めとする四肢短縮症に対しての有用性、安全性を報告している（Bone 35:892-898, 2004、Bone 40:522-528, 2007、JPO 27:629-634, 2007）。この骨芽細胞移植治療法は高度医療として厚生労働省より承認を得るに至った（2011年11月）。移植細胞数・質を安定的に確保することは成績向上に繋がる。成長因子（BMP,TGF β 等）の添加が広く検討されているがヒトに応用するには発癌性などの問題が指摘されている。運動器細胞にとって最適の培養条件を提供しうるバイオリアクターは成長因子に代わり、細胞数増加、形質安定を達成する方法である。生体中では通常の細胞培養と異なり常に動的環境に細胞はさらされている。より生体に近い環境を提供しうるバイオリアクターは各種運動器細胞に対して動

的負荷や酸素分圧の変化を介して細胞代謝・増殖能に変化を起こすことが示されている。この性質を利用してヒトに応用可能な機械を開発する事は細胞移植治療の成績向上に繋がると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目標は細胞生理学の基礎研究で蓄積された知見を元に工学系技術者の支援を得て、臨床応用可能なバイオリアクター機能を持つ医療機械の開発とそれを用いた臨床研究の実施であった。骨髄幹細胞や分化誘導した骨芽細胞を効率よく培養増殖させる機能を持ち、かつ臨床応用可能（GMP 基準を満たし、標準手順書が作成された状態）なバイオリアクター装置の開発と、それを医療機械として使用できるように当院でのCPC 設備（GMP, GLP 対応、ISO13485 取得）を利用して臨床研究を開始することを目的とした。これを達成するために以下の点について期間内検討を加えた。①安定的に増殖分化させて必要十分な量の培養骨芽細胞を獲得する培養の条件確立、②細胞環境としての微細環境条件の設定、③装置の安定性などの課題である。一方「骨髄由来骨芽細胞様細胞移植併用した脚延長術」の臨床研究は本課題でも引き続き継続され、ここで得られた臨床データがバイオリアクター研究開発に生かされる様に計画された。

3. 研究の方法

バイオリアクターの開発：単層培養と三次元培養の条件で細胞に機械的ストレスを加える事ができる装置を新規に作成した（萌芽研究成果 2004、石黒）。適正な機械刺激が運動器の細胞代謝に与える影響は基質合成と細胞増殖それぞれに働く事を示した（J. Biotech 2007）。軟骨細胞のデータを参考に軟骨細胞分化・増殖の最適条件を検討する事を目的に ATDC5 細胞に注目し検討

した。3次元培養下に機械的なストレスを培養細胞に加えることが出来る装置使用して、インスリン添加後の細胞分化と基質合成能の関係を代表的遺伝子の発現量に注目して検討した。機械的ストレスの回数と大きさを種々変化させることによる違いも検討した。このデータを基に装置を改造して、臨床使用目的に耐える材質・装置の安定性などが担保される装置の開発を目指した。ATDC 5細胞を用いて基礎的な検討を行った。軟骨細胞・骨芽細胞分化の指標としてはⅡ型コラーゲン、アグリカン mRNA 発現を検討した。増殖能の評価は細胞数と共に細胞周期に注目し、Cell cycle kinase mRNA 発現を解析した。バイオリアクターが求められる基礎性能について検討した。

血管新生促進による骨形成の検討：臨床研究で延長後の骨形成には血管新生との関連を示唆するデータを得た。ラット脚延長モデルに骨髄細胞由来分化誘導骨芽細胞を移植し更に骨形成を促進する目的で VEGF 遺伝子を導入強制発現させて、血管新生と最終的な骨形成との関連を検討し、促進効果を確認した (ORS 2006)。VEGF 遺伝子導入細胞の移植によりについて血管新生が刺激され、骨形成が促進した。血管内皮前駆細胞を末梢血。各種組織幹細胞から得る技術を用いて、骨形成促進効果を検証した。血管新生の誘導物質として血管内皮細胞の HIF (hypoxia inducible factor)-1,2 発現に注目し、HIF-1,-2 発現量により誘導される VEGF 産生の関係を骨形成に利用する系を確立する。内軟骨性骨化促進作用の認められる HIF-2mRNA の発現と骨軟骨細胞分化との関係に注目して検討を行い。骨形成促進作用を検討した。

適切な scaffold の開発：血管形成の促進研究を最優先に行うが、そのバックアップとしてこのテーマを平行した。ウサギ骨欠損モデル

を用いて新規 scaffold との組み合わせによる治療期間短縮の可能性を検討した。ヒアルロン酸化合物とアミノ酸ゲル状化合物を工学研究者から入手し、産学連携研究を開始する予定であった。ヒアルロン酸構造体、アミノ酸ゲル状化合物は作成カテにより消失までの時間が調節できるので、内皮細胞による VEGF 産生の足場となることが期待される。細胞担体として骨形成促進効果を検討した。

4. 研究成果

バイオリアクターの開発：骨芽細胞・軟骨細胞の静置培養でのデータを参考に骨芽細胞分化・増殖の最適条件を検討する目的で3次元培養ATDC 5細胞での機械的刺激による分化増殖を検討した。各種の機械的刺激を検討したが、機械的刺激が均等に加わる牽引刺激を最終的に選択した。その結果から3次元細胞培養における細胞分化促進のための最適条件を決定した。3次元培養の条件で細胞に機械的ストレスを加える装置の開発では条件を決定出来た。低酸素化を条件に追加することによる軟骨分化促進効果の実験を行ったが、促進効果は確認出来なかった。3次元培養での機械的刺激に反応してATDC5細胞あるいは骨髄間葉系細胞では、軟骨細胞、骨芽細胞に分化・増殖する過程での機械的刺激の大きさ、頻度など条件により、軟骨細胞分化指標であるSOX9mRNA 発現量、骨芽細胞分化指標であるRUNX 2mRNA発現量は共に変化することが確認された。過度な機械的刺激を加えると基質合成能が低下すると共に軟骨細胞分化から骨芽細胞への分化が遅延した。分化能遅延は運動負荷の軽減により回復した。基質産生能と細胞分化は平行しなかった。3次元培養装置ではGMP対応機種を作成するには細胞培地が問題となった。そこでGMP対応装置の開発では臨床使用目的にも対応でき、かつ可能な限り単純な構造と安定性もつ機械を調達する方針で臨み、相応しい機械が

調達できた。基礎実験で本装置の使用条件を設定し、臨床使用に応用予定である。ヒトに対する安全性が確立されている材質での培養が可能である。ヒト骨芽細胞に最適条件を設定し、臨床使用が可能な作動プログラムの決定を行っている。

血管新生促進による骨形成の検討：血管内皮細胞分化の検討は低酸素状態での静置培養系を確立する検討を進めたが、単なる低酸素状態と機械的刺激では達成が困難であった。低酸素条件でさらにズリ応力を加える装置を開発し、細胞源を変更することにより VEGF 産生細胞の効率的分化の可能性を検討している。このズリ応力発生装置は GMP 対応のバイオリアクターとして使用可能な状態である。従来血管内皮細胞をはじめとする VEGF 産生細胞はズリ応力に反応することが知られている。この形質を利用する目的で、今回開発したズリ応力発生装置にて検討を開始したものである。組織幹細胞の採取源を工夫することにより高率に VEGF 産生細胞を得るめどが立った。そこでこの細胞分化システムと前述のズリ応力発生装置を組み合わせる VEGF 産生細胞の GMP レベルでの供給体制が構築できるものと期待している。

適切な scaffold の開発：血管形成の促進研究を最優先に行うが、そのバックアップとしてこのテーマを平行した。ウサギ骨欠損モデルを用いて新規 scaffold との組み合わせによる治療期間短縮の可能性を検討した。ヒアルロン酸化合物とアミノ酸ゲル状化合物を入手し、産学連携研究を開始する予定であった。ヒアルロン酸構造体、アミノ酸ゲル状化合物は作成カテにより消失までの時間が調節できるので、内皮細胞による VEGF 産生の足場となることが期待される。細胞担体としてこれを用いて骨形成促進効果を検討する予定である

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 73 件)

1. Sakai T, Ishiguro N. Cartilage implantation for the bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. Clin Calcium. 22(2):245-9. Japanese. 2012 査読有
2. Kaneko H, Kitoh H, Wasa J, Nishida Y, Ishiguro N. Chondroblastoma of the femoral neck as a cause of hip synovitis. J Pediatr Orthop B. 21(2):179-82. 2012 査読有
3. Kitoh H, Kaneko H, Kondo M, Yamamoto T, Ishiguro N, Nishimura . Spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. Am J Med Genet A. 155A(4):845-9. 2011 査読有
4. Hirano Y, Kojima T, Kanayama Y, Shioura T, Hayashi M, Tsuboi S, Ishiguro N. Anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis patients with a history of deep prosthetic joint infection: a report of four cases. Mod Rheumatol. 21(5):542-7. 2011 査読有
5. Kojima T, Kaneko A, Hirano Y, Ishikawa H, Miyake H, Oguchi T, Takagi H, Yabe Y, Kato T, Ito T, Terabe K, Fukaya N, Kanayama Y, Shioura T, Funahashi K, Hayashi M, Kato D, Matsubara H, Fujibayashi T, Kojima M, Ishiguro N. Study protocol of a multicenter registry of patients with rheumatoid arthritis starting biologic therapy in Japan: Tsurumi Biologics Communication Registry (TBCR) Study. Mod Rheumatol. in press, 2011 査読有
6. Kojima T, Kaneko A, Hirano Y, Ishikawa H, Miyake H, Takagi H, Yabe Y, Kato T, Terabe K, Fukaya N, Tsuchiya H, Shioura T, Funahashi K, Hayashi M, Kato D, Matsubara H, Ishiguro N. Early aggressive intervention with tocilizumab for rheumatoid arthritis increases remission rate defined using a Boolean approach in clinical practice. Mod Rheumatol. in press, 2011 査読有
7. Hirano Y, Kojima T, Kanayama Y, Shioura T, Hayashi M, Kida D, Kaneko A, Eto Y, Ishiguro N. Influences of anti-tumor necrosis factor agents on postoperative recovery in patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 29(5):495-500. 2010 査読有

8. Nakashima Y, Haga N, Kitoh H, Kamizono J, Tozawa K, Katagiri T, Susami T, Fukushi J, Iwamoto Y. Deformity of the great toe in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Orthop Sci.* 15(6):804-9. 2010 査読有
9. Dai J, Kim OH, Cho TJ, Schmidt-Rimpler M, Tonoki H, Takikawa K, Haga N, Miyoshi K, Kitoh H, Yoo WJ, Choi IH, Song HR, Jin DK, Kim HT, Kamasaki H, Bianchi P, Grigelioniene G, Nampoothiri S, Minagawa M, Miyagawa S, Fukao T, Marcelis C, Jansweijer MCE, Hennekam RCM, Bedeschi F, Mustonen A, Jiang Q, Ohashi H, Furuichi T, Unger S, Zabel B, Lausch E, Superti-Furga A, Nishimura N, Ikegawa S. Novel and recurrent TRPV4 mutations and their association with distinct phenotypes within the TRPV4 dysplasia family. *J Med Genet.* 47(10):704-709, 2010 査読有
10. Nishimura G, Dai J, Lausch E, Unger S, Megarbané A, Kitoh H, OH Kim, Cho TJ, Bedeschi F, Benedicenti F, Mendoza-Londono R, Silengo M, Schmidt-Rimpler M, Spranger J, Zabel B, Ikegawa S, Superti-Furga A. Spondylo-epiphyseal dysplasia, Maroteaux type (pseudo-Morquio syndrome type 2) and parastremmatic dysplasia are caused by TRPV4 mutations. *Am J Med Genet.* 152A(6):1443-1449, 2010 査読有
11. Kitoh H, Kaneko H, Ishiguro N. Radiographic analysis of movements of the acetabulum and the femoral head after Salter innominate osteotomy. *J Pediatr Orthop.* 29(8):879-84. 2009 査読有
12. Kojima M, Kojima T, Ishiguro N, Oguchi T, Oba M, Tsuchiya H, Sugiura F, Furukawa TA, Suzuki S, Tokudome S. Psychosocial factors, disease status, and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. *J Psychosom Res.* 67(5):425-31. 2009 査読有
13. Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, Ishiguro N. Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *J Pediatr Orthop.* 29(6):643-9. 2009 査読有
14. Kitoh H, Kawasumi M, Ishiguro N. Predictive factors for unsuccessful treatment of developmental dysplasia of the hip by the Pavlik harness. *J Pediatr Orthop.* 29(6):552-7. 2009 査読有
- [学会発表] (計 118 件)
1. 石黒 直樹, 小嶋 俊久. 生物学的製剤の種類と外科治療のリスク. 第 55 回日本リウマチ学会. 2011.7.17-20. (神戸)
2. 鬼頭浩史, 金子浩史, 馬淵晃好, 三島健一, 石黒直樹. 軟骨無(低)形成症の身体的特徴. 第 26 回東海小児整形外科懇話会 2011.2.19 (名古屋)
3. 鬼頭浩史, 三島健一, 金子浩史, 石黒直樹. 進行性骨化性線維異形成症における早期(骨化発症前)の臨床的、X線学的特徴. 第 84 回日本整形外科学会 2011.5.12-15 (横浜)
4. 鬼頭浩史, 金子浩史, 北小路隆彦, 服部義, 石黒直樹. ペルテス病の治療成績に関連する因子の検討. 第 50 回日本小児股関節研究会 2011.6.24-25 (諏訪)
5. 鬼頭浩史, 金子浩史, 馬淵晃好, 三島健一, 松下雅樹, 石黒直樹, 北小路隆彦, 服部義. 重度大腿骨頭すべり症に対する創外固定法による骨切り術—プレート法との比較—. 第 22 回日本小児整形外科学会 2011.12.8-9 (京都)
6. Hiroshi Kaneko, Hiroshi Kitoh, Ryuichiro Yamamoto, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno. Drug screening for transcriptional activation of SOX9. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2011.1.13-16. Long Beach (USA)
7. 鬼頭浩史, 金子浩史, 石黒直樹. 培養骨髄細胞移植を併用した骨延長術. 第 83 回日本整形外科学会 2010.5.27-30, (東京)
8. 鬼頭浩史, 金子浩史, 石黒直樹. 骨系統疾患に対する培養骨髄細胞移植を併用した骨延長術. 第 83 回日本整形外科学会 2010.5.27-30, (東京)
9. 酒井忠博, 平岩秀樹, 濱田恭, 山本隆一郎, 大間知孝顕, 大野洋平, 中島基成, 石塚真哉, 松川哲也, 石黒直樹. 三角筋拘縮症に合併した反復性肩関節脱臼の 1 例. 第 37 回日本肩関節学会 2010.10.8-9. (仙台)
10. 小嶋 俊久, 石黒 直樹, 萩野 昇, 森 美賀子, 山本 一彦, 宮坂 信之, 山中 寿, 竹内 勤, 當間 重人. 人工関節置換術を施行した関節リウマチ患者の治療状況—全国 10000 例の横断的疫学調査より—. 第 83 回日本整形外科学会 学術総会 2010.5.27-30 (東京)
11. 小嶋 俊久, 石黒 直樹, 萩野 昇, 後藤 美賀子, 山本 一彦, 宮坂 信之, 山中 寿, 竹内 勤, 當間 重人. 本邦におけるエタネルセプトの使用状況—関節リウマチ 10427 例の横断調査より—. 第 54 回日本リウマチ学会総会 学術集会 2010.4.22-25 (神戸)

12. 平野 裕司, 大石 幸由, 小嶋 俊久, 石黒直樹, 金子 敦史. RA に対するアダリムマブの臨床成績-生物学的製剤未投与例と他製剤からの変更例の比較-. 第54回日本リウマチ学会総会 学術集会 2010. 4. 22-25(神戸)
13. 石黒直樹, 小嶋俊久, Poole Robin. 変形性関節症の病態と治療: 治療法の up to date. 第82回日本整形外科学会学術総会 2009. 5. 14-17 (福岡)
14. 鬼頭浩史, 川澄本明, 石黒直樹. 培養骨髄細胞移植による仮骨形成促進効果の移植部位による相違: 大腿骨延長と 骨延長の比較. 第82回日本整形外科学会学術総会 2009. 5. 14-17 (福岡)
15. 北小路隆彦, 服部義, 三島健一, 鬼頭浩史, 石黒直樹. Perthes 病における Salter 手術. 第82回日本整形外科学会学術総会 2009.5.14-17 (福岡)

[図書] (計8件)

1. 石黒直樹, 中村茂, 他. II 疾患編 16 運動器疾患 変形性膝関節症. 今日の診断指針 第6版/医学書院:1526-1527, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 骨形成促進剤及びその用途

発明者: 大野欽司、石黒直樹、

鬼頭浩史、三島健一

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 特許

番号: 特許 2011-185306

出願年月日: 平成 23 年 8 月 26 日

国内外の別: 国内

○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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 直樹 (ISHIGURO NAOKI)

名古屋大学大学院・医学系研究科・教授

研究者番号: 20212871

(2) 研究分担者

鬼頭 浩史 (KITOH HIROSHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 40291174

酒井 忠博 (SAKAI TADAHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号: 60378198

(3) 連携研究者

なし