

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591669

研究課題名(和文)再生医療技術を用いた同種骨移植の再活性化に関する研究

研究課題名(英文) Study for reactivating of devitalized allogenic bone by using tissue-engineering technique

研究代表者

田中 康仁 (TANAKA, YASUHITO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30316070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療技術を用いて移植同種骨の再活性化を目指した。研究にはラットを用いた。ACIラットより移植骨を作製し、細胞活性失活処理として放射線照射を行った。一方Fischer 344 (F344)ラット骨髄を採取、培養により間葉系細胞を獲得した。獲得した細胞を移植骨に含浸させ、F344ラット皮下に移植し、移植2、4週のALP活性及びオステオカルシン(OC)遺伝子発現測定、組織学的検討を行った。結果、経時的に上昇傾向を示すALP活性及びOC遺伝子発現を認め、組織学的に新生骨の形成を認めた。形成された新生骨の由来を分子生物学的に検討したところ、少くとも移植4週時の骨新生にはドナーの培養細胞が関与していた。

研究成果の概要(英文)：Our study aimed to determine whether in vivo osteogenesis could be enhanced using allogenic irradiated bone grafts after seeding with tissue-engineered autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs). We used rat experimental model. The allogenic bone samples were extracted from ACI rat bone and sterilized by irradiation. Donor BMSCs were obtained from Fischer 344 rat bone marrow by cell culture. The allogenic bone with or without BMSCs were transplanted subcutaneously into syngeneic F344 rats. At 2, 4 weeks after transplantation, alkaline phosphatase activity, osteocalcin mRNA expression and histological examination were detected. These biochemical values were gradually increased. New bone was found in histological section. Furthermore, we studied the origin of the new bone. It was derived from cultured donor BMSCs after 4 weeks transplantation at least. These results indicate the availability of autologous tissue-engineered BMSCs to heighten the osteogenic response.

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：同種骨移植 処理骨 間葉系細胞 骨形成 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 整形外科領域における広範囲骨腫瘍や先天性骨欠損疾患等の広範囲骨欠損患者の骨再建方法の一手段として同種骨移植が挙げられる。欧米では同種骨移植、いわゆるアログラフトは一般的治療方法として受け入れられているが、本邦での使用頻度は極めて少数である。その理由として、「他人の骨を自分の体内に用いる」という思想的な抵抗感だけでなく、医学的にも同種移植の免疫反応、移植骨の細胞活性の低下、いわゆる骨形成能の低下に起因する骨強度の脆弱性、骨再生の遷延化、遷延治療にともなう骨圧潰の危険性、社会復帰の遅延、さらには易感染性等の様々な問題点が挙げられる。

(2) 我々の研究班ではこれまでに細胞致死処理を施した自家骨に、再生医療による培養技術で獲得した自家骨髄由来の間葉系細胞を複合化することで、細胞活性の低下した自家処理骨の細胞活性の賦活化に成功しており(細胞致死処理骨に生細胞を搭載した骨補填システム:特許第3951023(2008))、本邦では立ち遅れている同種骨移植法の活性化を求め、この技術を進化させることで、臨床応用を目指した移植同種骨の再活性化を目指すことを考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 同種骨移植における医学上の大きな問題点として、移植同種骨の細胞活性の極度の低下が挙げられる。同種骨に求められる細胞活性としては骨形成能であり、次いで血管形成能や免疫応答能が挙げられる。本研究においては、極度に低下した骨形成能の賦活化を再生医療による細胞培養技術に求め、自家骨髄由来の間葉系細胞を同種骨に複合化させることで、同種骨の骨形成能の賦活化を図る技術の開発を目的とした。

(2) 同種骨移植の移植後の骨形成の促進を鑑みると、移植組織(ドナー)と移植母床(レシピエント)の再生環境における母床から移植組織に形成される栄養血管網の再構築の重要性が考えられる。そこで、本研究ではポリADPリボースポリメラーゼ阻害剤投与による血管再建の報告に着目し、同剤の投与によりレシピエントでのドナーへの栄養血管構築を促進することで、骨形成能の促進手技の開発、薬剤による移植骨の骨形成能の改善を探索することを考えた。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞活性の低下した同種骨への骨形成能の賦活化技術の開発:

動物実験モデルは、「細胞致死処理骨に生細胞を搭載した骨補填システム:特許第3951023」開発時の研究成果を参考に、同種骨移植の臨床応用を想定して、移植する骨組織にはACIラットを使用した。ACIラット大腿骨を採取し、放射線60Gyの一括照射により細胞活性を失活させた。一方、同種骨に搭載する骨髄由来の間葉系細胞にはFischer 344ラットを用いた。Fischer 344ラットの骨髄を採取し、培養により間葉系細胞を増殖・獲得して移植細胞を作成し、細胞活性失活処理を施した同種骨に注入・含浸させた。

比較実験群は培養自家骨髄由来間葉系細胞を搭載させた同種処理骨群、搭載していない培養細胞非搭載処理骨群、失活処理および細胞搭載を共に行っていない未処理の同種骨群の3群とし、骨再生能の評価として既に確立されているラット皮下移植実験モデルの手法に基づいて(Ohgushi H, Caplan AI. J Biomed Mater Res. 1999)、Fischer 344ラットの背部皮下に移植した。その後、移植した試験骨を摘出し、経時間的に移植骨の有するアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、オステオカルシン(OC)遺伝子発現を測定し、骨形成能力を評価した。また、併せて組織学的検討も行った。

(2) 新生骨組織の由来:

移植同種骨に賦活化された骨形成能が培養により得た自家骨髄由来の間葉系細胞に由来するものなのか、或いはレシピエントの組織に由来するものなのか、性染色体遺伝子を用いた手法にて検討した。ドナーとなる搭載する培養細胞の作製には雄のFischer 344ラットを、レシピエントである移植母床には雌のFischer 344ラットを使用し、移植後の形成された新生骨をマイクロレーザーダイセクション法にて取り出し、DNAを抽出、性染色体遺伝子発現を分子生物学的に測定し、形成された新生骨の由来を分子生物学的に解析した(Tohma Y, et al. J Tissue Eng Regen Med. 2008)。

(3) 血管形成促進因子の添加による血管形成および骨形成の検討:

移植骨の骨形成能の促進手法をレシピエントサイドに求めることも考えた。移植骨(ドナー)は移植されると、移植直後は移植骨への血管網が構築されておらず、細胞活性

は一時的極度に低下する。そこで、移植母床での移植骨への栄養血管網を早期に再構築することで、組織再生、骨形成の向上を検討した。血管網の再構築を促進することを目的に血管形成促進因子としてポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤を投与した。本剤は本学生化学講座教授高沢らによる「糖尿病ラットにおける膵臓ランゲルハンス島細胞の再生の研究」において報告され、本剤投与による血管再建の促進について我々の施設より既に報告されており (Kiji T, et al. J Vasc Res. 2003) この報告を参考にレシピエントに同剤を投与して (投与群) 非投与群と比較検討した。検討は移植骨の骨形成能、血管形成能を生化学的 (ALP 活性) 遺伝学的 (ALP, OC および血管内皮増殖因子 (VEGF) 遺伝子発現) 組織学的に解析して行った。

組織学的検討には、免疫組織学的染色法にて血管形成を描出することも考えた。間葉系細胞由来の形成血管壁を描出する抗体を探索することから開始されるが、Anti- VE Cadherin による描出を目指した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞活性の失活した同種骨への骨形成能の賦活化技術の開発:

比較群は培養骨髄由来間葉系細胞を搭載した同種処理骨群 (irradiated bone with BMSCs) 細胞を搭載していない非搭載処理骨群 (irradiated bone) 細胞致死処理及び細胞搭載を行っていない未処理骨群 (fresh bone) の 3 群で、移植 2, 4 週後の ALP 活性及び OC 遺伝子発現測定、組織学的検討を行った。

細胞非搭載処理骨群、未処理骨群では ALP 活性 (図 1) 及び OC 遺伝子発現 (図 2) はともに継続して低値を示していた。また、組織学的にも壊死骨 (図 3; (a) 未処理骨群、(b) 細胞非搭載処理骨群、N は壊死骨の領域を示す) のみであり、新生骨の形成は認められなかった。一方、細胞搭載処理骨群では経時的に上昇傾向を示す ALP 活性および OC 遺伝子発現が確認された。また、組織学的にも新生骨の形成が認められた (図 3; (c) 細胞搭載処理骨群、矢印は形成された新生骨を示す)。

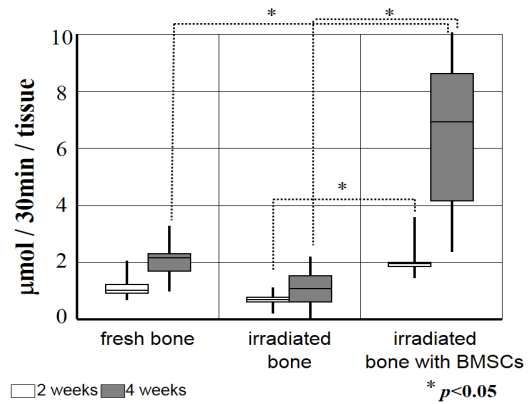


図 1: ALP 活性

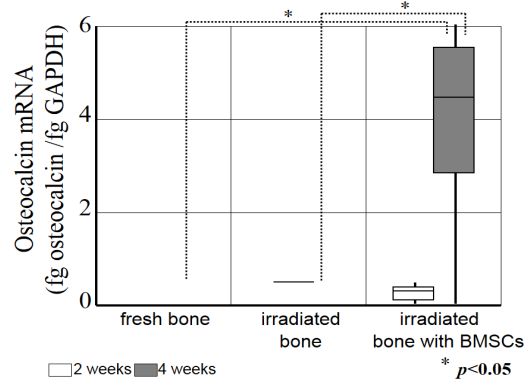


図 2: OC 遺伝子発現

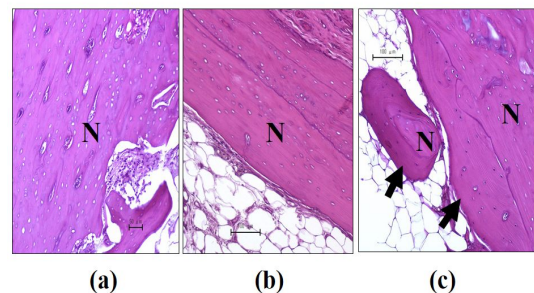


図 3: 組織像 (HE 染色/移植 4 週後)

(2) 新生骨組織の由来:

移植 4 週後の細胞搭載処理骨群には新生骨の形成が明瞭に認められた。その新生骨から DNA を抽出し、性染色体遺伝子 (Sry 遺伝子; 雄のみに発現) の発現をみたところ、新生骨には雄由来を示すバンドが検出された (図 4)。その結果から、少なくとも移植 4 週までの初期の骨形成には培養により獲得したドナーである培養骨髄由来の間葉系細胞が関与していたことが証明された。

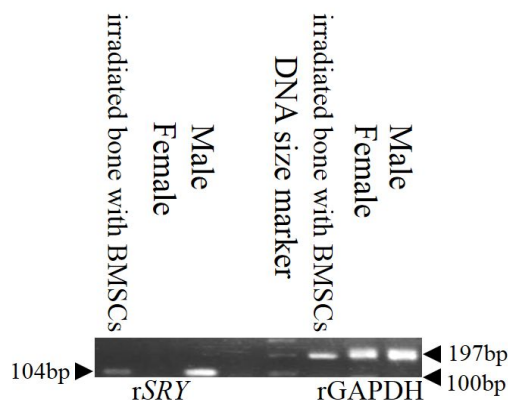


図4 : Sry 遺伝子発現

(3) 血管形成促進因子の添加による血管形成および骨形成の検討:

ポリADPリボースポリメラーゼ阻害剤の投与については、本研究では、まず移植後2週間の連続投与にて行った。同剤を投与して、移植骨の骨形成能、血管形成能を生化学的(ALP活性) 遺伝学的(ALP, OCおよび血管内皮増殖因子(VEGF) 遺伝子発現) 組織学および免疫組織学的に検討した。免疫染色の抗体には血管壁をターゲットとしてAnti-VE Cadherinを用いた。

移植4週後の移植骨のALP活性はポリADPリボースポリメラーゼ阻害剤投与群では非投与群と比べ有意に上昇していた。一方、ALP, OC, VEGF 遺伝子発現は投与群では非投与群と比べ高値傾向を示すも、有意差を示すまでのデータはまだ得られていない。

また、移植部位においては肉眼的にはラット皮下の試験骨片周囲の血管形成は、同剤投与群で旺盛に認められた



(右図)。Anti-VE Cadherinを用いた免疫組織学的染色でも、同剤投与群で著明な血管腔の形成が認められた。

(図1-3は公表論文 Tohma Y, Dohi Y, Ohgushi H, Tadokoro M, Akahanae M, Tanaka Y, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 6(2), 2012, 96-102 より引用)

## 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)

内原好信、赤羽学、森田有亮、中崎真太郎、上羽智之、清水隆昌、倉知彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁、培養骨芽細胞シートによる放射線照射自家処理骨の骨形成、日整会誌

(J.Jpn.Orthop.Assoc.)、査読有、87巻(8)、2013、1571

Tohma Y, Dohi Y, Ohgushi H, Tadokoro M, Akahanae M, Tanaka Y, Osteogenic activity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) seeded on irradiated allogenic bone, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 査読有、6(2)、2012、96-102 doi: 10.1002/term.401. Epub 2011 Feb 15.

藤間保晶、土肥祥子、大串始、谷掛洋平、高澤伸、赤羽学、田中康仁、骨髄由来間葉系細胞搭載人工骨の骨形成能に対するポリADPリボースポリメラーゼ阻害剤の影響、日整会誌

(J.Jpn.Orthop.Assoc.)、査読有、86巻(8)、2012、1347

谷掛洋平、中島弘司、林宏治、加藤宣伸、藤間保晶、大串始、土肥祥子、赤羽学、高澤伸、川手健次、田中康仁、FibronectinをコートしたTCPの骨形成能、日整会誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.)、査読有、86巻(8)、2012、1351

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉知彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁、培養骨芽細胞シートを用いた放射線照射自家処理骨の骨形成、日整会誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.)、査読有、86巻(8)、2012、1344

藤間保晶、土肥祥子、谷掛洋平、高澤伸、赤羽学、大串始、田中康仁、ポリADPリボースポリメラーゼ阻害剤投与による間葉系細胞搭載骨の血管新生・骨形成能の検討、日整会誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.)、査読有、85巻(8)、2011、1314

内原好信、赤羽学、上羽智之、藤間保晶、清水隆昌、倉知彦、川手健次、田中康仁、放射線照射骨に対する培養骨髄細胞シートを用いた骨形成能付与、日整会誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.)、査読有、85巻(8)、2011、1255

谷掛洋平、藤間保晶、土肥祥子、高澤伸、川手健次、田中康仁、TCPに導入した培養骨髄由来細胞の骨形成能の基礎的研究、日整会誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.)、査読有、85巻(8)、2011、1335

培養骨髄間葉系細胞搭載を搭載した移植同種骨での血管形成の検討、藤間保晶、土肥祥子、赤羽学、谷掛洋平、大串始、佐々木隆子、高澤伸、田中康仁、日整会

誌(J.Jpn.Orthop.Assoc.)、査読有、84  
巻(8)、2010、1123

〔学会発表〕(計14件)

藤間保晶、運動器再建をめざした私の幹細胞研究、第5回奈良医療センター医学会、2013年3月1日、奈良市

内原好信、赤羽学、森田有亮、中崎真太郎、上羽智之、清水隆昌、倉知彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁、培養骨芽細胞シートによる放射線照射自家処理骨の骨形成、第28回日本整形外科学会基礎学術集会、2013年10月17-18日、千葉市

藤間保晶、土肥祥子、大串始、谷掛洋平、高澤伸、赤羽学、田中康仁、骨髄由来間葉系細胞搭載人工骨の骨形成能に対するポリADPリボースポリメラーゼ阻害剤の影響、第27回日本整形外科学会基礎学術集会、2012年10月26-27日、名古屋市

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉知彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁、培養骨芽細胞シートを用いた放射線照射自家処理骨の骨形成、第27回日本整形外科学会基礎学術集会、2012年10月26-27日、名古屋市

谷掛洋平、中島弘司、林宏治、加藤宣伸、藤間保晶、大串始、土肥祥子、赤羽学、高澤伸、川手健次、田中康仁、FibronectinをコートしたTCPの骨形成能、第27回日本整形外科学会基礎学術集会、2012年10月26-27日、名古屋市

藤間保晶、大串始、土肥祥子、谷掛洋平、岩田栄一郎、高澤伸、赤羽学、田中康仁、再生医療技術による組織構築～薬剤を用いた骨移植法の基礎的研究～、第19回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス、2012年12月22日、橿原市

谷掛洋平、藤間保晶、土肥祥子、大串始、赤羽学、岩田栄一郎、川手健次、田中康仁、TCPへの効率的細胞搭載方法の検討、第19回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス、2012年12月22日、橿原市

藤間保晶、土肥祥子、谷掛洋平、高澤伸、赤羽学、大串始、田中康仁、ポリADPリボースポリメラーゼ阻害剤投与による間葉系細胞搭載骨の血管新生・骨形成能の検討、第26回日本整形外科学会基礎学術集会、2011年10月20-21日、前橋市

内原好信、赤羽学、上羽智之、藤間保晶、清水隆昌、倉知彦、川手健次、田中康仁、放射線照射骨に対する培養骨髄細胞シートを用いた骨形成能付与、第26回日本整形外科学会基礎学術集会、2011年10月20-21日、前橋市

谷掛洋平、藤間保晶、土肥祥子、高澤伸、川手健次、田中康仁、TCPに導入した培養骨髄由来細胞の骨形成能の基礎的研究、第26回日本整形外科学会基礎学術集会、2011年10月20-21日、前橋市

谷掛洋平、藤間保晶、土肥祥子、赤羽学、大串始、高澤伸、川手健二、田中康仁、細胞接着技術の導入によるTCPの骨化促進、第18回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス、2011年12月17日、京都市

藤間保晶、土肥祥子、赤羽学、谷掛洋平、大串始、佐々木隆子、高澤伸、田中康仁、培養骨髄間葉系幹細胞を搭載した移植同種骨での血管形成の検討、第25回日本整形外科学会基礎学術集会、2010年10月14-15日、京都市

藤間保晶、土肥祥子、谷掛洋平、大串始、赤羽学、清水隆昌、上羽智之、高澤伸、田中康仁、骨髄由来間葉系細胞を搭載した骨移植における骨・血管形成能の検討、第17回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス、2010年12月18日、京都市

谷掛洋平、藤間保晶、土肥祥子、大串始、赤羽学、高澤伸、田中康仁、TCPに導入した骨髄由来間葉系細胞の骨形成能の基礎的研究、第17回横浜・京都・奈良バイオメカニクスカンファレンス、2010年12月18日、京都市

〔図書〕(計1件)

藤間保晶、大串始、田中康仁 他(分担執筆)、科学情報協会、再生医療における臨床研究と製品開発、2013、109-115

〔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：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 康仁 (TANAKA, Yasuhiro)

奈良県立医科大学・整形外科・教授  
研究者番号：

(2)研究分担者

藤間 保晶 (TOHMA, Yasuaki)  
奈良県立医科大学・整形外科・研究生  
研究者番号：

赤羽 学 (AKAHANE, Manabu)  
奈良県立医科大学・健康政策・准教授  
研究者番号：