5. 幹細胞による骨組織の再生治療技術

—第52回日本透析医学会 学会・学術企画より—

廣瀬 志弘

産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門

はじめに

組織工学的技術により、細胞と生体材料とを組み合わせ、高機能な再生臓器・再生組織を創成する試みが世界規模で展開されている。細胞を用いて作製される再生組織は、再生医療の現場で用いられつつあり、その安全性の確保のみならず目的とする再生組織の安定的な供給が求められている。われわれは、2001年4月に設立された産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター（2004年4月より、セルエンジニアリング研究部門）において、間葉系幹細胞とセラミックスを中心とした生体材料を利用し、硬組織の再生に関する基礎研究と臨床応用研究を精力的に推進している。

本稿では、自己間葉系幹細胞を用いた再生培養骨組織の作製プロセスとその再生医療への早期実用化に向けた取り組みを解説する。

I. 再生培養骨組織の作製技術

従来より、人工関節材料としては生体親和性に優れたチタンやアルミナセラミックスなどが用いられてきている。しかし、それ自身には骨形成能がないために移植された部位での骨再生が生じず、移植された人工関節に「緩み」が生じることがある。この問題を解決するため、われわれは、間葉系幹細胞を利用することにより、種々の生体材料に生物機能を付与する独自の技術を開発してきた¹⁾。われわれは、間葉系幹細胞を生体外で増殖させ、さらに骨芽細胞へと分化させる技術を用いて、セラミックス表面をはじめとした種々の生体材料の表面上に骨芽細胞と骨芽細胞により形成される骨基質で被覆する技術を確立してきた²⁻⁶⁾。また、この生体外で構築された再生培養骨組織は、生体内へ

の移植によって新生骨組織を誘導することも確認している^{1,7,8)}。

われわれは、インフォームドコンセントのもとに患者腸骨より採取された骨髄（約10 mL）をBCRに搬入する。搬入された骨髄をプラスチック製培養皿上に播種し、主に患者自己血清を含む液体培地を用いて約2週間の一次培養を行う。この培養期間中に、骨髄中の血球細胞は除去され、数日後には間葉系幹細胞のコロニーが顕微鏡下で観察できるようになり、約2週間の培養でコンフルエントとなる。増殖した間葉系幹細胞を培養皿から剥離した後、人工関節表面に播種し、二次培養を行う。間葉系幹細胞を分化誘導すると、骨芽細胞に分化し、骨特異的アルカリホスファターゼ（ALP）、続いてオステオネクチン、オステオポンチン、オステオカルシンなどの遺伝子発現とタンパク量産生が促進される。われわれは間葉系幹細胞を骨分化誘導する際に、アスコルビン酸、デキサメタゾンならびに β -グリセロリン酸を加えている。これらを培地中に添加すると、約2週間で細胞外に骨基質の沈着がみられるようになり（図1）、人工関節表面は骨芽細胞と骨芽細胞が産生する骨基質に覆われることになる。このようにして作製された自己間葉系幹細胞由来の再生培養骨組織を保持する人工関節は病院に搬送された後、手術に用いられている（図2）。

II. 再生培養骨組織の機能性評価技術

われわれは、培養細胞による骨形成の程度を知るための新規測定系を開発し、種々生体材料上での骨形成をモニタリングしている。すなわち、カルシウム親和性の蛍光色素であるカルセイン（1 μ g/mL）を培養系に添加して、骨基質特異的に取り込まれたカルセインの蛍光強度を共焦点レーザー方式の蛍光イメージアナライザーで測定する手法である⁹⁻¹¹⁾。本手法は、骨基

図 1 患者骨髓に由来する間葉系幹細胞
骨分化誘導後、14 日目の患者骨髓由来間葉系幹細胞の位相差顕微鏡像。
矢印は、間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞により形成された骨基質を示す。

図 2 再生培養骨組織の移植後の X 線像
再生培養骨組織は医療機関に提供され、移植に用いられる。(a) は、アルミナセラミックス製の人工足関節を細胞の足場に用いた再生培養骨組織を示す。骨分化した間葉系幹細胞が染色されている。

質からカルシウムを抽出するなどの前処理を全く必要としないため、簡易かつ迅速な骨形成能の測定が可能であり、骨形成能測定後も継続培養が可能のため、同一細胞群による骨形成能を経時的に追跡することも可能である。また、異なるサンプル間における骨形成の程度の相違を定量評価できる大きな利点を有している。このことは、患者へのタイミングのよい再生培養骨組織の提供が可能になることを意味しており、移植用再生培養骨組織の機能を評価するための標準技術に

なりうると考えている。

おわりに

患者自己骨髓に由来する間葉系幹細胞を用いた「再生培養骨組織」は、変形性関節症、慢性関節リウマチなどの患者に臨床応用されてきている。また、この再生培養骨組織はハイドロキシアパタイトや β -トリカルシウムホスフェートのような人工骨にも形成可能で

あるため、良性骨腫瘍患者にも応用されている。2007年8月末現在までに大学病院と共同で約70例の移植治療を実施している。今後さらに細胞機能のデータと移植後の患者の検査結果のデータを蓄積するとともに、これまでに蓄積されたデータの系統的な解析を進め、再生組織の実用化に直結する再生治療技術の構築を進めていきたい。

謝辞：本研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO 技術開発機構）「再生医療の早期実用化を目指した再生評価技術開発」の助成のもとに行われた。

文献

- 1) Ohgushi H, Caplan AI : Stem cell technology and bioceramics : From cell to gene engineering. J Biomed Mater Res 48 : 913-927, 1999
- 2) Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI : Heterotopic osteogenesis in porous ceramic induced by marrow cells. J Orthop Res 7 : 568-578, 1989
- 3) Ohgushi H, Dohi Y, Katsuda T, Tamai S, Tabata S, Suwa Y : In vitro bone formation by rat marrow cell culture. J Biomed Mater Res 32 : 333-340, 1996
- 4) Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T, Tamai S, Tabata S, Okunaga K, Shibuya T : Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. J Biomed Mater Res 32 : 341-348, 1996
- 5) Ohgushi H, Yoshikawa T, Nakajima H, Tamai S, Dohi Y, Okunaga K : Al₂O₃ doped apatite-wollastonite containing glass ceramic provokes osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells. J Biomed Mater Res 44 : 381-388, 1999
- 6) Ohgushi H, Okumura M : Osteogenic ability of rat and human marrow cells in porous ceramics. Acta Orthop Scand 61 : 431-434, 1990
- 7) Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T : Mesenchymal stem cells and bioceramics : Strategies to regenerate the skeleton. Novartis Found Symp 249 : 118-127, 2003
- 8) Yoshikawa T, Ohgushi H, Akahane M, Tamai S, Ichijima K : Analysis of gene expression in osteogenic cultured marrow/hydroxyapatite construct implanted at ectopic sites : A comparison with the osteogenic ability of cancellous bone. J Biomed Mater Res 41 : 568-573, 1998
- 9) Hirose M, Kotobuki N, Machida H, Uchimura E, Ohgushi H : Quantitative monitoring of in vitro mineralization process using fluorescent dyes. Key Eng Mater 240 : 715-718, 2003
- 10) Uchimura E, Machida H, Kotobuki N, Kihara T, Kitamura S, Ikeuchi M, Hirose M, Miyake J, Ohgushi H : In-situ visualization and quantification of mineralization of cultured osteogenetic cells. Calcif Tissue Int 73 : 575-583, 2003
- 11) Kitamura S, Ohgushi H, Hirose M, Funaoka H, Takakura Y, Ito H : Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics. Artif Organs 28 : 72-82, 2004