

Review Article

幹細胞と遺伝子を用いた骨の再生医療

上田 実

名古屋大学大学院医学研究科 頭頸部感覚器外科学講座

Bone regeneration using osteogenic stem cell and sonic hedgehog gene

In this article the general strategy for bone regeneration using osteogenic stem cell and gene modified cells. In the past autogenous bone grafting was the most reliable and well documented technique for bone regeneration. However the patient usually is demanded the heavy burden for harvesting the grafted bone in the donor sites. In this circumstances the tissue engineering concept has been developed and introduced for clinical use.

In this article the general strategy for bone regeneration using tissue engineering concept. We have tried two essential elements such as mesenchymal stem cell and sonic hedgehog gene to generate the bone tissue.

Marrow expanded mesenchymal stem cell with ceramics scaffold have been studied and confirmed its usability for bone engineering especially for cavitary bone defects in the jaw bone. Also the sonic hedgehog gene modified fibroblasts could be useful for the systemic bone disease such as osteoporosis.

Rec.8/13/2003, pp262-268

Minoru Ueda

Nagoya University School of Medicine,

Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Key words tissue engineering, bone regeneration, mesenchymal stem cell, sonic hedgehog gene, osteoporosis

はじめに

骨に悪性の腫瘍があったとしたら、この患者の命を救うには広範囲に骨を切除しなくてはならない。こうした大きな骨欠損は自然治癒することではなく、再生するためには何らかの処置が必要である。また、高齢の女性が骨粗鬆症のため大腿骨頸部骨折を起こしたらなかなか治らないので、そのまま寝たきりになる可能性が高い。骨粗鬆症は、骨量を減少させるばかりではなく、骨折した骨を接合する新しい骨形成能も減少させてしまうからだ。

腫瘍切除後の骨再建と骨粗鬆症の治療、この二つの課題は似ていないように思えるが、根本的には、生体自身が成し得ないことを細胞もしくは細胞とマトリックス材料によって可能にするという共通の治療戦略が見えてくる。つまり通常の状態ではできない再生を、骨欠損部を補填するだけの十分な数の骨幹細胞を増やすことで解決することができるのである。つまり、体外で間葉系幹細胞を増殖させ、体内に戻すことで可能になる。また、2番目のケースのように、加齢に伴う骨量と骨修復能の減少は、自家の骨幹細胞の減少が原因である。こうしたケ

スでは幹細胞の増殖と、その継続的投与で防ぐことができる。もし骨再生能を持つ細胞が足りなければ、骨形成能を持つ遺伝子を導入すればよい。大事なことは、本来自然に起こる骨再生や骨代謝を人工的に導入することで骨再生が可能になるということである。本来自然に起こる骨再生や骨代謝を組織工学技術でうまくコントロールすればよいのである。骨再生や骨代謝をコントロールするということは、ある意味で、胎生期の形態形成を再現するということかもしれない。

本論文では、骨幹細胞と遺伝子導入細胞による骨再生の概要を紹介する。

骨の構造とはたらき

人間が生まれ、成長し、成熟し、老化していくように、骨もまた同じ過程をたどる。骨は生きている臓器であり、二つの大事な機能を持っている。一つは、カルシウムの補給庫としての機能である。カルシウムは筋肉の活動や神経の興奮など、生命の維持に必須のイオンである。したがって、体の中ではカルシウムの血中濃度が絶えず8～10mg/

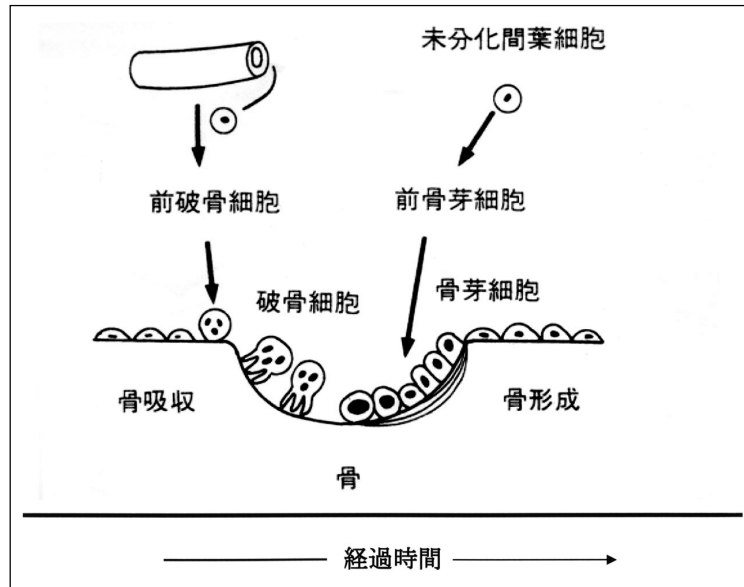


図1 骨のリモデリング

dlと一定に保たれている。血中カルシウムが不足すると、骨からカルシウムが供給され、すぐに補修される。もう一つは、体の支持組織としての機能である。骨格を形成し、骨を支点として筋肉が活動し、運動器官としての動きが可能となる。

こうした骨は多量の無機質を含む硬組織であり、そのほかに有機質と水を含む。水分含量は加齢とともに減少する。乾燥重量の24%は有機質、76%が無機質である。骨の有機質の90%はコラーゲンであり、残りはムコ多糖、非コラーゲン性蛋白、ペプチド、脂質などである。骨の無機質は主にカルシウムと燐酸イオンから成り、両者が結合した結晶として存在する。骨は一生の間、絶えず古い骨質が吸収（骨吸収）されて新しい骨に置換（骨形成）されている。この過程を、骨のリモデリングという。破骨の過程と造骨の過程が相接して起こり、一つの単位として行われている。最初、破骨細胞によって、あたかもトンネルを掘り進むように骨を吸収していき、円錐状の空洞の先端で破骨細胞がはたらいている。しばらくすると、この骨孔内の空洞の先端で破骨細胞がはたらいている。しばらくすると、この骨孔内の空洞の骨表面に骨芽細胞が現れて骨形成が始まり、オステオンを形成する。新しいオステオンが形成されると、古いオステオンは残存し同心円状の構造となる。中心にハバース管を残して造骨細胞も消失する。

このように常に破骨が先に起こり、後に同じ量の骨が形成される（図1）。このように骨は複雑な構造と重要な生命維持機能を担っている複雑な臓器といってよく、骨が欠損したからといって代謝することのない人工材料で補うことは不可能であり生理的ではない。理想的には自己の骨組

織によって欠損部が充填され、再生されなければならない。それを実現するのが再生医療である。

幹細胞と担体

骨の再生を実現するためには骨幹細胞の供給が必要である。しかし、欠損部に幹細胞が補填されたとしても、それだけでは機能的な組織構築ができない。大規模な組織再生を可能にするためには、細胞をとりまく環境づくりが必要である。

たとえば、骨形成と血管新生の間には密接な関係が存在することが知られている¹⁾。血管の存在は、骨芽細胞の分泌能を発揮するのに必要で、すなわち、修復すべき場所に骨幹細胞を移植したとき、細胞のすぐそばに毛細血管が存在するスペースがなくてはならない。もし、毛細血管が存在できないような密な組織に間葉系幹細胞が凝集すれば、軟骨に分化してしまう²⁾。したがって、血行がすぐに形成されるような形状で骨芽細胞がはたらけるような担体を作り出すことが重要である。同様に、骨芽細胞の分泌物の配列を助ける点から、担体の細胞接着部位は骨基質様のものでなければならない。

組織工学において骨を再生するためには、まず適当な細胞の足場を開発することである。理想的な担体基質は以下のような点を保持することが望ましい。

- 1) 細胞を均一に配置し、保持する
- 2) 速やかな血管侵入をサポートする
- 3) 解剖学的に正しい形状の骨新生を起こす
- 4) 最終的には吸収され、新生骨に置換される

- 5) X線透過性で骨新生が確認できる
- 6) 骨伝導能を有する
- 7) 臨床応用のために採型しやすい

こうして細胞は自然の生体環境に近い三次元的な空間の中で、分化と増殖をくりかえし、決められたメカニズムに従って組織を構築する。そのメカニズムを調節するのが各種の成長因子やサイトカインである。たとえば、骨再生の初期の段階では、幹細胞はコラーゲンマトリックスの網目の中で増殖し、次にBMPなどの成長因子が骨芽細胞に分化を導き、マトリックス上での石灰化が始まる。このように、組織構築のためには幹細胞とそれに与えられた環境、すなわち細胞の足場と成長因子の3つの要素が必要である³⁾。

骨の再生医療

1) 骨移植による再生

古典的な骨再生は人骨や動物骨の移植によって行われた。自分の骨を使う「自家骨移植」、他人の骨を使う「同種骨移植」、人工材料から作った骨を使う「人工骨移植」である。現在、国内では年間50,000例以上⁴⁾もの骨移植手術が行われているといわれる。交通事故で広範囲に骨を損傷した場合、骨腫瘍のため広範に病巣の切除を余儀なくされた場合、過去に用いた人工関節を入れ換えなければならない場合、脊椎の病気のため骨固定の手術が必要な場合、靱帯の再建が必要な場合など、多くの患者が骨移植によって救われている。

「自家骨移植」は自分の骨を移植するために拒絶反応が出ることはないが、採取する量には限界がある。また、骨採取のために、からだの別の場所に傷をつけねばならない。「同種骨移植」は自分のからだを傷つけなくて済むが、拒絶反応があり、供給も十分ではない。アメリカではドナーが多く、死体からの採取が比較的容易であるが、日本ではこの状況にない。「人工骨移植」は安定して供給されるうえに感染の危険もない。しかし、年月が経っても自分の骨に置き換わらず、母骨との癒合も完全ではない。

しかし今日でも、自家骨移植が最も信頼性のある治療法であることは変わらない。骨の中には、骨形成タンパク⁵⁾ (Bone Morphogenetic Protein; BMP) が存在し、間葉系の幹細胞を骨芽細胞に分化させる。BMPの骨誘導能があるために、自家骨移植や同種骨移植が有効なのである。最近、体重のかからない空洞状の骨欠損には、海綿骨骨髄組織移植が行われるようになり、大きな成功を収めている。この場合、骨形成タンパクの補給以外に、骨髄中に多く存在する幹細胞の移植という意味もある。このように考える

と、理想的な骨再生法は、少なくとも自家骨移植と同じ程度の安定的な骨再生能があり、ドナーの侵襲が少なく感染の危険のない人工骨を開発することである。

2) 組織工学による再生

骨髄細胞には、造血系の細胞の他に骨形成能力を有する細胞が含まれる。したがって、皮質骨を移植するよりも骨髄組織を移植した方が、骨再生の効果は高い。しかし、安定した骨再生を得るには多量の新鮮骨髄細胞を必要とし、臨床の場面で骨再建に応用するには、骨髄細胞の数を増幅させる必要があった。そこでGoshim⁶⁾らは、新鮮骨髄細胞を培養し浮遊細胞を除去し、骨髄付着細胞(骨髄間質細胞)を増殖させる方法を考案した。培養骨髄間質細胞を多孔質HAに含ませることで、移植後2ないし3週で、骨形成がみられることを報告し、形成された骨細胞が移植された細胞に由来することも明らかにした。骨髄細胞を培養増幅することで新鮮骨髄細胞の骨再生能を増幅させることに成功したといえる。細胞増殖中に、継代培養をくりかえすと骨芽細胞への分化能が低下し、細胞の骨形成機能が低下することが明らかとなった。

Maniopoulos⁷⁾らは、骨髄細胞の培養の際に、Dexamethasoneとbeta-glycerophosphateを加えて培養することで石灰化した骨様組織が形成され、この石灰化基質は骨形成誘導蛋白(BMP)活性を持つことを報告した。この培養骨を人工骨材料と結合させることで、増殖させた骨髄付着細胞の骨再生能力をさらに増殖した人工骨の作製をYoshikawa⁸⁾らが可能にした。その方法によれば、骨髄細胞を採取し、培養増殖させる。細胞をトリプシン処理し細胞浮遊液を作製し、HAのようなセラミックス材料と結合させる。使用するセラミックスは気孔率が高く、ちょうど海綿骨の骨梁構造に類似した微細構造を持つ。この気孔内に骨髄付着細胞を組み込み、セラミックス表面の培養により骨組織を構築するのである。

最近の技術の進歩により、非常に生体親和性に優れた生体材料が化学工学的に多数合成され、すでに臨床作用されている。しかし、これらの生体材料そのものでは生物活性を持たず、その応用範囲は限定される。もし、培養細胞を組み込むことで、これらの材料が生物活性を保持することになれば、生体親和性に付加価値が加わり、その応用範囲は非常に広がることが期待できる。

細胞とセラミックスの複合体は生体内外で骨組織を誘導し、硬組織における再生医療として応用されるだろう。われわれは細胞とセラミックスおよび血小板濃厚液の複合体においては、新鮮骨髄でも正常な骨組織と同じ微細構造を持つ新生骨を形成することを報告している⁹⁾(図2)。

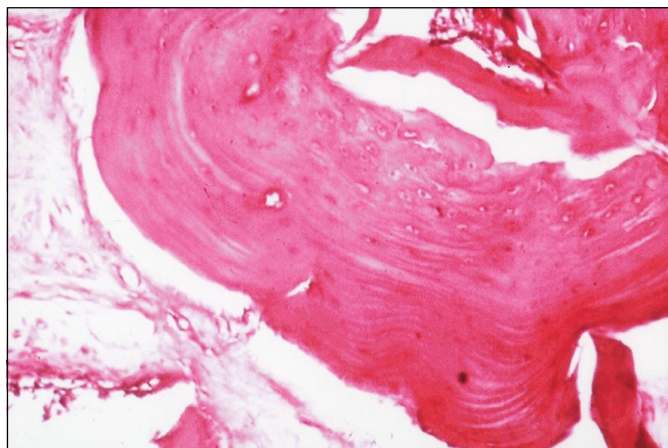


図2 再生した骨組織 (H-E Stain, × 400)

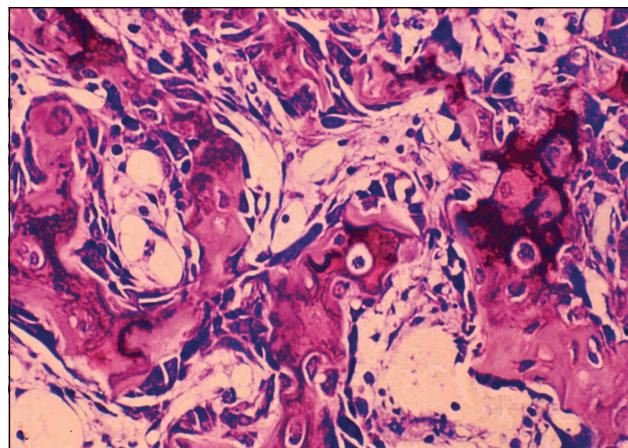


図3 ソニック・ヘッジhog遺伝子によって再生した骨組織 (H-E Stain, × 400)

幹細胞による再生

しかし、新鮮骨髄細胞を用いた皮下での骨形成はその細胞を多量に必要とし、さらに明らかな骨形成を生じるまでに約4週間を要した。これはadult (成人) 骨髄細胞中に間葉系幹細胞がごくわずかしかなかったことによる。そこで、培養技術を用いることにより、この幹細胞の増殖を可能にした。われわれが示したように、生検から得られたわずかな骨髄を *in vitro* で30回以上分裂させることで、骨形成能を失うことなく、間葉系幹細胞を10億個以上に増やすことが可能である¹⁰⁾。若年成人における骨髄間葉系幹細胞は、骨髄1ml中200個存在するので、これを10億倍に増やすことは骨髄全体の数万倍にも匹敵するものである。

ヒト新鮮骨髄細胞を培養すると、浮遊性の血液系細胞は培地の交換ごとに廃棄され、培養皿に付着する細胞が増殖する。この増殖した細胞のかかなりの部分が間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells; MSCs) に属すると思われる。

このヒト細胞とセラミックを複合化させ、ヌードマウス皮下に移植すると、セラミックの気孔内に新生骨形成がみられる。移植された部位は皮下組織内であり、ここには既存の骨組織は存在しない。それにもかかわらず、このヒト培養骨髄幹細胞とセラミックの複合体により骨形成がみられたことは、骨形成細胞である骨芽細胞が出現したことを示しており、これにより臨床応用の可能性は高まった。

遺伝子による再生

骨幹細胞が十分に得られない場合、もともと増殖能の高い別の細胞に骨形成遺伝子を導入する方法が開発された。

中でもヘッジhogという種々の組織の形態形成において重要な機能を担う分泌物のタンパクが注目されている。ヘッジhogには、ソニック・ヘッジhog、インディアン・

ヘッジhog、デザート・ヘッジhogの3種類の存在が知られているが、最近、骨・軟骨の形成過程におけるこれらのヘッジhogの役割が注目されている。

骨形成因子BMPは適当な担体とともにマウス皮下、筋膜下あるいは筋肉内に移植すると異所性軟骨内骨化を誘導することが知られている。この現象は、BMPが未分化な細胞を軟骨細胞へ分化誘導することを示している。BMPの相同遺伝子であるdpp (decapentaplegic) はヘッジhog遺伝子の下流遺伝子であること、および脊椎動物においてヘッジhog発現組織の近傍にBMPの発現が認められることが判明し、ヘッジhog→BMPというシグナル経路が提唱されている。そこで骨関連遺伝子導入による骨組織再生を目的に、ソニック・ヘッジhogを骨形成能を有しない細胞に遺伝子導入し、遺伝子高率発現細胞を選択培養後、適当な担体とともに移植し、異所性骨形成を誘導するかどうかを検討した。

その結果、埋入2週目では軟X線写真で明瞭な石灰化像を呈した。組織学的に検索したところ、埋入10日目ではソニック・ヘッジhog発現陽性細胞を埋入した部位を中心として軟骨像が認められ、埋入2週目では軟骨内骨化の所見が認められ、軟骨組織が骨組織へと置換されている過程が観察され、埋入3週目では骨髄を伴う明らかな骨形成が観察された (図3)¹¹⁾。

われわれは骨の再生医療における遺伝子治療を念頭に、ソニック・ヘッジhog遺伝子導入細胞移植を行い、良好な異所性骨形成を示した。そうした方法は、外発性の骨異形成症などの骨再生に可能性を開くものである。

骨再生医療と自家骨移植の比較

骨の再生法が実現することの意味は、少量の自家組織か

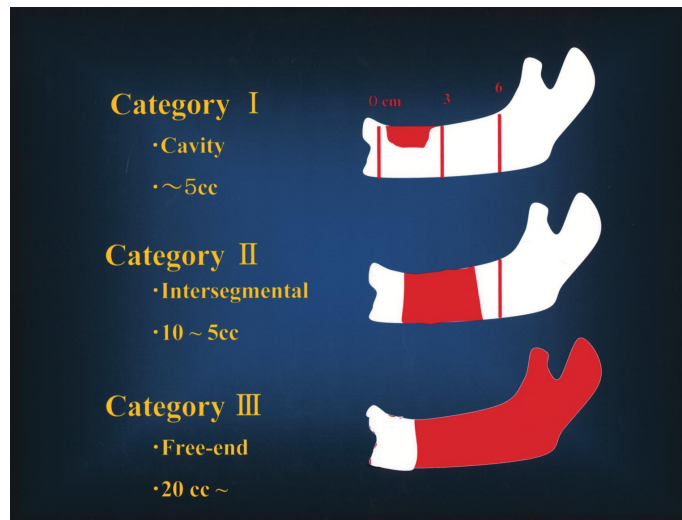


図4 顎骨欠損の分類と再建方法

ら大量の幹細胞の確保ができ、再生できる骨の量も大きいということだろう。自家細胞や組織の採取に伴う、採取部の侵襲が少なく、患者の負担が小さい。再生医療の場合、採取する骨髄組織はごくわずかであり、腸骨部から注射器で吸引するか、ごく少量の骨片を顎骨部から採取するだけでよい。いずれも局所麻酔で実施が可能であり、外来でも採取可能である。そこで骨再生療法と自家骨移植を、われわれの領域である顎骨再建を例にとって比較してみよう。

口腔外科では様々な理由で、異なるタイプの骨欠損が生じる。そしてそれらの顎骨欠損は、その大きさによって、大まかに3つに分類することができ、再建方法も欠損の大きさによって異なってくる¹²⁾。

図4に、それぞれの骨欠損のタイプと再建に必要な骨採取の方法、それによって患者が受ける負担をまとめた。たとえば、第一分類は最も小さな骨欠損に属し、最大径3cm以内の骨欠損である。顎裂部の骨欠損、インプラント(人工歯根)手術のための歯槽骨造成、歯周病治療のための骨再生などは第一分類に属する。こうした骨欠損は、下肢のように加重がほとんどかからず、従来は海綿骨髄移植が行われてきた。しかし、海綿骨の採取は腸骨から行われ、骨採取部のため全身麻酔が必要な上、一週間の入院を要する。

次に第二分類の骨欠損であるが、これは最大径3cm～6cmの骨欠損である。良性腫瘍による顎骨区域切除後の骨欠損、顎骨骨髄炎による骨欠損などがこの第二分類に相当するだろう。従来は腸骨からのブロック骨遊離移植が行われてきたが、ブロック骨の採取はさらに大きな採取部の侵襲に伴い、入院期間は14日までのびる。さらに最大の骨欠損である第三分類は顎の欠損が6cm以上、多くは悪性腫瘍治療後の骨欠損である。このような場合、現在最も一般

的な方法は血管柄付き非骨弁である。移植骨採取に下肢の皮膚、筋肉に大きなダメージが加わり、入院期間は採取部の治癒のために21日が必要である。当然のことながら、手術規模が大きくなればなるほど、患者の負担は大きくなり、入院期間が長くなり、その結果、治療費全体が上昇する。

再生医学の進歩によって、骨再生が自在に行えるようになれば、患者が受けるべき負担は骨髄細胞培養のために、骨髄組織を穿刺吸引するだけで済む。これは外来で、局所麻酔下でできる処置である。

一方、骨の再生医療を一般化させるためにはコスト・パフォーマンスの評価は避けて通れない。細胞培養やマトリックス、様々な成長因子を必要とする再生医療が、はたして従来の自家骨移植に、医学的にも経済的にも匹敵あるいはそれ以上になり得るだろうか。自家骨と比較してより強度があり、治癒期間が短く、治療費用は変わらないという程度まで技術が進歩すれば、再生医療が自家骨移植にとって変わるだろう。

骨粗鬆症と再生医療

骨粗鬆症は骨組織での骨量が減少した状態である。正常な骨では骨形成と骨吸収のバランスが保たれているが、遺伝、栄養、ホルモンなど様々な因子により、バランスが崩れ、骨吸収が骨形成よりも勝っている状態である。骨量は20歳頃をピークに加齢に伴い、年に0.3～0.5%の割合で減少する。

骨粗鬆症は大きく分けて2つに分類される。閉経後骨粗鬆症と老人性骨粗鬆症である。前者では、主として女性の閉経後に生じ、エストロゲン欠乏が基本的要因である。エストロゲンが欠乏すると急速に骨吸収が高まり、この骨吸

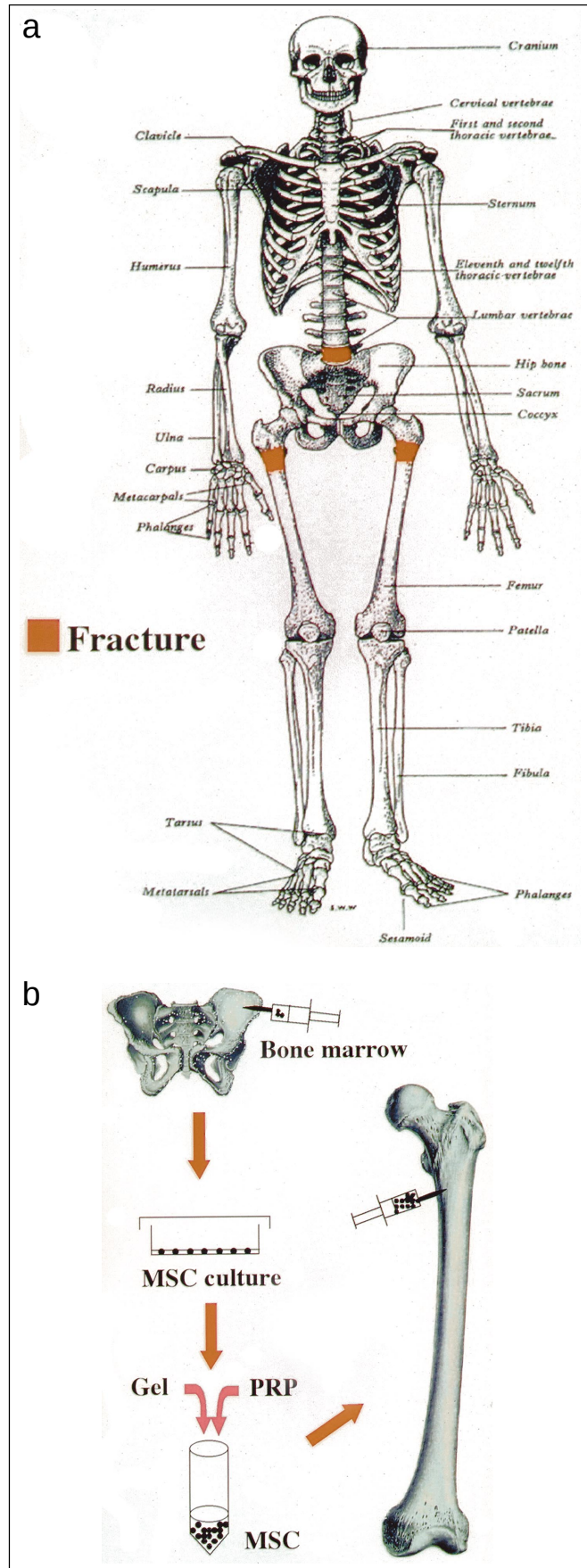


図 5a,b 幹細胞移植による骨粗鬆症の治療モデル

収を介して血清カルシウム値が上昇する。そのために副甲状腺ホルモン分泌抑制およびビタミンD活性化の低下が生じる。これらの要因が、ネガティブカルシウムバランスを生ずることにより骨減少を引き起こす。閉経直後、年に2～3%も骨量が減少する。後者は、腸管からのカルシウム吸収が低下するためのカルシウム欠乏の状態が大きな要因となっている。カルシウム欠乏は副甲状腺ホルモン分泌を促す。さらに、骨芽細胞の機能低下により骨吸収がさらに亢進し、骨減少が起こる。骨量は約1%の割合で減少する。

骨粗鬆症は骨量の減少が加齢によって生じる生体の生理学的変化である。これが問題となるのは骨量の減少によって、骨が折れやすくなることである。老人が転倒して起こる骨折の代表として、上腕骨頸部骨折、橈骨遠位端骨折、脊椎圧迫骨折、大腿骨頸部骨折がある。特に脊椎圧迫骨折や大腿骨頸部骨折は臥床を余儀なくされ、寝たきりになってしまうこともあり問題が多い。

こうした骨量が病的に減少した骨に自己の骨芽細胞を注入し骨量を増やし、骨折治癒を促進するという方法も再生医療の導入で可能になるだろう(図5a, b)。これが実現すれば高齢者のQOLは保たれ、介護などの二次的負担も軽減されるだろう。

おわりに

骨再生により骨欠損の修復を成功させるには、十分な数の骨前駆細胞を骨に分化させ、骨基質合成能や骨分化の成長因子の活性を高める至適な担体とともに修復すべき場所に移植することである。そのためには、介在する組織を除き、迅速な血管侵入を促し、適度なメカニカルフォースなどを加えることである。われわれが、もっと骨再生に関わる因子を知ることができれば、適切な担体と骨形成を導く種々のファクターをコントロールすることができるであろう。さらに体内ならびに体外で間葉系幹細胞を管理することも、組織工学において重要なことである。高齢者では、加齢とともに間葉系幹細胞数は減少しているため、採取し、蓄えた細胞を増加させることなくして組織工学的手法を使用することはできない。そのためには遺伝子導入法は有用である。

われわれが夢みた骨再生は、近い将来には現実のものとなるであろう。

文 献

- 1) Caplan AI, Pechak D: The cellular and molecular biology of bone formation: In Bone and Mineral Research, Vol.5. (ed Peck WA), Elsevier, New York, 1987, pp117-183.

- 2) Dennis JE, Caplan AI: Porous ceramic vehicles for rat-marrow-derived (*Rattus norvegicus*) osteogenic cell delivery: Effects of pre-treatment with fibronectin or laminin. *J Oral Implant*, 19: 106-115, 1993.
- 3) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science*, 260: 920-926, 1993.
- 4) 特集アспект 81: ドナー・脳死・臓器移植, 第一版. (村上雅英, 川原郁夫編), アспект, 東京, 2000, p59.
- 5) Wada K, Niimi A, Watanabe K, Sawai T, Ueda M: Maxillary Sinus Floor Augmentation in Rabbits: A Comparative Histologic-Histomorphometric Study Between rhBMP-2 and Autogenous Bone. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21 (3): 253-263, 2001.
- 6) Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI: Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed *in vivo* with porous calcium phosphate ceramic. *Biomaterials*, 12: 253-258, 1991.
- 7) Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH: Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adults rats. *Cell Tissue Res*, 254: 317-330, 1998.
- 8) Yoshikawa T, Ohguchi H: Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*, 32: 481-492, 1996.
- 9) Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M: Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*, 31(1): 27-33, 2003.
- 10) Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE: Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell biochem*, 64(2): 278-294, 1997b.
- 11) 服部 宇, 水谷英樹, 上田 実: Sonic hedgehog. *Clinical Calcium*, 12: 55-59, 2002.
- 12) Ueda M: Maxillofacial Bone Regeneration Using Tissue Engineering Concepts. *Dent Jpn*, 39: 199-207, 2003.