

Mini Review

幹細胞と人工関節による骨の再生医療

ティッシュエンジニアリング研究センターでの取り組み

大串 始, 寿 典子

産業技術総合研究所関西センター ティッシュエンジニアリング研究センター

Regenerative medicine in the field of hard tissue repair: stem cells and artificial joint

As for regenerative medicine in hard tissue field, such as osteoarthritis or bone tumor cases, we have combined both artificial scaffolds and patient's own cells. Osteoarthritis causes the cartilage between the joints to break down, and surgery of total joint replacements using artificial prosthesis is most common treatment. However, complicatedness which fail in the integrity between the host bone and prosthesis interface are not negligible. Concerning the treatments of bone tumor, synthetic calcium-phosphate ceramics are now available; however, massive bone defects cannot be treated with ceramics themselves. To overcome these problems, we have combined culture-expanded osteogenic cells with synthetic scaffolds. The cell source includes mesenchymal stem cells (MSCs) derived from small amount of patient's bone marrow. We seeded the cells on artificial scaffolds and further cultured to accomplish osteogenic differentiation, resulting in osteoblasts/bone matrix on the scaffolds. We have already applied the hybrid scaffold to more than 30 cases.

Rec.1/19/2004, Acc.4/5/2004, pp161-165

Hajime Ohgushi, Noriko Kotobuki

Tissue Engineering Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Key words osteoarthritis, stem cells, artificial joint, bone marrow, mesenchymal stem cells

はじめに

ティッシュエンジニアリング研究センター(TERC)は、2001年4月に独立行政法人 産業技術総合研究所の一センターとして誕生した。TERCは再生医療, ナノバイオテクノロジー, そしてバイオインフォマティクスをキーワードに応用研究を進めている研究機関である。理化学研究所や各大学などが主に基礎研究に重点を置くのに対して, TERCは基礎研究を産業化へ結びつけるための橋渡し研究(トランスレーショナルリサーチ)に重点を置いている。

本稿では上記の理念のもと, 我々メディカルデバイスチームが展開している骨の再生医療研究について紹介する。

骨の再生医療のニーズ

骨関連疾患には骨粗鬆症や変形性関節症, 骨腫瘍などがある。骨粗鬆症は高齢女性に多く発症することが知られている。変形性関節症も高齢者に頻発し, その潜在患者

数は3000万人ともいわれている。一方, 骨腫瘍は幅広い年齢層で発症する疾患である。全身性の骨粗鬆症に対する再生医療は未だ難しいのが現状であるが, 変形性関節症や骨腫瘍など, 局所性の疾患に対しては, 従来の関節置換術や骨補填による治療に加えて, 再生医療が有効であると考えられる。

骨の再生医療のシーズ

骨を再生医療技術をもって治療する際, 我々は人工関節や人工骨などの人工無機材料と患者自身の骨髄から得られる間葉系細胞を組み合わせ利用している。

アルミナセラミックスからなる人工関節は機械強度に優れており, また骨補填剤として知られるリン酸カルシウムは生体親和性ならびに生体活性があり, それぞれ単独で用いても, ある程度の治療効果は得られる。しかし, 日本人の寿命が年々延びていることから, 人工関節を長期に使用することを考慮する必要がある。また, リン酸カ

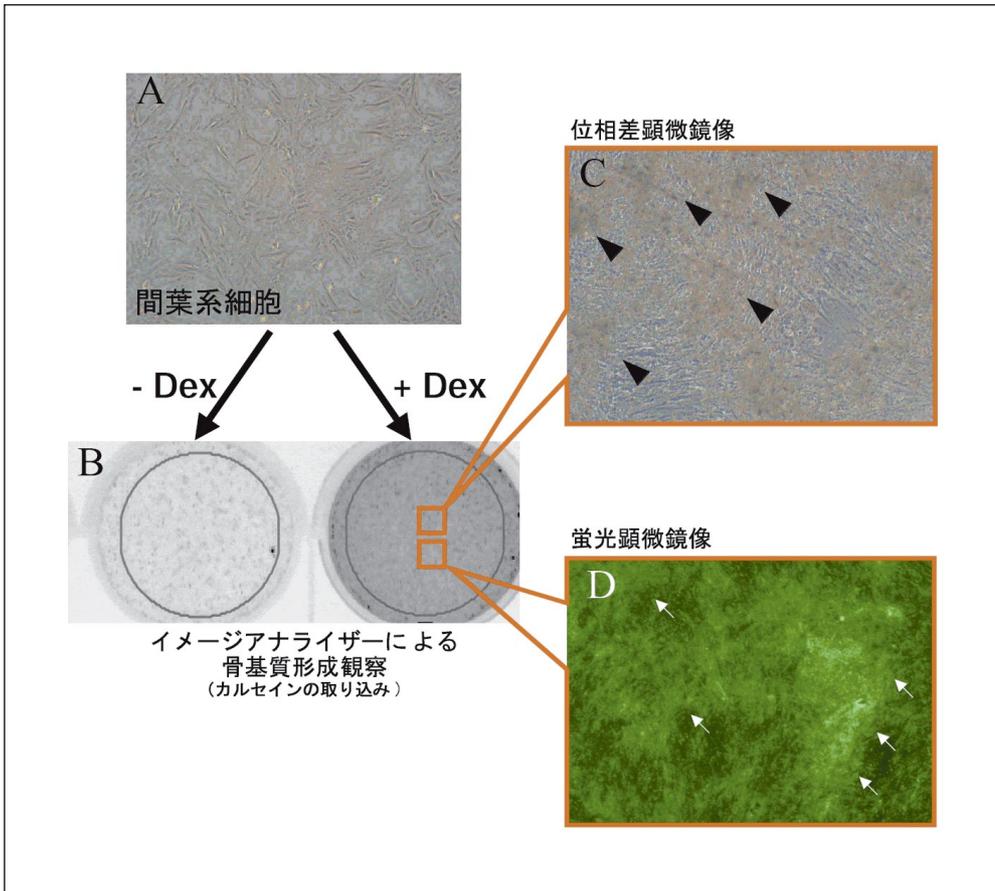


図1 ヒト骨髄より得られる間葉系細胞 (A) と、分化誘導後の細胞 (B-D)

(A)のような接着性の細胞が増殖し、デキサメタゾン (Dex) 存在下で分化誘導後、約2週間で細胞外骨基質を形成する。この基質形成は、カルシウム親和性蛍光色素であるカルセインの取り込み量をイメージアナライザーで観察することで培養皿全体のイメージとして捉えられる(B)^{5,16)}。さらに、細胞レベルの骨形成の程度は位相差顕微鏡や蛍光顕微鏡 (C,D矢印)で観察される。

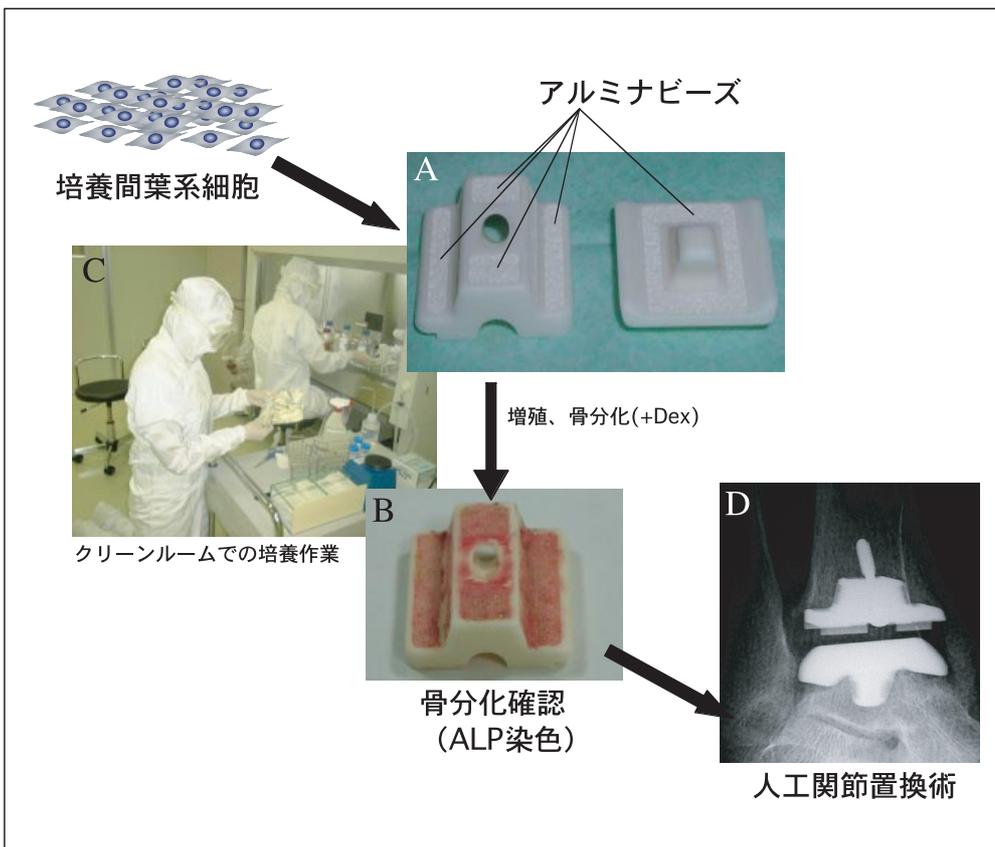


図2 再生培養骨作製過程
人工足関節の関節面は超高分子量ポリエチレンからなり、骨接合面はビーズ状のアルミナセラミックスからなる。写真では培養担体となるアルミナセラミックス部分を示す (A)。アルミナセラミックスのうち、アルミナビーズ面に培養した患者由来の間葉系細胞を播種する。約2週間で間葉系細胞は骨芽細胞へ分化し、骨基質をビーズ面に形成する。これは、ビーズ面全体にALP活性染色されていることから確認できる (B)。これらの培養操作はクリーンルーム内で行われる (C)。骨芽細胞と骨基質でコーティングされた人工関節は病院へ搬送され、人工関節置換手術に用いられる (D)。

ルシウム(とくに beta-tri-calcium phosphate; -TCP)の場合, 生体吸収性が良いことから生体骨に置換される前に吸収されてしまうことも考えられる。

人工関節の大きな問題点として, 生体骨との間に緩み(ルーズニング)が生じる場合が挙げられる。また, リン酸カルシウムを用いた場合は, 生体骨に置換される前に吸収されてしまい, 空洞が生じるケースがある。これらのような事態が起こると再手術を余儀なくされ, 患者の生活の質(QOL)は制限される。

我々は, 人工関節や人工骨などの人工無機材料の利点を最大に生かすとともに, 患者に再手術を施す可能性を減らすため, 患者由来の間葉系細胞と人工関節や人工骨をハイブリッド化した「再生培養骨」による治療技術を考案した^{1,2)}。2004年1月現在, TERCは, 骨の再生医療だけで32例の臨床応用研究を行ってきた。そのうち, 24例がアルミナセラミック製の人工関節を使用した症例, 8例がヒドロキシアパタイト等のリン酸カルシウム系セラミックが主成分の人工骨を使用した症例である。

間葉系細胞のソース

間葉系細胞のソースは前述のように, 患者自身の骨髄である。骨髄採取方法, 初代培養方法などは既に報告したとおりである³⁻⁵⁾。簡単に紹介すると, 大学病院で採取された骨髄は, TERCのセルプロセッシングセンター(CPC)に搬送された後, 遠心分離を経て間葉系細胞を含む層を15%の患者自己血清を含む培地(MEM)で初代培養される。この細胞採取は, 局所麻酔下で行うことが可能であり, 患者は入院を必要としない。間葉系細胞は図1Aに示すように紡錘形であり, 骨芽細胞へ分化する能力を持っている。この細胞を一, 二代継代することで, 我々はわずか3 mLの骨髄液から短期間で, 理論的に 1×10^8 個の間葉系細胞を得ることができる。得られた間葉系細胞を骨分化の誘導因子として知られるデキサメサゾン(Dex)の存在下で培養すると, 骨芽細胞へ分化し骨基質を産生する。この基質産生は蛍光イメージアナライザー(図1B)や種々顕微鏡下(図1C, D)に観察可能である。

我々は人工関節とのハイブリッド時に, 間葉系細胞を約 1.5×10^6 個使用している。新鮮な骨髄からこれだけの間葉系細胞を得るには相当量の骨髄液を必要とし, 間葉系以外の細胞も混入する可能性がある。また, 大量の骨髄採取は全身麻酔を必要とするので, 患者にはかなりの負担になる。これに比し, 我々の技術は局所麻酔により患者から約3 mLのみ骨髄を採取して*in vitro*培養するだけで, 大量の間葉系細胞を確保できうる利点がある。

人工関節と間葉系細胞のハイブリッド化

我々は主に足関節への再生医療を行っている。人工足関節の関節面は超高分子量ポリエチレンになっており, 骨接合面はアルミナセラミックスである(図2)。我々は細胞の接着性を向上させる目的でビーズ状に加工したアルミナセラミックス上に間葉系細胞を播種している。細胞がビーズ上に接着, 伸展するまで(約24時間)5%CO₂, 37℃インキュベーター内で静置する。その後, 細胞培養液とアスコルビン酸やグリセロリン酸, Dexなどの分化誘導因子を加え, 約2週間培養する。培地は週に2~3回の頻度で交換する。

間葉系細胞の骨分化

間葉系細胞は, 上記の分化誘導因子の存在下で骨芽細胞へ分化する。人工材料上での骨分化は, 細胞培養用プレート上で培養した細胞でモニタリングしている。分化誘導後, 約2週間で細胞外骨基質の沈着が確認できる(図1B-D)。骨分化の程度は, 細胞培養用プレート上で培養した細胞のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性と細胞外骨基質量の定量により評価している(図1B)。32症例すべて, 個人差はあるものの, 明らかに高いALP活性値, 細胞外骨基質量を示した。

ALP活性染色は数値化が難しく定量性に欠けるが, 培養細胞のALP活性を可視化できるので, 人工関節のような立体構造物上で培養した細胞には有効である。図2に示すように, 人工関節のビーズ面全体に広がるようにALP活性染色されていることから, 人工関節上で細胞が確かに接着, 増殖, 骨分化したことが視覚的に確認できる。骨分化を誘導して約2週間後, 細胞由来の再生培養骨をハイブリッドした人工関節は病院に搬送され, 移植(人工関節置換術)される。

間葉系細胞のさらなる可能性

我々は変形性関節症などの患者由来の骨髄から, 間葉系細胞を分離・培養することに成功してきた。しかし, これらの間葉系細胞がどの程度間葉系幹細胞としての性質を持つか, また血液幹細胞の混入はないかなどの疑問が残る。我々はFlow cytometryによる細胞膜表面のタンパク発現解析により, 間葉系細胞はすべてCD13⁺(図3A), CD34⁺(図3B), CD44⁺(図3C), CD105⁺(図3D)という結果を得ている。これらは市販の間葉系幹細胞の発現パターンと同一であり, 我々は再現性よく同一性質の細胞集団を得ていることを確認している。また, CD34は血液幹細胞マーカーといわれており, CD34⁺という結果から, 血液幹細胞の混入がないことも確認できる。

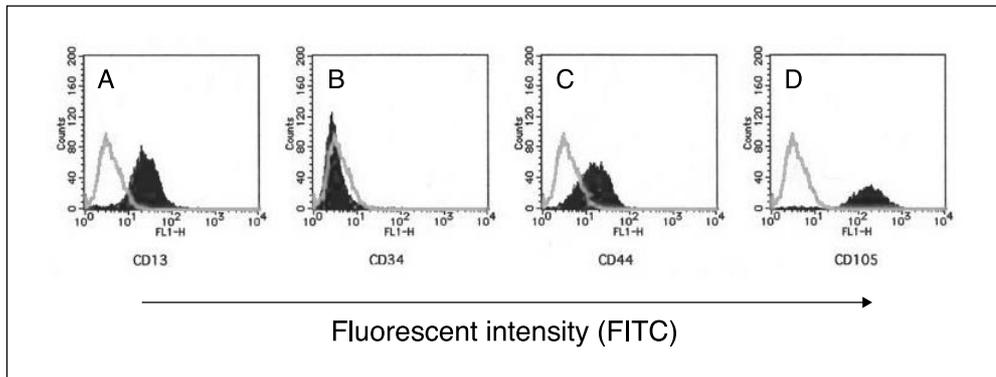


図3 ヒト間葉系細胞の表面抗原解析

コントロール抗体と比較した蛍光強度を示す。CD13(A), CD34(B), CD44(C), CD105(D) 血液幹細胞のマーカーであるCD34は陰性であるが、間葉系幹細胞で発現するといわれるCD13, CD44, CD105は陽性である。

間葉系幹細胞は、骨や軟骨などの間葉系細胞に由来する細胞以外にも、心筋、血管をはじめ、様々な組織に分化することが多数報告されている⁶⁻¹¹⁾。胚葉を越えた分化転換を示した間葉系幹細胞のこの性質は、再生医療の発展にとって大きな意味を持つ。現在は骨・軟骨疾患にのみ骨髄由来間葉系細胞を用いた臨床応用研究を進めているが、我々の手法で得られた間葉系細胞が未分化度を保っているならば、骨・軟骨疾患以外にも間葉系細胞の応用が考えられ、様々な疾患に対する治療技術の発展に貢献できると考えられる。我々の研究によって、患者自身の骨髄から患者自身の失った組織を、移植免疫反応を気にすることなく再生させる医療が可能となるのである。

患者間葉系細胞を適切に分化誘導したり、様々な人工材料とハイブリッド化したりすることで、骨・軟骨疾患以外への応用も十分に考えられる。我々はその先駆けとして、国立循環器病センターとの共同研究により、間葉系細胞が心筋や血管へと分化する結果を得ており、現在臨床応用研究への準備を進めている。

おわりに

再生医療には、細胞とその支持体となるバイオマテリアルが欠かせない。我々は、間葉系細胞を骨芽細胞へ分化させ、さらに細胞由来の骨基質を産生させる技術を持つ。そして、上述の通りアルミナセラミックスやリン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイトなどのバイオマテリアルが細胞の支持体として有効であることを *in vitro*, *in vivo* とともに確認し、臨床応用研究へと発展させてきた¹²⁻¹⁴⁾。

再生医療の国内市場規模は、2020年には1兆5000億円以上に拡大する予測もあり、我々のトランスレーショナルリサーチが日本の医療のみならず、経済発展にも貢献

できることを願っている。

謝辞

ティッシュエンジニアリング研究センターメディカルデバイスチームの皆様、再生培養骨を用いた実際の治療を行っていただいた奈良県立医科大学高倉義典教授、田中康仁講師に深くお礼申し上げます。

文献

- 1) 大串 始：W8-3 再生培養骨組込型人工関節．炎症・再生，23 (6): 419, 2003.
- 2) Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H: Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: Preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artificial Organs*, 28 (1): 33-39, 2004.
- 3) 寿 典子, 舟岡宏幸, 北村繁行, 廣瀬志弘, 大串 始：骨と再生医療～骨髄由来間葉系細胞を利用した再生培養骨の臨床応用研究．*再生医療*，2(2): 11-17, 2003.
- 4) Ohgushi H, Caplan AI: Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*, 48(6): 913-927, 1999.
- 5) Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S, Tabata S, Suwa Y: In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res*, 32(3): 333-340, 1996.
- 6) Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP: Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res*, 13(4): 655-663, 1998.
- 7) Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI: Cell surface anti-

- gens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13(1): 69-80, 1992.
- 8) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 103: 697-705, 1999.
 - 9) Akahane M, Ohgushi H, Kuriyama S, Akahane T, Takakura Y: Hydroxyapatite ceramics as a carrier of gene-transduced bone marrow cells. *J Orthop Sci*, 7(6): 677-682, 2002.
 - 10) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1284: 143-147, 1999.
 - 11) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49, 2002.
 - 12) 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(4): 381-388, 1999.
 - 13) Akahane M, Ohgushi H, Yoshikawa T, Sempuku T, Tamai S, Tabata S, Dohi Y: Osteogenic phenotype expression of allogeneic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J Bone Miner Res*, 14(4): 561-568, 1999.
 - 14) Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI: Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res*, 24 (12): 1563-1570, 1990.
 - 15) 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(6): 575-583, 2003.
 - 16) Hirose M, Kotobuki N, Machida H, Uchimura E, Ohgushi H: Quantitative monitoring of in vitro mineralization process using fluorescent dyes; *Bioceramics 15*. Tech Publications, Switzerland, 2002, pp715-718.