

## 大腿骨頭壊死に対する再生医療の応用

—Scaffold free の細胞シートによる骨再生—

実施責任者：奈良県立医科大学 整形外科 川手 健次  
分担研究者：奈良県立医科大学 大学院 重松 英樹  
奈良県立医科大学 健康政策医学 赤羽 学  
産業技術総合研究所 (AIST) 大串 始

### はじめに

骨髄細胞には、造血系の細胞のほかに骨形成能力を有する細胞が含まれる。近年、自家の骨髄細胞を用いて骨再生を試みる研究が盛んに行われている<sup>1)</sup>。

大串らはラットの大腿骨や脛骨より採取した新鮮な細胞浮遊液を多孔質のヒドロキシアパタイト(HA)と混和し移植することで、異所性にHA気孔内に移植後約3週間で組織学的に骨新生が見られることを報告した<sup>2)</sup>。

その骨形成過程は軟骨を介さず、膜内骨化の形式でHAの表面に直接成熟した層板骨が形成された<sup>3)</sup>。

しかしながら、安定した骨形成を得るには多量の新鮮骨髄細胞を必要とするため、実際に臨床で骨再建に応用するには、骨髄細胞の骨形成能力を増幅させる必要があった。

そこで新鮮骨髄細胞を培養し浮遊細胞を除去し、増殖した骨髄付着細胞(骨髄間葉系細胞)を多孔質HAに含ませることによって、移植後2ないし3週で、骨形成を得ることが可能となり<sup>4)</sup>、形成された骨組織が移植された細胞に由来することも明らかにした。骨髄細胞を培養増殖することで新鮮骨髄細胞の骨再生能力を増幅させることに成功したのである。

しかしながら、継代培養を繰り返すと骨芽細胞への分化能が低下し、細胞の骨形成能力が低下することも明らかになった。

一方 Maniatopoulos らは、骨髄細胞の培養の際にデキサメサゾンと $\beta$ グリセロリン酸を加え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<sup>5)</sup>。

この細胞外に形成される石灰化基質は、形態学的には、生体の骨基質ときわめて類似し<sup>6)</sup>、さらにこの培養細胞が、高い骨芽細胞活性を持つことが生化学的、遺伝子発現的に証明された<sup>7)</sup>。

この培養骨をHAと結合させることで高い骨再生能力を持つ人工骨が作製されうることを報告した。

今回我々はscaffoldを用いずに、骨芽細胞からなる細胞シート作成する方法を確立したため、それを利用した新たな人工骨作成が可能かどうかを将来大腿骨頭壊死へ応用することを視野にいれて、検討を行った。

### 材料と方法

実験に使用したHAブロックは珊瑚骨格から作製され、気孔連通性など、海綿骨の骨梁構造に類似した微細構造を持つ。使用したHA

は、直径5mm、厚さ2mmの円柱径 CELLY-ARD HA scaffold (PENTAX社製)であった。このHAを骨芽細胞からなる細胞シートによりくるむことで人工培養骨を作成することを試みた。

細胞シートの作成方法は、7週齢、雄のF344ラット大腿骨から骨髓細胞を採取し、T75フラスコでEagle's minimal essential medium (MEM) に15%牛胎児血清、抗生剤を加えた標準培地で約10日間一次培養を行った。この培養で造血系の浮遊細胞は培地交換時に除去され、付着細胞(間葉系細胞)のみが培養される。骨髓間葉系細胞を増やした後、トリプシン処理を行い10cm Dishに $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>の濃度で播種した。2次培養は、標準培地に82  $\mu$ g/ml vitamin C phosphate、10m M dexamethasone (以下Dex)を加えて行った。骨基質形成の際、リンを供給して石灰化を促進する $\beta$ -glycerophosphateは今回の2次培養の際には加えなかった。Vitamin C phosphateはコラーゲン繊維の合成を促進し、Dexは、骨形成細胞への分化を促進する効果を持つ。

10日間の2次培養の後、スクレーパーを用いてDishに付着した細胞をはがし細胞シートを得た。この細胞シートでHAを包み同系ラットの背部皮下へ移植した。

コントロールは従来どおりの細胞浮遊液にHAを2時間浸し、その後に同系ラットの背部皮下へ移植した。移植後2週、4週後に摘出し骨形成過程を生化学的、組織学的に検討した。

生化学的分析は骨芽細胞活性に相関するALP活性と、形成された骨量に相関するオステオカルシンを測定して行った。摘出したHAを、0.2% Nonidet P40で粉碎し遠心分離し、上清をALPの酵素液とし、p-nitrophenyl phosphateを基質として測定した。沈殿物より20%ギ酸でオステオカルシンを抽出し、脱塩後、ELIZA法でオステオカルシンを測定した。



図 1

## 結 果

移植後2週目のALP活性の測定値はシートHA群と細胞浮遊液HA群とを比較すると、前者が後者の約3倍の活性値を示した。移植後4週目のALP活性の測定値は両群ともほぼ同等であった。また、移植後2週目のオステオカルシンの測定値はシートHA群が細胞浮遊液HA群の約1.1倍の値を示した。また、移植後4週目のオステオカルシンの測定値はシートHA群が細胞浮遊液HA群の約1.5倍の値を示した。組織学的には移植後4週目に脱灰しHE染色した。シートHA群はHA気孔内表面に成熟した層板骨がみられ、さらにHAの表面にも層板骨がみられた(図1)。一方細胞浮遊液HA群ではHA気孔内表面に成熟した層板骨がみられるものの、その表面の骨形成は明らかではなかった。

## 考 察

骨髓細胞を多孔質のセラミックに混和して生体移植した場合、移植後2ないし3週で骨の再生が開始される。しかし、臨床的に、骨欠損部または壊死部に対して骨再生を試みるには、さらに安定した骨再生が要求される。今回の検討により、骨芽細胞からなる細胞シートを利用し、HAと組み合わせることで従来よりも活性の高い培養骨の作製が可能であることが示された。最近ステロイド性大腿骨頭壊死症例の骨形成能力が低いことが報告されており<sup>8)</sup>、そのような症例に対して今回の研究は非常に有用な方法のひとつと考えられる。

一方、HAを関節近傍に移植することは、将来関節内にHAが迷入した場合に関節軟骨や軟骨下骨の破壊が加速されることが危惧されるため、今後は細胞シートのみを大腿骨頭壊死部を掻爬したのちの死腔に充填する方法、骨形成能の維持について研究を進める予定である。

## 文 献

- 1) McDavid PT, et al.: Effect of autogenous marrow and calcitonin on reactions to a ceramic. *J. Dent. Res.*, 58:1478-1483, 1979.
- 2) Ohgushi H, et al.: Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res*, 12:568-578, 1989.
- 3) Yoshikawa T, et al.: Biochemical and histological sequences of membranous ossification in ectopic site. *Calcif Tissue Int*, 50:184-188, 1992.
- 4) Goshima J, et al.: Osteogenic potential of cultured-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. *Biomaterials*, 12:253-258, 1991.
- 5) Maniopoulos, C. et al.: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*, 254:317-330, 1988.
- 6) Davies JE, et al.: Deposition and resorption of calcified matrix in vitro by rat marrow cells. *Cell Mater*, 1:3-15, 1991.
- 7) Yao KL, et al.: Temporal changes in matrix protein synthesis and m-RNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Res*, 9:231-240, 1994.
- 8) Weinstein RS, et al.: Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2907-2912, 2000.