

179. 同種間葉系幹細胞シートによる難治性骨折治療法の確立

内田 健太郎

Key words: 間葉系幹細胞積層シート,
コラーゲン結合型成長因子, 骨形成促進

北里大学 医学部 整形外科

緒 言

交通外傷による骨・軟部損傷は血流障害や骨欠損や骨折の修復に重要な骨膜組織の著しい損傷を伴うため、治療に難渋する。治療の長期化に伴う患者の社会復帰の遅延は患者に肉体的のみならず精神的苦痛を与える。また、入院の長期化は医療費の増加に直結する。従って、新規骨・軟部組織修復法の開発は、医療経済的にも重要な意味を持つ。近年、細胞を積層した細胞シートを用いることで骨や軟骨組織の修復が促進できることが示されてきた。しかし、細胞採取、培養プロセスに一定期間を要する。そのため、緊急性を要する交通外傷患者の治療において患者自身の細胞でシートを作製し、即時治療することは困難である。従って、あらかじめ作製、保存可能な同種間葉系幹細胞シートによる即時治療可能な難治性骨折治療法の確立が必須であると考えられる。

一方、我々は、細菌性コラゲナーゼからコラーゲン結合ドメイン (CBD) を単離し、これをアンカーとした塩基性線維芽細胞増殖因子 (コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子: Collagen Binding-bFGF, CB-bFGF) を作製することに成功した¹⁾。さらに、種々のコラーゲン材料と CB-bFGF の併用により骨形成を促進できることを示した。我々は、交通外傷患者の早期社会復帰を実現すべく、同種間葉系幹細胞積層シートと CB-bFGF の併用による相加相乗効果について検討した。

方 法

1. ラット骨膜間葉系細胞幹細胞の採取

10 週齢雄 SD ラットから大腿骨を採取した。ラット大腿骨遠位部よりメスを用いて骨膜組織を採取した。37℃ の 0.1% コラゲナーゼタイプ I 溶液中で 2 時間酵素処理し、有核細胞を採取した。ビオチン標識抗 CD45 抗体、抗 erythroid cell 抗体と反応後、磁気ビーズを用いて白血球、赤血球を除去した。37℃、5% CO₂ で 1 週間培養後、フローサイトメトリーを用いて採取した細胞の間葉系幹細胞 (CD45⁻CD29⁺CD54⁺CD90⁺) の割合を検討した。

2. 間葉系幹細胞積層シートの作製

0.25% トリプシン/EDTA 溶液を用いたフラスコ底面から骨膜間葉系幹細胞を剥離後、2×10⁶ 個の細胞にフィブロネクチン、ゼラチンを交互にコーティングした。コーティング後、カルチャーインサート上に間葉系細胞を播種し、間葉系幹細胞積層シートを作製した。間葉系幹細胞積層シート作製後、4% パラホルムルデヒドで 24 時間固定し、カルボキシメチルセルロースに包埋した。フィルム法を用いて凍結切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (H.E) 染色を行った。コーティングを行わず、カルチャーインサート上で単層培養を行ったものをコントロールとして用いた。

3. コラーゲン膜に対するコラーゲン結合型 bFGF の結合能の検討

Alexa547 標識コラーゲン結合型 bFGF とコラーゲン膜を 4℃ で 30 分間反応後、蛍光顕微鏡下に結合を確認した。

4. 間葉系幹細胞積層シート成長因子産生能, 骨芽細胞マーカー発現の検討

積層2日後, 骨形成タンパク (Bone morphogenetic protein-2, BMP-2), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF), トランスフォーミング増殖因子 (Transforming growth factor-beta, TGF- β), 血管内皮成長因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF), I型コラーゲン (collagen type 1 alpha 1, COL1A1), アルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase, ALP), オステオカルシン (osteocalcin) mRNA 発現をリアルタイム PCR により定量し, 単層培養細胞との比較を行った.

5. 同種成長因子アンカーリング間葉系幹細胞積層シートの骨形成能を検討

SD ラットから採取した骨膜間葉系幹細胞をコラーゲン膜上に播種し, 間葉系幹細胞積層シートを作製した. 0.58 nmole CB-bFGF と 37°C で 30 分間反応し, bFGF アンカーリング間葉系幹細胞積層シート (CB-bFGF/CS 群) を作製し, Wistar ラット大腿骨膜上に移植した. 2 週間後, 管電圧 90 kV, 電流 108 μ A, ボクセルサイズ 20 μ m の条件下に micro-CT を撮影した. 骨塩定量ファントムを同条件で撮影し, 骨密度 300 mg/cm³ 以上を新生骨として定義し, 画像解析ソフト Tri3D bon を用いて新生骨量, 骨塩量を測定した. 偽手術群 (sham), 間葉系幹細胞積層シート (CS) のみ移植した群を比較に用いた.

結 果

1. 間葉系幹細胞積層シート

採取した細胞の 95% 以上は CD45⁻CD29⁺CD54⁺CD90⁺であった (図 1A). 骨膜間葉系幹細胞のゼラチン/フィブロネクチンコーティングにより培養2日後に間葉系幹細胞の積層が認められた (図 1B).

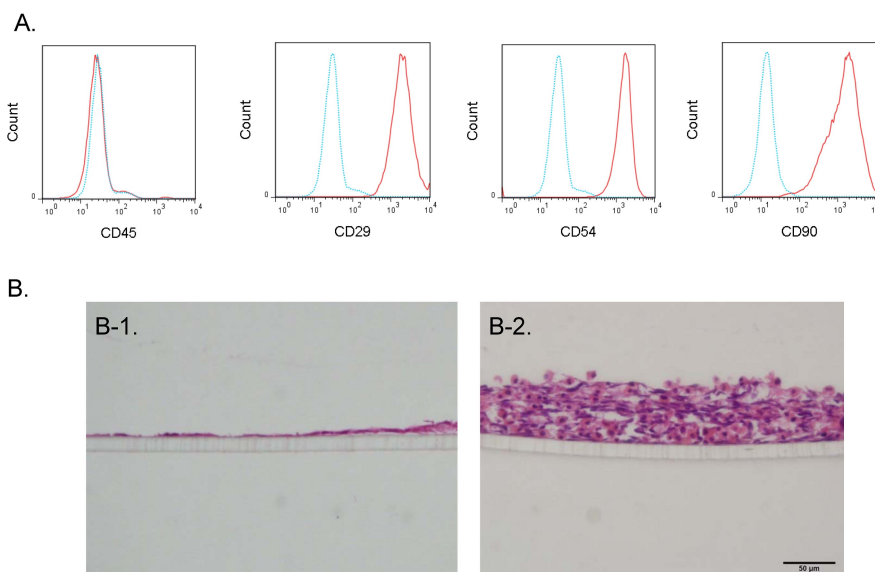


図 1. 間葉系幹細胞積層シート.

A) 使用した間葉系幹細胞における表面マーカーの発現.

B-1) 単層培養間葉系幹細胞. B-2) 積層した間葉系幹細胞.

2. 間葉系幹細胞積層シート成長因子産生能

細胞積層群では単層培養群に比べ BMP-2, VEGF, COL1A1 の発現が有意に高かった (図 2). 一方, bFGF, ALP, OCN の発現に優位な差は認められなかった (図 2).

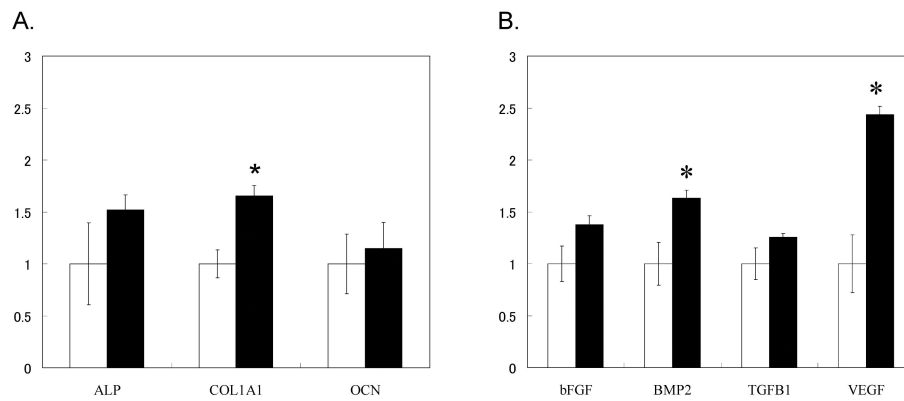


図2. 間葉系幹細胞積層シートにおける骨芽細胞マーカー，成長因子の発現.

□単層培養細胞■間葉系幹細胞積層シート. Y軸は単層培養間葉系幹細胞における発現を1とした際の間葉系幹細胞積層シートにおける発現比を表している. * $P < 0.05$ を有意差ありとした (t-test).

3. コラーゲン膜に対する CB-bFGF の結合能

Alexa547 標識 CB-bFGF のコラーゲン膜への結合が認められた (図3).

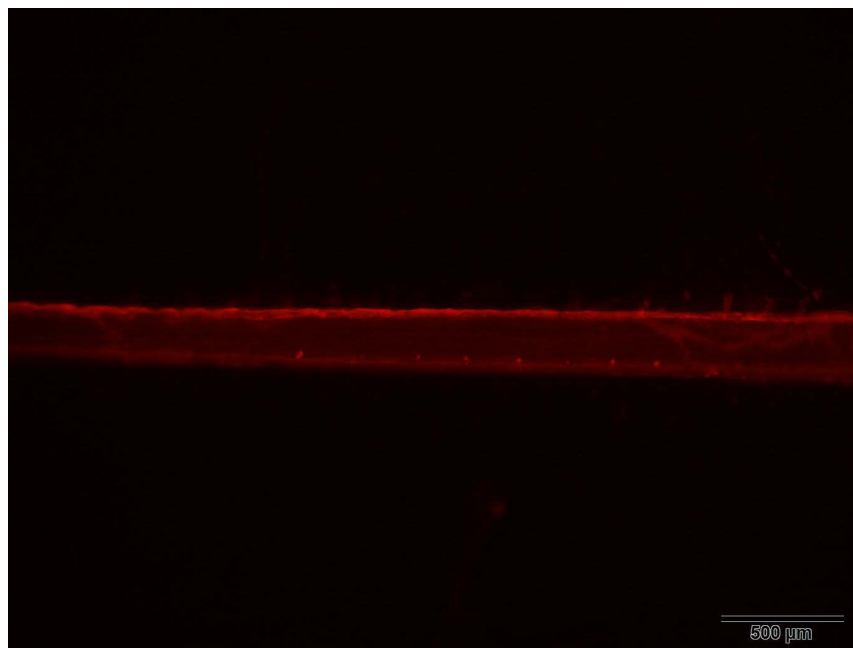


図3. コラーゲン膜へのコラーゲン結合型 bFGF の結合.

赤は Alexa547 標識コラーゲン結合型 bFGF の局在を示している.

4. 成長因子アンカーリング間葉系幹細胞積層シートの骨形成能

CB-bFGF/CS 群では sham 群, CS 群に比べて旺盛な新生骨形成が認められた (図4).

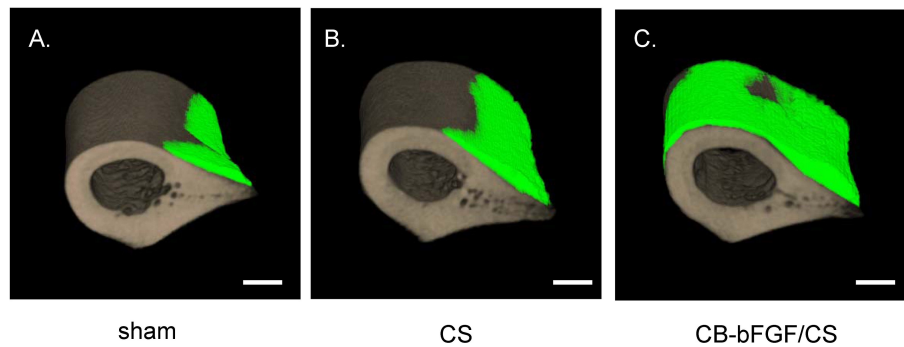


図 4. 間葉系幹細胞積層シート移植 2 週後の microCT 像。

グレーは既存骨，緑は新生骨を示している。Scale bar: 1 mm.

CB-bFGF/CS 群，CS 群は sham 群に比べ有意に新生骨量，骨塩量が多かった。また，bFGF/CS 群は CS 群に比べ有意に新生骨量，骨塩量が多かった（図 5）。

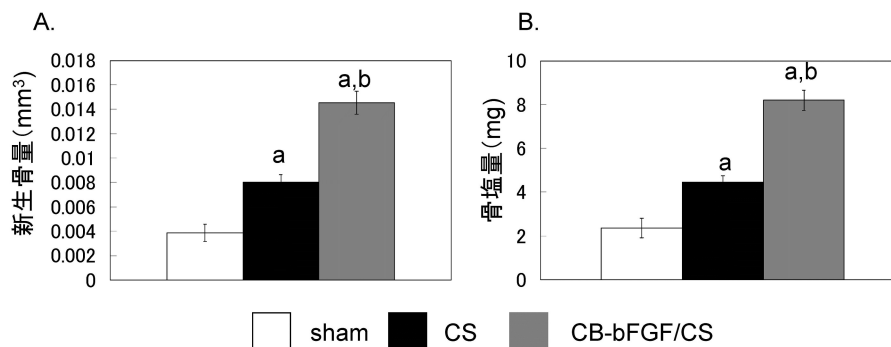


図 5. 間葉系幹細胞積層シート移植 2 週後の新生骨量，骨塩量。

A) 新生骨量. B) 骨塩量. a は sham 群に対する有意差，b は CS 群に対する有意差を表している。P < 0.05 を有意差とした (Tukey's multiple comparison tests).

考 察

現在，細胞シートによる骨折治療や骨欠損治療法の確立が試みられている^{2,4)}。しかし，細胞シートの作製に際しては煩雑な手技や作製時間を要するなどの問題点があった。本研究結果から，ゼラチン/フィブロネクチンコーティングにより短時間で間葉系幹細胞積層シートが可能であることが明らかになった。本方法は外傷治療に極めて有用である可能性が示唆された。

近年，細胞移植における細胞自身が放出する成長因子の重要性が示されている^{5,6)}。本研究結果から F/G コーティングによる間葉系幹細胞積層により，骨形成促進作用を有する BMP-2 と血管新生作用を有する VEGF の発現が上昇することが明らかになった。F/G コーティング技術による細胞積層は成長因子産生の増加による組織修復に有用かもしれない。

一方，細胞移植と成長因子の併用は組織修復促進に有用な方法の一つとして注目されている。本研究結果から，CB-bFGF を用いることで間葉系幹細胞積層シートによる骨形成をさらに促進できることが明らかになった。細胞積層技術と成長因子アンカーリング技術を駆使した本シーズは，外傷後の骨折治療促進に極めて有用であると考えられた。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北里大学医学部整形外科の井上 玄，上野正喜，高相晶士，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学分野の松下 治および東京医科歯科大学保健衛生学研究科の馬淵 洋である。

文 献

- 1) Nishi, N., Matsushita, O., Yuube, K., Miyanaka, H., Okabe, A. & Wada, F. : Collagen-binding growth factors: production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95** : 7018-7023, 1998.
- 2) Ma, D., Yao, H., Tian, W., Chen, F., Liu, Y., Mao, T. & Ren, L. : Enhancing bone formation by transplantation of a scaffold-free tissue-engineered periosteum in a rabbit model. *Clin. Oral Implants Res.*, **22** : 1193-1199, 2011.
- 3) Ma, D., Zhong, C., Yao, H., Liu, Y., Chen, F., Li, J., Zhao, J., Mao, T. & Ren, L. : Engineering injectable bone using bone marrow stromal cell aggregates. *Stem Cells Dev.*, **20** : 989-999, 2011.
- 4) Nakamura, A., Akahane, M., Shigematsu, H., Tadokoro, M., Morita, Y., Ohgushi, H., Dohi, Y., Imamura, T. & Tanaka, Y. : Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*, **46** : 418-424, 2010.
- 5) Hawryluk, G. W., Mothe, A., Wang, J., Wang, S., Tator, C. & Fehlings, M. G. : An *in vivo* characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev.*, **21** : 2222-2238, 2012.
- 6) Hawryluk, G. W., Mothe, A. J., Chamankhah, M., Wang, J., Tator, C. & Fehlings, M. G. : *In vitro* characterization of trophic factor expression in neural precursor cells. *Stem Cells Dev.*, **21** : 432-447, 2012.