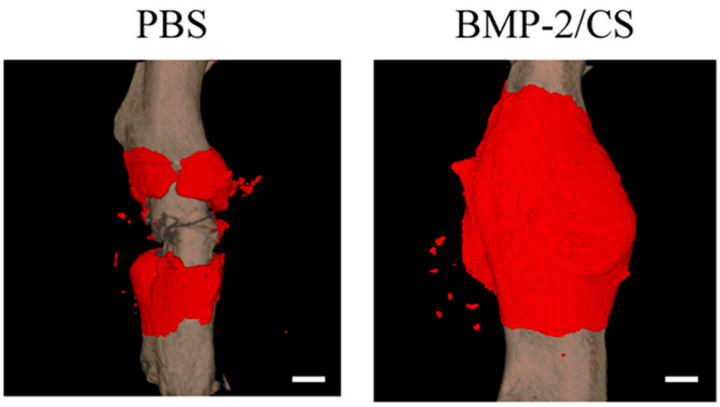
166　機能性間葉系幹細胞シートによる難治骨折治療法の確立	内田　健太郎

【目的】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。本研究では、高純度ヒト間葉系幹細胞シートと成長因子を併用した機能性間葉系幹細胞シートによる難治性骨折治療法の確立を目指し検討を行った。

【方法】ヒト骨髄からセルソーターを用いてヒト骨髄組織からから間葉系幹細胞を採取した。フィブロネクチン／ゼラチン（F/G）コーティング技術を用いてコラーゲン膜状に間葉系幹細胞を積層し、細胞シートを作製した。bFGF、BMP-2 を細胞シートに吸着後、免疫不全マウス難治性骨折モデルに移植した。移植後、micro-CT を用いて新生骨量、骨塩量の測定と骨癒合率の判定を行った。

【結果】F/G コーティング技術を用いることで、2 日間で骨形成促進能を有するヒト間葉系幹細胞シートを作製することが可能であった。骨折部に PBS を投与した群は全例偽関節であった。一方、BMP-2 を吸着させたヒト間葉系幹細胞積層シートを移植した群では全例に骨癒合が認められた。BMP-2 を吸着させたヒト機能性間葉系幹細胞シートは難治性骨折治療法として有用である可能性が示唆された。

マウス難治性骨折モデル作製後 4 週の microCT 像



166. 機能性間葉系幹細胞シートによる難治骨折治療法の確立

内田　健太郎

北里大学 医学部 整形外科学

Key words：ヒト間葉系幹細胞積層シート，難治性骨折，骨形成タンパ，骨癒合促進

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、即時作成可能な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。

近年我々は、フィブロネクチン/ゼラチン（F/G）コーティング技術を用いることにより短期間でラット間葉系幹細胞の細胞積層シートを作製すること成功した。また、細胞積層シートを移植することにより骨形成の促進が可能であった。さらに、細胞胞積層シートに塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor：bFGF）を結合させることで骨形成をさらに促進できることを示した［1]。しかし、ヒト間葉系幹細胞積層シートの効果については明らかになっていない。本研究ではシーズの実用化に向けてヒト間葉系幹細胞積層シートと成長因子の併用による難治性骨折治療法の可能性について検討した。

方　法

1. ヒト骨髄間葉系幹細胞の分離

セルソーターを用いて LONZA 社より購入したヒト骨髄細胞からヒト間葉系幹細胞分画 $LNGFR^{+}THY\text{-}1^{+}$を分離した。2 継代した細胞を実験に用いた。3 継代後の細胞の表現型をフローサイトメトリーを用いて解析した。

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ヒト骨髄間葉系幹細胞を剥離後、2×10^{6} 個の細胞をフィブロネクチン、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。

3. 間葉系幹細胞積層シート成長因子産生能の検討

積層 2 日後、RNA 抽出液を用いて total RNA を抽出した。逆転写酵素を用いて cDNA を作製後、骨形成タンパク（Bone morphogenetic potein-2：*BMP2*）、*BFGF*、トランスフォーミング増殖因子（Transforming growth factor-beta, *TGFB*）、血管内皮成長因子（Vasuclar endothelial growth factor：*VEGF*）mRNA の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（n = 3）。

4. ヒト間葉系幹細胞積層シートの骨形成能を検討

ヒト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。2 日間培養後、2 μg / 500 μℓ BMP-2（BMP2/CS）あるいは 10 μg / 500 μℓ bFGF 溶液中で 37℃で 30 分間反応し、bFGF 吸着間葉系幹細胞積層シート（bFGF/CS 群）、BMP-2 吸着間葉系幹細胞シート（BMP-2/CS 群）を作製した。、ドミトール、ベトルファール、ミタゾラムの三種混合麻酔を投与後、電気メスで免疫不全マウス NSG（NOD.Cg-Prkdcscidil2rgtm1Wjl/SzJ）の大腿骨骨膜を 3 mm 幅で焼灼した。焼灼後、0.22 mm のギグリワイヤを用いて大腿骨骨幹部の骨切りを行い、難治性骨折モデ

ルを作製した。作製後、bFGF/CS, BMP2/CS を骨折部に移植した（n＝10）。PBS を投与した群（PBS）をコントロールとして用いた（n＝10）。骨折 4 週間後、管電圧 90 kV、電流 108 μA、ボクセルサイズ 20 μm 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/cm^3 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。また、正側 2 方向の写真で 4 つの皮質の連続性のうち仮骨による 3 つ以上の皮質の連続性があるものを癒合と判定した。

5. 統計

リアルタイム PCR における *BMP2*、*BFGF*、*TGFB*、*VEGF* mRNA 発現の統計学的差異の検定には t-test を用いた。骨癒合率の統計学的有意差の検定には Fisher’s exact test を用いた。仮骨量、骨塩量の統計学的有意差の検定には一元配置分散分析、多重比較（Tukey 法）を用いた。すべての統計解析は IBM SPSS Statistics version 19 を用いた。

結　果

1. 間葉系幹細胞積層シートの作製

ヒト骨髄から分離、培養した細胞の 98%以上は CD45$^-$CD90$^+$陽性であった（図 1）。マクロファージ（CD45$^+$CD14$^+$細胞）の混入は認められなかった（図 1）。ヒト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。

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 *BMP2*、*TGFB*、*VEGF* の発現が有意に高かった（図 2、P＜0.05）。一方、*BFGF* の発現に優位な差は認められなかった（図 2、P＝0.426）。

3. 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

PBS 群では骨折部の仮骨形成はほとんど認められず全例骨癒合が認められなかった（図 3、表 1）。bFGF/CS 群、PBS に比べ有意に新生骨量、骨塩量が多かった。しかし、骨癒合率は 20%であり、高率に偽関節を認めた（表 1）。BMP2/CS 群における仮骨体積、骨塩量は bFGF/CS 群、PBS 群に比して有意に多く、全例で骨癒合を認めた（図 3、表 1）

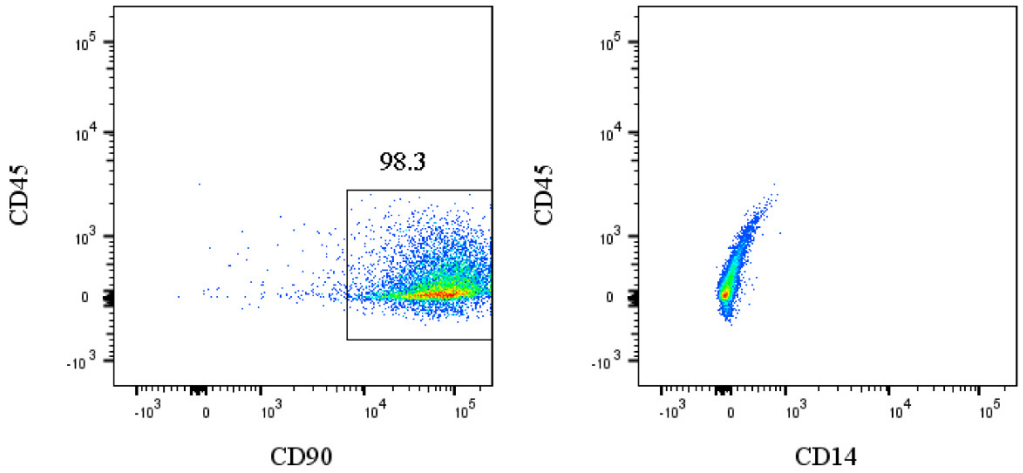


図 1. 培養骨髄間葉系幹細胞のフローサイトメトリー分析
98%以上は間葉系幹細胞分画のCD45$^-$CD90$^+$陽性細胞であった。

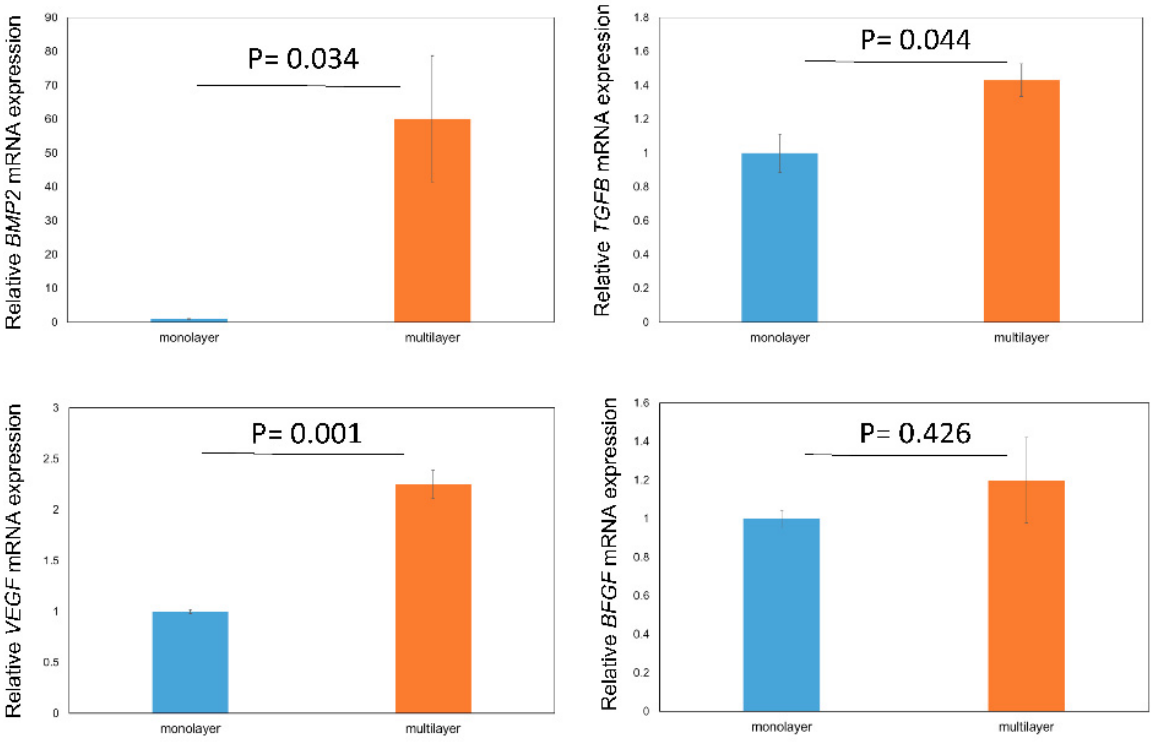


図2. 単層培養群、積層細胞群における成長因子の発現

縦軸は単層培養細胞群における発現を1とした際の相対発現量を示している。

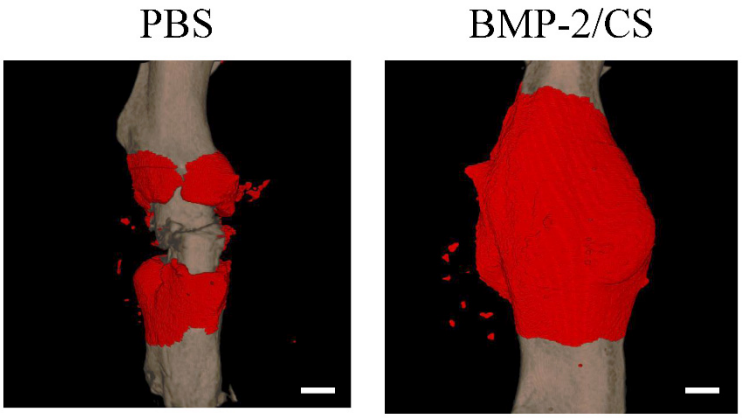


図 3. 骨折後 4 週の MicroCT 画像

Scale bar = 1 mm。

表 1. 難治性骨折モデル作製 4 週後の骨癒合率

PBS	bFGF/CS	BMP/CS	*P* value
0/10 (0%)	2/10 (20%)	10/10 (100%)	3.1×10^{-6}

各群における難治性骨折モデル作製4週後の骨癒合率を表している。

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。本研究成果から我々が以前に報告したラット間葉系幹細胞と同様に、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ヒト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。さらに、BMP-2を吸着すことで免疫不全マウス難治性骨折モデルにおける骨形成、骨癒合が促進された。

近年、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、BMP-2を併用することで間葉系幹細胞積層シートによる骨形成、骨癒合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を併用した本シーズは、外傷後の骨折治癒促進に極めて有用であると考えられた。

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］。我々のラット間葉系細胞を用いて検討では積層細胞が産生するBMP-2と外因性のbFGFの相乗効果により骨形成が促進される可能性が示されている。ヒト間葉系幹細胞を用いた本研究においても栄養因子の発現上昇が認められたことから、間葉系幹細胞の積層は骨折治癒促進に重要な役割を果たすかもしれない。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学保健衛生学研究科の馬渕洋、北里大学医学部整形外科学の井上玄、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である。

文　献

1) Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Horikawa K, Sekiguchi H, Saito W, Takano S, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M et al. Basic Fibroblast Growth Factor-Anchored Multilayered Mesenchymal Cell Sheets Accelerate Periosteal Bone Formation. Biomed Res Int 2017;2017:4371460. doi: 10.1155/2017/4371460. Epub 2017 Jul 6.
2) 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 2011 Jun;20(6):989-99. doi: 10.1089/scd.2010.0348. Epub 2010 Dec 29.
3) 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 2011 Oct;22(10):1193-9. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02091.x. Epub 2011 Feb 8.
4) Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, Dohi Y, Imamura T, Tanaka Y et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. Bone 2010 Feb;46(2):418-24. doi: 10.1016/j.bone.2009.08.048. Epub 2009 Aug 27.
5) Hawryluk GW, Mothe AJ, Chamankhah M, Wang J, Tator C, Fehlings MG. In vitro characterization of trophic factor expression in neural precursor cells. Stem Cells Dev 2012 Feb 10;21(3):432-47. doi: 10.1089/scd.2011.0242. Epub 2011 Dec 5.
6) Hawryluk GW, Mothe A, Wang J, Wang S, Tator C, Fehlings MG. 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 2012 Aug 10;21(12):2222-38. doi: 10.1089/scd.2011.0596. Epub 2012 Feb 7.