

骨再生医療



大串 始^{1,2)}

¹⁾ 医療法人 大隈病院、整形外科部長

²⁾ 産業技術総合研究所、健康工学研究部門、招聘研究員

はじめに

我々の体内には間葉系幹細胞と呼ばれる幹細胞が存在する。この幹細胞を試験管やシャーレ上で培養増殖させ、その培養細胞による生体外での骨組織形成をおこなうことが可能であろうか。また、可能なら、その培養による骨組織は生体内においても正常の骨としての機能を発揮するのであろうか。これらの事が実現できれば、骨組織を人為的に作製できることとなり、様々な骨疾患に対して応用、すなわち骨再生治療が可能になる。我々は20年以上も前から、このような命題について答えるべく研究をおこなってきた。本稿では、我々の研究を基にした骨再生の方法論につき概略し、さらに最近の技術開発や今後の展開についても論じる。

1. 骨の構造と発生

1-1. 骨構造

細胞による骨形成を論じる前に、骨の構造につき述べる。骨も他の組織と同様、細胞成分と細胞外基質成分から構成される。しかし、他の組織と異なり、細胞外基質は骨基質と呼ばれ、その基質には燐酸カルシウムの結晶すなわちハイドロキシアパタイトを多量に含む。この結晶により骨は硬度を保つ。また、骨基質には生体高分子としてI型コラーゲンを主とした蛋白質にムコ多糖類も存在する。細胞成分として骨基質の表面には骨形成作用を営む骨芽細胞が存在し、骨基質内部には骨細胞が存在する。骨芽細胞の細胞表面は高いアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を呈し、このALPは骨形成の重要な役割を担う。生体において、骨組織は古い部分が常にあたらしい部分に置き換えられる。この現状はリモデリングとよばれ、古い骨の破壊すなわち骨吸収とそれに続く骨形成からなる。この現象により、我々の体の骨の量 (骨量) は恒常性を保ってい

る。すなわち、骨組織は内因生の骨再生能力を有する。実際、多くの骨折はギブス等の保存的な加療により治癒する。しかし、広範囲な骨欠損や生体親和性の低い医療材料を骨内に埋植したときには、内在性の骨再生能力が不十分なため骨再生技術の適応が考えられる。

1-2. 骨形成過程とその過程に關与する細胞

胎児期における骨の形成過程には2つの様式がある。軟骨性骨化 (endochondral ossification) と膜性骨化 (membranous ossification) である。前者は、まず軟骨組織が形成され、そのなかに血管が進入して、最終的に骨組織に置換される複雑なプロセスを経る。後者は未分化な細胞が骨芽細胞に分化し、この骨芽細胞による骨形成過程で軟骨の形成が無く単純な骨形成過程である。骨形成に関わる一番の主役は骨芽細胞であり、骨芽細胞が骨基質を分泌した後に、一部の骨芽細胞は骨細胞へさらに分化し、この骨細胞は骨基質の中の骨小窩と呼ばれる間隙に存在するようになる。また、骨芽細胞に分化し得る未分化な細胞として古くより知られているのは間葉系幹細胞である。幹細胞を簡単に定義すると、全く同じ機能や形態をもった細胞へ分裂増殖する能力 (一個の細胞がそのまま2つ、さらに4つと分裂増加する自己増殖能) を有し、この増殖された細胞が種々の細胞へ分化する能力を持った細胞である (図1)。このように、幹細胞は旺盛な増殖能と多分化能を有する細胞である。当然発生初期にこの幹細胞があり embryonic stem cell (ES細胞) と呼ばれている¹⁾。また、最近では複数の遺伝子や蛋白あるいはRNAを通常の細胞に導入する事により作製される幹細胞すなわちiPS細胞 (induced pluripotent stem cells) も知られている^{2,3)}。このES細胞やiPS細胞に比し、我々成人の体の組織中にも幹細胞が存在する。よく知られているのは赤血球や白血球等の血球系細胞になりうる造血幹細胞である。造血幹細胞は骨の中の柔らかい組織である

骨髓に存在する。また、この骨髓には上述の間葉系幹細胞と呼ばれる幹細胞も存在し、骨組織へ分化するのみならず、軟骨や脂肪にも分化することが以前より知られている^{4,5)}。最近では、この間葉系幹細胞は神経細胞⁶⁾、血管内皮細胞⁷⁾、肝細胞⁸⁾等へも分化しえることが報告されている(図1)。

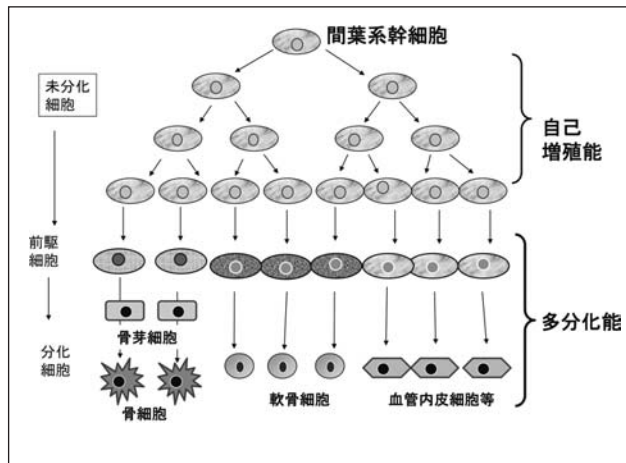


図1. 間葉系幹細胞の増殖・分化能

1-3. 骨再生と利用できる細胞

再生医療の一般的な戦略として、目的とする再生組織になりうる細胞の移植による再生医療が考えられる。骨再生の場合は、骨形成に重要な役割を担う骨芽細胞の移植が考えられる。しかし、骨芽細胞は骨組織表面にへばりつくように存在し、骨芽細胞を体内から得るには骨組織も採取する必要がある。すなわち、ドナーから骨芽細胞を得て、その骨芽細胞を移植するのは困難である。その為、骨芽細胞へ分化しえる間葉系幹細胞あるいはこの幹細胞が存在する骨髓そのものをドナーから採取して骨再生に応用することが考えられる。また、一步進んで、間葉系幹細胞を用いて骨組織そのものを生体外で作製して移植することも考えられる。もちろん、その場合生体外で作製した組織が生体内へ移植後もその機能を発揮しえることの証明が必要である⁵⁾。

2. 間葉系幹細胞による生体外での (in vitro) 骨形成

上述のように、骨再生には間葉系幹細胞や骨髓そのものの移植による骨再生が考えられる。また、骨組織そのものを人為的に作製して応用することも考えられる。後者の方法を用いるには、生体に存在するのと同様の骨の構造を生体外での操作(具体的には幹細胞の培養)により構築しなければならない。生体の骨組織には骨芽細胞、骨細胞ならびに骨基質が含まれるとともに、骨組織内には豊富な血管とともに神経も存在する。すなわち、骨組織は3次元の構造をもつ複雑な組織であ

る。昨今、神経ならびに血管の再生研究は進展し、神経細胞そのものをシャーレ上で作製できるようになっている。しかし、神経ネットワークの機能を有する神経組織や完全な管腔構造をもつ血管をシャーレ上で構築するのは困難である。すなわち、細胞培養によって、血管や神経を有する骨組織を構築するのは現段階では不可能である。しかし、骨形成の主役である骨芽細胞や骨基質に含まれる骨細胞を誘導し、さらに骨基質にI型コラーゲンとハイドロキシアパタイトの沈着が生じれば、これは生物学的にみて生体内の骨形成に匹敵する^{9,10)}。

この培養による生体外での骨形成には間葉系幹細胞を得る必要がある。間葉系幹細胞は骨髓に含まれるのであり、骨髓から間葉系幹細胞を分離することが考えられる。しかし、骨髓にふくまれる間葉系幹細胞の数は非常に少ない⁵⁾。すなわち、単に分離等の操作による間葉系幹細胞採取では大量の骨髓を必要とする。そこで、最初のステップとして骨髓から間葉系幹細胞を増殖することが考えられる。種々の方法による間葉系幹細胞の増殖方法があるが、我々が用いている方法は、ドナーから採取したわずか約3mlの骨髓をシャーレ上の播種し、シャーレ上に接着して増殖する細胞を得る方法である¹¹⁾。非常に単純な方法であるが、この方法により少量の骨髓から大量の間葉系幹細胞を得ることができ。このようにして得られた細胞をフローサイトメーターで表面抗原を解析してみるとCD34,45等血球系細胞に特異的なマーカーは陰性であり、間葉系幹細胞に多く発現しているとされているCD29,73,90.105の発現が確認される。次のステップとしてこの培養増殖した間葉系幹細胞をホルモンの一種のデキサメサゾンや燐酸、ビタミンCの存在下にさらに2週間培養をおこなう。このステップで間葉系幹細胞は前駆細胞を経て骨芽細胞にシャーレ上で分化する¹¹⁾。この骨分化過程において、早期にはALPが発現し、引き続いて骨に特異的なオステオカルシン蛋白の発現がみられ、最終的に生体内の骨基質に存在する結晶構造を有するハイドロキシアパタイトとI型コラーゲンの産生がおこる。また、この骨基質内には骨細胞も存在する(図2)。なお、これらのステップには軟骨細胞の形成はみられない。すなわち、上述の発生過程における膜性骨化が間葉系幹細胞の培養により再現出来、間葉系幹細胞を用いて生体外で骨組織が構築出来る事を意味する^{9,10)}。また、骨組織構築は臨床で用いられている種々のセラミックの上でも構築可能である。図2の右端に多孔体のアルミナセラミック上での骨形成を示す。なお、このような培養細胞利用による生体外での骨組織構築を培養骨と我々は名付けている。

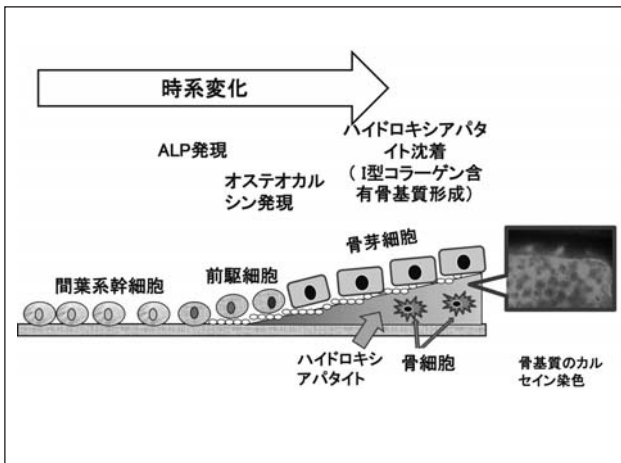


図2：間葉系幹細胞の*in vitro*骨形成（培養骨形成）過程
 間葉系幹細胞を種々因子の元で培養することにより*in vitro*骨形成を生じる。右端に多孔体のアルミナセラミック上でのヒト間葉系幹細胞による骨質形成がカルセインの取り込み（緑色）で示される。

3. 間葉系幹細胞による生体内での (*in vivo*) 骨形成

このように、骨髄由来間葉系幹細胞を用いてシャーレ上で骨形成を生じることが可能である。しかし、細胞を用いてシャーレ上で骨が構築可能であれば、細胞を単純に生体内へ移植することにより骨が形成できないであろうか。これに関してロシアのFriedenstein等の先駆的な業績がある¹²⁾。彼らは骨髄そのものや骨髄から増殖された間葉系幹細胞の腎皮膜内への移植、あるいは細胞を通さないが蛋白等の分子は通過可能であるdiffusion chamberという閉鎖空間内に細胞を閉じ込め皮膚の下（皮下）に移植することにより骨形成が生じることを証明し、細胞そのものの生体内への移植により骨形成がおこなうことを報告した。しかし、これら腎皮膜内への移植やchamberを用いての移植方法は、通常の骨疾患に対して応用出来ない。そこで、我々は臨床応用に適する実験モデルを考慮した。当初、細胞そのものを生体に移植して骨形成の観察を試みたが、残念ながら移植された細胞は移植部位にとどまらず骨形成は生じなかった。そこで、細胞を保持できる担体が必要であると認識し、用いる担体を臨床にも使用できるセラミックとした。使用したセラミックは直径約200umの無数の穴の開いている多孔体ハイドロキシアパタイトセラミックである。このセラミックを用いることにより、骨髄細胞そのものでも骨形成をセラミックの気孔内に生じた（図3A）¹³⁾。しかし、骨髄が体内で間葉系細胞を増やすために時間が必要とし、明らかな骨形成には約4週間を必要とした。この期間を短縮するために、あらかじめ生体外で骨髄から間葉系幹細胞を培養増殖し、その培養間葉系幹細胞をセラミックに播種して生体内に移植することにより、やや早期に骨形成を生じることを確認した（図3B）。

以上のように、細胞とその細胞を保持できる担体と

の複合化により生体内で骨形成を生じることが可能であるが時間がかかる。この点において、上記に述べているように、我々は生体外であらかじめ骨組織を構築（培養骨作製）する技術を確立した。この培養骨を利用して生体内における骨再生に応用することが考えられる。しかし、生体外で構築された組織が、移植後もはたして生体内でその組織/細胞活性を維持出来るかの疑問点が残る。この疑問に答えるべく、我々は培養による生体外の骨形成をまずセラミックス内で生じさせた。そして、この骨形成の生じたセラミックス（培養骨）をラットの皮下へ移植することにより、さらなる新生骨組織を誘導することに成功した^{5,14)}。すなわち、移植された培養骨はセラミック気孔内に混在する間葉系幹細胞をさらに骨芽細胞へ誘導、あるいはレシピエント由来の未分化細胞を骨芽細胞へ分化誘導をおこない、これらの骨芽細胞による新生骨形成を引き起こすことに成功した。この新生骨組織は移植後一週でも検出でき、培養骨が新たな骨再生能を有することは明白である（図3C）¹⁴⁾。

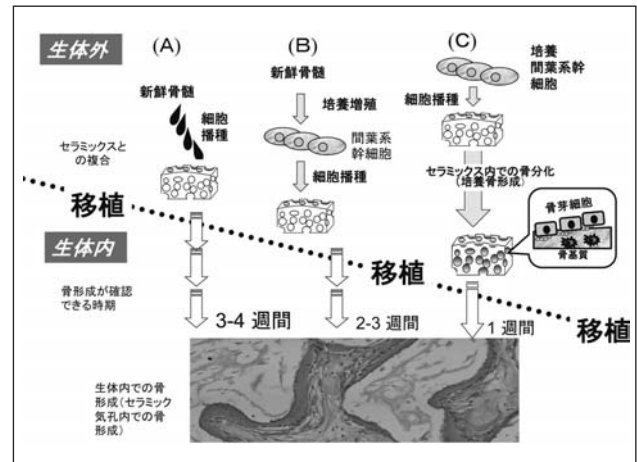


図3. 骨再生の種々方法

4. 骨再生治療

以上述べたように、我々は細胞（間葉系幹細胞）を用いて生体内で骨形成を生じる種々技術を確立した。大事な点は細胞そのもの移植治療による骨再生も可能であるが、あらかじめ生体外で培養骨を種々細胞担体でも構築可能な技術を確立した点にある。この培養骨を用いて、関節が破壊される関節症、骨腫瘍掻爬後の骨欠損ならびに骨壊死等に対しての骨再生治療をおこなっている。これらの詳細については我々の報告を参照されたい^{11,15,16)}。なお、骨腫瘍や骨壊死の治療にはリン酸カルシウムを主成分とするセラミックを用いているが、関節症に対してはアルミナセラミックを用いている。

リン酸カルシウムは骨との親和性が高く非常に有用な細胞担体である。しかし、力学的に弱く人工関節として用いることは出来ない。その為、人工関節にはア

ルミナ等の硬いセラミックスを用いている。このセラミックスの欠点は骨との親和性が低いことにある。この点において我々は培養骨を作製する技術確立している。この技術はアルミナセラミックスに応用することも可能である(図2右端)。実際、アルミナセラミックス上で培養骨を構築することにより、骨との親和性が高まる。例えば、ウサギの脛骨の骨欠損にアルミナセラミックスを移植する実験において培養骨を形成されたセラミックスはわずか3週間で骨欠損部における既存の骨と強固に接着することを示した¹⁷⁾。すなわち、我々が開発した培養骨作成技術は生体材料の表面の改築にも寄与し、生体との親和性を高めることも可能である。これらの経験により、我々は奈良県立医大整形外科とともに、重度足関節症の患者に培養骨が組み込まれた人工関節を用いての再生治療を2001年よりおこなっている¹¹⁾。

5. 骨再生医療の問題と今後の展開

骨再生技術を応用してきた疾患は変形性関節症、良性骨腫瘍、骨壊死等の患者であり、再生培養骨作製に用いた細胞は患者自身の骨髄由来の間葉系幹細胞である。すなわち、自己の細胞を用いた自家移植である。自己の細胞を用いる利点は移植による拒絶反応が無いことや他家細胞移植(同種移植)の際に生じ得る感染症の問題を回避できる点にある。しかし、我々の数多くの臨床例から、間葉系幹細胞の増殖能は限界があり、さらに分化能には個人差が多い事を経験してきた。また、最近の報告により、間葉系幹細胞は免疫抑制の作用を有し、同種間葉系幹細胞移植の可能性も報告されている¹⁸⁾。すなわち、保存されている他人の細胞を用いる同種移植治療が考えられる。しかし、我々の研究では、例え minor mismatch の間葉系幹細胞を用いた同種移植でもドナー間葉系幹細胞は移植により拒絶された¹⁹⁾。このように、骨再生においては自己の細胞を用いることが原則であり、同種(他家)の細胞を用いるのは特殊な場合に限られると思われる。

この特殊な例として、患者自身の遺伝子の異常による骨疾患では、患者の細胞を用いることができず、同種移植の適応となる可能性がある。例えば、希な疾患である低フォスファターゼ症(hypophosphatasia)はALP遺伝子の異常による骨の形成不全を引き起こす疾患である。この患者の間葉系幹細胞を増殖することは可能であるが、増殖された細胞は骨分化能が非常に低く、患者自身の細胞を用いることができない。そこで、我々は致死性の重度低フォスファターゼ症に対して父親(同種)の間葉系幹細胞と培養骨を用いての再生治療をおこなった。誌面の関係上詳細は省略するが、骨髄移植と適切な免疫抑制剤を併用することにより、患者の延命とともに一定の効果がみられた。しかし、血清のALP値は低値のままであり、根治治療にはいたらなかった²⁰⁾。これらの点を踏まえて、現在我々は患

者自身の細胞に正常な遺伝子を導入する再生治療技術開発をおこなっている。例えば、低フォスファターゼ症の間葉系幹細胞に正常のALP遺伝子を導入することにより、正常な骨形成が営むことに成功した²¹⁾。この結果は間葉系幹細胞が多分化能を有する事を考えると重要である。すなわち、低フォスファターゼ症の症例のみならず、他の遺伝子異常による様々な疾患にも応用できる可能性があると考えている。

また、間葉系幹細胞は有用な細胞であるがES細胞やiPS細胞に比し、増殖や多分化能力は限定的である。この点において、我々は間葉系幹細胞がiPS細胞作製の有用な細胞源となることも見いだしている²²⁾。但し、現段階での我々の知見として、iPS細胞からの骨分化能力は間葉系幹細胞に比し優れているとのデータは得られていない。また、間葉系幹細胞ではみられない腫瘍化の問題がiPS細胞には存在する。以上より、現段階では間葉系幹細胞ならびに間葉系幹細胞由来の培養骨を用いての骨再生治療が現実的であり、iPS細胞ならびにES細胞を用いるには大きな壁が存在する。

謝辞

培養間葉系幹細胞を用いての骨再生治療は奈良県立医科大学整形外科でおこなわれ、同整形外科高倉義典名誉教授、田中康仁教授にお礼申し上げます。また、同種間葉系幹細胞を用いた低フォスファターゼ症の治療は島根大学との共同研究であり、同小児科の山口清次教授、同輸血部の竹谷健講師に深謝いたします。患者間葉系細胞の培養に関しては産業技術総合研究所健康工学研究部門の組織・再生工学研究グループの皆様のご協力によりおこなわれた。

文献

- 1) Thomson JA, et.al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145-1147, 1998.
- 2) Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663-76. 2006.
- 3) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131: 861-87, 2007.
- 4) Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 9:641-50, 1991.
- 5) Ohgushi H, Caplan AI., Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res.*;48(6):913-927, 1999.
- 6) Dezawa M, et.al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation *J Clin*

- Invest. 113(12):1701-10. 2004.
- 7) Nagaya N, et. al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Circulation.*;112:1128-1135. 2005.
 - 8) Ikeda E, et.al. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation* 76:495–505, 2008.
 - 9) 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):333-40. 1996.
 - 10) Kihara T, Oshima A, Hirose M, Ohgushi H. Three-dimensional visualization analysis of in vitro cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 316(3):943-8, 2004.
 - 11) Ohgushi H, et al: Tissue engineered ceramic artificial joint—ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment ofosteoarthritis, *Biomaterials* 26:4654–4661, 2005.
 - 12) Friedenstein A, et al. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and in heterotopic transplants. *Exper Hematol.* 6:440-444. 1978.
 - 13) Ohgushi,H., Goldberg,V.M., Caplan,A.I. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res*7:568-578, 1989.
 - 14) Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 32(3):481-92, 1996.
 - 15) Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells, *Artif Organs* 30:115–118, 2006.
 - 16) Kawate K, et. al. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula, *Artif Organs.* 30(12):960-2, 2006.
 - 17) Tohma Y., Tanaka,Y., Ohgushi,H., Tadokoro M, Akahane M, Tanaka Y. Early bone in-growth ability of alumina ceramic implants loaded with tissue-engineered bone. *J Orthop Res* 24(4):595-603, 2006.
 - 18) Bartholomew A et al.: Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance. *Transplantation* 15: 55-7, Review. 2009.
 - 19) Kotobuki N, Katsube Y, Katou Y, Tadokoro M, Hirose M, Ohgushi H. In vivo survival and osteogenic differentiation of allogeneic rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). *Cell Transplant* 17:705-12, 2008.
 - 20) Tadokoro M, Kanai R, Taketani T, Uchio Y, Yamaguchi S, Ohgushi H, New bone formation by allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in a patient with perinatal hypophosphatasia. *J Pediatr* 154:924-30, 2009.
 - 21) Katsube Y, et al.: Restoration of cellular function of mesenchymal stem cells from a hypophosphatasia patient. *Gene Ther,* 17:494-502, 2010.
 - 22) Oda Y, et.al. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem.* 285:29270-8. 2010.