

患者自身の間葉系幹細胞を用いた骨・軟骨の再生テクノロジー

セルエンジニアリング研究部門 組織・再生工学研究グループ

大串 始、寿 典子

健康に暮らすための要となる体の組織 骨・軟骨

わが国は、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎え、高齢者特有の疾患による問題点が指摘されています。そうした疾患の中に、関節軟骨がしだいに変性する変形性関節症があり、高齢者の日常生活の動作を妨げる大きな要因となっています。

骨・軟骨は、体の中でも私たちが動くときの「要」になる組織です。さて、骨・軟骨の場合、障害が起こったときに、風邪が治るように自然治癒するのでしょうか。答えはノーです。骨の場合、骨折したらギプスで固定して治せるように、もともと自己修復能(自分で再生する能力)を持っていますが、複雑な骨折だと自己修復も難しく、部位によっては偽関節(骨が正常にくっつかない状態)が生じたりします。また、軟骨は自己修復能が非常に乏しく、自然には治癒しません。骨移植の従来法と再生療法についてまとめた

ものを図1に示します¹⁾。このように、骨・軟骨損傷に対する従来の治療は、人工骨や人工関節などの生体材料に置き換えたり、体内の別の部分から骨・軟骨を移植するなどの方法がとられていました。しかし、これらの方法では人工物の耐用年数を考慮する必要があったり、体の健康な部分を傷つけてしまうことになったりします。

成人にも幹細胞は存在する

私たちは、これらの問題点を少しでも解決するために、「再生医療」という分野で社会に貢献できるような技術開発に取り組んでいます。例えば、骨・軟骨を試験管内で再生させて、患者の体に移植するまでの過程を総合的に研究しています。再生医療は植物の栽培にたとえると、種子(幹細胞)を花壇(患者)に移植していろいろな花(組織・臓器)を咲かせる(再生させる)ということです。また、場合によっては、苗床(試験管内)に種子(幹

細胞)と肥料(分化誘導因子)をまいて苗木(たとえば細胞から作る再生培養骨)にまで育てて、その苗木を花壇(患者)に移植することも行ないます。ここ本稿では、おもに再生培養骨の作製について紹介します。

幹細胞とは、幹(みき)つまり「中心」という意味の漢字が入っているように、いろいろな組織を構成する細胞へと特殊化(分化と呼びます)していく前の状態(未分化状態)の細胞のことを指します。この幹細胞としては、受精卵から得られる胚性幹細胞(ES細胞)と骨髄中にある間葉系幹細胞(MSC)がよく知られています。これらの細胞は、適切な分化誘導因子とともに培養すると、骨や軟骨だけではなく神経や肝臓など、あらゆる組織や臓器に分化する可能性を秘めています(図2)²⁾。この未分化の幹細胞は、赤ちゃんや成長期の子供にしか存在しないと思われがちですが、私たちの研究では80歳代の患者から採取した骨髄にも存在することが分かっています³⁾。つまり、何歳になっても自分自身の骨髄を用いて、再生医療が受けられるということです。患者への臨床応用を考えたとき、倫理的に抵抗のあるES細胞に比べて、自分自身の骨髄を利用できるというのは安全性の面からも非常に意味のあることです。

骨・軟骨を試験管内で再生させる

骨髄中には確かにMSCが含まれていますが、その比率は骨髄細胞のわずか0.01～0.1%にしかすぎません。ところが再生医療には大量のMSCを必要とするので、大量の骨髄が必要になってきます。しかし、大量の骨髄を採取するのはあまりにも非現実的です。そこで私たちは、骨髄中のMSCを試験管内で分化能を保ったまま殖やすことを試み、再生医療に必要な数の細胞を培養によって確保できるよう

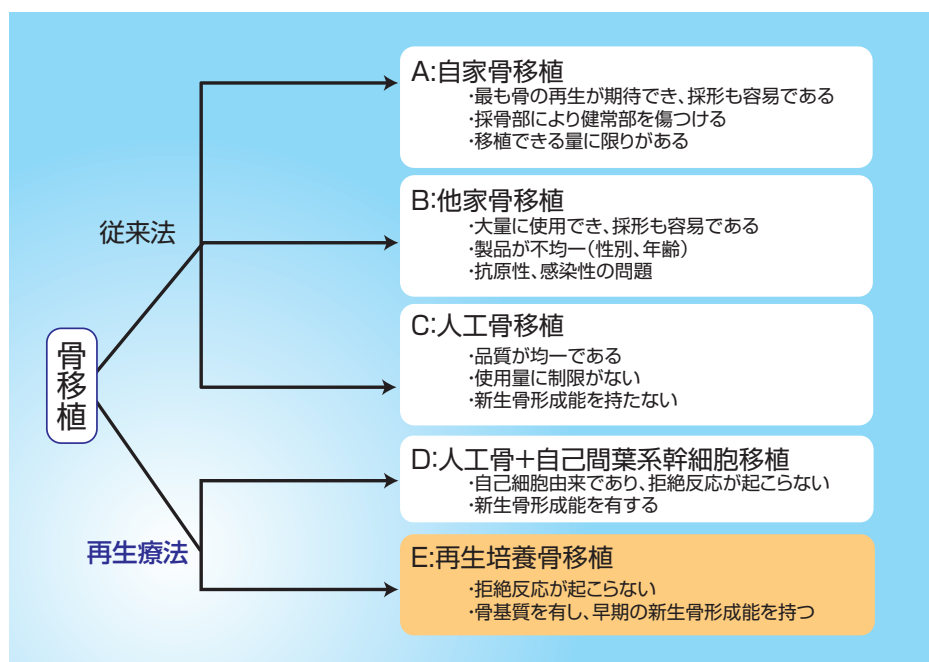


図1 骨移植における従来法と再生療法の比較

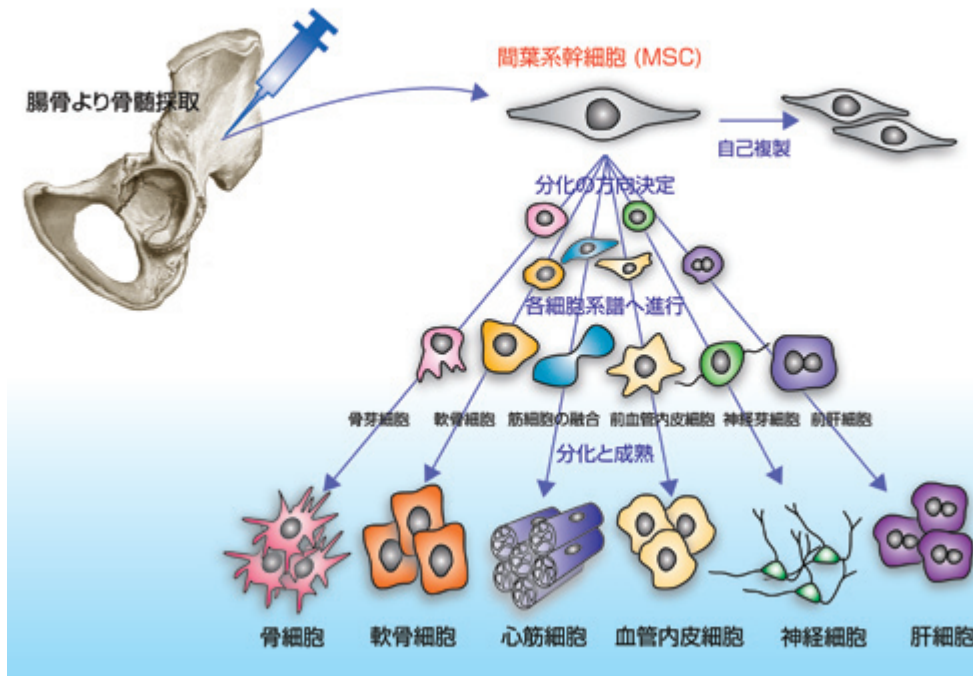


図2 MSCの分化系譜

骨髓中に含まれるMSCは適切な分化誘導因子の元で培養すると、骨・軟骨をはじめ、様々な細胞へと分化する。

になりました⁴⁾。図3aに示すようにこのMSCは培養皿上では紡錘形をしており⁵⁾、さらに分化誘導因子を加えて培養すると骨・軟骨などをつくる細胞(骨芽細胞や軟骨細胞と呼ばれる)に分化します(図3b)⁶⁾。

骨芽細胞はその分化にともなって、I型コラーゲンを生産し、アルカリホスファターゼという酵素の活性が上昇します。これは骨の分化のマーカーとして知られ

ているものです。そして骨芽細胞の周りには、リン酸カルシウムでできた骨を構成する成分、ハイドロキシアパタイトを主成分とするミネラルが沈着していきます。図3bの矢印で示したように、塊状のものがミネラルです。また、図4に示すように軟骨細胞はII型コラーゲンや、プロテオグリカンと呼ばれる糖タンパクを多く生産していることが染色により確認できます。これらのタンパクを生産す

ることで、軟骨の重要な機能である水分を大量に保持し、関節においてクッションの役割を果たしています。

このように幹細胞が特殊化された細胞へ分化し、コラーゲンなどの細胞外物質を生産することによって、試験管内で組織が形成(再生)されていきます。つまり生体外で行う(能動的な)培養操作によって、未分化の細胞から骨・軟骨組織が構築できるのです。

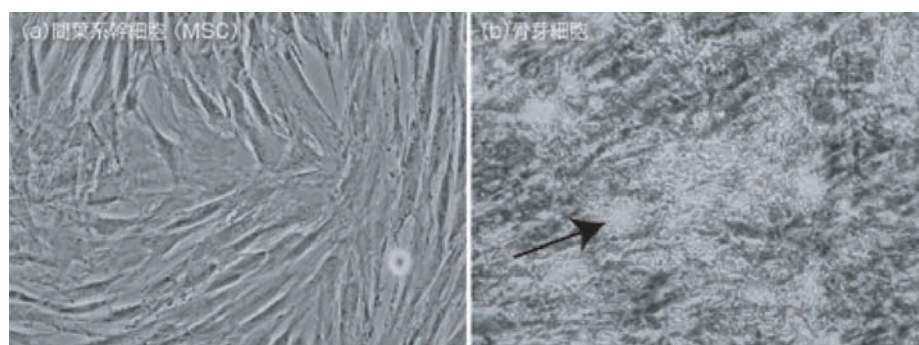


図3a 「MSCの形態」 MSCはこのように紡錘形をしている。

図3b 「MSCより分化した骨芽細胞の形態」 矢印は沈着したミネラルを示す。

再生した骨・軟骨を移植に適した状態にする

ここで紹介したように、試験管内で骨・軟骨を再生することはできましたが、生体に移植できる骨・軟骨に仕上げるには、生体材料と組み合わせることが必要です。なぜなら、生体は立体的な構造をしているのに対し、試験管内で細胞だけから作製された骨・軟骨組織は、そのままでは平面状の構造にしかないからです。それでは、細胞だけで立体的な構

造を試験管内で作り上げればいいじゃないか、と思うかもしれませんが、現在の技術では細胞だけからなる立体的な構造で、なおかつ移植に使用できるような大きさと機能をもった組織を作製することはまだまだ困難です。そこで、生体内での機能や強度を補うために、細胞や生体となじみやすい生体材料を使用するわけです。

生体材料とは、体の中で使用したり、細胞やタンパク質などの生体成分と直接に接触したりするような状況で使用される材料の総称です。骨再生にはハイドロキシアパタイトやリン酸カルシウム、アルミナなどのセラミックスが、そして軟骨再生にはコラーゲンスポンジや生分解性高分子であるポリ乳酸が生体材料として使用されます。これまでの研究から多孔質のハイドロキシアパタイトやリン酸カルシウム、そしてコラーゲンスポンジなどは細胞が増殖・分化する足場として適していることが分かっています。とくに、これらの生体材料は内部に細胞が入り込める多数の細かい穴が開いているの

で、表面だけでなく内部でも細胞は組織を再生することができます。

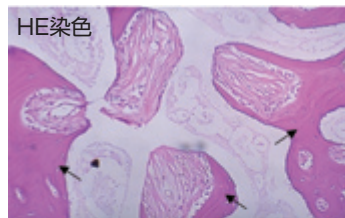
前述したように、生体材料は単独でも十分に治療効果のあるもので、実際に臨床の現場で使用されています。私たちはこれらの生体材料に細胞のもつ組織再生能力を付加し、それぞれの利点を併せ持つ移植用材料を開発し、2001年からこれまでに大学病院と共同で約60症例の応用を行ってきました。

患者自身のMSCを用いた骨・軟骨再生

私たちの研究グループは、患者に移植できる品質の細胞を培養するための施設（セルプロセッシングセンター）をもっています。この施設には空気清浄度の高い、そして無菌状態で作業ができるクリーンルームがあります(図5)。

図6は、この施設で行っている臨床応用研究の流れです。患者の骨髓と血液が大学病院からこの施設に搬送されると、まず血液から細胞培養の栄養素となる血清を分離し、細胞培養液を作ります。次に骨髓を細胞培養液でフラスコ培養する

骨分化



軟骨分化

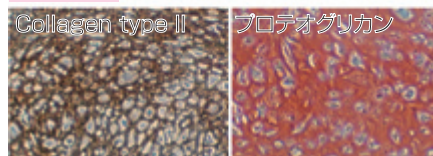


図4 生体材料上で分化誘導した骨・軟骨の組織染色像
骨組織はHE染色により、矢印のようにピンク色に染色されます。軟骨組織では抗体染色でII型コラーゲンが褐色に染色され、サフラニノO染色でプロテオグリカンが赤く染色されます。

と、MSCが増殖してきます。骨再生の場合は、このMSCをアルミナなどの生体材料の上に播種し、骨分化誘導因子を加えた培養液中で約2週間培養します(図7a)。すると、細胞外物質をふんだんに生産した細胞と生体材料とのハイブリッド(混成物)ができあがります(再生培養骨)。この再生培養骨は試験管内で新た



図5 クリーンルーム
患者から採取した骨髓は非常に清潔な作業空間で取り扱われる。

な新生骨を誘導することが確認できます(図7b)。さらに、培養中に感染などが起こっていないことを確認してから、患者に移植します。軟骨組織を作る場合には増殖したMSCをコラーゲン成分であるゲル状の物質に混ぜて、コラーゲンスポンジに播種します(図7c)。骨再生の場合は、試験管内でMSCを骨細胞に分化誘導させてから患者に移植しますが⁶⁾、軟骨再生の場合は、MSCの状態で移植しても十分に効果があることが確認されているため、試験管内で分化誘導せずに、つまり骨髓採取してから比較的短期間で移植に用いています。

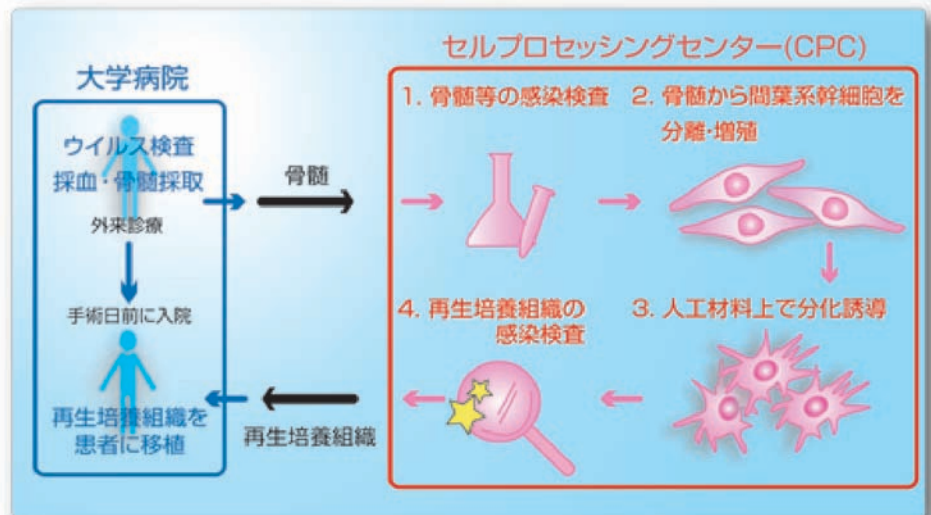


図6 大学病院と共同で進めている臨床応用研究の流れ

今後の展開

世界に先駆けた再生培養骨の移植を始めて約4年が経過しています。まだ短期の経過観察ですが、炎症反応や感染などの副作用も発生せず、非常に良好な結果を保っています。ここに紹介したように、再生医療技術によって、患者自身の組織を犠牲にすることなく、最小限の侵襲で採取された骨髓から生体の骨と同じ構造と機能をもつ骨組織が作製可能となり、種々の骨疾患の治療に用いられる時代がやってきました。また、体内での自然治癒は難しいと考えられてきた軟骨も、再生医療によって治癒する可能性がでてきました。

今後、MSCがもつさまざまな組織構成細胞への分化能力を利用して、骨・軟骨疾患だけでなく、幅広い組織や臓器の再生における臨床応用が期待できます。

現在、私たちが行なっている再生医療は、残念ながらこの医療機関においても受けられる医療にはまだ成熟していません。私たちのチームでは、この再生医療を広く普及させるため、さらなる基礎研究を進めていくことはもちろん、再生医療技術の標準化をはじめ、培養や評価(系)などに用いる機器の開発を大学や企業とともに進めていくことも重要な役割と考えています。

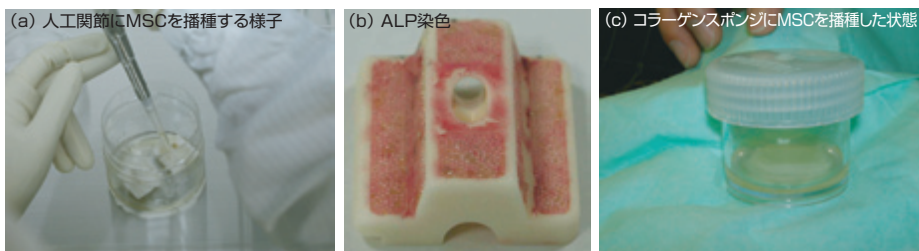


図7a アルミナ製人工関節にMSCを播種する様子

図7b ALP染色により骨分化が確認された再生培養骨

これは、ハイドロキシアパタイトにMSCを播種し、骨分化誘導させた再生培養骨である。赤く染色されている部位が骨としての活性を持つ部分である。

図7c 軟骨再生のためにMSCが播種されたコラーゲンスポンジ

参考文献

- Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y, Takakura Y. Tissue engineered ceramic artificial joint-ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*. 2005;26:4654-61.
- 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. *Artif. Organs*. 2004;28:33-9.
- Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T. Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton. *Novartis Found Symp*. 2003;249:118-27; discussion 127-32, 170-4, 239-41.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am*. 1994 Apr;76(4):579-92.
- 寿典子, 大串 始, 三宅 淳. 細胞プロセッシングセンターの実例 ~ティッシュエンジニアリング研究センター(TECC)~. *老年医学* 41 1837-1841, 2003
- Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J. Biomed. Mater. Res*. 1999;48(6):913-27.