

冷凍保存骨髓細胞を用いた培養骨移植による骨形成能の評価

奈良県立医科大学第1病理学教室

中島弘司, 吉川隆章, 市島國雄,
山田英二, 井上和也, 榎本泰典

奈良県立医科大学整形外科学教室

大串始, 高倉義典

奈良県立医科大学公衆衛生学教室

土肥祥子

EVALUATION OF OSTEOGENIC CAPACITY OF CULTURED BONE GRAFT USING CRYOPRESERVED MARROW CELLS

HIROSHI NAKAJIMA, TAKAFUMI YOSHIKAWA, KUNIO ICHIJIMA,
EJI YAMADA, KAZUYA INOUE and YASUNORI ENOMOTO

First Department of Pathology, Nara Medical University

HAJIME OHGUSHI and YOSHINORI TAKAKURA

Department of Orthopedic Surgery, Nara Medical University

YOSHIKO DOHI

Department of Public Health, Nara Medical University

Received December 14, 2001

Abstract: To investigate the osteogenic capacity of cryopreserved marrow cells, rat bone marrow cells obtained from femora were cultured in a standard medium for ten days. The cultured cells were released by trypsin treatment and stored at -196°C (liquid nitrogen) in a preservative culture medium containing 10% dimethylsulfoxide. After 3 months, the cryopreserved cells were thawed and subcultured in porous hydroxyapatite (HA; Interpore 500). The medium consisted of Eagle-MEM containing 15% fetal bovine serum, antibiotics, ascorbic acid, b-glycerophosphate and dexamethasone. After 2 weeks of the subculture, the composites of the cells and porous HA were subcutaneously implanted into syngeneic rats. These implants were harvested 2 and 4 weeks postimplantation and prepared for histological, biochemical and gene expression analyses. These implants showed bone formation together with active osteoblasts in many pore regions. Northern hybridization showed osteoblast marker of alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin in cryopreserved marrow cells. The course of ALP activities and amounts of osteocalcin derived from cryopreserved marrow cells were comparable to those derived from fresh marrow cells. These results indicate the osteogenic capacity of cryopreserved marrow cells in porous HA.

Key words : cryopreservation, marrow, hydroxyapatite, osteoblast, osteogenesis

緒 言

骨髄には、血液系細胞に分化する能力を持った造血系幹細胞と、様々な結合組織や臓器に分化する能力を持った間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)が含まれている^{1,2)}。この間葉系幹細胞は、脂肪細胞、筋芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などに分化する能力を持つ線維芽細胞様細胞である³⁾。我々は新鮮な骨髄と多孔性ハイドロキシアパタイトセラミックとの合成体をラットの背部皮下に移植すると、良好な骨形成がおこることを報告した⁴⁾。しかし、この方法をそのまま骨再生に用いるには多量の新鮮骨髄液が必要となり、骨髄細胞の骨再生能力を増幅する過程を加えた方が、より臨床応用に則したものになると考えられた⁵⁾。そこで我々は培養ヒト間葉系幹細胞の骨再生能について検討し、良好な再生能を有することを明らかにした⁶⁾。また、五島ら^{7,8)}は、ラットの骨髄間葉系細胞を継代培養することによっても、骨髄細胞の骨再生能が増幅することが可能であることを報告している。さらに、Maniopoulos et al.⁹⁾はこの間葉系細胞を dexamethasone (Dex)などの存在下で培養することにより、骨基質によく似た石灰化結節を形成できることを報告している。この培養組織は、形態学的、生化学的、物理化学的、遺伝子発現的にも骨としての性格を有することが証明されている^{10,11,12,13)}。我々は、この培養骨組織を多孔性ハイドロキシアパタイト(HA)と複合して生体へ移植すると、速やかに骨が再生され、移植後長期間骨再生能が維持され、より自家骨に近い培養人工骨が作製されることを明らかにした^{14,15,16,17,18)}。以上の研究成果により、分化因子や培養技術を生体材料と複合することで、骨髄細胞の骨再生能を十分に増幅可能であることが明らかになり、臨床での骨再生治療への応用が期待されている。

一方、細胞の冷凍保存技術も進歩し、半永久的な保存が可能となってきた。冷凍保存は、藤ランゲルハンス島、血液、骨髄細胞、精子などを含めた多くの組織や細胞の長期保存のためにすでに臨床応用されている¹⁹⁾。細胞を冷凍保存することにより、細胞の老化を止め、細胞の運搬、細胞治療の時期を自由に計画できる。

本研究では、骨髄間葉系細胞による骨再生の治療の応用をさらに広げるために、冷凍保存技術を併用した骨再生の検討をおこなった。

材料と方法

冷凍保存骨髄細胞の準備

Fischer 344, 7週令雄性ラットの大腿骨を無菌的に採取、両骨端を切断し、21ゲージ針を挿入、標準培養液(standard culture medium; SCM)で骨髄を押し出して細胞を採取した。15%牛胎児血清(ICN Biomedicals Japan Co. Ltd.)、抗生剤(100U/ml penicillin, 100-g/ml streptomycin, 0.25-g/ml amphotericin B; Sigma)を含むEagle minimal essential medium (MEM) (阪大微研)をSCMとした。採取した骨髄をT-75 flask (COSTAR)に集め、15mlのSCMで24時間培養した後、接着細胞を残し浮遊細胞を除去した。得られた培養細胞は、37℃、湿度100%、5%CO₂の条件下で維持し、SCMは週3回の割合で交換した。10日間の培養の後、0.1%トリプシン処理により接着した培養細胞を浮遊させた。次に、浮遊細胞液を900 rpm, 5分間、室温にて遠心、細胞成分を分離し、細胞保存液1mlあたり10⁶個に調整した。1mlずつに分けたものを、まず-4℃で1時間、次いで-20℃で1時間冷凍した後に、-196℃(液体窒素)で急速に冷凍した。この状態で約3ヶ月間液体窒素内で冷凍保存した。細胞保存液には10% dimethylsulfoxide (DMSO)と20%牛胎児血清からなるMEMを用いた。

冷凍保存骨髄細胞は室温で急速解凍した。また、冷却・保存・解凍期間中に失活したと考えられる細胞を除去するために、解凍した冷凍保存骨髄細胞をT-75 flaskに播種、15mlのSCMで24時間培養後、接着細胞を残し浮遊細胞を洗い流した。

培養皿での冷凍保存骨髄細胞の培養

冷凍保存骨髄細胞の骨形成能を確認するために、これらの細胞を培養してalkaline phosphatase (ALP)染色をおこなった。細胞を100 × 10³個/35 mm²の密度で組織培養プレート(Falcon)に播種し、2週間培養した。2次培養は、2mlのSCMに10mM Na β-glycerophosphate, 82 μg/ml vitamin C phosphate (L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate)を加え、さらに骨形成能を増幅する10⁻⁸M Dexを加える群(Dex(+))と加えない群(Dex(-))に分けた。週に3回培養液を交換しながら、2週間培養をおこなった。この培養細胞にnaphthol-AS-MX phosphate sodiumとfast red violet Bを用

いて、既報告²⁰⁾にしたがいALP染色を施した。

多孔性HA内での冷凍保存骨髄細胞の培養

骨髄細胞・セラミック合成体ブロックを用いて培養骨移植をおこなった。冷凍保存骨髄細胞の培養は、既報¹⁴⁾に準じて多孔性ハイドロキシアパタイト(HA)の中でおこなった。簡単に述べると、HAブロック(Interpore 500, 5×5×5mm³, 気孔率66%, 立方体, Interpore, USA)を4mlの冷凍保存骨髄細胞の浮遊液の中で5%CO₂下で2時間培養し、10mM Na β-glycerophosphate, 82μg/ml vitamin C phosphate (L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate)を添加した。さらに骨形成能を増幅させる目的で10⁻⁸MのDexを加える群(Dex(+))と加えない群(Dex(-))に分けた。週に3回培養液を交換し、細胞・セラミック合成体ブロック(composite)を2週間培養した。培養後4つのブロックを同系統Fischerラットの背部皮下の4カ所に移植したが、このうち2つのcompositeはDex(+)とし、残りの2つのcompositeはDex(-)とした。移植したcompositeは2週目と4週目に採取した。Compositeは脱灰後、通常のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色をおこなった。

ALP活性の測定

抽出した移植 composite を 1 ml の 0.2% Nonidet P 40 の中でマイクロ粉砕器でホモジネートした。これを13,000rpm, 10分間遠心分離し、この上清を酵素液としALP活性の測定をおこなった。方法は既報^{14, 21)}のごとくであるが、以下に簡単に述べる。この上清を p-nitrophenylphosphate を基質とした assay buffer に 37℃ で反応させ、30分後に 0.2N の NaOH で反応を停止させた。

この optical density (410nm) 値を測定し、ALP 活性を測定した。

Osteocalcin の測定

Osteocalcin は 0.2% Nonidet P40 を用いた沈殿物に 20% 蟻酸を 10ml 加えて約 2 週間、4℃ で振盪して抽出した。そのうち 2 ml の蟻酸抽出物をカラム(Ampure™ SA; Amersham Japan, Japan)で精製し、10% 蟻酸で抽出した。これらから蛋白分画を収拾し、凍結乾燥の後、太田らの方法²²⁾により ELISA 法を用いて intact osteocalcin の測定をおこなった。

Northern hybridization

Total RNA を ISOGEN (Nippon gene, Japan) を用いて説明書にしたがって抽出した。RNA (10μg per lane) は 1% agarose-formaldehyde gel を通して電気泳動をおこない、nylon membrane にプロットした。これを³²Pでラベルした osteocalcin と alkaline phosphatase の cDNA の存在下に hybridization をおこなった²³⁾。簡単に述べると、68℃, QuickHyb™ (Strata Gene, USA) の存在下に prehybridization と hybridization をそれぞれ 30 分間および 120 分間おこなった。Hybridization 後は 2 × SSC 溶液 (0.15 M NaCl, 0.015 M trisodium citrate, pH 7.0) と 0.1% SDS 溶液 (sodium dodecyl/sulfate) で membrane を洗浄した。Membrane を IM plate (Fuji Film) に転写し、MacBas (Fuji Film) を用いて解析した。

結 果

Dex の存在下に培養した冷凍保存骨髄細胞は、2週間 で多数の石灰化細胞結節を形成した。また、この石灰化細胞結節は ALP 染色で染色され(Fig. 1), ALP 活性すな

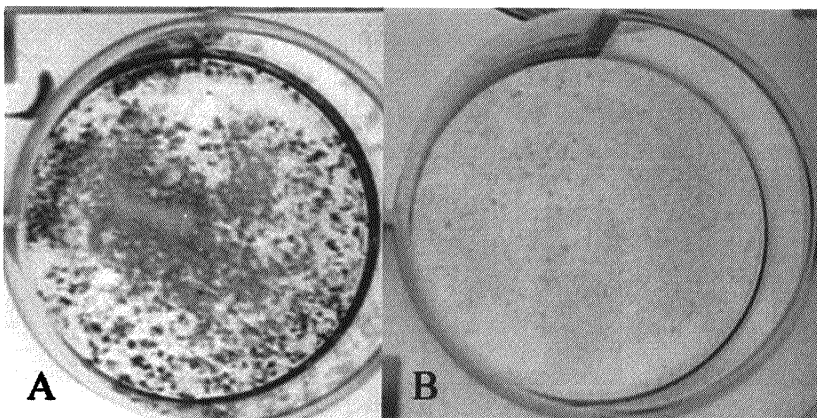


Fig.1. Alkaline phosphatase staining A ; Dex(+), B ; Dex(-)

わち骨芽細胞活性が高いことが明らかになった。以上の *in vitro* での結果は、冷凍によって骨髄間葉系細胞の骨芽細胞への分化能が損なわれないことを示すものと考えられた。

また、HA と混和し Dex (+) で培養し移植し作製した培養人工骨では、移植後2週間目の脱灰HE標本 (Fig. 2) で、HA 気孔内表面に接して成熟した層板骨がみられ、その表面では骨形成を営む骨芽細胞が多数認められた。4週ではさらに旺盛な骨形成像がみられ、骨組織内には、骨髄様組織も散見された。Control 群 (Dex (-)) では、組織学的には骨形成を確認し得なかった。

Dex の存在下で培養・移植した composite (培養人工骨) の ALP 活性と osteocalcin の量は特徴的な経過を示した。ALP 活性は移植後2週および4週で有意に増加し、吉川ら¹⁰が報告したように2週で最高値を呈した。Osteocalcin は、2週、4週と経時的に増加した。このことから移植後活発な骨形成能が維持されることが明らか

になった (Fig. 3)。

骨芽細胞活性の指標である ALP、および骨組織にもっとも特異的であると考えられている osteocalcin の発現を Northern hybridization で検討した (Fig. 4)。HA と混和し Dex (+) で培養し移植した composite では、移植後2週で、ALP および osteocalcin の mRNA の発現が確認されたが、Dex (-) の composite では、発現はみられなかった。移植後4週では Dex (+)、Dex (-) ともに ALP および osteocalcin の mRNA の発現がみられたが、Dex (+) で発現量は多かった。以上の移植実験での組織学的、生化学的、遺伝子発現の結果は、冷凍保存細胞により作製された培養人工骨が活発な骨再生能力を有することを示していると考えられた。

考 察

液体窒素中に3ヶ月間保存した骨髄細胞を解凍し培養したところ、冷凍保存骨髄細胞は新鮮な細胞と同等に分

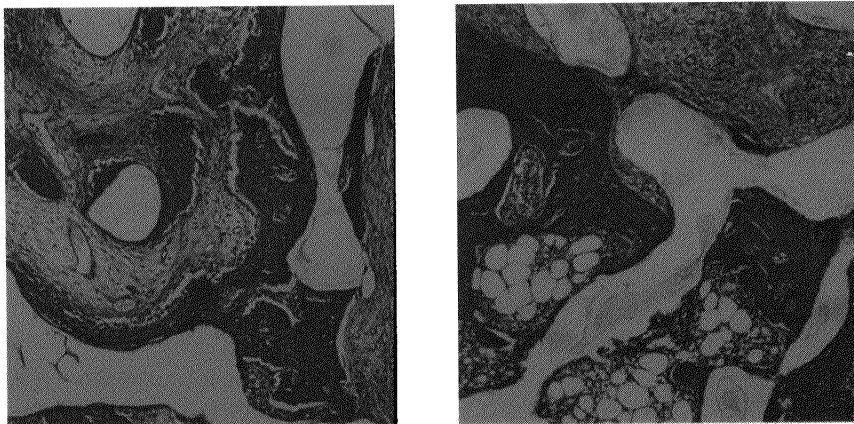


Fig. 2. Histology of cryopreserved marrow cells/ceramic composites A ; 2 weeks after implantation, B ; 4 weeks after implantation

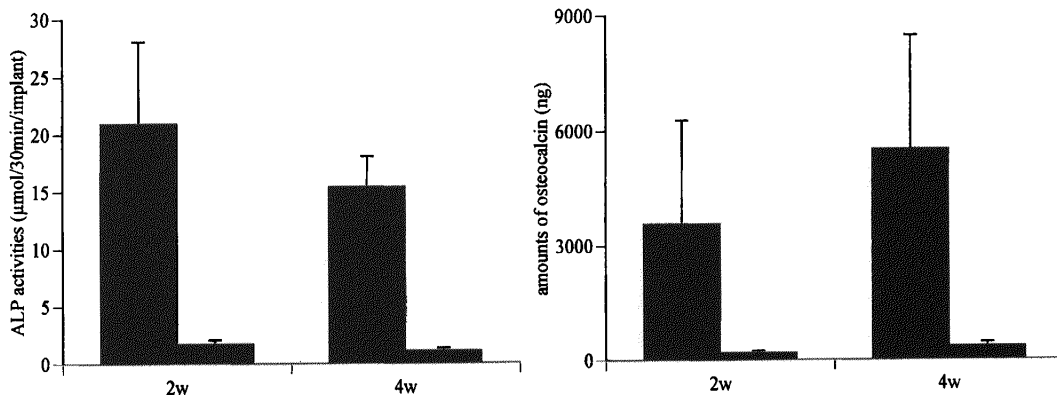


Fig. 3. ALP activities and amounts of osteocalcin left column : Dex (+), right column : control (mean ± S. D.)

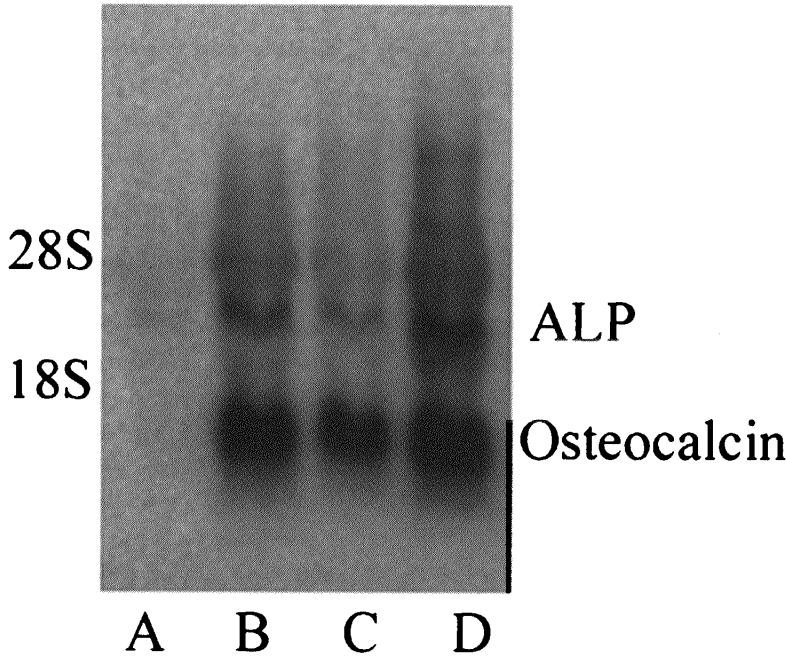


Fig. 4. Northern hybridization
 A ; Dex (-), 2 weeks, B ; Dex (+), 2 weeks
 C ; Dex (-), 4 weeks, D ; Dex (+), 4 weeks

化, 増殖する能力を示した. また, 冷凍保存細胞によって作製した培養人工骨を, 同系ラットの背部皮下に移植しても, 新鮮な骨髄細胞を移植した場合と同様に, 良好な骨基質がHA気孔内に形成され, 骨芽細胞がみられた. 骨形成能の定量的な指標である ALP 活性や osteocalcin 量の測定結果は, 以前に吉川ら¹⁴⁾が報告した, 新鮮培養骨髄細胞によって作製した培養人工骨の移植後2週, 4週の成績と比べるとほぼ同等もしくはやや高い値を示し, 移植後高い骨芽細胞活性を有する培養人工骨が作製可能であることが本実験から明らかになった. なお, このことは骨芽細胞のマーカー遺伝子である ALP および osteocalcin 遺伝子の発現によっても確認された.

冷凍保存は, 多くの哺乳類の組織や細胞の長期保存のためにすでに臨床でも多く用いられている方法である. しかし, 冷凍する過程, 冷凍期間中, 解凍する過程において, 細胞に傷害がおこることも知られている²⁴⁾. 本研究では, 骨髄細胞を急速冷凍および解凍して実験をおこなったが, 冷凍期間中の細胞の傷害および生存率を検討するためには, 他の冷凍方法と比較検討する必要がある. しかし, 今回の簡易な方法でも骨形成能は十分保たれることが明らかになったことは, 今後の研究に役立つものと考えられる.

今回の移植実験はラットを用いておこなったが, 最近

ではヒトの新鮮骨髄細胞を Dex の存在下に培養すると, ラットと同様に骨様組織が形成されることが報告^{25, 26)}されている. さらにヒト骨髄間葉系細胞は, in vitroでの解析により, 冷凍によって細胞活性が低下することはなく, 分化能が維持されることが報告されている²⁷⁾. これらのことから, ヒトの冷凍保存された培養細胞の移植でも, 今回の実験と同様に骨組織が形成される可能性は高く, 自家骨髄細胞移植は骨欠損治療, 自家骨移植の有用な一手法となり得ると考えられる.

また, 骨髄細胞も老化によって骨の再生能力が低下する²⁸⁾が, 冷凍保存により細胞の老化を防ぐこともできる. これを利用して若い健康な時期に骨髄を採取し, 骨髄間葉系細胞を増殖させて冷凍保存しておき, 高齢になったとき自らの若い活性の高い細胞で組織の再生治療をおこなうことが可能である. これにより通常の治療より早い回復が期待できる. このことから, 細胞銀行構想も考えられる.

現在, 骨移植には, 自家骨を用いる方法, 同種骨(銀行骨)を用いる方法, 人工骨材料を用いる方法が一般的におこなわれている. 同種骨を用いる方法では, 骨量は十分に得られるが, 免疫的に拒絶を示す症例もあり満足な結果が得られない場合が多い. また, 供給者のもつ感染症が伝染する危険性もある. 人工骨材料を用いる方法

では、近年、生体親和性のよい材料が開発されつつあるものの、生体にとっては基本的には異物であり、また、それ自体骨形成能力をもつことはなく、複雑な生体の機能ももたない。このような免疫拒絶、感染症、骨再生能力、異物反応などの問題を考慮すると、自らの骨を移植するのが理想的であり、臨床的にも最も良好な結果が得られている。しかし、採取できる骨の量には限界があり、広範な骨欠損を自家骨で再建することは不可能である。また、正常な骨組織、軟部組織を傷つけることになる。したがって、培養技術により体外で自家骨が作製できれば、正常な組織を傷つけることなく、広範に欠損した骨組織の修復も可能になると考えられる。

骨髄間葉系細胞の採取は、組織片からの細胞採取に比べると、採取後の止血処置や皮膚縫合処置、組織の細片化後のコラーゲンナーゼ処理やフィルター処理など複雑な操作を必要としない。腸骨穿針により細胞浮遊液の状態が得られ、容易に培養できる。ES細胞のような倫理的問題も少なく、特殊な培養皿や増殖因子も必要とせず、技術的にも比較的簡便で安価に培養増殖が可能である。骨髄間葉系細胞は、骨、筋肉、線維組織および神経などの非上皮性の組織の再生能力にすぐれていることから、現在のところ再生医療では、もっとも実際的で有用な細胞として注目されている。さらに、培養によって増殖した骨髄細胞の冷凍保存が可能になれば、培養骨移植は患者の状態等による時間的な制約が軽減され、より臨床に則したものとなると考えられる。

結 語

冷凍保存骨髄細胞の骨形成能が新鮮な骨髄細胞に匹敵することが示唆され、今後培養骨移植の多様な臨床応用に向けた研究が期待される。

文 献

- Owen, M. : Marrow stromal stem cell. J. Cell Sci. Supplement 10 : 63-78, 1988.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284 : 143-147, 1999.
- Ohgushi, H. and Caplan, A. I. : Stem Cell Technology and Bioceramics: From cell to gene engineering J. Biomed. Mat. Res. 48 : 913-927, 1999.
- Ohgushi, H., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I. : Heterotopic Osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. J. Orthop. Res. 7 : 568-578, 1989.
- Yoshikawa, T. : Bone reconstruction by cultured bone graft. Mat. Sci. Eng. C-Biomim. 13: 29-37, 2000.
- Ohgushi, H. and Okumura, M. : Osteogenic ability of rat and human marrow cells in porous ceramics. Acta Orthop. Scand. 61 : 431-434, 1990.
- Goshima, J., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I. : The osteogenic potential rat marrow mesenchymal cells assayed *in vivo* in calcium phosphate blocks. Clin. Orthop. Res. 262 : 298-311, 1991.
- Goshima, J., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I. : Osteogenic potential of culture-expand rat marrow cells as assayed *in vivo* with porous calcium phosphate ceramic. Biomaterials 12 : 253-259, 1991.
- Maniopoulos, C., Sodek, J. and Melcher, A. H. : Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res. 254 : 317-330, 1988.
- Davies, J. E., Chernenky, R., Lowenberg, B. and Shiga, A. : Deposition and resorption of calcified matrix *in vitro* by rat marrow cells. Cells Mater. 1 : 3-15, 1991.
- Yao, K-L., Todescan, R. Jr. and Sodek, J. : 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, 1994.
- Ohgushi, H., Dohi, Y., Kaduda, T., Tamai, S., Tabata, S. and Suwa, Y. : In vitro bone formation by rat marrow cell culture J. Biomed. Mat. Res 32 : 333-340, 1996.
- Yoshikawa, T., Peel, S. A., Gladstone, J. R. and Davies, J. E. : Biochemical analysis of the response in rat bone marrow cell cultures to mechanical stimulation. Biomed. Mater. Eng. 7 : 369, 1997.
- Yoshikawa, T., Ohgushi, H. and Tamai, S. : Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. J. Biomed. Mat. Res. 32 : 481-492, 1996.
- Yoshikawa, T., Ohgushi, H., Dohi, Y. and

- Davies, J. E. : Viable bone formation in porous hydroxyapatite : marrow-derived *in vitro* bone on the surface of ceramics. *Biomed. Mater. Eng.* **7** : 49-58, 1997.
- 16) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., Nakajima, H., Yamada, E., Ichijima, K., Tamai, S. and Ohta T. : In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics (A novel method to autogenous bone graft substitute). *Transplantation* **69** : 128-134, 2000.
- 17) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., Uemura, T., Nakajima, H., Ichijima, K., Tamai, S. and Tateishi, T. : Human marrow cells-derived cultured bone in porous ceramics. *Biomed. Mater. Eng.* **8** : 311-320, 1998.
- 18) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., Akahane, M., Tamai, S., and Ichijima, K. : Analysis of gene expression in osteogenic cultured marrow/hydroxyapatite construct implanted at ectopic sites: a comparison with the osteogenic ability of cancellous bone. *J. Biomed. Mater. Res.* **41**, 568-573, 1998.
- 19) Farrant, J. : *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. Pitman Medical, p 1-18, 1980.
- 20) Ohgushi, H., Dohi, Y., Yoshikawa, T., Tamai, S., Tabata, S., Okunaga, K. and Shibuya, T. : Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. *J. Biomed. Mat. Res.* **32** : 341-348, 1996.
- 21) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., Okumura, M., Tamai, S., Dohi, Y. and Moriyama, T. ; Biochemical and histological sequences of membranous ossification in ectopic site. *Calcif. Tissue Int.* **50** : 184-188, 1992.
- 22) Ohta, T., Azuma, Y., Kiyoki, M., Eguchi, H., Arita, M., Hosoda, K., Tsukamoto, Y. and Nakamura, T. : Measurement of intact rat osteocalcin in osteoblast (ROS17/2.8) cells and in ovariectomized rats with a sandwich enzyme immunoassay. *Calcif. Tissue Int.* **59** : 283-290, 1996.
- 23) Ohgushi, H., Dohi, Y., Tamai, S. and Tabata, S. : Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* **27** : 1401-1407, 1993.
- 24) Gao, D. and Critser, J. K. : Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar. J.* **41** : 187-96, 2000.
- 25) Cheng, S. L., Yang, J. W., Rifas, L., Zhang, S. F. and Avioli, L. V. : Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* **134** : 277-86, 1994.
- 26) Majors, A. K., Boehm, C. A., Nitto, H., Midura, R. J. and Muschler, G. F. : Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J. Orthop. Res.* **15** : 546-57, 1997.
- 27) Bruder, S. P., Jaiswal, N. and Haynesworth, S. E. : Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell Biochem.* **64** : 278-94, 1997.
- 28) Inoue, K., Ohgushi, H., Yoshikawa, T., Okumura, M., Sempuku, T., Tamai, S. and Dohi, Y. : The effect of aging on bone formation in porous hydroxyapatite: biochemical and histological analysis. *J. Bone Miner. Res.* **12** : 989-94, 1997.