

## 養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名：廣瀬志弘

2. 養成カリキュラム名：「バイオマテリアル利用組織形成技術」

3. 養成カリキュラムの達成状況

フェローの廣瀬志弘は養成カリキュラム「バイオマテリアル利用組織形成技術」に従い、骨髄に由来する未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞へ分化させる技術とその生物学的機能評価法の確立をおこなった。この手法により、再生医療を支援する組織工学の分野で顕著な成果を残した。この成果をもとに、ティッシュエンジニアリング研究センターでは大学病院などと共同し、変形性足関節症、良性骨腫瘍などの患者に対し、30例を超える臨床応用をおこなった。以上の観点から、フェローのカリキュラム達成状況は非常に高度であると認められる。

4. 成果（A4版3枚程度）

1. 研究開発業務の概要

私は、独立行政法人 産業技術総合研究所 ティッシュエンジニアリング研究センターにおいて、ヒトおよび小動物の骨髄細胞に由来する未分化間葉系細胞を生体外で骨芽細胞に分化させる組織工学的技術により、骨欠損部や人工関節置換術を含む様々な治療に利用可能な医療用デバイスの研究開発をおこなった。組織工学を基礎とする細胞を用いた再生医療技術の発展には、信頼性の高い分析技術に基づき分離された生存率および分化度の高い培養細胞の効果的な利用技術の開発が必須である。最近、骨髄中には造血系のみならず多種組織の機能細胞に分化する幹細胞が存在していることが報告され、骨芽細胞や軟骨細胞に分化する間葉系幹細胞も骨髄中に含まれていることが分かってきた。ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞から生体外で分化させた骨芽細胞を効率的に分取する技術が開発できれば、骨欠損部や人工関節置換術を含む様々な治療に利用可能な医療用デバイスの開発が急速に進展するものと考えられる。また、このような培養細胞の担体として、セラミックスや生分解性ポリマーなどの生体親和性材料（バイオマテリアル）が頻用され始めている。

以上の背景のもと、私は、2001年4月に設立された当研究センターにおいて、「バイオマテリアル利用組織形成技術」をカリキュラムとする研究開発に着手した。治療効果の高い再生培養骨組織作製を目的に、ヒト間葉系幹細胞から生体外で分化させた骨芽細胞を、高い生存率と分化能を保持させたまま大量に獲得できる技術の獲得、ならびに研究開発に着手した。1. ヒト骨髄細胞から分化誘導した骨芽細胞の再現性の高い分化活性測定法の開発。2. 分化マーカーを利用したヒト骨芽細胞の高効率分取法の開発。3. 凍結保存継代培養ヒト間葉系幹細胞の解凍後の生存率と骨芽細胞への分化活性の測定。4. ヒト間葉系幹細胞の培養担体としての人工細胞外マトリックスの効果の検討。を行った。

2. 成果の概要

1. ヒト骨髄細胞から分化誘導した骨芽細胞の再現性の高い分化活性測定法の開発

組織工学を基礎とする培養細胞を用いた再生医療技術の発展には、信頼性・再現性の高い分析・解析技術の開発が必須である。骨芽細胞の機能評価系としては、ALP活性の測定に代表される生化学的解析法は確立されつつあるが、その「骨」としての機能である石灰化能の測定法に関しては、いまだ十分な手法は開発されていない。私は、骨芽細胞の活性の一つである骨基質産生能の程度を、カルシウム親和性蛍光色素であるカルセインを利用して測定する手法を開発した。また、カルシウム親和性蛍光色素であり、カルセインとは異なる励起波長で蛍光を発するキシレノールオレンジを併用した培養骨芽細胞による新規石灰化定量法を開発した。

骨芽細胞株および骨髄細胞由来の未分化間葉系細胞を骨芽細胞へと分化誘導する培養系にキシレノールオレンジを添加した後、細胞外基質に沈着したキシレノールオレンジの蛍光強度を蛍光イメージアナライザーで測定することにより、骨芽細胞によるカルシウム沈着（骨形成）の程度を定量した。蛍光色素存在下でも、骨芽細胞の細胞増殖や ALP 活性は変化しなかったことから、これら蛍光色素は骨芽細胞の石灰化能に影響を与えないことが確認された。両蛍光色素ともアリザリンレッド S と同様の部位に沈着すること、石灰化を起こさないヒト線維芽細胞と比べてその蛍光強度は培養 14 日目で 100 倍以上であったことから、これらの蛍光色素は石灰化部位特異的に取り込まれることが判明した。本手法は、アリザリンレッド S 染色のような細胞固定を必要としないため、石灰化測定後も継続的に細胞培養が可能であり、同一細胞群による骨形成を経時的に追跡できる大きな利点を持つ。また、元素分析分光計により測定した培養骨芽細胞の細胞外基質に沈着したカルシウム量と蛍光色素の蛍光強度との間には相関関係があったことから、本手法は、石灰化基質中のカルシウムを精度良く定量できる方法であることが判明した。

以上のことから、カルセインおよびキシレノールオレンジを用いた骨形成・石灰化定量法は、培養骨芽細胞による石灰化測定の新たな手法であり、移植用再生培養骨組織の生物機能をバリデーションするための標準技術になると考えられる。

## 2. 分化マーカーを利用したヒト骨芽細胞の高効率分取法の開発

近年、様々な組織幹細胞の存在が明らかにされるにつれ、これらの幹細胞の同定・精製方法に加え、培養方法や目的とする細胞へと分化させる方法など、再生医療を支援する様々な再生医工学・組織工学技術の開発が進んできている。その中でも、フローサイトメトリー (FCM)・セルソーティングは、目的の細胞を分析・分取するための強力な手法である。このような背景のもと、私は、骨髄細胞に含まれる接着性細胞のヒト未分化間葉系細胞の骨型アルカリフォスファターゼ (ALP) 発現を指標にした FCM 解析系を構築し、骨芽細胞に分化する細胞を高効率で分取する技術の開発をおこなった。分取した ALP 発現陽性細胞を再培養し、その細胞による骨組織形成能を生化学的、細胞生物学的に解析した。ALP 発現陽性細胞と ALP 発現陰性細胞をセルソーターで分取後、再び培養皿に播種したところ、両細胞集団とも培養皿表面上で接着・増殖することが観察され、再培養が可能であることが確認された。再培養後 12 日目に ALP 発現量および ALP 活性値を定量したところ、分取操作をおこなわなかった細胞と比較して、ALP 発現陽性細胞は約 2 倍の発現量と活性値を示した。一方 ALP 発現陰性細胞は、全く ALP の発現と活性が観察されなかった。また新規に開発した、カルシウム親和性蛍光色素を用いた培養細胞による骨形成のモニタリングシステムにより、両細胞群による石灰化の程度を定量したところ、再培養後 12 日目において分取操作をおこなわなかった細胞と比較して、ALP 発現陽性細胞は約 1.7 倍の蛍光強度を示した。一方 ALP 発現陰性細胞は全く蛍光強度が測定されなかった。光学顕微鏡観察により、ALP 発現陽性細胞は、その細胞外マトリックスに骨基質を沈着する様子が認められた。さらに骨芽細胞の後期分化マーカーとして知られるオステオカルシンの発現を調べたところ、ALP 発現陽性細胞は、分取操作をおこなわなかった細胞の 9 倍以上の発現活性を示した。

以上のことから、ヒト骨髄細胞から骨芽細胞に分化する能力を有した細胞を効率的に分取する一手法が確立でき、高効率の再生培養骨組織の作製が可能であることが分かった。

## 3. 凍結保存継代培養ヒト間葉系幹細胞の解凍後の生存率と骨芽細胞への分化活性の測定

培養細胞を臨床に用いるには、生体組織と同程度の細胞密度を実現できる多量の細胞数を確保することが重要である。ヒト新鮮骨髄由来の間葉系幹細胞のみならず、継代培養で増殖させた間葉系幹細胞を凍結保存し、必要なときに利用可能であるなら、再生骨組織構築のための有用な細胞ソースが確保できることになる。継代培養で増殖させた後、冷凍保存したヒト骨髄間葉系幹細胞に関して、解凍直後に生細胞に特異的な活性である細胞内エステラーゼ活性を有する細胞を計数したところ、98%の細胞が陽性であった。骨芽細胞への分化誘導条件で 21 日間培養後でも、新鮮骨髄由来の間葉系幹細胞と同程度のカルセイン取り込み活性を有していたことから、冷凍保存継代培養ヒト間葉系幹細胞は、高い生存率と骨芽細胞への高い分化能を保持していることが判明した。

## 4. ヒト間葉系幹細胞の培養担体としての人工細胞外マトリックスの効果の検討

高度な分化機能を示す細胞が大量に得られる細胞培養床を開発できれば、細胞を利用した再生医療用デバイスの開発が急速に進展する。細胞外マトリックスタンパク (ECM) は細胞外からの細胞機能制御因子で、

機能性バイオマテリアルとして注目されているおり，細胞を分化誘導して組織を形成させるために必要な，細胞の足場としての培養担体（スキャホールド）になりうるとの知見が蓄積してきている．オートクレーブでの滅菌が可能である利点を有し，安全な再生医療用デバイスの基盤材料になるものと期待されているフィブロネクチン分子中の細胞接着活性本体である RGD 配列をフィブロイン骨格に遺伝子工学的に高効率で組み込んだ人工細胞接着因子（プロネクチン F<sup>TM</sup>）のヒト間葉系幹細胞の培養担体としての有用性を *in vitro* で骨形成を指標に評価した．コントロールには，培養基質として汎用される I 型コラーゲンをを用いて比較検討した．プロネクチン F<sup>TM</sup> をコートした培養皿上へのヒト間葉系幹細胞の接着数は，I 型コラーゲンをコートした培養皿上への接着数と同程度であった．骨芽細胞への分化を誘導する培養系にカルセインを添加し，細胞外基質に沈着したカルセインの蛍光強度を蛍光イメージアナライザーを用いて経日的に *in situ* で測定したところ，培養 14 日目からプロネクチン F<sup>TM</sup> をコートした培養皿上での石灰化が顕著になり，培養 20 日目では，I 型コラーゲンをコートした培養皿上の 1.5 倍に達した．プロネクチン F<sup>TM</sup> は，ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進する細胞外マトリックスであることが判明した．

## 5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表（論文掲載済、または査読済を対象。）

Motohiro Hirose, Noriko Kotobuki, Hiroko Machida, Eiichiro Uchimura, and Hajime Ohgushi;  
Quantitative Monitoring of *In Vitro* Mineralization Process Using Fluorescent Dyes  
*Key Engineering Materials*, **240**, 715-718 (2003)

Noriko Kotobuki, Motohiro Hirose, Hiroyuki Funaoka, and Hajime Ohgushi;  
Flowcytometric Analysis of Human Osteoblastic Cells Expressing Bone Specific Alkaline Phosphatase  
*Key Engineering Materials*, **240**, 729-732 (2003)

Mitsuhiro Ebara, Masayuki Yamato, Motohiro Hirose, Takao Aoyagi, Akihiko Kikuchi, Kiyotaka Sakai, and Teruo Okano;  
Copolymerization of 2-Carboxyisopropylacrylamide with *N*-Isopropylacrylamide Accelerates Cell Detachment from Grafted Surfaces by Reducing Temperature  
*Biomacromolecules*, **4**, 344-349 (2003)

Shinji Higashiyama, Megumi Noda, Satoko Muraoka, Motohiro Hirose, Hajime Ohgushi, Masaya Kawase, and Kiyohito Yagi;  
Transplantation of Hepatocytes Cultured on Hydroxyapatite into Nagase Analbuminemia Rats  
*Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96**, 83-85 (2003)

Eiichiro Uchimura, Hiroko Machida, Noriko Kotobuki, Takanori Kihara, Shigeyuki Kitamura, Masako Ikeuchi, Motohiro Hirose, Jun Miyake, and Hajime Ohgushi;  
*In-Situ* Visualization and Quantification of Mineralization of Cultured Osteogenic Cells  
*Calcified Tissue International*, **73**, 575-583 (2003)

Motohiro Hirose, Noriko Kotobuki, Hiroko Machida, Shigeyuki Kitamura, Yoshinori Takakura, and Hajime Ohgushi;  
Osteogenic Potential of Cryopreserved/Thawed Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells  
*Key Engineering Materials*, **254**, 1051-1054 (2004)

Noriko Kotobuki, Motohiro Hirose, Yoshinori Takakura, and Hajime Ohgushi;  
Cultured Autologous Human Cells for Hard Tissue Regeneration: Preparation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow  
*Artificial Organs*, **28**, 33-39 (2004)

Shigeyuki Kitamura, Hajime Ohgushi, Motohiro Hirose, Hiroyuki Funaoka, Yoshinori Takakura, and Hiromoto Ito;

Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells Cultured on Alumina Ceramics  
*Artificial Organs*, **28**, 72-82 (2004)

Motohiro Hirose, Noriko Kotobuki, Hiroko Machida, Shigeyuki Kitamura, Hajime Ohgushi, and Tetsuya Tateishi;  
Osteogenic Potential of Cryopreserved Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells after Thawing in Culture  
*Materials Science and Engineering C*, **24**, 355-359 (2004)

廣瀬志弘, 大串 始  
自己幹細胞移植を用いた人工関節  
整形・災害外科, **45 (10)**, pp. 1013-1017 (2002)

廣瀬志弘, 大串 始  
自己培養間葉系細胞を用いた骨関節疾患の治療  
日本内科学会誌, **92 (9)**, pp. 173-177 (2003)

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

廣瀬志弘, 寿 典子, 町田浩子, 大串 始  
ヒト骨髄間葉系幹細胞のカルセイン取込みによる viability 判定 (特に冷凍保存細胞に関して)  
第1回産業技術総合研究所・生命工学部会バイオテクノロジー研究会 (産業技術総合研究所つくばセンター) : 2002年2月

廣瀬志弘, 寿 典子, 町田浩子, 内村英一郎, 大串 始  
培養骨芽細胞のカルシウム親和性蛍光色素を用いた新規石灰化測定法  
第55回日本細胞生物学会大会 (横浜国際会議場) : 2002年5月

廣瀬志弘, 寿 典子, 町田浩子, 内村英一郎, 大串 始  
カルシウム親和性蛍光色素を用いた培養骨芽細胞による石灰化のモニタリング  
第24回日本バイオマテリアル学会大会 (早稲田大学国際会議場) : 2002年11月

Motohiro Hirose, Noriko Kotobuki, Hiroko Machida, Eiichiro Uchimura, and Hajime Ohgushi;  
Quantitative Monitoring of *In Vitro* Mineralization Process Using Fluorescent Dyes.  
15th International Symposium on Ceramics in Medicine, Bioceramics 15 (Sydney, University of Technology Sydney, Australia); December 2002

Motohiro Hirose, Noriko Kotobuki, Hiroko Machida, Eiichiro Uchimura, and Hajime Ohgushi;  
Novel *In Situ* Quantitative Method for Mineralization by Cultured Osteoblasts Using Fluorescent Dyes.  
5th International Meeting of the Tissue Engineering Society international (Kobe, International Conference Center Kobe); December 2002

廣瀬志弘, 寿 典子, 町田浩子, 内村英一郎, 大串 始, 立石哲也  
カルシウム親和性蛍光色素を用いた *in situ* 骨形成定量  
第15回バイオエンジニアリング講演会 (大阪大学コンベンションセンター) : 2003年1月

廣瀬志弘, 寿 典子, 町田浩子, 吉田綾子, 内村英一郎, 大串 始  
カルシウム親和性蛍光色素を用いた培養骨芽細胞による石灰化の新規測定法  
日本バイオマテリアル学会特別シンポジウム (鹿児島大学稲盛会館) : 2003年1月

廣瀬志弘, 寿典子, 町田浩子, 池内正子, 北村繁行, 大串 始, 立石哲也  
冷凍保存ヒト骨髄由来間葉系細胞の viability 判定  
第2回日本再生医療学会総会 (神戸国際会議場) : 2003年3月

廣瀬志弘, 池内正子, 寿典子, 土肥祥子, 寺嶋修司, 高倉義典, 大串 始  
不織布フィルターを用いて分離したヒト間葉系細胞による骨形成  
第6回日本組織工学会 (早稲田大学国際会議場) : 2003年6月

廣瀬志弘, 寿典子, 町田浩子, 舟岡宏幸, 吉田綾子, 北村繁行, 木原隆典, 大串 始  
骨髄由来未分化間葉系細胞とバイオセラミックスの複合化による再生培養骨組織の作製  
第52回高分子討論会 (山口大学) : 2003年9月

Motohiro Hirose, Noriko Kotobuki, Hiroko Machida, Shigeyuki Kitamura, Yoshinori Takakura, and Hajime Ohgushi;  
Bone Formation by Cryopreserved Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells on Bioceramics Surfaces.  
8th IUMRS International Conference on Advanced Materials (Yokohama, International Conference Center Yokohama);  
October 2003

廣瀬志弘  
温度応答性ポリマーを用いたティッシュエンジニアリング  
材料科学特論 (北陸先端科学技術大学院大学) : 2003年10月

廣瀬志弘, 寿典子, 町田浩子, 吉田綾子, 大串 始  
カルシウム親和性蛍光色素を用いた培養骨芽細胞による骨形成のモニタリング  
第18回日本整形外科学会基礎学術集会 (北九州国際会議場) : 2003年10月

廣瀬志弘, 寿典子, 町田浩子, 吉田綾子, 木原隆典, 大串 始  
冷凍保存ヒト骨髄由来未分化間葉系細胞による骨形成  
第22回日本運動器移植・再生医学研究会 (千里ライフサイエンスセンター) : 2003年10月

Motohiro Hirose, Noriko Kotobuki, Hiroko Machida, Shigeyuki Kitamura, Yoshinori Takakura, and Hajime Ohgushi;  
Osteogenic Potential of Cryopreserved/Thawed Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.  
16th International Symposium on Ceramics in Medicine, Bioceramics 16 (Porto, Alfundega Congress Center, Portugal);  
November 2003

廣瀬志弘  
再生医療を指向した温度応答性ポリマーを利用したティッシュエンジニアリング  
物質科学特論 IV (奈良先端科学技術大学院大学) : 2003年11月

廣瀬志弘, 寿典子, 町田浩子, 大島 央, 高倉義典, 大串 始  
シンポジウム「間葉系幹細胞を用いた組織構築」  
再生治療に用いられる患者由来間葉系細胞のバリデーション  
第3回日本再生医療学会総会 (幕張メッセ) : 2004年3月

### (3) 特許等

1件