

GMP 基準に準拠したヒト培養自己骨髄間葉系細胞移植による骨増生法

寺本 祐二

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Establishment of bone regeneration system by transplantation of cultured autologous mesenchymal stromal cells originated from human bone marrow in keeping with the Good Manufacturing Practice (GMP)

YUJI TERAMOTO

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

近年、顎骨の骨増生を目的に自家骨移植が行われているが、外科的侵襲が大きいなどの欠点があり、低侵襲性で増骨能が高い再生医療技術としてヒト組織体性幹細胞を用いた骨再生療法が行われつつある。しかし、品質の優れた医薬品を製造するための基準「Good Manufacturing Practice (GMP)」を柱とした「ヒト幹細胞の臨床研究に関する指針（厚生労働省）」に準拠し、細胞調製施設（cell processing center：CPC）を利用した再生医療は未だ確立されていない。そこで、松本歯科大学病院口腔外科（採取施設）で採取した骨髄間葉系細胞を、信州大学医学部附属病院 CPC（細胞調製施設）を利用して培養する骨増生システムを構築することを目的とし、ウサギを用いた骨再生療法のシミュレーションとヒト培養骨髄間葉系細胞移植のドライランを行った。

【対象と方法】

(1) ウサギを用いた培養骨髄間葉系細胞移植のシミュレーション

松本歯科大学動物実験委員会の承認を得て16週齢日本白色種ウサギの脛骨部より骨髄液を採取して初代培養を行った。3週間培養した骨髄間葉系細胞を、 β -リン酸三カルシウム（ β -tricalcium

phosphate：TCP）と多血小板血漿（platelet-rich plasma：PRP）とともにウサギ上顎洞底粘膜拳上部に移植した。血液採取時に分離した PRP のゲル化条件について塩化カルシウムを用いて検討した。分化培地で培養した骨髄間葉系細胞における骨形成マーカー遺伝子の発現は、reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）で検討し、石灰化能はアリザリンレッド染色で検討した。移植後、動物用小線源エックス線 CT 撮影を行い、採取した組織から組織切片を作製し特殊染色を行った。

(2) ヒト骨髄間葉系細胞を用いた骨増生のドライラン

松本歯科大学病院および信州大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得て行った。7名のボランティアから腸骨骨髄液を採取し、CPC で細胞品質検査を行いながら3週間培養した。増殖培地は15%自己血清を含む Minimum Essential Medium Alpha Medium（ α -MEM）とした。骨髄間葉系細胞をフローサイトメトリー細胞表面マーカー、CD 271・CD 105・CD 44を用いて同定し、出庫した細胞の形質、骨関連遺伝子と遺伝子産物の発現および基質の石灰化を、RT-PCR、Real-time PCR およびアリザリンレッド染色で検討し

た。細胞の品質検査は無菌試験，エンドトキシン濃度測定，マイコプラズマ試験を行った。

【結果および考察】

(1) ウサギを用いた培養骨髄間葉系細胞移植のシミュレーション

3週間の培養により骨髄間葉系細胞は約 2×10^6 個に増加した。PRP と塩化カルシウムを混合して細胞の保持が可能なゲルが形成された。デキサメタゾンと β -グリセロリン酸を添加して培養した細胞はI型コラーゲン (COL-I)，オステオカルシン (OCN) 遺伝子の発現が亢進した。分化培養した骨髄間葉系細胞はアリザリンレッド染色が陽性となり骨芽細胞形質を獲得した。動物用小線源エックス線 CT 像では β -TCP が移植部に局在が観察され，同部の組織標本から細胞外基質の形成と石灰化の亢進が観察された。

(2) ヒト骨髄間葉系細胞を用いた骨増生のドライラン

細胞増殖能には個人差があるものの GMP 基準

下で約 1×10^7 個の骨髄間葉系細胞を得ることが可能であった。出庫した骨髄間葉系細胞を松本歯科大学病院で分化培養を行ったところ，デキサメタゾンと β -グリセロリン酸を添加して培養すると骨芽細胞様細胞の形質を獲得した。骨芽細胞分化培地で培養した骨髄間葉系細胞では，ALP，OCN，COL-I および Runx 2 の発現がみられ，アリザリンレッド陽性の石灰化結節が観察された。骨髄間葉系細胞をインプラント体，生体吸収性メンブレン， β -TCP の存在下で培養したところ，細胞の増殖に変化はみられなかった。骨髄液採取・搬送ならびに細胞調製の過程でマイコプラズマ，細菌およびエンドトキシンは検出されなかった。

以上の結果から，ウサギの脛骨骨髄液を用いた骨増生のシミュレーションとヒト腸骨骨髄液を用いた細胞移植のドライランの結果から，外部施設と CPC が協力して骨再生療法を地域医療に適用することが可能であると考えられた。