



「自家骨髄間葉系幹細胞－磁気ビーズ」複合体  
及び磁性体リポソームを用いた四肢再生

16209045

平成16年度～平成19年度 科学研究費補助金（基盤研究（A））研究成果報告書

平成20年5月

研究代表者 越智 光夫  
(広島大学病院 教授)





## 目 次

はしがき	1
研究組織	1
交付決定額	1
研究発表	1
(1) 雑誌論文	1
(2) 学会発表	3
(3) 図 書	20
研究成果による産業財産権の出願・取得状況	20
研究成果	21
1) 生体に安全な「細胞の磁気標識法」の研究	21
I) 磁性体リポソームを使用した磁気標識法	21
II) 磁気ビーズを使用した磁気標識法	21
III) Ferumoxides を使用した磁気標識法	22
2) 外磁場発生装置の開発	23
3) 薬剤のデリバリーに関する研究	24
4) 関節軟骨欠損に対する幹細胞デリバリーシステム	25
5) 脊髄損傷に対する幹細胞デリバリーシステム	28
I) in vitro の実験	28
II) in vivo の実験	30
6) 骨欠損に対する幹細胞デリバリーシステム	31
7) 腫瘍に対する細胞デリバリーシステム	32
まとめ	34
研究成果の刊行物・別刷	



## はしがき

近年、自己の細胞や組織を用いて失われた組織を再生させようとする再生医療の研究や臨床応用が進んでいる。我々は幹細胞を磁気標識した後、体外から磁場をかけることにより、目的の部位に幹細胞を効果的に集積させ、組織の修復をはかる幹細胞デリバリーシステムを考案し、関節軟骨、骨、脊髄の損傷を修復するための基礎的研究を重ねてきた。これらの実験結果について報告する。

## 研究組織

研究代表者：越智光夫 広島大学 病院 教授  
研究分担者：安永裕司 広島大学 大学院医歯薬学総合研究科 寄附講座教授  
研究分担者：安達伸生 広島大学 大学院医歯薬学総合研究科 助教

## 交付決定額（配分額）

（金額単位円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	24,200,000	7,260,000	31,460,000
平成17年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
平成18年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
平成19年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	38,700,000	11,610,000	50,310,000

## 研究発表

### (1) 雑誌論文

Takahiko Hamasaki, Nobuhiro Tanaka, Osamu Ishida, Shinobu Yanada, Naosuke Kamei, Yasushi Fujiwara, Koji Nishida, Kazuyoshi Nakanishi, Patrick Sharman, Seiichi Kawamata, Mitsuo Ochi.

Characterization of labeled neural progenitor cells for magnetic targeting.  
Neuroreport; 16(15), 1641-1645. 2005.

Yuko Nakashima, Masataka Deie, Shinobu Yanada, Patrick Sharman, Mitsuo Ochi.  
Magnetically labeled human natural killer cells, accumulated in vitro by an external magnetic force, are effective against HOS osteosarcoma cells.  
International Journal of Oncology; 27(4), 965-971. 2005.

Shinobu Yanada, Mitsuo Ochi, Nobuo Adachi, Hiroo Nobuto, Muhammad Agung, Seiichi Kawamata.

Effects of CD44 antibody-or RGDS peptide-immobilized magnetic beads on cell proliferation and chondrogenesis of mesenchymal stem cells.

Journal of Biomedical Materials Research 77(4), 773-784, 2006.

Koji Nishida, Nobuhiro Tanaka, Kazuyoshi Nakanishi, Naosuke Kamei, Takahiko Hamasaki, Shinobu Yanada, Yu Mochizuki, Mitsuo Ochi.

Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord: through cerebrospinal fluid.

Neuroreport; 17(12), 1269-1272, 2006.

Takahiko Hamasaki, Nobuhiro Tanaka, Naosuke Kamei, Osamu Ishida, Shinobu Yanada, Kazuyoshi Nakanishi, Koji Nishida, Yoshiaki Oishi, Seiichi Kawamata, Norio Sakai, Mitsuo Ochi.

Magnetically labeled neural progenitor cells, which are localized by magnetic force, promote axon growth in organotypic cocultures.

Spine; 32(21), 2300-2305, 2007.

Takaaki Kobayashi, Mitsuo Ochi, Shinobu Yanada, Masakazu Ishikawa, Nobuo Adachi, Masataka Deie, Koji Arihiro.

A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair.

Arthroscopy; 24(1), 69-76, 2008.

Toshihiro Sugioka, Mitsuo Ochi, Yuji Yasunaga, Nobuo Adachi, Shinobu Yanada.

Accumulation of magnetically labeled rat mesenchymal stem cells using an external magnetic force, and their potential for bone regeneration.

J Biomed Mater Res A; 85(3), 597-604, 2008.

Mitsuru Motoyama, Masataka Deie, Atsushi Kanaya, Makoto Nishimori, Ayato Miyamoto, Shinobu Yanada, Nobuo Adachi, Mitsuo Ochi.

*In vitro* cartilage formation using TGF- $\beta$ -immobilized magnetic beads and mesenchymal stem cell-magnetic bead complexes under magnetic field conditions.

J Biomed Mater Res A. in press

柳田忍, 安達伸生, 越智光夫

磁気を用いた新しい cell and drug delivery system

関節外科; 25(4):162-168, 2006.

濱崎貴彦, 田中信弘, 越智光夫

磁気ターゲティング法による脊髄再生効果の促進をめざして 集積させた神経前駆細胞磁気  
ビーズ複合体が軸索伸長に与える影響

整形外科; 57(13):1720, 2006.

田中信弘, 越智光夫

細胞移植による脊髄再生 磁気ターゲティング法による細胞投与方法の開発

脊椎脊髄ジャーナル;20(12):1253-1258, 2007.

小林孝明, 安達伸生, 出家正隆, 越智光夫

軟骨再生の再生医療

日本医事新報 No4361;49-52, 2007.

## (2) 学会発表

越智光夫

(シンポジウム) 軟骨損傷に対する再生医療

第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2004. 4. 15 岡山市

Mitsuo OCHI

(招待講演) Clinical results of tissue-engineered cartilage and future direction.

11thESSKA 2004. 5. 7, Athens, Greece.

越智光夫

(教育研修講演) 骨軟骨欠損に対する治療 -過去, 現在, 未来- 組織工学的手法を用いた軟  
骨再生

第 77 回日本整形外科学会学術総会 2004. 5. 22 神戸市

越智光夫

(レクチャー) 軟骨損傷診断

第 22 回関節鏡セミナー 2004. 7. 9 東京都

越智光夫

軟骨損傷と変形性関節症

香川地区リウマチ教育研修会 2004. 7. 11 高松市

越智光夫

壊れた膝をどの様に直すか -再生医療による軟骨修復を中心に-

NPO 再生医療推進センター 2004. 8. 21 京都市

越智光夫

骨・軟骨における再生医療 -現在から未来に向けて-

ナノメディシンフォーラム NMF4 第2回ナノメディシン研究会 2004. 9. 25 東京都

越智光夫

(シンポジウム) 次世代の関節軟骨再生法-マグネットビーズ間葉系幹細胞複合体を用いた治療-

第32回日本リウマチ・関節外科学会 2004. 10. 1 奈良市

中島祐子, 出家正隆, 柳田忍, 越智光夫

「ヒトNK細胞-磁気ビーズ」複合体を用いた磁気ターゲティング療法の開発

第19回日本整形外科学会基礎学術集会 2004. 10. 22 東京都

柳田忍, 越智光夫

膝関節軟骨修復のための磁気を応用した新規低侵襲的治療の試み「骨髄間葉系幹細胞-磁気ビーズ」複合体の形成及び軟骨誘導

第19回日本整形外科学会基礎学術集会 2004. 10. 22 東京都

杉岡敏博, 越智光夫, 安永裕司, 柳田忍

磁場と磁気ビーズを利用した骨髄間質細胞の集簇と骨分化に関する検討

第19回日本整形外科学会基礎学術集会 2004. 10. 22 東京都

Mitsuo Ochi

(シンポジウム) Tissue-engineered cartilage: Technique and results.

The Asia Pacific Knee Society.

2004. 11. 2, Ankara, Turkey.

Mitsuo Ochi

(シンポジウム) Chondrocyte culture & Future direction of cartilage repair.

The Asia Pacific Knee Society.

2004. 11. 2, Ankara, Turkey.

越智光夫

(招待講演) 運動器の再生医療

佐賀県臨床整形外科医会秋期研修会 2004. 11. 13 佐賀市

Mitsuo Ochi

(招待講演) Recent technology for cartilage repair.

4th Asian International Symposium on Biomaterials. 2004. 11. 17 つくば市

越智光夫

(特別講演) 膝関節障害における再生医療の役割

整形外科卒後研修セミナー 2005. 1. 8 大阪市

Mitsuo Ochi

(招待講演) Clinical results of tissue-engineered cartilage and some thoughts about the future.

8th Advanced Arthroscopy Course. 2005. 1. 17, Courmayeur, Italy.

越智光夫

(講演) 関節軟骨の修復-基礎と臨床-

広島大学 21 世紀 COE 「放射線災害医療開発の研究教育拠点」連携シンポジウム

「生体ダイナミズムと疾患」2005. 1. 19 広島市

安達伸生, 越智光夫, 伊藤洋平, 出家正隆

(シンポジウム) 組織工学的手法を用いた軟骨再生

第 30 回日本膝関節学会 2005. 2. 11 東京都

越智光夫

(特別講演) 運動器の再生医療-現状と近未来-

第 3 回横浜運動器再建医学研究会 2005. 3. 4 横浜市

越智光夫

(招待講演) スポーツ傷害 -最近の話題-

日本医師会生涯教育講座 2005.3.17 東京都

Mitsuo Ochi

(招待講演) Tissue Engineering of Cartilage for Clinical Defects.

Tissue Engineering Symposium. 2005.3.31, North Carolina, USA.

Mitsuo Ochi

(シンポジウム) Cartilage Regeneration with Tissue-engineering Technique Clinical Application and Future Direction.

The 5th Biennial ISAKOS Congress. 2005.4.3, Florida, USA.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Tissue Engineering of Cartilage for Clinical Defects.

The 5th Biennial ISAKOS Congress. 2005.4.4, Florida, USA.

Nobuo Adachi.

(招待講演) Tissue engineering and practical application in soft tissue repair.

The 5th Biennial ISAKOS Congress. 2005.4.3-7, Florida, USA.

越智光夫

(招待講演) Tissue-engineered Cartilage and Future Direction.

The 8th Asian Federation of Sports Medicine Congress. 2005.5.11, 東京都

Mitsuo Ochi

(招待講演) Tissue engineered cartilage.

The Spanish Arthroscopy Association Annual Meeting. 2005.5.27, Barcelona, Spain.

越智光夫

(招待講演) 運動器の再生医療 -臨床応用-

第64回山口県臨床外科学会 2005.6.5 小野田市



越智光夫

(招待講演) 変形性関節症の治療

2005 関節外科フォーラム 2005.6.12 福岡市

越智光夫

(招待講演) 運動器の再生治療

第47回日本老年医学会学術集会 2005.6.16 東京都

越智光夫

(招待講演) 関節軟骨損傷

第23回関節鏡セミナー 2005.7.29 滋賀県

越智光夫

(招待講演) 治療・予防法の開発: 軟骨再生システムの確立

厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 中村班

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業 高取班

平成17年度第1回合同班会議 2005.8.13 東京都

Nobuo Adachi, Mitsuo Ochi

(招待講演) Clinical results after transplantation of tissue-engineered cartilage in the knee joint.

SICOT/SIROT 2005.9.2-9, Istanbul, Turkey.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Future direction for cartilage repair.

Riks hospital. 2005.9.26, Oslo, Norway.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Clinical results of transplantation of tissue-engineered cartilage.

Ullevaal hospital. 2005.9.26, Oslo, Norway.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Tissue-engineering in orthopaedic surgery.

Compete the world. 2005.9.30, Budapest, Hungary.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Clinical results of Tissue-engineered Cartilage and Future Direction.  
Australian Knee Society 28<sup>th</sup> Annual Meeting. 2005.10.8, Perth, Australia.

本山満, 出家正隆, 宮本礼人, 柳田忍, 越智光夫

(優秀ポスター賞) 磁気標識 TGF- $\beta$  を用いた磁気ターゲティング法の軟骨分化における効果  
第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005.10.20 伊勢市

濱崎貴彦, 田中信弘, 石田治, 奥田晃章, 中西一義, 藤原靖, 西田幸司, 亀井直輔, 當天賢子, 柳田忍, 越智光夫

神経前駆細胞-磁気ビーズ複合体の作製およびその性質- 脊髄再生のための磁気ターゲティング法による低侵襲的治療の試み (第一報) -

第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005.10.20 伊勢市

杉岡敏博, 安永裕司, 柳田忍, 中島祐子, 西田幸司, 越智光夫

磁気ターゲティングシステムを用いた in vivo 骨髄間葉系幹細胞誘導と骨誘導能の検討

第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005.10.20 伊勢市

西田幸司, 田中信弘, 石田治, 藤原靖, 柳田忍, 越智光夫

脊髄損傷に対する磁気ターゲティングの試み (第 1 報)

第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005.10.20 伊勢市

濱崎貴彦, 石田治, 田中信弘, 柳田忍, 亀井直輔, 越智光夫

磁気ターゲティング法のための神経幹細胞-磁気ビーズ複合体の作製とその生存率, 分化能, 誘導能

第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005.10.20 伊勢市

夏恒治, 越智光夫, 柳田忍, 望月由, 延藤博朗

(シンポジウム) 外磁場と磁性体リポソームの Active Targeting 効果を利用した骨髄間葉系幹細胞による関節軟骨修復 Cell Delivery System の開発

第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 2005.10.21 伊勢市

越智光夫

(招待講演) 運動器の再生 骨・軟骨を中心に

第 32 回日本臨床バイオメカニクス学会 2005.10.28 札幌市

越智光夫

(招待講演) 運動器疾患における再生医療の新たな展開

第 100 回備後整形外科医会記念学術研修会 2005. 10. 29 福山市

安達伸生

(招待講演) 軟骨再生の現状と将来展望

第 11 回鹿児島リウマチ医の会 2005. 10. 29 鹿児島市

越智光夫

(招待講演) 現状と展望

第 33 回日本リウマチ・関節外科学会 2005. 11. 12 東京都

濱崎貴彦, 田中信弘, 石田 治, 亀井直輔, 柳田忍, 中西一義, 西田幸司, 越智光夫, 大石陽介, 川真田聖一

神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が外磁場存在下で脊髓軸索伸長に与える影響 -脳・脊髓器官共存培養系を用いた検討-

第 24 回日本運動器移植・再生医学研究会 2005. 11. 12 横浜市

安達伸生, 越智光夫

(シンポジウム) 組織工学的手法を用いた関節軟骨再生

第 32 回日本股関節学会 2005. 11. 6. 7 新潟市

越智光夫

(特別講演) 運動器の再生医療

第 58 回広島医学会総会 2005. 11. 13 広島市

濱崎貴彦, 田中信弘, 石田 治, 亀井直輔, 柳田忍, 中西一義, 西田幸司, 越智光夫, 大石陽介, 川真田聖一

神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が外磁場存在下で脊髓軸索伸長に与える影響 -脳・脊髓器官共存培養系を用いた検討-

第 24 回日本運動器移植・再生医学研究会 2005. 11. 12 横浜市

越智光夫

(招待講演) 運動器の再生医療

第 11 回組織工学・再生医学ワークショップ 2005. 11. 26 神戸市

安達伸生, 越智光夫, 出家正隆, 伊藤洋平  
(シンポジウム) 組織工学的手法を用いた関節軟骨再生  
第 31 回日本関節鏡学会 2005. 12. 2 大津市

越智光夫

(招待講演) Tissue-engineering of Orthopaedic Surgery.  
Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2006. 2006. 1. 9, Hiroshima.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Clinical results of tissue-engineered cartilage and some thoughts about  
the future.  
9th Advanced Arthroscopy Course. 2006. 1. 17, Courmayeur, Italy.

越智光夫

(招待講演) 軟骨修復の再生医療  
ペンタックス社社内講演 2006. 2. 1 東京都

越智光夫

(招待講演) 運動器の再生医療  
第 9 回生活習慣病検査研究会 2006. 2. 15 広島市

越智光夫

(招待講演) 運動器の再生医療の近未来  
第 1 回東海運動器フォーラム 2006. 2. 18 名古屋市

濱崎貴彦, 田中信弘, 大石陽介, 亀井直輔, 柳田忍, 中西一義, 佐々木浩文, 西田幸司, 當  
天賢子, 山田清貴, 越智光夫  
神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が磁場存在下で脊髄軸索伸長に与える影響  
第 5 回日本再生医療学会総会 2006. 3. 8 岡山市

濱崎貴彦, 田中信弘, 大石陽介, 亀井直輔, 柳田忍, 中西一義, 佐々木浩文, 西田幸司, 當  
天賢子, 山田清貴, 越智光夫  
(最優秀ポスター賞) 神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が磁場存在下で脊髄軸索伸長に与える  
影響 集積させた神経前駆細胞は軸索伸長を促す? -脳・脊髄器官共存培養系を用いた検討-  
第 35 回日本脊椎脊髄病学会 2006. 4. 21 東京都

安達伸生, 越智光夫, 出家正隆, 石川正和, 伊藤洋平

(シンポジウム) 組織工学的手法を用いた関節軟骨の再生  
第 22 回日本医工学治療学会 2006. 4. 23 福岡市

Mitsuo Ochi

(招待講演) Tissue-engineering Orthopaedic Surgery.  
3<sup>rd</sup> International Symposium for Orthopaedic Sports Medicine.  
2006. 5. 6, Taipei, Republic of China.

越智光夫

(招待講演・シンポジウム) 「運動器の 10 年」変形性関節症の病態解明・診断・治療の新世界 -治療の最前線-  
第 79 回日本整形外科学会学術総会 2006. 5. 19 横浜市

安達伸生, 越智光夫

組織工学的手法を用いた軟骨の再生  
第 79 回日本整形外科学会 2006. 5. 18-21 横浜市

越智光夫

(招待講演) 教育研修講演 軟骨の再生医療 -現状と未来-  
第 79 回日本整形外科学会学術総会 2006. 5. 20 横浜市

Mitsuo Ochi

(招待講演) News in tissue engineering.  
The 12<sup>th</sup> ESSKA2000 CONGRESS. 2006. 5. 24, Innsbruck, Austria.

Nobuo Adachi, Mitsuo Ochi.

(招待講演) A potential future therapeutic approach I: Use of magnetic beads for local delivery of mesenchymal stem cells.  
The 12<sup>th</sup> ESSKA2000 CONGRESS. 2006. 5. 24-27, Innsbruck, Austria.

越智光夫

(招待講演・シンポジウム) 進行する膝関節破壊への挑戦-How do you prevent the progression of OA Knees; Do they really work? Articular cartilage regeneration について  
JOSKAS2006 2006. 6. 9 宜野湾市

越智光夫

(講演) 軟骨再生

第 17 回広島整形外科先端医学セミナー 2006. 6. 12 広島市

Mitsuo Ochi

(招待講演) Regeneration and transplantation of articular cartilage.

FIMS World Congress of Sports Medicine 2006. 2006. 6. 16, Beijing, China.

越智光夫

(招待講演) 膝関節機能の再構築

札幌医科大学整形外科同門会 2006. 6. 24 札幌市

越智光夫

治療・予防法の開発：軟骨再生システムの確立

厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 中村班

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業 高取班

平成 18 年度第 1 回合同班会議 2006. 7. 1 東京都

Mitsuo Ochi

(招待講演) Tissue-engineering in Orthopaedic Surgery.

Update in Knee surgery. 2006. 9. 8, Heidelberg, Germany.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Tissue Engineering in Orthopaedic Surgery—Present Status and Future Direction.

4<sup>th</sup> Congress of Asia-Pacific Knee Society. 2006. 9. 23, Seoul, Korea.

Takaaki Kobayashi, Mitsuo Ochi, Shinobu Yanada, Satoshi Ujigo, Nobuo Adachi.

Novel Cell Delivery System using Magnetically Labeled Mesenchymal Stem Cell and External Magnetic Device for Articular Cartilage Defect.

4<sup>th</sup> Congress of Asia-Pacific Knee Society. 2006. 9. 22, Seoul, Korea.

Takahiko Hamasaki, Nobuhiro Tanaka, Naosuke Kamei, Kazuyoshi Nakanishi, Koji Nishida, Mitsuo Ochi.

Magnetically labeled neural progenitor cells, which are localized by magnetic force, promote corticospinal axon growth in organotypic co-cultures -New cell delivery system using magnetic targeting.

21st North American Spine Society Annual Meeting. 2006.9.26, Seattle, USA.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Emerging technology in cartilage repair.

4<sup>th</sup> Meeting of the European Federation of National Associations of Orthopaedic Sports Traumatology. 2006.9.29, Pavia, Italy.

越智光夫

(招待講演) 再生医療が先導する運動器治療の近未来

第15回日本形成外科学会基礎学術集会 2006.10.12 大宮市

濱崎貴彦, 田中信弘, 亀井直輔, 柳田忍, 中西一義, 西田幸司, 越智光夫

磁気ターゲティング法を目指した神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が脊髄軸索伸長に与える影響

第21回日本整形外科学会基礎学術集会 2006.10.19 長崎市

杉岡敏博, 安永裕司, 柳田忍, 越智光夫

磁気ターゲティングシステムを用いた in vivo 骨髄間葉系幹細胞誘導と骨誘導能の検討(第2報)

第21回日本整形外科学会基礎学術集会 2006.10.19 長崎市

越智光夫

(招待講演) 軟骨再生 -世界の動向-

第21回日本整形外科学会基礎学術集会 2006.10.20 長崎市

安達伸生, 越智光夫, 出家正隆

(シンポジウム) 組織工学的手法を用いた軟骨再生

第21回日本整形外科学会基礎学術集会 2006.10.20 長崎市

西田幸司, 田中信弘, 石田治, 中西一義, 柳田忍, 越智光夫  
脊髄損傷に対する磁気ターゲティングの試み(第2報) 骨髄間葉系幹細胞の脳脊髄液内投与  
第21回日本整形外科学会基礎学術集会 2006.10.20 長崎市

小林孝明, 越智光夫, 柳田 忍, 安達伸生  
外磁場発生装置を用いた磁気ラベル間葉系幹細胞の磁気ターゲティング-新しい軟骨修復  
法-  
第21回日本整形外科学会基礎学術集会 2006.10.20 長崎市

越智光夫  
(招待講演) 軟骨の再生医療  
北里学園祭 最先端医療シンポジウム 2006.11.12 相模原市

越智光夫  
(招待講演) 運動器の再生医療  
第54回NPO 法人日本口腔外科学会 2006.11.17 広島市

越智光夫  
(招待講演) プロ選手の膝関節の治療と再生医療  
第23回安芸医学会 2006.12.3 広島市

越智光夫  
(招待講演・ランチョンセミナー) 放射線臨床医が知って役立つ運動器疾患の知識  
-腰痛・肩こり, 再生医療-  
第107回日本医学放射線学会中国・四国地方会 2006.12.9 広島市

越智光夫  
(招待講演) 広島大学整形外科の最近の進歩  
臨床骨関節研究会新年会 2007.1.12 広島市



越智光夫

(招待講演) Tissue Engineering for Cartilage Defects-Present Status and Future Direction.

第4回国際シンポジウムゲノム障害と再生医療 -東海村臨海被曝事故の教訓を踏まえて-  
広島大学 21世紀 COE プログラム-放射線災害医療開発の先端的研究教育拠点-  
2007.2.7 広島市

Takahiko Hamasaki, Nobuhiro Tanaka, Naosuke Kamei, Kazuyoshi Nakanishi, Koji Nishida, Mitsuo Ochi.

Magnetically labeled neural progenitor cells, which are localized by magnetic force, promote corticospinal axon growth in organotypic co-cultures -New cell delivery system using magnetic targeting.

53rd Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2007.2.11, San Diego, USA.

越智光夫

(招待講演・シンポジウム) 関節軟骨再生

第6回日本再生医療学会総会 2007.3.14 横浜市

越智光夫

(招待講演) スポーツと再生医療

財団法人日本法律家協会定期総会 2007.4.16 広島市

越智光夫

(招待講演・シンポジウム) 関節軟骨再生

第51回日本リウマチ学会総会・学術集会 2007.4.27 横浜市

越智光夫

(招待講演) 関節軟骨の新しい治療

東京イブニングセミナー 2007.4.27 東京都

Mitsuo Ochi

(招待講演) Cartilage regeneration-novel approach.

XXV Arthroscopy Spanish association Congress. 2007.5.16, Sevilla, Spain.

Mitsuo Ochi

(招待講演・シンポジウム) The Future of Sports Medicine.  
6<sup>th</sup> BIENNIAL ISAKOS CONGRESS. 2007.5.28, Florence, Italy.

Mitsuo Ochi

(招待講演・シンポジウム) Clinical Decision Making in Cartilage Lesions Using Evidence Based Medicine.  
6<sup>th</sup> BIENNIAL ISAKOS CONGRESS. 2007.5.28, Florence, Italy.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Emerging Technologies.  
6<sup>th</sup> BIENNIAL ISAKOS CONGRESS. 2007.5.30, Florence, Italy.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Tissue Engineering of Cartilage for Clinical Defect.  
6<sup>th</sup> BIENNIAL ISAKOS CONGRESS. 2007.5.31, Florence, Italy.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Clinically Related Cartilage Engineering.  
6<sup>th</sup> BIENNIAL ISAKOS CONGRESS. 2007.5.31, Florence, Italy.

Nobuo Adachi, Mitsuo Ochi, Masataka Deie, Masakazu Ishikawa, Yohei Ito.

Implantation of tissue-engineered cartilage made ex vivo for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee. Follow-up study with 10 years clinical experience.

International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine.  
2007.5.27-31, Florence, Italy.

Nobuo Adachi, Mitsuo Ochi.

(シンポジウム) Clinical decision making in cartilage lesions using evidence based medicine

International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine.  
2007.5.27-31, Florence, Italy.

安達伸生, 越智光夫, 出家正隆, 小林孝明, 石川正和

(シンポジウム) 軟骨欠損の修復-新しい方向性-

第 32 回日本膝関節学会 2007. 6. 14-16 札幌市

小林孝明, 柳田忍, 越智光夫

鏡視下での軟骨修復を目的とした新しい幹細胞デリバリーシステム

第 33 回日本関節鏡学会 2007. 6. 15 札幌市

小林孝明, 越智光夫, 安達伸生, 柳田忍, 石川正和, 出家正隆

(シンポジウム) 磁場を利用した新しい軟骨再生

第19回日本運動器リハビリテーション学会 2007. 7. 7 長野県北佐久郡軽井沢町

小林孝明, 越智光夫, 安達伸生, 柳田忍, 石川正和, 出家正隆

(シンポジウム) 軟骨再生の現状と問題点, 将来の展望

第25回日本骨代謝学会学術集会 2007. 7. 20 大阪府

越智光夫

(招待講演) 先進医療の現状 -広島大学からの発信-

第 38 回全国看護高等学校研究協議大会 2007. 7. 26 広島市

越智光夫

治療・予防法の開発: 軟骨再生システムの確立

厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 中村班

平成 19 年度第 3 回班会議 2007. 7. 28 東京都

越智光夫

(招待講演) 広島大学病院における先進的医療

広島臨床骨関節症研究会 2007. 8. 10 広島市

Mitsuo Ochi

(招待講演) Emerging technology for cartilage repair.

The 1st Stockholm Arthroscopy Conference. 2007. 9. 7, Stockholm, Sweden.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Chondrocyte transplantation, Japanese experience.

Finish 2<sup>nd</sup> Knee Arthroscopy Course. 2007.9.10, Tampere, Finland.

越智光夫

変形性関節症治療の最前線

「見える・聞こえる・歩けるように」議員連盟勉強会 2007.9.18 東京都

越智光夫

(招待講演) 膝関節の生物学的機能再建

山梨整形外科合同カンファレンス 2007.9.28 甲府市

Mitsuo Ochi

(招待講演) Cartilage repair-Basic research-

Annual Fall Congress of the Korean Arthroscopy Association. 2007.10.5, Seoul, Korea.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Tissue engineering for cartilage defects-present status and future direction.

RCOST Annual Meeting. 2007.10.20, Pattaya, Thailand.

Mitsuo Ochi

(招待講演) Cartilage repair.

RCOST Annual Meeting. 2007.10.21, Pattaya, Thailand.

小林孝明, 越智光夫, 安達伸生, 柳田忍, 石川正和, 出家正隆

(パネルディスカッション) 組織工学的手法を用いた関節軟骨再生の現状, 問題点と将来の展望

第22回日本整形外科学会基礎学術集会 2007.10.25 浜松市

西田幸司, 田中信弘, 中西一義, 佐々木浩文, 山田清貴, 越智光夫

(パネルディスカッション) 脊髄損傷に対する磁気ターゲティングを利用した骨髄間葉系幹細胞移植

第22回日本整形外科学会基礎学術集会 2007.10.25 浜松市

越智光夫

(招待講演) 膝の痛みと再生医療について

広島鉄道病院講演会 2007. 11. 8 広島市

安達伸生, 越智光夫, 出家正隆, 小林孝明, 石川正和

(パネルディスカッション) 組織工学的手法を用いた軟骨再生と将来展望

第 35 回日本リウマチ・関節外科学会 2007. 11. 10 東京都

越智光夫

(招待講演) 運動器の再生医療

慶應義塾大学整形外科公開セミナー 2007. 11. 17 東京都

安達伸生, 越智光夫

関節軟骨損傷の病態別治療. 新しい治療法の可能性と問題点

第 24 回膝関節フォーラム 2007. 12. 9 東京都

越智光夫

(招待講演) 運動器の再生医療

広島大学医学部第三内科同門会総会 2008. 1. 5 広島市

越智光夫

(招待講演) 軟骨再生医療

東京医科歯科大学整形外科シンポジウム・第 13 回 COE 国際シンポジウム 2008. 2. 7 東京都

越智光夫

(招待講演) Emerging technology of tissue engineering for cartilage repair.

2008 Annual Meeting of Formosa Association of Regenerative Medicine.

2008. 2. 23, Taipei, Republic of China.

佐々木浩文, 田中信弘, 中西一義, 山田清貴, 山本りさこ, 中前稔生, 越智光夫

ラット脊髄損傷モデルに対する磁気ターゲティングを利用した骨髄間葉系 幹細胞移植

第 35 回日本生体電気・物理刺激研究会 2008. 3. 8 新潟市

磁気標識ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)に対する外磁場の影響—細胞間接着について—  
中前稔生, 越智光夫, 望月由, 田中信弘, 小林孝明, 永田義彦  
第35回日本生体電気・物理刺激研究会 2008.3.8 新潟市

越智光夫

(招待講演) How will we treat articular cartilage injuries in athletes in the future?  
Current trend in Sports Medicine.

AAOS 75<sup>th</sup> Annual Meeting. 2008.3.9, San Francisco, U.S.A.

小林孝明, 柳田忍, 安達伸生, 出家正隆, 越智光夫

(シンポジウム) 磁場を利用した新しい軟骨再生  
第7回日本再生医療学会総会 2008.3.13 名古屋市

渋谷早俊, 安達伸生, 小林孝明, 出家正隆, 越智光夫

磁気標識した骨髄間葉系幹細胞と関節内埋め込み型磁性体を用いた新しい軟骨修復—磁場を  
使ったセルデリバリーシステム—

第21回日本軟骨代謝学会 2008.3.22 京都府

### (3) 図 書

なし

#### 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

磁気誘導装置および磁性複合体の誘導システム

発明者: 越智光夫, 玉川克紀

出願人: 越智光夫, (株) 玉川製作所

出願番号: 特願2005-346911号 (2005年11月30日)

磁性細胞およびその使用方法

発明者: 越智光夫

出願人: エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント(株), 越智光夫

出願番号: 特願2006-196830号 (2006年7月19日)

## 研究成果

### 1) 生体に安全な「細胞の磁気標識法」の研究

#### I) 磁性体リポソームを使用した磁気標識法

整形外科領域に応用できる磁性体 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ : フェライト粒子, 約10nm径) を脂質二重膜で包み, 磁性体リポソームを作製し, 磁性体リポソームを抗原抗体反応で細胞に接着して細胞を磁気標識する. このリポソームに磁性体と共に薬剤を封入することにより細胞とともに薬剤を目的の部位に集積させることができる. またリポソームを抗原抗体反応させて骨髄間葉系幹細胞に接着し, 目的の部位に集積させて, 軟骨欠損の修復をはかる研究を行った.

#### II) 磁気ビーズを使用した磁気標識法

我々は細胞 - 磁気ビーズ複合体を独自に開発した. 細胞として臨床応用可能である骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を選択した. 複合体を形成するためMSCに発現する細胞表面抗原CD44を選択し, 複合体のmediatorとして抗CD44抗体を選択した. CD44抗体の磁気ビーズへのカップリングは, 縮合剤であるEDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) と反応安定剤であるNHS (N-hydroxy succinimide) を用いて, カルボキシル基付与磁気ビーズ (Ferri sphere 100C°, 約310 nm径・球形, 日本ペイント) にアミド結合を介して行った. その後, CD44抗体付与磁気ビーズとMSCを4°Cで反応させることで磁気標識したMSC - CD44抗体 - 磁気ビーズ複合体を形成させた.

またMSCを含めた細胞は細胞膜にインテグリンを発現しており, 細胞接着因子であるアルギニン(R)-グリシン(G)-アスパラギン酸(D) (RGD) のアミノ酸配列を介して, 細胞外マトリクスに接着している. MSC - CD44抗体 - 磁気ビーズ複合体を考案・設計した後, 合成された細胞接着因子である, RGD配列を含むRGD-セリン(S), RGDSペプチドを介した, 抗体を用いない細胞 - 磁気ビーズ複合体も形成させ, 前者と同等な形態であることを光学及び電子顕微鏡下で確認した (MSC - RGDSペプチド - 磁気ビーズ複合体) .

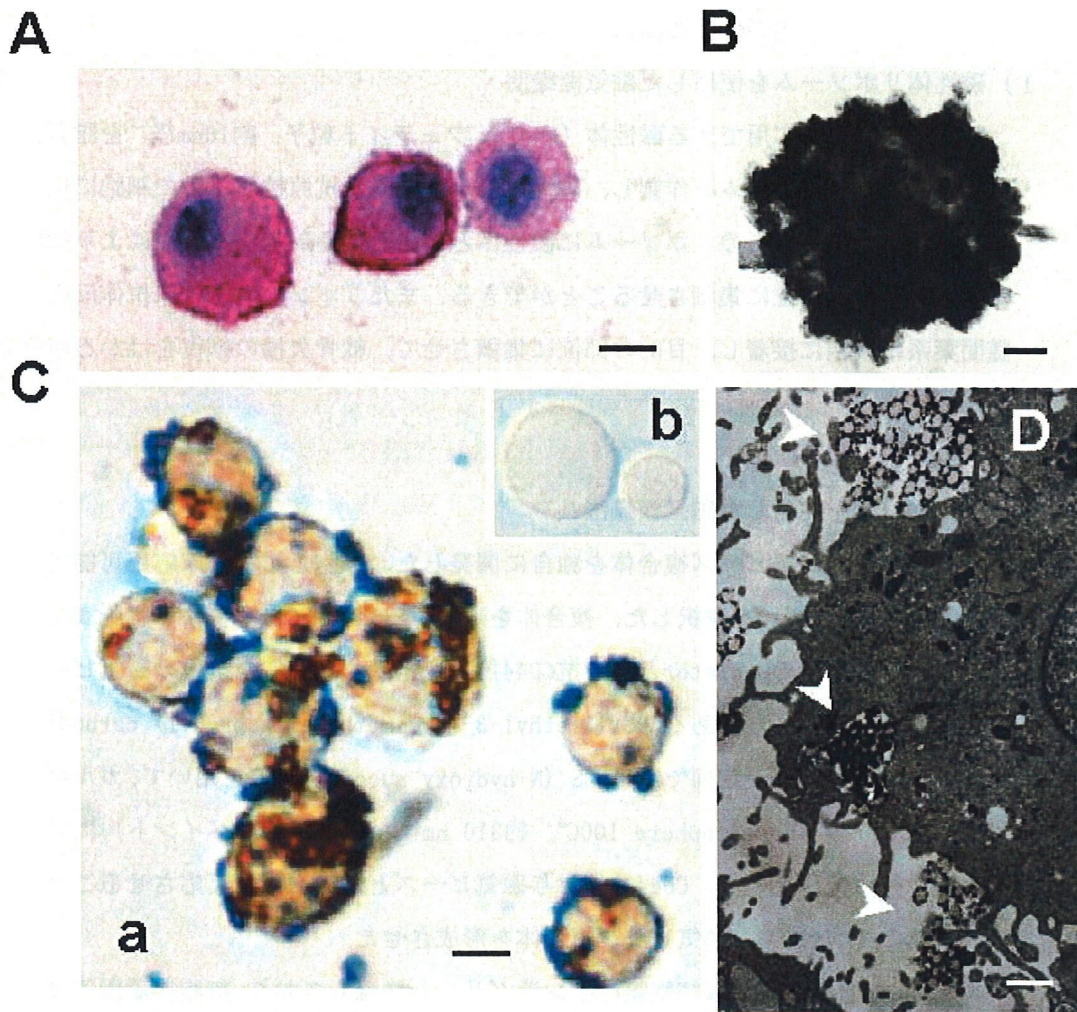


図1. MSC - CD44抗体 - 磁気ビーズ複合体

A : rat MSC (継代回数 : 4) におけるCD44の発現 (免疫染色,  $\times 400$ , スケールバー :  $5\mu\text{m}$ )

B : カルボキシル基付与磁気ビーズ, Ferri Sphere 100C<sup>o</sup>の電子顕微鏡像 ( $\times 100,000$ , スケールバー :  $50\text{nm}$ )

C : 複合体の光学顕微鏡像 (a) と正常非標識 MSC (b)  $\times 400$ , スケールバー :  $5\mu\text{m}$

D : 複合体の電子顕微鏡像 ( $\times 5,000$ , スケールバー :  $1\mu\text{m}$ ) 矢印はCD44抗体付与磁気ビーズを示す.

(図1は関節外科; 25(4):162-168, 2006. より引用)

### III) Ferumoxidesを使用した磁気標識法

現在, MRIの造影剤として臨床で使用されているFerumoxides ( $(\text{Fe}_2\text{O}_3)_n(\text{FeO})_m$ ) を骨髄間葉系幹細胞の培養液に添加し, 一晚培養することにより骨髄間葉系幹細胞を磁気標識する方法である.



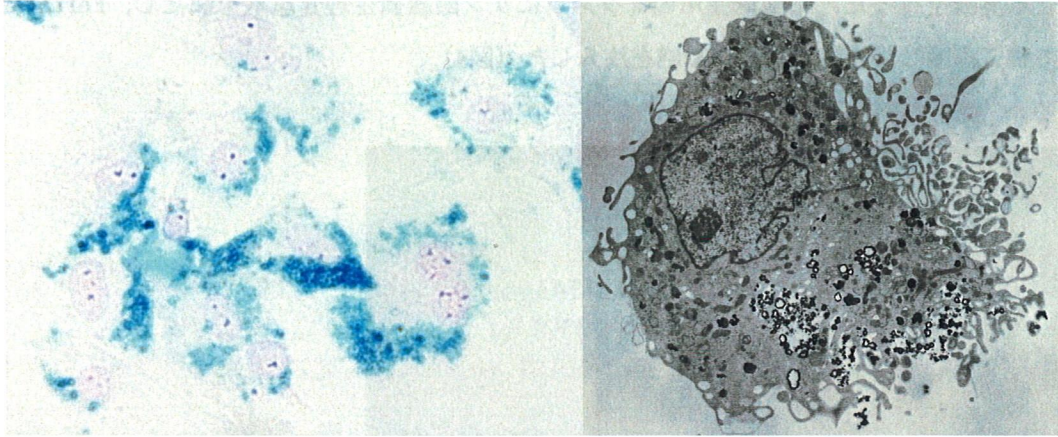


図2. Ferumoxidesで磁気標識した骨髄間葉系幹細胞

図左：鉄染色（Berlin Blue染色）．図右：電子顕微鏡写真

## 2) 外磁場発生装置の開発

我々は、上記磁気標識した細胞を強い磁場を介して、低侵襲的に患部に移動させ、四肢再生を目指す研究を行った。強い磁場を生体外から生体にかけることができる装置（外磁場発生装置）を独自に開発した。株式会社玉川製作所とともに、臨床応用可能な関節軟骨修復のための外磁場装置の開発を行い、単ポール型電磁石（TM-SP1210SC-014型）と電源（TM-SP60554型）、ソレノイドコイル（TM-DSW2422SC-1206型）と電源（TM-SP100664型）を開発した（図3）。この装置は直径40cmのまるい円盤状に0.6テスラの磁場を発生させることが可能で、流す電流を変化させることにより、発生する磁場の強さを変化させることができる。

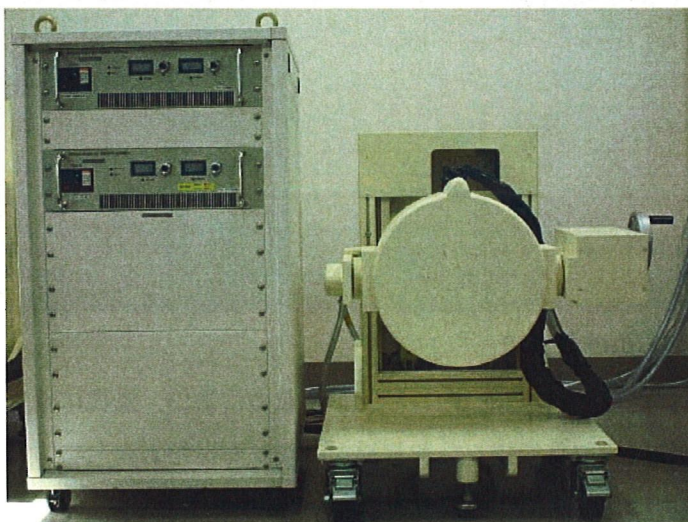


図3. 外磁場発生装置

単ポール型電磁石（TM-SP1210SC-014型）と電源（TM-SP60554型）玉川製作所作製

この外磁場発生装置を使い、磁気標識した骨髄間葉系幹細胞を目的の部位や方向に集積さ

せる実験を行った。細胞培養用のフラスコにリン酸緩衝生理食塩水を満たし、Ferumoxidesで磁気標識した骨髄間葉系幹細胞を注入した（図4）。

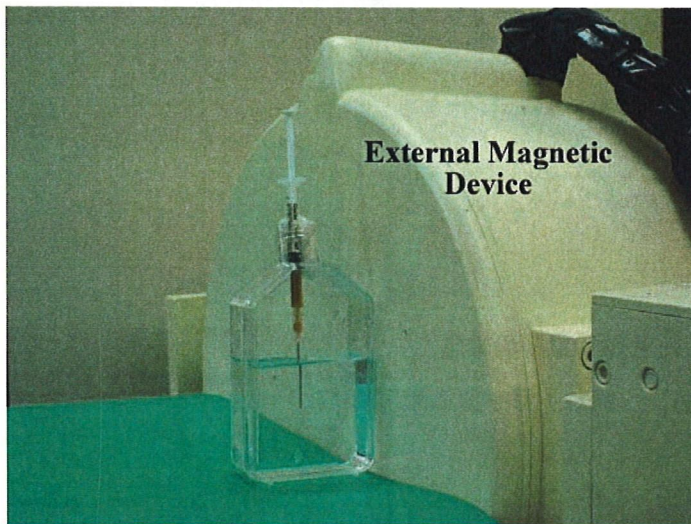


図4. 磁気標識した幹細胞を外磁場発生装置で誘導する実験

磁場をかけない状態では、磁気標識した幹細胞は重力に従い、垂直に落下にしたが、磁場をかけた場合、磁気標識した幹細胞が磁場の方向に誘導され、重力に逆らいフラスコの側壁にとどまることが分かった。

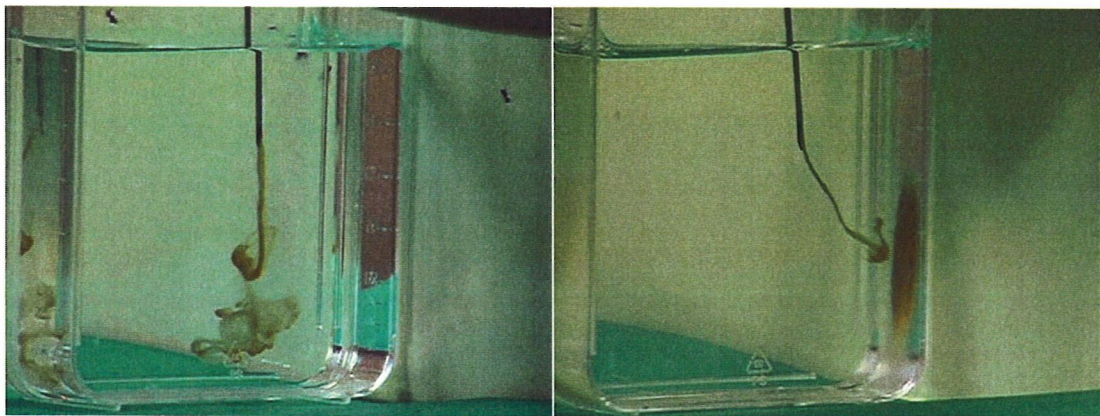


図5. 磁気標識した骨髄間葉系幹細胞の磁気誘導

磁場をかけない状態（図左）では茶色の磁気標識した幹細胞が、重力に従い、垂直に落下している。磁場をかけた状態（図右）では磁気標識した幹細胞が磁場をかけた方向（右方向）に誘導され、フラスコの側壁に重力に逆らって接着している。

### 3) 薬剤のデリバリーに関する研究

磁気標識したTransforming Growth Factor-beta (TGF-β)を用いた新しい軟骨形成方法の開発を行った。

8週齢のラット脛骨から骨髓液を採取し、1〜2継代後の細胞を骨髄間葉系幹細胞（MSC）として使用した。免疫磁気ビーズ（IMB）は、Ferri Sphere100C にラット抗 CD44 抗体をアミド結合させて作製した。コントロールとして、TGF-β を 10ng/ml 含む軟骨誘導培地に、外磁場を用いて MSC のみをペレット培養したもの（コントロール群）、免疫磁気ビーズの影響を調べるために、TGF-β を 10ng/ml 含む軟骨誘導培地に、IMB と結合している細胞（以下 CD44-MIC）を選択採取し、外磁場を用いてペレット培養したもの（IMB 群）、TGF-β を含まない軟骨誘導培地に、TGF-β をアミド結合させて作製した磁気標識 TGF-β を、外磁場を用いて局所に集積させ、CD44-MIC をペレット培養したもの（IMB-TGF-β 群）として、それぞれの軟骨分化について検討した。

IMB 群では、コントロール群と比較して、軟骨基質産生量の減少を認めたが、軟骨化に要する培養期間には差を認めなかった。IMB-TGF-β 群では、同様に軟骨基質産生量の減少を認めたが、約 1ng/ml に相当する磁気標識 TGF-β で軟骨化が可能であった。

以上より免疫磁気ビーズを用いたペレット培養では、細胞間に磁気ビーズが介在することで軟骨基質の産生が低下したものと推察されるが、磁気標識 TGF-β を用いることにより、通常の約 1/10 の低濃度の TGF-β で軟骨化が可能であった。従って磁気ターゲティング法を用いた薬剤のデリバリーを用いることにより、より効率のよい軟骨修復の可能性が示唆された。

#### 4) 関節軟骨欠損に対する幹細胞デリバリーシステム

日本白色家兎の膝蓋骨に（φ3mm×深さ2mm）の骨軟骨欠損を作製し、磁場（0.6テスラ）をかけた状態で、Ferumoxidesで磁気標識した骨髄間葉系幹細胞（MSC）を関節内に注入して、4時間後に評価した。コントロール群は磁場をかけない群とした（図6）。

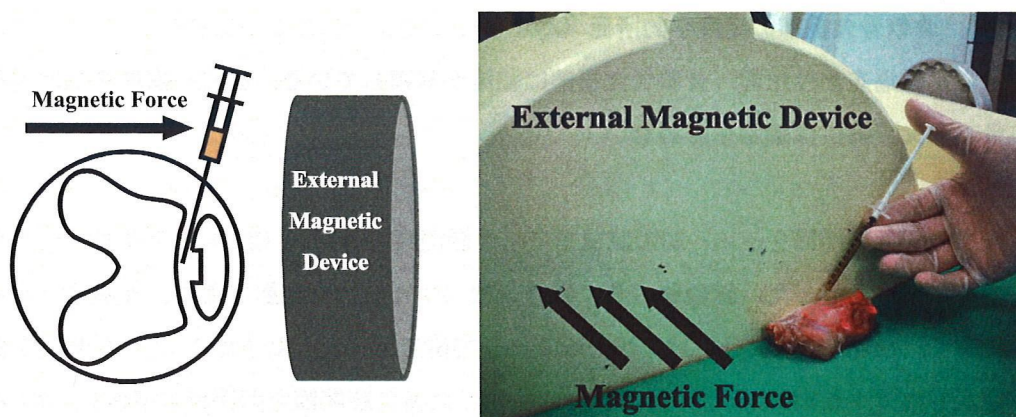


図6. 家兎を使用した幹細胞デリバリーシステムの実験概要

磁場をかけた群では、磁気標識したMSCが骨軟骨欠損部に集積していた。これに対して磁場をかけない群では、磁気標識したMSCは関節内に散在していた（図7）。



図7. 家兎の膝蓋骨の肉眼所見

図左：磁場をかけた群. 磁気標識したMSCは骨軟骨欠損部に集積していた. 図右：磁場をかけたない群. 磁気標識したMSC（茶色）は関節内に散在していた.

また組織学的にも骨軟骨欠損部にMSCが集積しているのが確認できた（図8）.

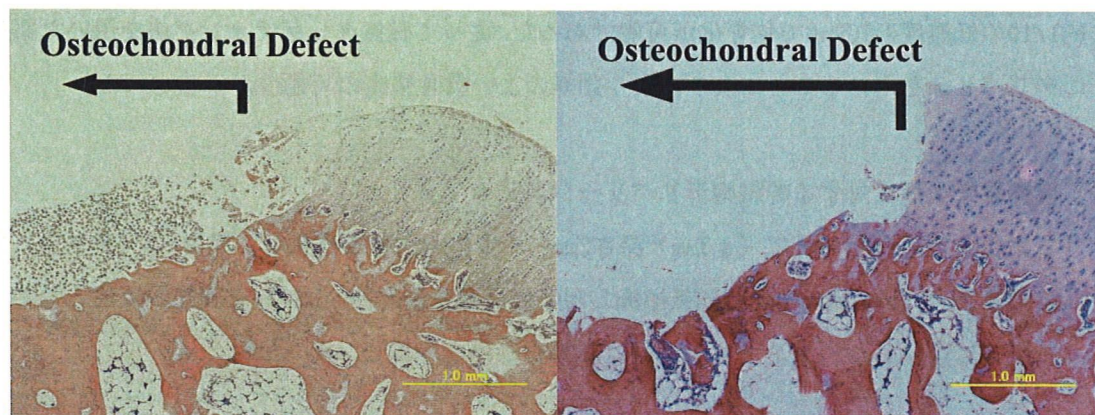


図8. 骨軟骨欠損部の組織学的所見（ヘマトキシリン・エオジン染色）

図左：磁場をかけた群. 骨軟骨欠損部に細胞が集積している. 図右：磁場をかけてない群. 骨軟骨欠損部には細胞を認めない.

次に豚の膝関節を使い、関節鏡視下でも骨髄間葉系幹細胞（MSC）のデリバリーが可能かについて実験を行った. 豚の膝蓋骨に軟骨欠損（ $\phi 10\text{mm}$ ）を作製した後、外磁場（0.6テスラ）影響下に関節鏡で観察しつつ、Ferumoxidesで磁気標識したヒトMSC（ $2 \times 10^6$ 個）を関節内に注入した. またMSC注入後、外磁場を90分かけた後に膝関節を関節鏡で観察し、MSCが軟骨欠損部に接着しているかについても検討した. コントロール群は磁場をかけない群とした.

磁場をかけた群では、磁気標識したMSCが軟骨欠損部に集積している様子が関節鏡で確認できた. コントロール群では磁気標識したMSCは関節内に拡散していた. また外磁場影響下に幹細胞を注入し、90分経過した後の関節鏡所見では、集積されたMSCが軟骨欠損部に接着していることも確認された（図9）.

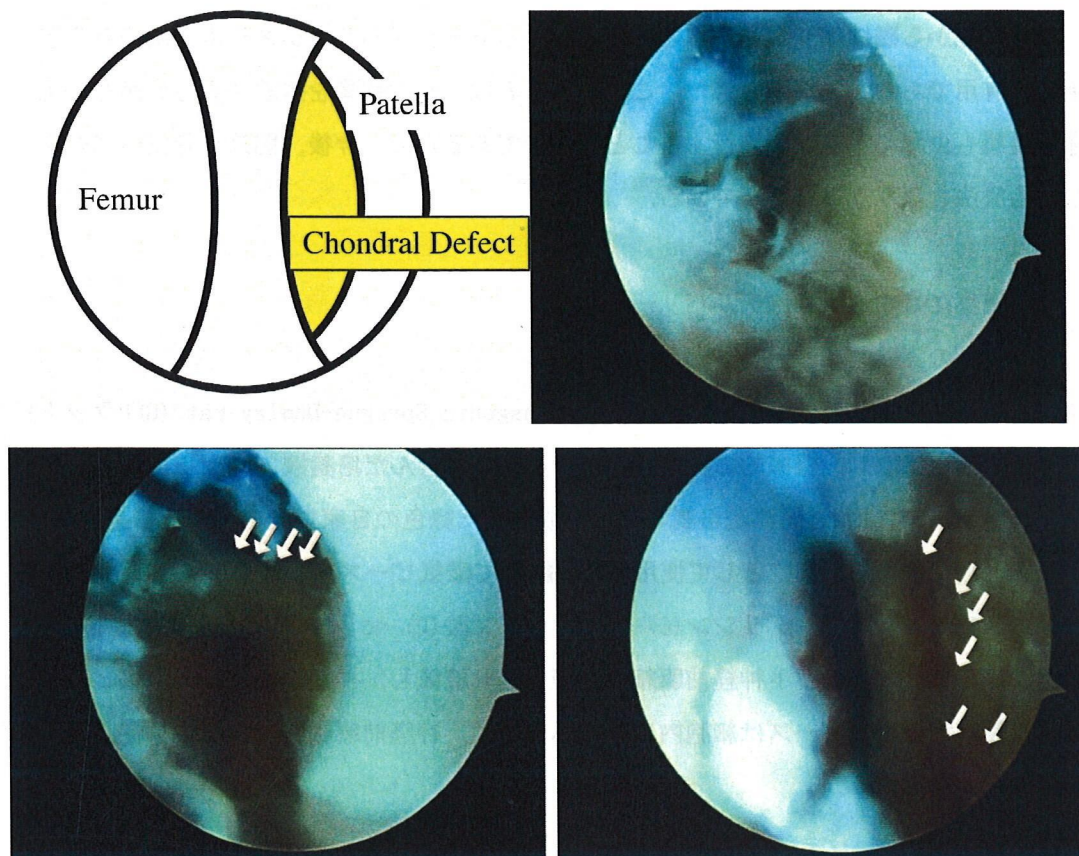


図9. 関節鏡視下に行った幹細胞デリバリーの実験

図右上：磁場をかけてない状態で磁気標識したMSC（茶色）を注入する実験の関節鏡所見。磁気標識したMSCは関節内に拡散している。図左下：磁場をかけた状態で磁気標識したMSCを注入する実験の関節鏡所見。磁気標識したMSCは軟骨欠損部に集積している（白矢印）。図右下：外磁場影響下にMSCを注入し、90分経過した後の関節鏡所見。磁気標識したMSCが軟骨欠損部に接着していた。

（図3-9は Arthroscopy; 24(1), 69-76, 2008. より引用）

また磁性体リポソームを使用した幹細胞デリバリーの実験として家兎を使用した軟骨損傷モデルを作成し、in vivoの実験を行った。

6週齢の日本白色家兎を用い、骨髓液からDexter法に従って骨髓間葉系幹細胞（MSC）を回収した。磁性体（フェリスフェア： $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ）を封入した磁性体リポソーム（ML）を調整し、抗CD44抗体を用いて免疫学的にMSCと反応させ、磁性体リポソーム・骨髓間葉系幹細胞複合体（ML-MSC）を作製した。10週齢の家兎大腿骨顆部に軟骨欠損を作製して損傷モデルとした。軟骨損傷直上の皮下に永久磁石（180mT）を埋込み7日間磁場を作用させたM群、ML-MSCを関節内注射したC群、ML-MSCを注射し、磁場を作用させたCM群を各6羽作製した。M群では損傷部は線維軟骨で修復されていたが、C群の1羽（16.7%）とCM群の3羽（50.0%）ではトルイジンブルーやサフランINで染色され、2型コラーゲン陽性である硝子軟骨様の細胞層が形成され

た。

この研究から磁性体リポソームと外磁場によるセルデリバリーシステムが関節軟骨損傷の治療に有用であることが示された。このシステムは、健常軟骨を採取する必要がない上、関節内侵襲も少なく、複数回施行することが可能であるため、今後、関節軟骨損傷に対する新しい治療法となりうると考えている。

## 5) 脊髄損傷に対する幹細胞デリバリーシステム

### I) *in vitro*の実験

胎生14日のGreen fluorescent protein transgenic Sprague-Dawley rat (GFPラット) より海馬組織を採取し、機械的に細片化した後、bFGFを含んだ培養液 (DMEM/F12 , N2 supplement, bFGF) 中で約2週間浮遊培養した。形成された緑色の自家蛍光を発する細胞集塊 (neurosphere) を神経前駆細胞として使用した。続いて磁気ビーズ (フェリスフェア100C<sup>®</sup>) を活性化させアルギニン (R)-グリシン (G)-アスパラギン酸 (D)-セリン (S) (RGDSペプチド) を結合させ、得られた培養ラット神経前駆細胞と癒合させ標識し、神経前駆細胞・磁気ビーズ複合体を作製した。磁気ビーズは細胞内に取り込まれず、神経前駆細胞の表面に存在して複合体を形成した (図10)。

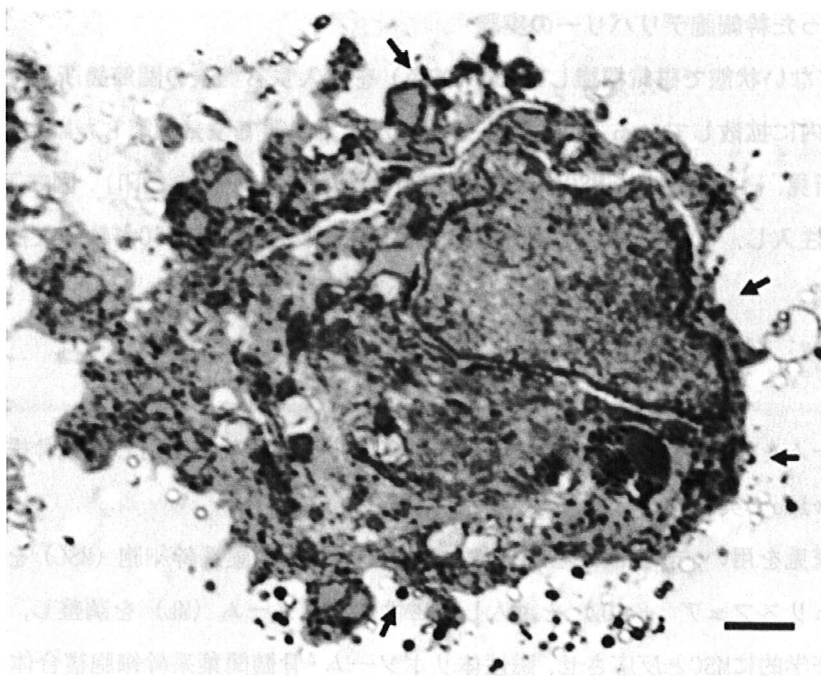


図10. 神経前駆細胞・磁気ビーズ複合体 (電子顕微鏡写真)

神経前駆細胞表面に磁気ビーズ (矢印) が付着している。 (Bar = 1  $\mu$ m)

同数の複合体と磁気ビーズを反応させていない非複合体を培養し、比較した生存率では両群間に有意差を認めなかった。またこの複合体の細胞分化能について免疫染色にて確認した

ところ、この神経前駆細胞・磁気ビーズ複合体のニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化能は、非複合体と同様であった。この複合体をin vitro で外磁場存在下に播種すると複合体は磁石設置部へと集積した。つまり磁気ビーズで標識することによる毒性や副作用を認めず、生存率、増殖能、分化能を保ちながら外磁場による誘導能を獲得していることが確認できた。

次に脳・脊髄器官共存培養法を用いてこの複合体の軸索伸長に与える影響を検討した。本器官共存培養法は脳皮質から脊髄への軸索伸長を定量的に評価できる。出生後3日目のSprague-Dawley rat (SDラット) から脳と胸髄を採取した。切除した脳皮質と脊髄は1mlの培養液が入った6-well tissue culture plate内のmembrane (Millicell-CM)上に置いた。脳皮質と脊髄の組織片は1日間培養した後、2日目に脊髄が脳皮質に接触するような位置で互いに接触させた。脳皮質と脊髄を接触させた直後に神経前駆細胞・磁気ビーズ複合体と非複合体を移植し、14日間共存培養を行った。外磁場による細胞の誘導・集積の影響を調査するため、plate底面で脳皮室と脊髄を接触させた部分に磁石(直径1mm, 110mT)を設置した磁石あり群と、磁石なし群を作製した。

14日間の共存培養後、標本作製し、DiIによる順行性トレースで標識された脳皮室から脊髄へ伸長する軸索を蛍光顕微鏡下で観察した。軸索伸長を分析するために脳皮質と脊髄の境界線と平行で、境界部から500, 1000, 1500, 2000 $\mu$ mの距離に基準線を設け、この基準線を越える軸索の本数を計測した。この共存培養組織に磁石なしで複合体と非複合体を移植すると、どちらの細胞も組織近傍に散在し組織内で伸長した軸索数は同等であり、磁気ビーズで標識することによる影響は軸索伸長能力においても存在しなかった。それに対し複合体を磁石により組織周辺に集積させると軸索伸長は有意に促進されていた(図11, 12)。つまり供給に限界のある神経前駆細胞を脊髄損傷部に集積させることで、より高い脊髄再生能力を発揮させる可能性があることが示された。

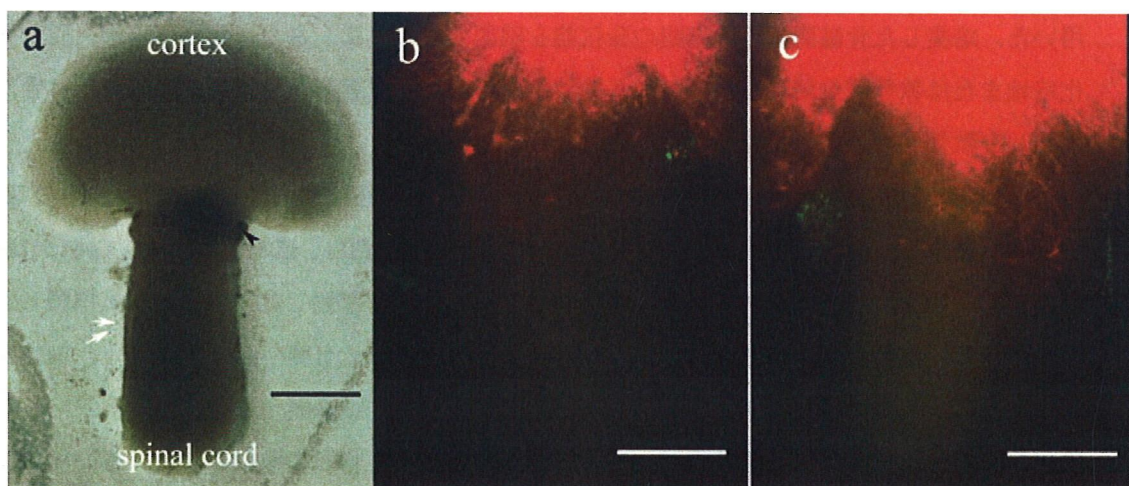


図11. 脳・脊髄器官共存培養組織

(a) 脳皮質 (cortex) と脊髄 (spinal cord) とを互いに接触させ培養した。脳皮質・脊髄

接合部に磁石（黒矢印頭）を設置し，神経前駆細胞・磁気ビーズ複合体（白矢印）集積させた。磁力を作用させていないcontrol群（b）と比較すると，磁石を設置した群（c）では，脳皮質から脊髄内への軸索伸長が促進された。（Bar=1000 μm）

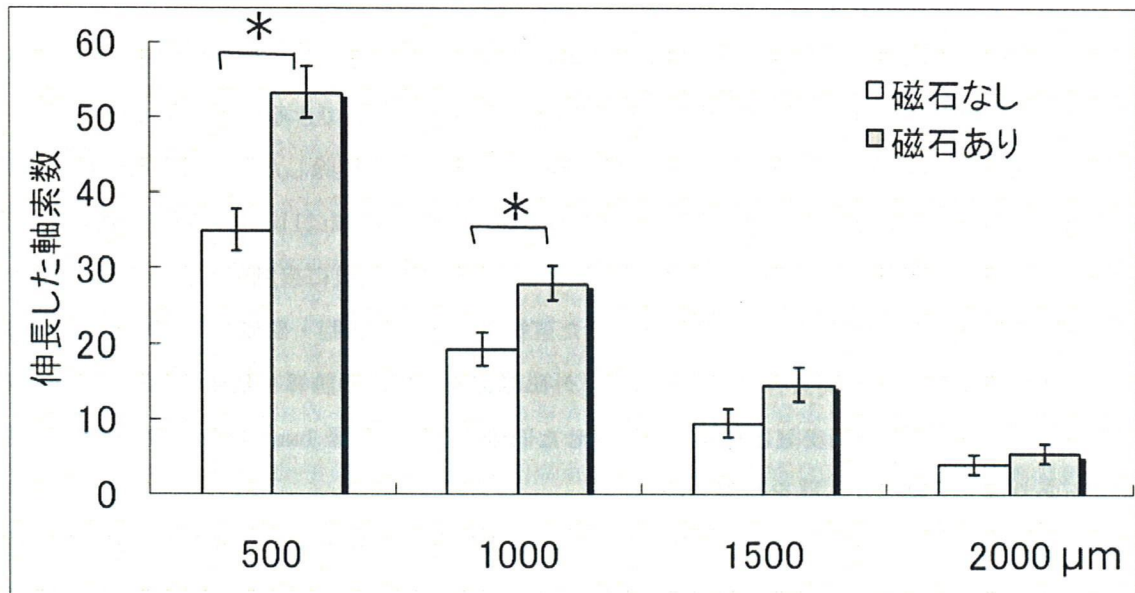


図 12. 脳・脊髄器官共存培養組織における伸長した軸索数

外磁場により複合体を組織周辺に集積させると軸索伸長は有意に（約 1.5 倍）促進された。

## II) in vivoの実験

Ferumoxidesで磁気標識した骨髄間葉系幹細胞をラットの脊髄腔でターゲティングする実験を行った。

12週齢のGFPラットの大腿骨および下腿骨から骨髄液を採取し，10%ウシ胎児血清を含んだ培養液中で21日間培養を行い，ディッシュに接着した細胞を骨髄間葉系幹細胞として移植に用いた。培養した骨髄間葉系幹細胞の分化能を確認するために，さらに骨分化培地，脂肪分化培地または軟骨分化培地を用いて21日間培養を行った。培養した骨髄間葉系幹細胞は骨，脂肪及び軟骨への分化能を有していることを確認した。

得られた骨髄間葉系幹細胞をFerumoxidesで磁気標識し，移植に使用した。SDラットの第7胸椎椎弓切除後，磁石（直径5mm, 380mT）を背側筋肉内に設置し，磁石群とした。Control群として同一素材，同一サイズの非磁性体を同じ背側筋肉内に留置した。先述の磁気標識した骨髄間葉系幹細胞を移植細胞とし，L4/5椎間より経硬膜的にくも膜下腔に投与した。24時間後に還流固定した後，ラット脊髄を摘出し矢状断切片を蛍光顕微鏡下に観察した。

磁石群では直視下に磁石留置部直下で鉄由来と思われる褐色物質の集積を認め，蛍光顕微鏡下においても同部を中心により多くのGFP陽性細胞の集積を認めた。一方，control群ではわずかな集積を認めるのみであった（図13）。各スライス脊髄表面でのGFP陽性部の面積を測



定した。磁石群は $229,498 \pm 71,390 \mu\text{m}^2$ 、対照群は $7,745 \pm 3,118 \mu\text{m}^2$ であり、有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。すなわち磁気ターゲティングを利用することにより、くも膜下腔に投与した骨髄間葉系幹細胞を胸椎椎弓切除部に設置した磁石周辺部に有効に集積させることに成功した。経脳脊髄液内に投与した骨髄間葉系幹細胞は拡散しやすいために細胞の移植効率が悪いことが危惧されたが、磁気ターゲティング法を応用することにより細胞を磁石設置部位へ有効に集積させることが可能であった。

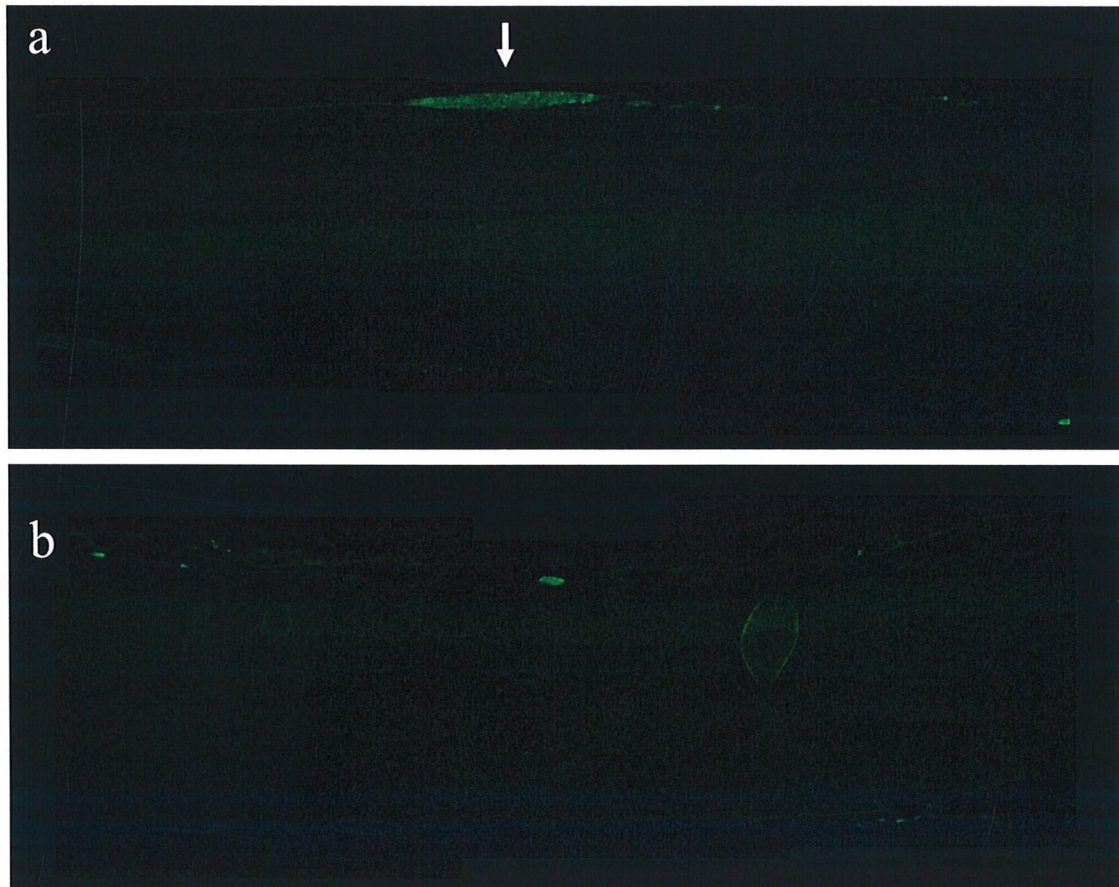


図 13. 磁力による骨髄間葉系幹細胞の集積（蛍光顕微鏡下）

(a) 磁石設置群では磁石設置位置（矢印）に GFP 陽性細胞の集積を認めた。(b) Control 群（非磁性体設置群）では明らかな集積は認めなかった。

磁気ターゲティング法は、脊髄損傷部へ細胞を誘導・集積させ、その効果を増幅させる有効な細胞移植方法の一つとなりうるものと期待される。

(図 10-13 は脊椎精髄ジャーナル;20(12):1253-1258, 2007. より引用)

#### 6) 骨欠損に対する幹細胞デリバリーシステム

磁性体と結合させた骨髄間葉系幹細胞 (MSC) と外磁場を利用し、足場材非存在下における MSC の集積及び骨分化誘導について検討した。

8週齢の Green Fluorescent Protein 発現ラットの大腿骨及び脛骨から骨髓液を採取し、分離した MSC を 10%ウシ胎児血清含有培地で培養、5 継代した。磁性体ビーズ (Ferrisphere 100C<sup>®</sup>) と MSC 特異的抗体である抗ラット CD44 抗体をアミド結合させ、抗体付加磁性体ビーズ (以下 IMB) を作製した。この抗 CD44 抗体結合 IMB と外磁場を用い、IMB と結合した MSC を選択的に採取した。対照として抗ラット CD45 抗体、IgG1 マウスモノクローナル抗体を結合した IMB、さらに抗体非存在下で同様の処理をした Ferrisphere 100C<sup>®</sup> を作製した。MSC はこれらの対照磁性体とは結合せず、MSC の抗 CD44 抗体結合 IMB との結合は特異的といえた。

直径 10cm 培養皿の底面中央に 0.43 Tesla のネオジウム磁石を設置したものを実験群、設置しないものを対照群とした。培養皿に骨分化誘導培地を加え、抗 CD44 抗体結合 IMB で選択採取した IMB 結合 MSC を  $5 \times 10^3$  個緩徐に滴下し、攪拌せず 4 週間静置培養した。培養 24 時間後、培養皿上の細胞分布を調べた。実験群のみ培養皿の中央に細胞が集積していた。骨分化の指標としてアリザリンレッドの染色性およびリアルタイム PCR (RT-PCR) によるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) とオステオカルシンの発現の検出を用いた。実験群では 4 週目において強い骨塩の染色性を認めたが、対照群では 1, 2, 4 週目全てにおいて染色性の増強を認めなかった。RT-PCR では、ALP については両群とも全ての時期で発現を認めた。オステオカルシンについては実験群で 7 日目から発現を認めたのに対し、対照群では 14 日目に発現を初めて認めた。

以上のように、抗体付加磁性体ビーズにより、MSC を選択採取し、外磁場により任意の部位に集積させることが可能であった。また IMB の結合が MSC の骨分化を妨げることもなかった。集積した細胞は、密度効果により対照群よりも早期に骨芽細胞に分化し多量に骨塩を形成しており、従来の報告と一致していた。本方法が足場材を必要とせず、少数の細胞でも任意の部位に細胞を集積させ効率よく骨形成を促す新しい骨修復の方法となりうる可能性が示唆された。

#### 7) 腫瘍に対する細胞デリバリーシステム

腫瘍に対する細胞免疫療法は 1980 年代から研究され、現在臨床の場でも用いられているが、腫瘍抗原の抗原性や発現の低さ、ヒト悪性腫瘍の不均一性、培養細胞自体の不十分な抗腫瘍活性、患者に存在する免疫抑制機構、輸注細胞の組織への集積性の低さなどにより、期待された効果が得られていない。我々は輸注細胞の組織への集積性が低いことに注目し、磁気標識した細胞ならば、磁力によって局所に集積させることができると考えた。悪性細胞に対する自然免疫に関与し、腫瘍の増殖や転移の防御において中心的役割を持つヒト Natural Killer (NK) 細胞を磁気ビーズで標識し、この NK 細胞を磁力で集積させ、HOS 骨肉腫細胞に対する効果を評価し、腫瘍の細胞免疫療法における磁気細胞輸送システムの有用性を検討した。

ヒト末梢血から単核球細胞を分離し、不活化した K562 細胞 (高 NK 感受性細胞) と IL-2 の存在下で 5 日間共培養した。培養後浮遊細胞を回収し、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK 細胞のみを分離するため

に、磁気細胞分離 (MACS) システムを用いて CD3 陽性細胞を磁気標識し除去した後、CD3 陰性細胞の中の CD56 陽性細胞を磁気標識した。こうして得られた CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK 細胞を磁気ビーズ標識ヒト NK 細胞とし、純度を FACS にて測定した。また、ターゲット細胞 (K562 細胞, HOS 骨肉腫細胞) に対する細胞傷害性を測定した。次に、磁気ビーズ標識ヒト NK 細胞が磁力によって特定部位にの集積性を評価するために、8well のチャンバースライドの well 底中央に磁石 (直径:1.5mm, 高さ:3mm, 磁束密度:0.282T) を設置して外磁場を形成し、この NK 細胞を滴下して中央 (磁石部位) と辺縁の細胞数を計測した。さらに、抗腫瘍効果を評価するために、チャンバースライドに HOS 骨肉腫細胞を前培養し、前実験と同じように磁石で外磁場を形成し、この NK 細胞を加え、HOS 細胞の経時変化 (0.5h, 1h, 2h) と、0.5h 後の中央 (磁石部位) と辺縁の HOS 細胞を観察した。コントロール群として、磁石を設置しない群で同様に実験を行った。HOS 細胞の評価には、パパニコロ染色を行い、細胞の面積を NIH image にて計測し、比較した。またアポトーシスの検出にはパパニコロ染色と anti-active caspase-3 を用いた免疫染色を使用した。

分離後の磁気ビーズ標識ヒト NK 細胞の純度は 97.7%であり、高い純度の細胞群が得られ、これらはターゲット細胞である K562 細胞, HOS 細胞に対する高い細胞傷害性を持っていた。この NK 細胞を、チャンバースライドに滴下すると、磁石あり群では、滴下細胞数に関わらず、磁石部位である中央に多く集まっていた。さらに、前培養した HOS 細胞にこの NK 細胞を加えると、磁石あり群では、時間の経過とともに磁石部位に一致した HOS 細胞が剥がれており、中央に残存している HOS 細胞の面積が磁石なし群と比較して有意に小さかった。また、NK 細胞滴下後 0.5h の HOS 細胞は、磁石あり群では中央からほとんどが剥がれており、辺縁からはほとんど剥がれていなかった。一方、磁石なし群では中央と辺縁で剥がれ方に差はなく、その数も少なかった。この HOS 細胞の残存面積を比較すると、磁石あり群の中央は辺縁に比べて有意に小さく、また磁石なし群の中央と比べても有意に小さかった。剥がれた細胞を観察すると、核、細胞質の断片化を認め、免疫染色では anti-active caspase-3 antibody にて陽性に染まる細胞が多く見られた。

以上より、1. NK 細胞が K562 細胞と IL-2 の存在下で共培養することによって増殖し、HOS に対する細胞傷害性を獲得すること、2. 磁力によって磁気標識した NK 細胞が集積し、これより輸注細胞の組織への集積性が低いという問題点を克服できると思われること、3. 磁力によって集積した NK 細胞が HOS 細胞に有効に働くことが確認された。磁石設置部位である中央の HOS 細胞が、磁力によって集積した NK 細胞によってアポトーシスをおこしたと考えられ、今まで大量に輸注していた細胞をより少ない細胞で置き換えても同じ効果を期待できると考えられた。磁気輸送を用いた腫瘍の治療では温熱療法、化学療法、放射線療法、遺伝子療法がすでに報告されているが、本研究は細胞を輸送するという点で新しく、細胞免疫療法における磁気輸送を用いた治療も可能であると思われる。自家細胞を用いることができ、拒絶反応などの合併症を回避することができるということは、大きな利点と考える。

## まとめ

以上のように磁気ビーズや磁性体リポソーム, Ferumoxides を使用して幹細胞を磁気標識し, 軟骨再生, 脊髄再生, 骨再生に利用する基礎的な実験を行い大きな成果を得た. 今後はこれらの研究成果を基にさらに基礎的な実験を遂行し, 最終的にはヒトへの臨床応用をめざすつもりである.

研究成果の刊行物・別刷