The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	間葉系幹細胞集団の同定分離方法の開発と分化過程における細胞表面マーカーの解析
Author(s)	山本, 由美子
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52331
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　山本　由美子　　）	
論文題名	間葉系幹細胞集団の同定分離方法の開発と分化過程における細胞表面マーカーの解析

論文内容の要旨

【研究目的】

近年，失われた組織の回復を目指した再生医療に関する研究，特に幹細胞に対する研究が多面的に進められ，成果が得られつつある．間葉系幹細胞は，象牙質歯髄複合体や歯根膜そして歯槽骨の源となる幹細胞として考えられており，歯科領域において重要な幹細胞として位置づけられているが，厳密に定義された細胞表面マーカーが存在しないため，その性状や分化の詳細なメカニズムについては不明な点が多い．本研究では，間葉系幹細胞に特異的なマーカーを見出す方法として，分化過程における細胞表面マーカーの発現量の変化に着目することで，間葉系幹細胞の単離や性状の解明につながると考えた．しかしながら，骨芽細胞が分化中に産生する石灰化物がフローサイトメーターによる細胞表面マーカーの解析を困難にしていた．そこで，この石灰化物を除去して，分化した骨芽細胞を回収する方法を開発し，その方法を用いて間葉系幹細胞に特異的な細胞表面マーカーを検討することを本研究の目的とした．

【材料と方法】

1.　間葉系幹細胞集団の精製

C57BL/6Jマウスより大腿骨と脛骨を採取し，シリンジを用いてα-MEMを骨髄腔内に注入し骨髄を得た．セルストレーナーを用いて軟組織を除去した後，細胞培養皿にて10%FCSと1%抗生物質を含むα-MEMにて培養を開始し，3日後にPBSを用いて浮遊細胞を除去した．その後，3日ごとに培養液を交換し，2週間後にTrypsin-EDTA処理にて付着細胞を回収した．回収した骨髄ストローマ細胞と，血球系細胞のマーカー分子に対する抗体（抗CD5，抗CD45，抗CD11b，抗Gr-1，抗7-4，抗Ter-119，抗CD45R）を結合したマグネティックビーズとを反応させた．反応後，細胞をマグネティックカラムに注入し，カラムから流出させ，回収した細胞集団（HipOPs：highly purified osteoprogenitors）を間葉系幹細胞として以下の実験に用いた．

2.　石灰化物を除去し，骨芽細胞を回収する方法の開発

1)　骨芽細胞への分化の確認

10%FCS含有α-MEMに50μg/ml ascorbic acidと10^{-8}M dexamethasoneを添加した骨芽細胞分化誘導培地中でHipOPsを1週間培養した．分化したHipOPsに対し，alkaline phosphatase (ALP) 染色とvon Kossa染色およびFACS解析を行った．

2)　Percoll®の適正濃度の設定

10％おきに10％から80％のPercoll®グラジュエントを作製し，そこに骨芽細胞分化誘導培地にて1週間培養した細胞を填塞し，遠心分離を行った．各界面の細胞層を回収し，FACS解析した．

3.　間葉系幹細胞の細胞表面マーカーの検討

1)　脂肪細胞と軟骨芽細胞への分化の確認

(1)　HipOPsを脂肪細胞分化誘導培地（10%FCS含有α-MEM, 50μg/ml ascorbic acid, 10^{-2}mM

rosiglitazone (BRL)) もしくは軟骨細胞分化誘導培地 (10%FCS含有α-MEM, 50μg/ml ascorbic acid, 10^{-8}M dexamethasone, 50ng/ml rBMP2) にて1週間培養した．それぞれ分化させた細胞に対し，脂肪細胞についてはOil red O染色，軟骨芽細胞については2型コラーゲンに対する免疫組織化学染色を行った．

(2) 脂肪細胞や軟骨芽細胞そしてHipOPsから，セパゾールを用いてmRNAを回収した．逆転写酵素を用いてcDNAを合成し，脂肪細胞分化マーカーである*PPARγ*，軟骨芽細胞分化マーカーである*Aggrecan*のmRNA発現量をreal-time PCRにて定量した．

2) 細胞表面マーカーの発現解析

2.2)で分離した骨芽細胞や脂肪細胞そして軟骨芽細胞とHipOPsを, CD16/32にてブロッキングした後, biotin-Sca-1, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106抗体を各々反応させ, APC-streptoavidineにて発色させた．その後，各々の細胞表面マーカー分子の発現量についてFACS解析した．

【結果】

1． 骨芽細胞分化誘導培地で1週間培養した細胞に対してALP・von Kossa染色を行ったところ, Colony forming unit-osteoblastsの形成を確認した．また, *OCN, ALP, Runx2*の発現も上昇していた．

2． 骨芽細胞分化誘導1週間の細胞に対してFACS解析した結果，石灰化物のみを検出した．また強度の自家蛍光も検出された．

3． Percoll®グラジュエントの各界面の細胞をFACS解析したところ, 10～70％までの各界面には生細胞を検出したが, 70％と80％の界面からは生細胞が検知されなかった．また，石灰物は沈殿し，除去されることがわかった. 10％と70％の2層のPercoll®グラジュエントでほぼすべての生細胞の回収に成功した．

4． 3.で開発した方法により，骨芽細胞へと分化したHipOPsとHipOPsの細胞表面マーカーの発現量について比較解析したところ, Sca-1, CD44, CD73, CD105, CD106の発現が減少していた．

5． 脂肪細胞分化誘導培地で1週間培養したところ，多数のOil red O陽性細胞が確認され，また*PPARγ*の発現も上昇していた．また，軟骨芽細胞分化誘導培地中で1週間培養したところ，多数の2型コラーゲン陽性細胞が確認され, *Aggrecan*の発現も上昇していた．

6． 脂肪細胞，軟骨芽細胞へと分化したHipOPsとHipOPsの細胞表面マーカーの発現量について比較解析したところ, Sca-1, CD73, CD105, CD106の発現が減少していた．

【考察および結論】

Percoll®グラジュエントの各界面の細胞のFACS解析した結果より, 10～70％までの各界面には生細胞を検出したが, 70％と80％の界面から生細胞が検知されなかったことから, 10％と70％の2層のPercoll®グラジュエントでほぼすべての生細胞を回収できると考えた．そして, 10％と70％のPercoll®グラジュエントで分離したところ，骨芽細胞が産生した石灰化物を簡便に除去しつつ, 2層の界面から分化した骨芽細胞を回収することができた．さらに，回収した細胞の細胞表面マーカーの解析を行ったところ, Sca-1, CD73, CD105, CD106の発現が分化することで減少していた．特にCD105の発現パターンは，分化することで二峰性から一峰性に変化していたことから， CD105陽性細胞群が間葉系幹細胞群であることが示唆された．また, CD44は骨芽細胞分化時のみ発現が低下することから，骨芽細胞分化特異的なマーカーであることも示唆された．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　山本　由美子　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	林　美加子
	副 査	教授	西村　理行
	副 査	准教授	河合　伸治
	副 査	講師	墨　哲郎

論文審査の結果の要旨

本研究は，分化した骨芽細胞を回収する方法を開発し，その手法を用いて間葉系幹細胞に特異的な細胞表面マーカーを見出すことを目的として行ったものである．

その結果，10%-70% の Percoll®濃度勾配が骨芽細胞と石灰化物の分離に最適であることが明らかとなった．本法を用いて間葉系幹細胞から分化する過程での細胞表面タンパク質発現量の変化について解析したところ，Sca-1，CD73，CD105，CD106 が間葉系幹細胞集団に高発現し，分化過程で減少することがわかり，間葉系幹細胞に特異的なマーカーの候補であることが示唆された．

本研究で開発した骨芽細胞回収法は，間葉系幹細胞に特異的な細胞表面マーカーの探索に有効な手法であり，間葉系幹細胞の分化の分析に寄与するものであることより，本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める．