



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

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

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻（歯科保存学教室）
（指導教官：林 美加子教授）

山本由美子

本論文の一部は、第 140 回日本歯科保存学会（2014 年 6 月，滋賀）および
The International Bone and Mineral Society（2014 年 3 月，ベルギー）にお
いて発表した。

目次

I. 緒言	1
II. 材料および方法	
1. HipOPs の調整	7
2. 骨芽細胞への分化誘導と ALP 染色および von Kossa 染色	8
3. Percoll®密度勾配遠心分離法	9
4. 脂肪細胞への分化誘導と Oil red O 染色	9
5. 軟骨細胞への分化誘導と 2 型コラーゲン免疫組織化学染色	10
6. 脂肪細胞分化マーカーと軟骨細胞分化マーカーの定量	10
7. 細胞表面マーカーの発現解析	11
8. 統計処理	12
III. 結果	
1. 骨芽細胞によって産生される石灰化物の FACS 解析への影響	13
2. 分化した骨芽細胞により生じた石灰化物の除去法の検索	14
3. 分化した骨芽細胞を回収する最適な濃度勾配の検索	15
4. 細胞表面マーカーの発現解析	16
IV. 考察	20
V. 結論	29
VI. 謝辞	30
VII. 参考文献	31
X. 図表	45

I．緒言

う蝕や外傷そして歯周病などにより失われた象牙質・歯髄複合体や歯周組織を回復しうる治療法として組織再生療法が有効であると提唱されてはいるが、その治療法は未だ完全には確立されていない。近年、幹細胞研究の進展により幹細胞を用いた組織再生療法について様々な領域で研究がすすめられている[1, 2]。歯科においては、間葉系幹細胞が重要な幹細胞として位置づけられている[3]。その理由として、象牙質・歯髄複合体や歯周組織（歯槽骨や歯根膜など）に分化することができる幹細胞として考えられているからである[4]。間葉系幹細胞は、骨格筋や骨そして脂肪などの間葉系組織への多分化能を有する幹細胞であり[5, 6]、幹細胞を含む細胞集団は、様々な組織から得られることが報告されている[7-16]。そして、間葉系幹細胞は主に骨髓中の微小環境内に存在し、間葉系の恒常性の維持のみならず、造血幹細胞の増殖や分化の制御も行っていることが明らかとなってきた[5, 17-20]。このような間葉系幹細胞が有する多様な働きは、組織再生療法における有力な細胞供給源として期待されており、また、倫理的観点や拒絶反応といった問題点についても自己の骨髓細胞を用いることで解消できることから、間葉系幹細胞は臨床応用に適した幹細胞といえる[21]。しかしながら、その性状については依然として不明な点が多

い.

Friedenstein らは、骨髄細胞の中に繊維芽細胞様の形態を持つ骨形成細胞が存在することを 1970 年代に発見した[22]. その後の研究により、骨髄中に存在する付着性の繊維芽細胞様細胞は、1 つのクローンからさまざまな間葉系細胞に分化できるということがわかってきた[23-25]. こうして、骨髄中には多分化能をもつ幹細胞、すなわち間葉系幹細胞が存在するという概念が生まれた[5, 7]. そして現在、ヒト間葉系幹細胞は 1) CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR といった血球系マーカー群の発現が陰性であること、2) CD73 や CD90 そして CD105 が陽性であること、3) 付着系細胞であり、少なくとも骨芽細胞や軟骨芽細胞そして脂肪細胞の 3 系統の細胞に分化できる幹細胞として、国際細胞療法学会によって定義付けられている[26]. しかしながら、現状の間葉系幹細胞は heterogeneous であり、分離法や培養条件によって、細胞集団の構成が大きく左右される[27, 28]. ゆえに細胞表面タンパク質の発現量についての解析結果はまちまちであり、厳密に定義されたマーカーが存在しないといった問題点がある[27, 28]. そのため、分化誘導培地で骨芽細胞や軟骨芽細胞そして脂肪細胞に分化できる幹細胞を便宜的に間葉系幹細胞と呼んでいるのが現状である.

間葉系幹細胞の単離法はまだ確立されていないが、組織再生療法への応用は

行われてきている。たとえば、造血幹細胞移植時に間葉系幹細胞を同時に移植すると免疫反応の抑制が起こり、組織片対宿主病が軽減されることが明らかになったことから、これを利用した細胞医薬の開発が進められている[29-33]。他にも間葉系幹細胞移植により生体内で骨格筋や軟骨などへの分化が可能であることから、組織再生のための細胞医薬の臨床試験が米国で開始されている[21]。ところが、間葉系幹細胞を高濃度で移植すると、骨や軟骨組織の異所性形成を誘発するという問題が生じた。これは移植に用いられる間葉系幹細胞集団内に様々な系列に分化した前駆細胞が存在し、これら前駆細胞によって骨や軟骨組織の異所性の形成を惹起するのではないかと推察されている[34]。このようなことから、安定した組織再生療法への応用を行ううえで、前駆細胞の混入のない間葉系幹細胞を精製する方法の確立は重要であり、間葉系幹細胞に特異的なマーカーを見出すことが幹細胞精製の鍵となると考えられる。現在までに実施されている動物実験においては、マウス骨髄細胞から血球系細胞の混入を除去することは、他の種に比べて非常に困難であることが知られているばかりか[25]、報告されている細胞表面マーカーの結果は一致していない[27, 35-40]。

現在、間葉系幹細胞を分離する方法は、特定の表面抗原を用いる positive selection 法と造血系細胞を除去する negative selection 法の 2 つに大きく

分けることができる. positive selection 法は, 間葉系幹細胞のマーカーと推察されている Sca-1, CD44, CD90 (Thy1.1), SH2 (CD105 もしくは endoglin), SH3, SH4 (CD73) に対する抗体を用いて行われている[27, 41-44]. 一方, negative selection 法は, マウスの骨髄に含まれる多量の血球細胞を取り除くためにいくつかの血球系の細胞に対する抗体を使用して行われている[41, 42, 45]. ところが, 上記の方法により精製した幹細胞集団が, 骨芽細胞や軟骨芽細胞そして脂肪細胞の 3 系統すべてへの分化能を有していることを検証している報告は少なく, またそれらを示していたとしても *in vivo* での評価や, どの程度濃縮できたかを数値化して示している報告はあまり見当たらない.

近年, Itoh らはマグネティックマイクロビーズを用いた negative selection 法を行うことによって間葉系幹細胞を簡便に濃縮する方法を見出した[46]. 通常, 骨髄から調整した濃縮前の骨髄ストローマ細胞に含まれる間葉系幹細胞は, 15 万個に 1 個の確率で含まれているが, 濃縮した新規細胞集団には 1000 個に 1 個の確率で含まれていることがわかった. つまり, 間葉系幹細胞が約 100 倍濃縮されていることが明らかとなった. さらに, この新規細胞集団を用いて *in vivo* 細胞移植実験を行い, 移植 2 カ月後の移植片から組織切片を作成し, 切片を観察したところ, 多量の硬組織の再生が確認された. そして, 卵円形の皮質骨様硬組織によって囲まれた内部には, 骨梁や骨髄様組

織が観察された。さらに、移植片をマイクロ CT にて硬組織量を測定したところ、この新規幹細胞集団は濃縮前の骨髓ストローマ細胞と比較して約 100 倍もの硬組織再生能を有することが明らかとなった。この硬組織再生能の高い “highly purified osteoprogenitors” (HipOPs) と命名された新規幹細胞集団を本研究に用いることとした[46]。

HipOPs は間葉系幹細胞を濃縮したものではあるが、未だ heterogeneous な幹細胞集団である。したがって、間葉系幹細胞の性状の解明や、臨床応用のためには更なる濃縮が必要である。homogeneous な間葉系幹細胞を精製する新たな方法を確認するためには間葉系幹細胞表面上特異的に発現する細胞表面マーカーを見出す必要がある[24, 27]。その細胞表面マーカーを見出す実験を構築するために、1 つの仮説を立てた。つまり、骨芽細胞や軟骨芽細胞そして脂肪細胞に分化しうる間葉系幹細胞は、その分化過程で、細胞表面マーカーの発現パターンを変化させるのではないかと推察した。図 1 に示すように、*in vitro* において骨芽細胞や軟骨芽細胞そして脂肪細胞に分化しうる間葉系幹細胞の細胞表面には 4 種類のタンパク質 (A・B・C・D) が発現しているが、分化過程でタンパク質の発現量が変化し、骨芽細胞上には A , 軟骨芽細胞上には B , そして脂肪細胞上には C が発現していると仮定した場合、差し引きすると D のみが間葉系幹細胞上に特異的に発現していることになる。つまり、D のタ

ンパク質が間葉系幹細胞に特異的な細胞表面マーカーの可能性がある．このように，間葉系幹細胞と分化した細胞の細胞表面上に発現するタンパク質群を差し引きすることで間葉系幹細胞に特異的に発現する細胞表面マーカーが特定できると考え，細胞表面マーカーの発現量の解析を行うこととした．

しかしながら，分化した骨芽細胞は，石灰化物を産生し，この石灰化物が FACS 解析を妨げるという障壁が予想された．そこで，その分離法として Percoll® 密度勾配遠心分離法に着目した．Percoll® はポリビニルピロリドンでコートされた直径 15-30 nm のケイ酸コロイド粒子（含水率 23%）より成る試薬で，遠心分離により特定の細胞や細胞小器官，ウイルス等を分離するために用いられる．これまでも Percoll® 濃度勾配を用いて末梢血幹細胞を分離したという報告[47]，Percoll® と磁気ビーズにより分化段階別の好中球前駆細胞を分画採取したという報告[48]，Percoll® により母体血中に有核赤血球を回収したという報告がある[49]．また Percoll® は産婦人科の不妊治療の場面で臨床応用されており[50-52]，細胞毒性の低い材料であるため[53]，将来的にも臨床応用しやすいという利点がある．本研究では Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いて，石灰化物と分化した骨芽細胞の分離を試みた．さらに，開発した方法にて仮想の間葉系幹細胞マーカーの発現についても解析を行い，検討した．

II. 材料および方法

1. HipOPs の調整

4-6 週齢の C57BL/6J マウス（チャールス・リバー，横浜）の大腿骨および脛骨を採取し，抗生物質を含んだ Alpha modification of Eagle's Minimum Essential Medium (α -MEM; life technologies, Carlsbad, CA, USA) に浸漬した．骨頭を除去した後に，シリンジを用いて α -MEM を骨髓腔内に注入し，骨髓を得た．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% Fetal calf serum (FCS; ニチレイ，東京) と 1% 抗生物質を含む α -MEM にて培養を開始し，3 日後に Phosphate-Buffered Saline (PBS; Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, MO, USA) を用いて 3 回洗浄することで浮遊細胞を除去した．その後，2-3 日ごとに培養液を交換し，80% セミコンフルエントになるまで，2 週間培養を続けた．そして，0.25% Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid (0.25% Trypsin-EDTA solution, life technologies) 処理にて付着細胞を回収した（骨髓ストローマ細胞）．回収した骨髓ストローマ細胞と，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）が結合したマグネ

ティックビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) とを反応させた。反応後、マグネティックカラムに注入し、カラムから流出してきた細胞を回収し、間葉系幹細胞集団 (HipOPs : highly purified osteoprogenitors) として以下の実験に用いた[46]。なお、本研究における全ての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け、承認のもとに実施した。(受付番号：動歯-21-002-0 および動歯-26-011-0)

2. 骨芽細胞への分化誘導と alkaline phosphatase (ALP) 染色および von Kossa 染色

HipOPs を 10% FCS 含有 α -MEM に 50 μ g/ml ascorbic acid (AA; Sigma-Aldrich Corporation) と, 10 mM β -glycerophosphate (β g; Sigma-Aldrich Corporation), 10^{-8} M dexamethasone (Dex ; Sigma-Aldrich Corporation) を添加した骨芽細胞分化誘導培地にて細胞を培養した。7 日間培養後, 10% 中性緩衝ホルマリン液で 15 分間固定した。Tris-HCl に Fast red violet LB Salt および Naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich Corporation) を溶解させて作製した ALP 染色液を加えて 45 分間放置したのち, 蒸留水で 3 回洗浄した。さらに 2.5% 硝酸銀水溶液を加えて 30 分間放

置し、蒸留水で 3 回洗浄した.

3. Percoll® 密度勾配遠心分離法

HipOPs を 10% FCS 含有 α -MEM に 50 $\mu\text{g/ml}$ AA (Sigma-Aldrich Corporation) と 10 mM β g (Sigma-Aldrich Corporation) そして 10^{-8} M Dex (Sigma-Aldrich Corporation) を添加した骨芽細胞分化誘導培地にて細胞を培養した. 7 日後に Trypsin-EDTA 処理にて細胞を回収した. Percoll® (GE ヘルスケアジャパン, 東京) を Hank's balanced salt solution (HBSS; life technologies) にて希釈して 10% おきに 10% から 80% の Percoll® 溶液を調製した. 遠沈管に各濃度の Percoll® 溶液層を作製し, 濃度勾配を作製した. そこに HipOPs の細胞懸濁液を填塞し, 3000 rpm で 10 分間, 4 °C にて遠心分離を行った. 各界面の細胞層を回収し, その後 Fluorescence activated cell sorting (FACS) 解析を行った.

4. 脂肪細胞への分化誘導と Oil red O 染色

HipOPs を 10% FCS 含有 α -MEM に 50 $\mu\text{g/ml}$ AA (Sigma-Aldrich

Corporation) と PPAR γ のリガンドとして知られる 10^{-2} mM rosiglitazone (BRL49653; Cayman Chemical, Michigan, USA) を添加した脂肪細胞分化誘導培地にて培養した。7 日間培養後、脂肪滴を内在する細胞を 10% 中性ホルマリン溶液にて固定し、Oil red O 溶液 (0.5% Oil red O 含有 isopropanol を 3 : 2 の割合にて蒸留水で希釈したもの) を用いて 30 分間染色を行った。染色後、蒸留水にて 3 回洗浄した。

5. 軟骨細胞への分化誘導と 2 型コラーゲン免疫組織化学染色

HipOPs を 10% FCS 含有 α -MEM に 50 μ g/ml AA (Sigma-Aldrich Corporation) と、 10^{-8} M Dex (Sigma-Aldrich Corporation) , 50 ng/ml recombinant human BMP2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を添加した軟骨細胞分化誘導培地にて細胞を培養した。7 日間培養後、10% 中性ホルマリン溶液にて 30 分間固定し、ヤギ抗 2 型コラーゲン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) を反応させ、ビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体と Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) にて染色した。

6. 脂肪細胞分化マーカーと軟骨細胞分化マーカーの定量

脂肪細胞分化誘導培地および軟骨細胞分化誘導培地にて 7 日間培養した後、Sepasol-RNA I（ナカライテスク、京都）を用いて mRNA を抽出した。この mRNA から、Oligo-dT Primer (Life Technologies) および逆転写酵素（東洋紡、大阪）を用いて cDNA を合成した。cDNA は、脂肪細胞分化マーカーである *PPAR* γ 、軟骨細胞分化マーカーである *aggrecan* に特異的なプライマー（表 1）および SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, California, USA) そして ABI 7500 Fast System (Applied Biosystems) を用いて (95°C 10 秒 / 60°C 30 秒) \times 40 サイクルのリアルタイム PCR を行った。これらの遺伝子発現量の定量は、内在性コントロールとして用いた L32 遺伝子の発現量との比較により行った。この相対的定量化に必要な計算は、 $\Delta\Delta$ Ct 法により行った。

7. 細胞表面マーカーの発現解析

細胞を CD16/CD32 (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) にてブロッキングした後、ビオチン化抗 Sca-1, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 抗体を各々15分間反応させる。その後、APC-streptoavidine (BD Biosciences) にて発色させた。各々の細胞表面マーカー分子の発現量は、guava easyCyte (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を用いて解析した。

8. 統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で表示した. 一連の実験では Student's t -test または One-way ANOVA および Tukey's test によって有意水準 5% で統計学的検定を行った.

Ⅲ. 結果

1. 骨芽細胞によって産生される石灰化物の FACS 解析への影響

本研究では Itoh らの方法で濃縮した HipOPs [46]を間葉系幹細胞集団として用いた. この間葉系幹細胞集団 HipOPs を骨芽細胞分化誘導培地にて 7 日間培養し, ALP 染色および von Kossa 染色を行ったところ, Colony-forming units-osteoblast (CFU-0) の形成が確認された (図 2 A). 通常, 間葉系幹細胞集団として骨髄ストローマ細胞が用いられるが, 骨髄ストローマ細胞を同様の条件下で培養した場合, 28 日培養の後に CFU-0 が観察されることがわかっている. つまり, HipOPs は骨髄ストローマ細胞 (通常の間葉系幹細胞集団) と比較して 1/4 の期間で CFU-0 を形成することがあきらかとなった. このことから HipOPs は, 間葉系幹細胞が濃縮された細胞集団であることがあらためて証明された[46]. そして, HipOPs を骨芽細胞分化誘導培地にて 7 日間培養し, 骨芽細胞へと分化した HipOPs (Osteoblastic-HipOPs: OB-HipOPs) を回収し, FACS 解析を行った. 図 2 B のように, X 軸を Forward scatter (FSC) にて Y 軸を Side scatter (SSC) にて展開したところ, Y 軸近傍に偏在するパターンを示した. この結果は, 石灰化物のみが検出され, 生細胞を検出することができなか

ったことを示している (図 2 B). さらに, OB-Hip0Ps を biotin-抗 IgG1 抗体と反応させたのち, APC-ストレプトアビジンにて発色させ, FACS 解析を行った. その結果, 抗 IgG1 抗体蛍光強度で展開したヒストグラムにおいて, IgG1 抗体がコントロール抗体であるにも関わらず, 偽陽性のピークが検出されることがわかった (図 2 C). 以上の結果から, 分化した骨芽細胞の細胞表面タンパク質を解析するためには, 産生された石灰化物を除去することが必須条件であることが明らかとなった.

2. 分化した骨芽細胞により生じた石灰化物の除去法の検索

石灰化物を除去する方法として, 目的の細胞を分離するために多くの分野で広く用いられている Percoll[®] 密度勾配遠心分離法に着目した. 図 3 に Percoll[®] 密度勾配遠心分離法の 1 例として, 10% と 20% の Percoll[®] 濃度勾配を用いて分化した骨芽細胞と産生された石灰化物を分離する方法の概略図を示す. まず, Percoll[®] を HBSS にて希釈して 10% と 20% の Percoll[®] 溶液を作成する. そして, 高濃度の 20% Percoll[®] 溶液を遠沈管へ静かに注入し, 次に 20% Percoll[®] 溶液の上に低濃度の 10% Percoll[®] 溶液を静かに注入して, 10% と 20% の異なった濃度の 2 層の濃度勾配を作製した. 次に, Hip0Ps

を骨芽細胞分化誘導培地にて培養し、骨芽細胞へと分化した OB-HipOPs を回収後、HBSS にて懸濁した。この OB-HipOPs 細胞懸濁液を 10%-20% Percoll® 密度勾配上へ静かに注入した後、遠心分離した。すると、石灰物は沈殿し、10% と 20% の層の界面に、細胞層の存在が観察された (図 3)。同様に、20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-80% の Percoll® の濃度勾配を用いて細胞分離を行ったところ、石灰化物の沈殿および界面に細胞層の存在が観察された。そして、界面の細胞層から回収した骨芽細胞 (OB-HipOPs) に対して FACS 解析を行った。図 4 に示すように、X 軸を FSC にて Y 軸を SSC にて展開したところ、図 2 B とは明らかにことなるパターンを示した。つまり、回収された OB-HipOPs は、生細胞が検出される領域に分布していることがわかった。そして、10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70% の界面からも生細胞が検出される結果が得られた。しかしながら、70%-80% の界面から生細胞は検出されなかった (図 4)。これらの結果から、Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いることで、石灰化物が除去され、分化した骨芽細胞を 10% から 70% の界面から回収できることがわかった。

3. 分化した骨芽細胞を回収する最適な濃度勾配の検索

次に、OB-Hip0Ps は 10% から 70%までの濃度勾配から回収されることから、10%-20%, 20%-30%, 30%-40%, 40%-50%, 50%-60%, 60%-70%, 70%-80% の Percoll® 濃度勾配を作成しなくとも 10% と 70% の 2 層の Percoll® 濃度勾配だけで石灰化物と OB-Hip0Ps を分離することが可能なのではないかと考えた。そこで、10% と 70% の 2 層の Percoll® 濃度勾配を遠沈管に作成し、OB-Hip0Ps を填入し、遠心分離したところ、石灰物の沈殿および、10% と 70% の界面に細胞層を確認することができた。そして、FACS 解析の結果、生細胞が存在することが確認された (図 5 A)。さらに、回収した OB-Hip0Ps を biotin-抗 IgG1 抗体と反応させたのち、APC-ストレプトアビジンにて発色させ、FACS 解析を行った。その結果、抗 IgG1 抗体蛍光強度で展開したヒストグラムにおいて、図 2 C に示されるような、石灰化物を除去していない OB-Hip0Ps で観察されていた偽陽性ピークは、この 10%-70% Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いて分離した OB-Hip0Ps では観察されないことがわかった (図 5 B)。この結果から、石灰化物の除去および分化した細胞の回収は、10%-70% Percoll® 密度勾配が試験条件の中では最適であることが明らかとなった。

4. 細胞表面マーカーの発現解析

最後に、10%-70% Percoll[®] 密度勾配遠心分離法によって分離した OB-HipOPs と HipOPs との間での細胞表面タンパク質発現量の差異について、現在のところ間葉系幹細胞マーカーとして考えられている、Sca-1, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106（仮想間葉系幹細胞マーカー）について検索を行った。10%-70% Percoll[®] 密度勾配遠心分離法にて分離した OB-HipOPs と HipOPs をそれぞれ、各 biotin-抗 Sca-1, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 抗体と反応させたのち、APC-ストレプトアビジンにて発色させ、FACS 解析を行った。その結果、OB-HipOPs では Sca-1, CD44, CD73, CD105, CD106 の発現量が大幅に減少していることがわかった（図 6, 表 2）。特に CD105 については特徴的な発現パターンを示していた。つまり HipOPs では CD105 を高発現している細胞群（CD105^{high} 細胞群）と、低発現の細胞群（CD105^{low} 細胞群）からなる二峰性を示しているが、分化した OB-HipOPs では HipOPs の CD105^{low} 細胞群と重なる一峰性の発現パターンを示した。

次に、脂肪細胞および軟骨芽細胞へ分化させた HipOPs に対しても細胞表面タンパク質発現量の検索を行った。まず、それぞれの分化誘導培地にて培養した HipOPs がそれぞれの系列の細胞に分化しているかどうかについて検証した。HipOPs を脂肪細胞分化誘導培地にて 7 日間培養後、Oil red O 染色を行ったところ、多数の Oil red O 陽性細胞が確認された（図 7 A）。さらに、脂肪細

胞の分化マーカーである PPAR γ の発現量をリアルタイム PCR にて検索したところ、PPAR γ の発現量の上昇も確認された (図 7 C). また、軟骨芽細胞分化誘導培地中で 7 日間培養した後、抗 2 型コラーゲン抗体を用いての免疫染色をおこなったところ、多数の 2 型コラーゲン陽性細胞が確認された (図 7 B). さらに、軟骨芽細胞の分化マーカーである Aggrecan の発現量をリアルタイム PCR にて検索したところ、Aggrecan の発現量の上昇も確認された (図 7 D). 以上の検証結果から、Hip0Ps を脂肪細胞分化誘導培地にて 7 日間培養した細胞を脂肪細胞へ分化した Hip0Ps (Adipogenic-Hip0Ps: AD-Hip0Ps) として、また Hip0Ps を軟骨芽細胞分化誘導培地にて 7 日間培養した細胞を軟骨芽細胞へ分化した Hip0Ps (Chondrogenic-Hip0Ps: Ch-Hip0Ps) として以下の FACS 解析に用いた. また、脂肪細胞分化誘導培地および軟骨芽細胞分化誘導培地にて培養を行っても石灰物は産生されないため、Percoll[®] 密度勾配遠心分離法を行う必要性はなく、分化誘導した細胞を直接 FACS 解析に供した.

まず、AD-Hip0Ps と Hip0Ps の間での Sca-1, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 の発現量の差異について検索をおこなった. AD-Hip0Ps と Hip0Ps をそれぞれ、各 biotin-抗 Sca-1, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 抗体と反応させたのち、APC-ストレプトアビジンにて発色させ、FACS 解析を行った. その結果、AD-Hip0Ps では Sca-1, CD73, CD105, CD106 の発現量が大幅に減少

していることがわかった（図 8，表 3）．特に，CD105 の発現は他の細胞表面タンパク質と異なる発現パターンを示していた．同様に，Ch-Hip0Ps と Hip0Ps の間での仮想間葉系幹細胞マーカーの発現量の差異についても検索をおこなった．その結果，Ch-Hip0Ps においても Sca-1，CD73，CD105，CD106 の発現量が大幅に減少しており，CD105 の発現パターンは特徴的であった．（図 9，表 4）．以上の結果から，Hip0Ps と，分化した OB-Hip0Ps と AD-Hip0Ps そして Ch-Hip0Ps との間での細胞表面タンパク質の発現量の差異について検索することが可能となり，Sca-1，CD44，CD73，CD105，CD106 の発現量に差異があることが明らかとなった．

IV. 考察

間葉系幹細胞は象牙質・歯髄複合体や歯周組織といった多様な細胞に分化できる幹細胞として組織再生療法への応用が期待されている。しかしながら、現状の間葉系幹細胞は、特定の形態学的特徴や特異的な細胞表面マーカーなどにより定義された細胞ではなく、少なくとも *in vitro* で骨芽細胞や軟骨芽細胞そして脂肪細胞に分化しうる幹細胞集団を便宜的に間葉系幹細胞として定義されているに過ぎないため、未だに詳細な性状はわかっていない。間葉系幹細胞の性状を解明するためには、間葉系幹細胞を単離する必要性があり、間葉系幹細胞の表面上に特異的に発現する細胞表面マーカーを見出すことが重要である。そこで、間葉系幹細胞集団として骨髓ストローマ細胞から間葉系幹細胞を濃縮して得られた細胞集団 (HipOPs) [46]を用いて細胞表面マーカーの解析を行うこととした。また、本研究ではマウス骨髓細胞を実験に用いた。これはマウス骨髓細胞を用いる際多数匹の骨髓を混合して使用するため、ヒト骨髓細胞に比べて個体差の影響を受けにくいこと、また将来的に間葉系幹細胞を維持する遺伝子の解析を行う場合、遺伝子改変マウスを使用することが可能だからである。そして、マウス骨髓細胞で間葉系幹細胞を分離し、間葉系幹細胞の詳細な性状や分化メカニズムを明らかにした後に、ヒト骨髓細胞へ応用することを考えて

いる.

Hip0Ps を, 骨芽細胞分化誘導培地や軟骨芽細胞分化誘導培地および脂肪細胞分化誘導培地にて培養し, 分化誘導前の Hip0Ps と分化誘導後の Hip0Ps 上に発現する細胞表面タンパク質の発現量を比較することで, 真の間葉系幹細胞マーカーを特定できるのではないかと仮説を立てた. すなわち, マウス間葉系幹細胞集団として Hip0Ps を用い, 骨芽細胞分化誘導培地や軟骨芽細胞分化誘導培地および脂肪細胞分化誘導培地にて培養して, 分化誘導をおこない, 分化誘導前の Hip0Ps と分化誘導後の Hip0Ps 上に発現する細胞表面タンパク質を比較することで, 真の間葉系幹細胞マーカーを特定できるのではないかと考えた.

まず, 7 日間の分化誘導で Hip0Ps が骨芽細胞や軟骨芽細胞そして脂肪細胞に分化できることを細胞染色と分化マーカーの発現レベルにて確認した (図 2 A, 図7). その後, これら分化した細胞に対して FACS 解析を行ったところ, 骨芽細胞が分化する過程で多量の石灰化物を産生するため, 骨芽細胞分化誘導培地にて培養した Hip0Ps の細胞表面タンパク質の解析は不可能であることが明らかになった (脂肪細胞および軟骨芽細胞は解析可能であった). その理由は, フローサイトメーターは石灰化物を 1 つの細胞として検知してしまうため, 分化した生細胞を解析することができず, FSC の小さな石灰化物のみを検

出したからである (図 2 B). さらに石灰化物が多量に混入した OB-HipOPs を FACS 解析すると IgG1 抗体はコントロール抗体であるにも関わらず, 陽性領域に蛍光強度のピークを認め, 石灰化物が自己蛍光を引き起こしていることが明らかとなった (図 2 C). このように石灰化物がサンプルに混入していると FACS 解析の結果に偽陽性が生じる危険性が示されたために, 石灰化物から生細胞を分離する新しい方法を開発する必要性が生じた.

そこで, Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いて石灰化物と OB-HipOPs の分離を試みた. 結果, 10%-70% の 2 層の Percoll® 濃度勾配で十分に石灰化物を除去し, 分化した細胞を回収することに成功した. 10%-70% の 2 層の Percoll® 濃度勾配によって回収された細胞に対して FACS 解析を行ったところ, Percoll® を用いていない場合と比較すると, FCS の小さい石灰化物が認められず, また分化した生細胞が回収できていることが明らかとなった (図 5 A). さらに FACS 解析において, 石灰化物を除去していない OB-HipOPs で観察されていた偽陽性ピークが, この Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いて分離した OB-HipOPs では観察されなかった (図 5 B). この結果から, 10%-70% Percoll® を用いることで, 骨芽細胞分化誘導培地で分化させた細胞を FACS 解析する際に, 石灰化物による偽陽性を陽性細胞として計測してしまうことから回避できることが示された.

近年、骨関連遺伝子改変マウスを作製し、骨細胞を 99% の純度で取り出すことに近年成功したという報告があった[54]。しかし、この方法は遺伝子操作が介入しており、安全性という点で問題があると思われる。一方、本研究における骨芽細胞回収の方法は遺伝子操作等の処理は必要としない簡便な方法であり、また、Percoll® の濃度勾配を 10%-70% の中で細かく変化させることで、骨芽細胞のより詳細な分化段階をみることができると考えられ、本法は非常に有用であるといえる。

ところで、これまでのさまざまな研究グループにより、間葉系幹細胞マーカーについて解析されてきた[17, 55-57]。間葉系幹細胞上には、CD11b, CD31 および CD45 といった血球系細胞上に発現している細胞表面マーカーが発現していないという共通した見解が得られている。一方で、ヒトおよびラットの間葉系幹細胞は、血球系細胞マーカーである CD34 の発現が陰性であるとの報告があるが、マウス間葉系幹細胞の CD34 の発現については陽性であるという報告や陰性であるという報告があり一致した見解が得られていない[35, 55, 56]。MHC class I と Sca-1 の発現は、多くの研究グループからの報告で陽性であるという一致した見解が得られており、また、間葉系幹細胞は CD44 や CD49e そして CD62 などといった接着分子を発現していることも報告されている[5, 55, 56, 58, 59]。CD73, CD90, CD105, CD117(c-kit),

STRO-1 については、それぞれの研究グループごとでその発現強度において異なった結果が報告されている[5, 26, 57, 60-62]. このように間葉系幹細胞の細胞表面に発現するタンパク質については異なった見解が認められる. その理由のひとつとして、現在、間葉系幹細胞として研究に用いられている細胞集団は heterogeneous であることが考えられる. 間葉系幹細胞は分離法や培養条件に大きく左右されることから、厳密に定義されたマーカーが未だに存在しないためである. 本研究では骨髄ストローマ細胞と比較して硬組織再生能が高く、濃縮された間葉系幹細胞集団である HipOPs を解析に用いて、仮想マウス間葉系幹細胞マーカーと考えられている Sca-1, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105 および CD106 の発現について解析することとした.

FACS 解析の結果、HipOPs と比較して OB-HipOPs (前駆骨芽細胞と骨芽細胞を含む) では Sca-1, CD44, CD73, CD105, CD106 の発現が著明に減少することがわかった (図 6, 表 2). また、分化した AD-HipOPs と Ch-HipOPs において、Sca-1, CD73, CD105, CD106 の発現が減少することがわかった (図 8, 9 および表 3, 4). 間葉系幹細胞から骨芽細胞や軟骨芽細胞そして脂肪細胞への分化の過程において、細胞表面マーカーの発現パターンが変化するならば、図 1 に示すコンセプトから Sca-1, CD73, CD105, CD106 が間葉系幹細胞マーカーの候補となりうる可能性がある. また、図 6, 8, 9 を比較すると、CD44

の発現は AD-HipOPs や Ch-HipOPs への分化過程で、その発現量に変化がなかったのに対し、OB-HipOPs への分化過程では減少を認めた。この結果から CD44 が骨芽細胞の分化に関わっている可能性が示唆された。CD44 はリンパ球や顆粒球などの造血系細胞以外にも組織マクロファージや繊維芽細胞、ケラチノサイト、上皮細胞など多様な細胞に発現していることが知られており [63]、細胞運動やがん細胞の浸潤、増殖にも関与している接着分子である [64]。またリガンドはオステオポンチンであることが報告されている [65]。したがって、CD44 は骨芽細胞の分化過程において重要な働きがあると考えられているが、分化する過程で CD44 の発現が減少するという結果が得られている。本研究の目的は細胞と石灰化物の分離であり、10%-70% 濃度勾配を用いることで生細胞を余すところなく回収することができた。また一方、10%-70% の分画から採取される細胞の中に分化途上から成熟した骨芽細胞まで、様々な分化段階の骨芽細胞が含まれているため、分化段階別の骨芽細胞上の細胞表面タンパク質の解析においては、より細かい分画毎の今後さらなる詳細な解析が必要であると考えている。

また、CD105 は血管内皮細胞に強く発現し、血管新生及び造血において重要な役割を果たしていることから血管内皮細胞のマーカーとして考えられている [66, 67]。この CD105 の発現パターンでは、骨芽細胞や軟骨芽細胞そして

脂肪細胞に分化する過程で二峰性から一峰性に変化していることが観測された。そして、分化後の HipOPs が示す細胞集団は、分化する前の HipOPs の CD105^{low} の細胞集団と重なっていることがわかる。このことから CD105^{high} 細胞群が分化前の細胞に特異的な細胞集団、すなわち間葉系幹細胞群であることが推察された。そこで、CD105^{high} 細胞群と CD105^{low} 細胞群を FACSaria にてソーティングし、limiting dilution 法にて幹細胞の含まれる確率を計測したところ、CD105^{high} 細胞群は HipOPs と比較して幹細胞の含まれる確率が高いという結果が得られた（未発表データ）。これについてはこれから更なる検証を重ねる予定にしている。今後、CD105 だけでなく、他の間葉系幹細胞マーカー候補、例えば CD13, CD29, CD31, CD45, CD117, SSEA4[35, 60, 68-70], のみならず包括的に様々な細胞表面タンパク質の発現について検索を行い、最終的には見出した特異的マーカーにて間葉系幹細胞を分離したいと考えている。

ところで、骨芽細胞は、多量の 1 型コラーゲンを形成し、そこにオステオカルシンやアルカリフォスファターゼなどの細胞外タンパク質を分泌し類骨を形成する。その後、類骨上にリン酸カルシウムが沈着、蓄積し、ハイドロキシアパタイトが形成され石灰化がすすんでいく。こうして軽量であるが強度のある成熟した骨が形成されていく[71]。上記のような働きを持つ骨芽細胞は間葉

系幹細胞由来であり，その分化段階で前骨芽細胞（pre-osteoblast）という前段階を経て成熟した骨芽細胞へ分化すると推測されている．骨芽細胞の分化は，bone morphogenetic proteins (BMPs) ，insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ，fibroblast growth factor2 (FGF-2) ，parathyroid hormone (PTH) ，tumor necrosis factor- α (TNF- α) ，Wnt などのホルモンやサイトカイン，そして細胞外マトリックスなどの刺激によって，様々なシグナル伝達経路が活性化され，骨芽細胞の分化が誘導される[72]．その中でも，骨芽細胞の分化を制御する主たる転写因子として Runx2 (runt-related transcription factor 2) と Osterix が知られている．例えば，Runx2 の遺伝子を欠損させた *Runx2*^{-/-} マウスは，骨芽細胞の分化が起きないことが報告されており[73, 74]，骨芽細胞分化には Runx2 が必須であることがわかっている．さらに，骨基質の合成を含む成熟した骨芽細胞の適切な機能のために必要であることもわかっている[75]．また，Osterix は Runx2 とともに，骨芽細胞分化のために必要な転写因子であり，骨芽細胞分化の際，Runx2 の下流で機能することが知られている[76, 77]．それぞれの発現については，前駆骨芽細胞は Runx2 を発現していること，そして，より分化の進んだ段階では Runx2 と osterix の両方を発現していることがわかっている[24]．本研究では骨芽細胞分化と細胞表面タンパク質の発現量について解析を行ってきたが，骨芽細胞分化に関連する転写制御因子の発現レ

ベルとあわせて考察することでより詳細な骨芽細胞の分化過程を理解できるのではないかと考えている。この前骨芽細胞は間葉系幹細胞から成熟した骨芽細胞までの分化途中のすべての細胞を含んだ細胞集団であるため、必然的に不均一な集団となっている。確かに前骨芽細胞は存在し、生物学的な議論をするうえで重要なものであるが、1つの分化段階を経るのみなのか、多数の分化段階を経るのか、それを裏付ける研究成果は今のところ得られていない。したがって、間葉系幹細胞から骨芽細胞までの分化過程についてはほとんど理解されていないというのが現状である。Percoll® の濃度勾配を用いてマウス頭蓋骨の骨芽細胞集団を3つの分画に分離、解析した報告があるが[78, 79]、骨芽細胞が分化する際により細かい段階を経るかどうかについては検討する必要がある。

今後、研究成果である Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いて、間葉系幹細胞から前骨芽細胞を経て骨芽細胞に至るまでの各分化段階で発現する細胞表面マーカーと転写制御因子群との関連性を示し、より詳細な骨芽細胞の分化段階を解明したいと考えている。また、この解析の過程で、間葉系幹細胞特異的なマーカーを発見することができれば、間葉系幹細胞の単離および解析が可能となり、歯科のみならず、整形外科も含めた広範な領域における再生医療の発展に大きく貢献できるものと考えている。

V. 結論

10%-70% の Percoll[®] の濃度勾配という簡便な方法を用いることで，分化した骨芽細胞を石灰化物から分離・回収することができた．そして，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の発現について解析したところ，Sca-1, CD73, CD105, CD106 が間葉系幹細胞マーカーの候補であることが示唆された．

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えて頂き，適切なる御指導と御高閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）恵比須繁之教授，林美加子教授に謹んで感謝の意を表します．また，本研究の遂行に際し，終始変わらぬ御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）伊藤祥作博士に深く感謝致します．最後に本研究に対して御理解，御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）の諸先生方に心から感謝致します．

VII. 参考文献

- [1] Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T. 2003. Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton. *Novartis Found Symp.* 249: 118-127.
- [2] Ohgushi H, Caplan AI. 1999. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res.* 48: 913-927.
- [3] Ishizaka R, Iohara K, Murakami M, Fukuta O, Nakashima M. 2012. Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. *Biomaterials* 33: 2109-2118.
- [4] Huang GT, Gronthos S, Shi S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 88: 792-806.
- [5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- [6] Meirelles Lda S, Nardi NB. 2009. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci.* 14: 4281-4298.
- [7] Caplan AI. 1994. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 21:429-435.

- [8] Meirelles Lda S, Nardi NB. 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 123: 702-711.
- [9] Meirelles Lda S, Chagastelles PC, Nardi NB. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 119: 2204-2213.
- [10] De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism.* 44: 1928-1942.
- [11] De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biology* 160: 909–918.
- [12] Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 5807-5812.
- [13] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 174: 101-109.
- [14] Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. 2002. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.*

9: 642-647.

- [15] Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Löwik CW, Falkenburg JH, Willemze R, Fibbe WE. 2002. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 30: 870-878.
- [16] Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. 2003. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 412: 196-212.
- [17] Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*. 107: 275-281.
- [18] Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT. 1998. Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci*. 94: 549-555.
- [19] Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. 2002. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 46: 704-713.
- [20] D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. 1999. Age-related

osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 14: 1115-1122.

[21] Giordano A, Galderisi U, Marino IR. 2007. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 211: 27-35.

[22] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 4: 267-274.

[23] Prockop DJ. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74.

[24] Bianco P, Kuznetsov SA, Riminucci M, Gehron Robey P. 2006. Postnatal skeletal stem cells. *Methods Enzymol.* 419: 117-148.

[25] Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 72: 570-585.

[26] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.

- [27] Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. 2004. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 32: 414-425.
- [28] García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, Castro JG, Arranz MG, Vicente A, Bueren J, García-Olmo D. 2010. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther.* 10: 1453-1468.
- [29] Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A. 2008. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun.* 30: 121-127.
- [30] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363: 1439-1441.
- [31] Le Blanc K, Ringdén O. 2005. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11: 321-334.
- [32] Nauta AJ, Fibbe WE. 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110: 3499-3506.
- [33] Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E,

Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O; Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 371: 1579-1586.

[34] Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. 2007. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res*. 313: 698-706.

[35] Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. 2004. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103: 1662-1668.

[36] Post S, Abdallah BM, Bentzon JF, Kassem M. 2008. Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone* 43: 32-39.

[37] Pelekanos RA, Li J, Gongora M, Chandrakanthan V, Scown J, Suhaimi N, Brooke G, Christensen ME, Doan T, Rice AM, Osborne GW, Grimmond SM, Harvey RP,

Atkinson K, Little MH. 2012. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. *Stem Cell Res.* 8: 58-73.

[38] Rosca AM, Burlacu A. 2010. Isolation of a mouse bone marrow population enriched in stem and progenitor cells by centrifugation on a Percoll gradient. *Biotechnol Appl Biochem.* 55: 199-208.

[39] Nadri S, Soleimani M, Hosseini RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R. 2007. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol.* 51: 723-729.

[40] Rombouts WJ, Ploemacher RE. 2003. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17: 160-170.

[41] Hachisuka H, Mochizuki Y, Yasunaga Y, Natsu K, Sharman P, Shinomiya R, Ochi M. 2007. Flow cytometric discrimination of mesenchymal progenitor cells from bone marrow-adherent cell populations using CD34/44/45(-) and Sca-1(+) markers. *J Orthop Sci.* 12: 161-169

[42] Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E. 1994. Characterization and

purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood* 84: 753-763.

[43] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25: 2739-2749.

[44] Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H, Matsuzaki Y. 2012. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nat Protoc.* 7: 2103-2111.

[45] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG. 2003. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem.* 89: 1235-1249.

[46] Itoh S, Aubin JE. 2009. A novel purification method for multipotential skeletal stem cells. *J Cell Biochem.* 108: 368-377.

[47] Youichi T, Tsutomu W, Yoshifumi K, Tetsuya K, Takanori A, Takeshi S, Jyunko S, Mahbubul AHM Huq, Tohru O, Tsuneo N, Tatsuko S, Eiji S, Takeshi O. 1988. Separation of circulating stem cells on discontinuous percoll gradients. *Jpn J Clin Hematol.* 29: 539-543.

- [48] Shikama Y. 2013. New fractionation method of bone marrow-derived neutrophil progenitor cells for in vivo gene expression profile analyses. *Folia Pharmacol Jpn.* 141: 90-94.
- [49] Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T. 1995. Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn.* 15: 74-77.
- [50] Mortimer D. 2000. Sperm preparation methods. *J Androl.* 21: 357-366.
- [51] Mortimer D, Mortimer ST. 1992. Methods of sperm preparation for assisted reproduction. *Ann Acad Med Singapore.* 21: 517-524.
- [52] Bolton VN, Warren RE, Braude PR. 1986. Removal of bacterial contaminants from semen for in vitro fertilization or artificial insemination by the use of buoyant density centrifugation. *Fertil Steril.* 46: 1128-1132.
- [53] Pertoft H, Laurent TC, Laas T, Kagedal L. 1978. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal Biochem.* 88: 271-282.
- [54] Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. 2011. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.*

17: 1231-1234.

[55] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 3213-3218.

[56] Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. 2001. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 19: 219-225.

[57] Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. 1992. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13: 69-80.

[58] Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol*. 30: 879-886.

[59] Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, Mao N. 2003. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells* 21: 527-535.

[60] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC,

- Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395.
- [61] Kobune M, Kawano Y, Ito Y, Chiba H, Nakamura K, Tsuda H, Sasaki K, Dehari H, Uchida H, Honmou O, Takahashi S, Bizen A, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Kato K, Houkin K, Niitsu Y, Hamada H. 2003. Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp Hematol.* 31: 715-722.
- [62] Rombouts WJ, Ploemacher RE. 2003. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17: 160-170.
- [63] Underhill C. 1992. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci.* 103: 293-298.
- [64] Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. 2003. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 33-45.
- [65] Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271: 509-512.
- [66] Chen CZ, Li M, de Graaf D, Monti S, Göttgens B, Sanchez MJ, Lander ES, Golub TR, Green AR, Lodish HF. 2002. Identification of endoglin as a functional marker

that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 15468-15473.

[67] Chen CZ, Li L, Li M, Lodish HF. 2003. The endoglin (positive) sca-1 (positive) rhodamine (low) phenotype defines a near-homogeneous population of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Immunity* 19: 525-533.

[68] Pelekanos RA, Li J, Gongora M, Chandrakanthan V, Scown J, Suhaimi N, Brooke G, Christensen ME, Doan T, Rice AM, Osborne GW, Grimmond SM, Harvey RP, Atkinson K, Little MH. 2012. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. *Stem Cell Res.* 8: 58-73.

[69] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49.

[70] Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109: 1743-1751.

- [71] Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. 2006. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 235: 176-190.
- [72] Long F. 2012. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Rev Mol Cell bio*. 13: 27-38.
- [73] Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764.
- [74] Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. 1997. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-771.
- [75] Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. 1999. A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*. 13: 1025-1036.
- [76] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29.

- [77] Zhou X, Zhang Z, Feng JQ, Dusevich VM, Sinha K, Zhang H, Darnay BG, de Crombrughe B. 2010. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 12919-12924.
- [78] Wong GL, Ng MC, Calabrese DW, Swartzendruber DE. 1991. Characterization of bone cells isolated on discontinuous Percoll gradients: distribution in sequentially derived populations. *J Bone and Mineral Res*. 6: 969-976.
- [79] Wong GL, Ng MC. 1992. Maturation-associated changes in the cellular composition of mouse calvariae and in the biochemical characteristics of calvarial cells separated into subclasses on Percoll density gradients. *J Bone Miner Res*. 7: 701-708.

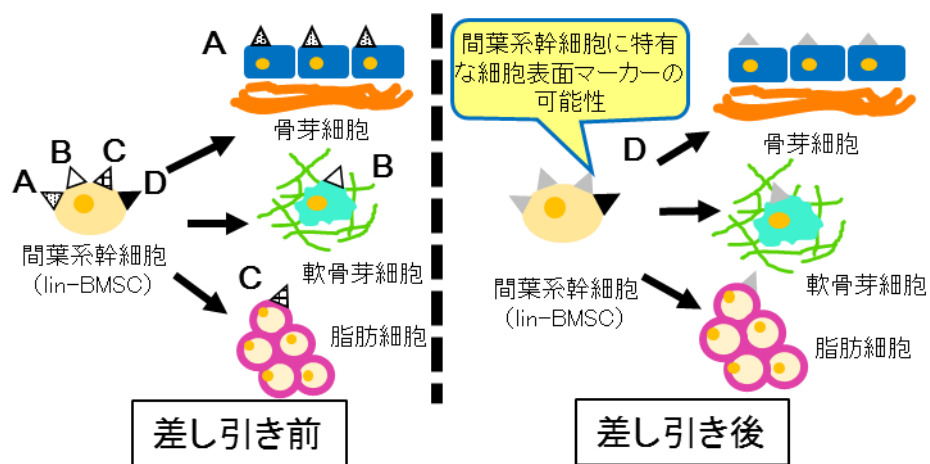


図1 間葉系幹細胞から分化する過程での細胞表面マーカー発現パターンの仮説図

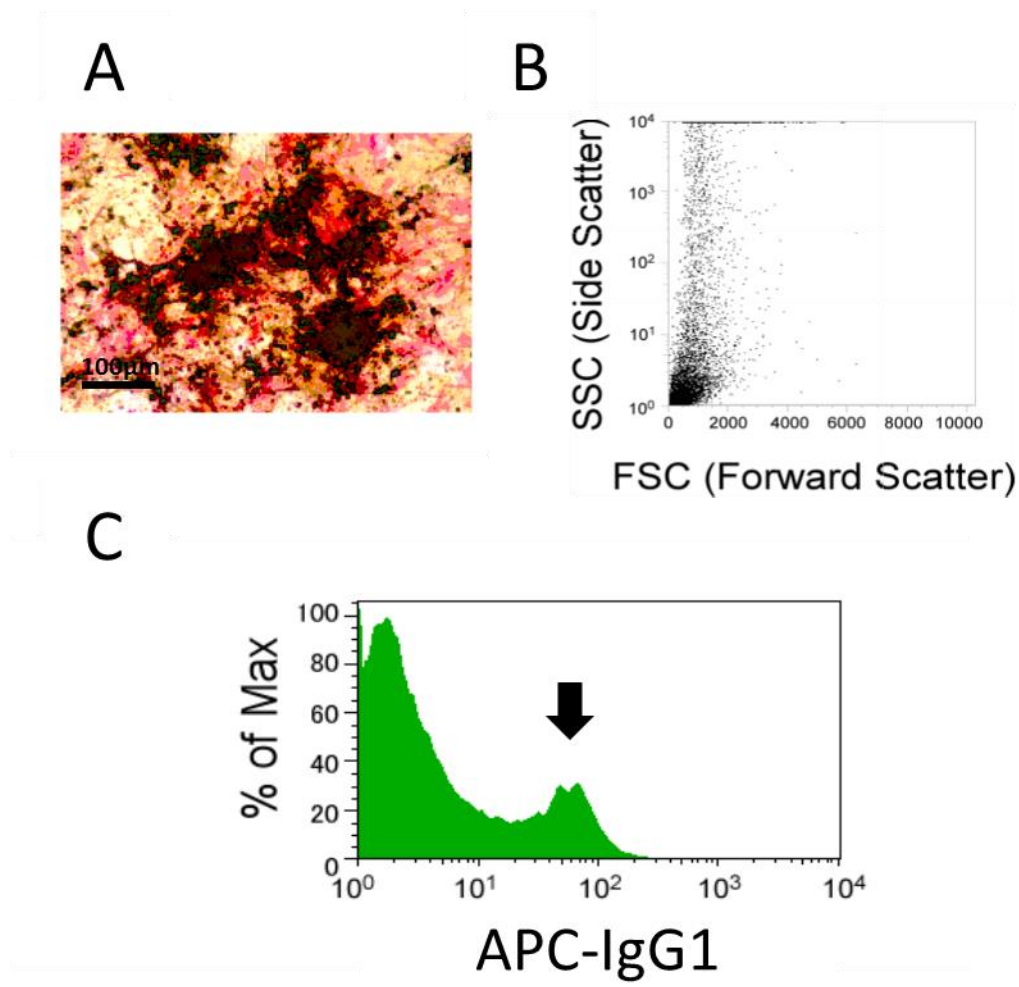


図2 骨芽細胞によって産生される石灰化物がFACS解析に及ぼす影響

- (A) 骨芽細胞分化誘導培地にて7日間培養したHipOPsのALP染色とvon Kossa 染色像.
- (B) 骨芽細胞へと分化した OB-HipOPs のFACS解析結果.
- (C) OB-HipOPsにおけるIgG1発現量についてのFACS解析結果. ➡: 偽陽性のピーク

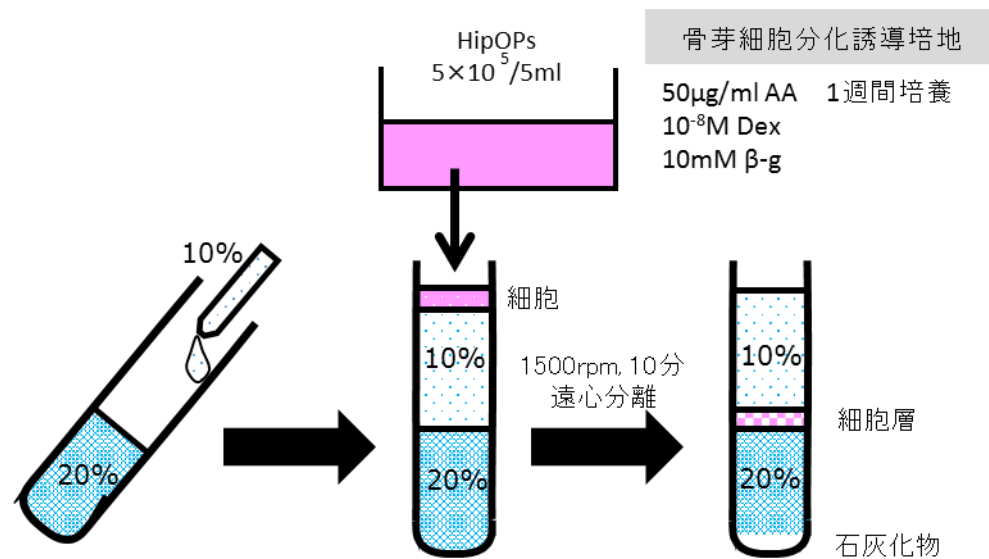


図3 Percoll[®] 密度勾配遠心分離法による分化した骨芽細胞の回収, および生じた石灰化物を除去する方法の概略図

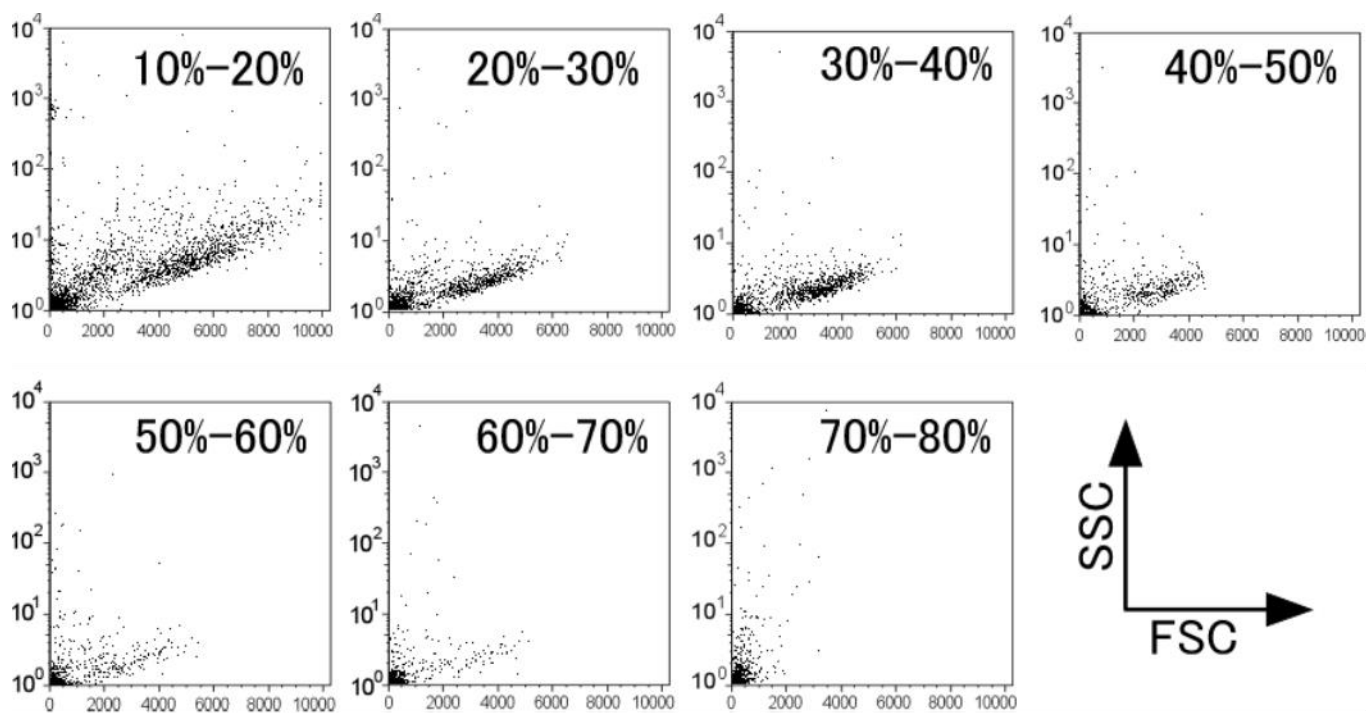


図4 Percoll[®]界面から回収したOB-HipOPに対するFACS解析結果

OB-HipOPsの細胞懸濁液を層の上に填入した後、3000 rpmで10 分間、4 °Cにて遠心分離をし、Percoll[®]界面の細胞層を回収し、FACS解析を行った。

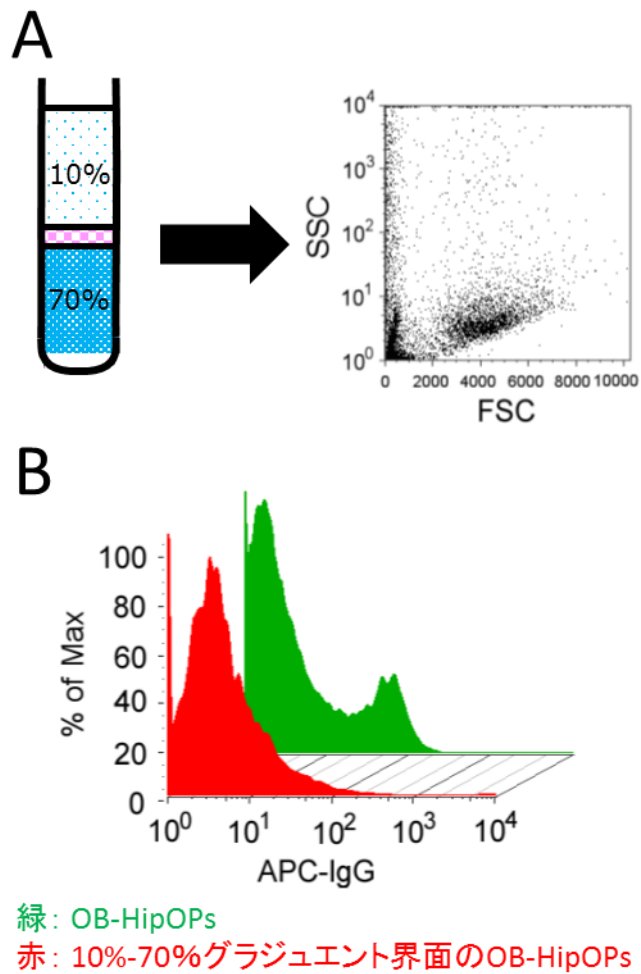


図5 分化した骨芽細胞を回収する最適な濃度勾配の検索

- (A) 10-70%のPercoll[®]界面の細胞層の細胞 (OB-HipOPs) の FACS解析結果.
- (B) OB-HipOPsをbiotin-抗IgG1抗体と反応させた後, APC-streptavidinによって発色させてFACS解析を行った. 緑色のヒストグラムはOB-HipOPs, 赤色のヒストグラムは 10%-70%グラジュエント界面のOB-HipOPsの細胞表面マーカーの発現量を示す.

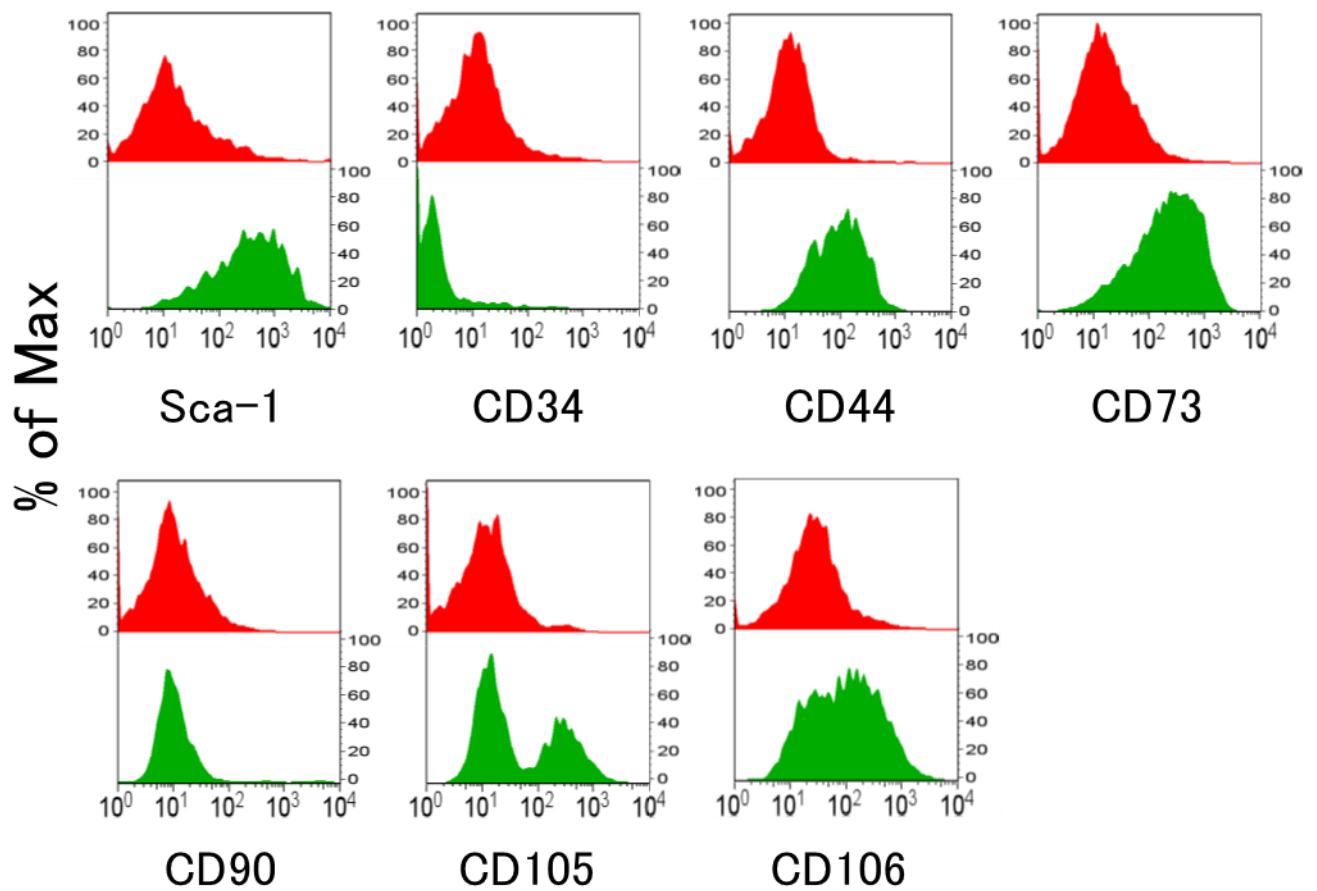


図6 OB-HipOPs に発現する細胞表面タンパクのFACS解析

10–70%のPercoll[®]界面の細胞を各種biotin化抗体と反応させた後、APC–streptavidinにて発色させた。その後、フローサイトメーターにて発現量を計測した。緑色のヒストグラムはHipOPs、赤色のヒストグラムはOB-HipOPsの各細胞表面マーカーの発現量を示す。

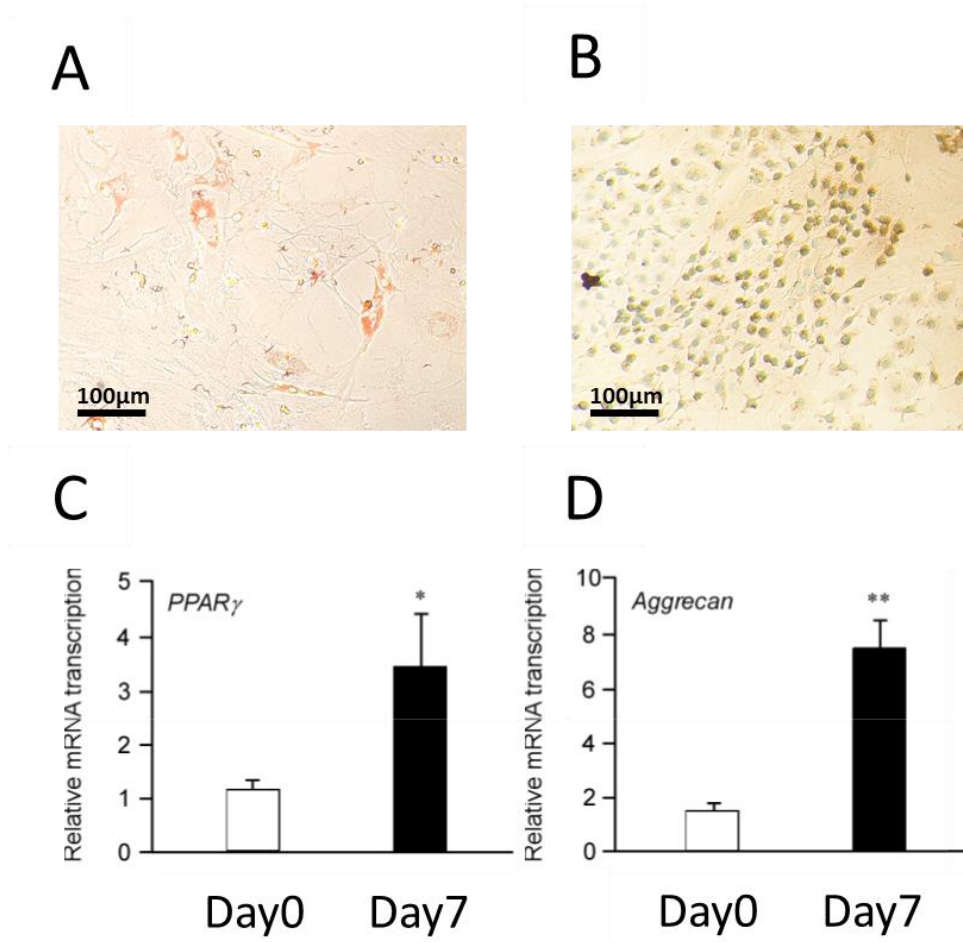


図7 脂肪細胞と軟骨芽細胞への分化の確認

- (A) 脂肪細胞分化誘導培地にて7日間培養したHipOPsの Oil red O染色像.
- (B) 軟骨細胞分化誘導培地にて7日間培養したHipOPsの 2型コラーゲンに対する免疫組織化学染色像.
- (C) HipOPsを脂肪細胞分化誘導培地中で, 0 日間および 7日間培養後の *PPARγ* の mRNA 発現量.
なお, mRNA 発現量はL32 を用いて補正した ($n = 3$), Student's t -test, $p < 0.05$ (*)
- (D) HipOPsを軟骨芽細胞分化誘導培地中で, 0 日間および 7日間培養後の *Aggrecan* の mRNA 発現量.
なお, mRNA 発現量はL32 を用いて補正した ($n = 3$), Student's t -test, $p < 0.001$ (**)

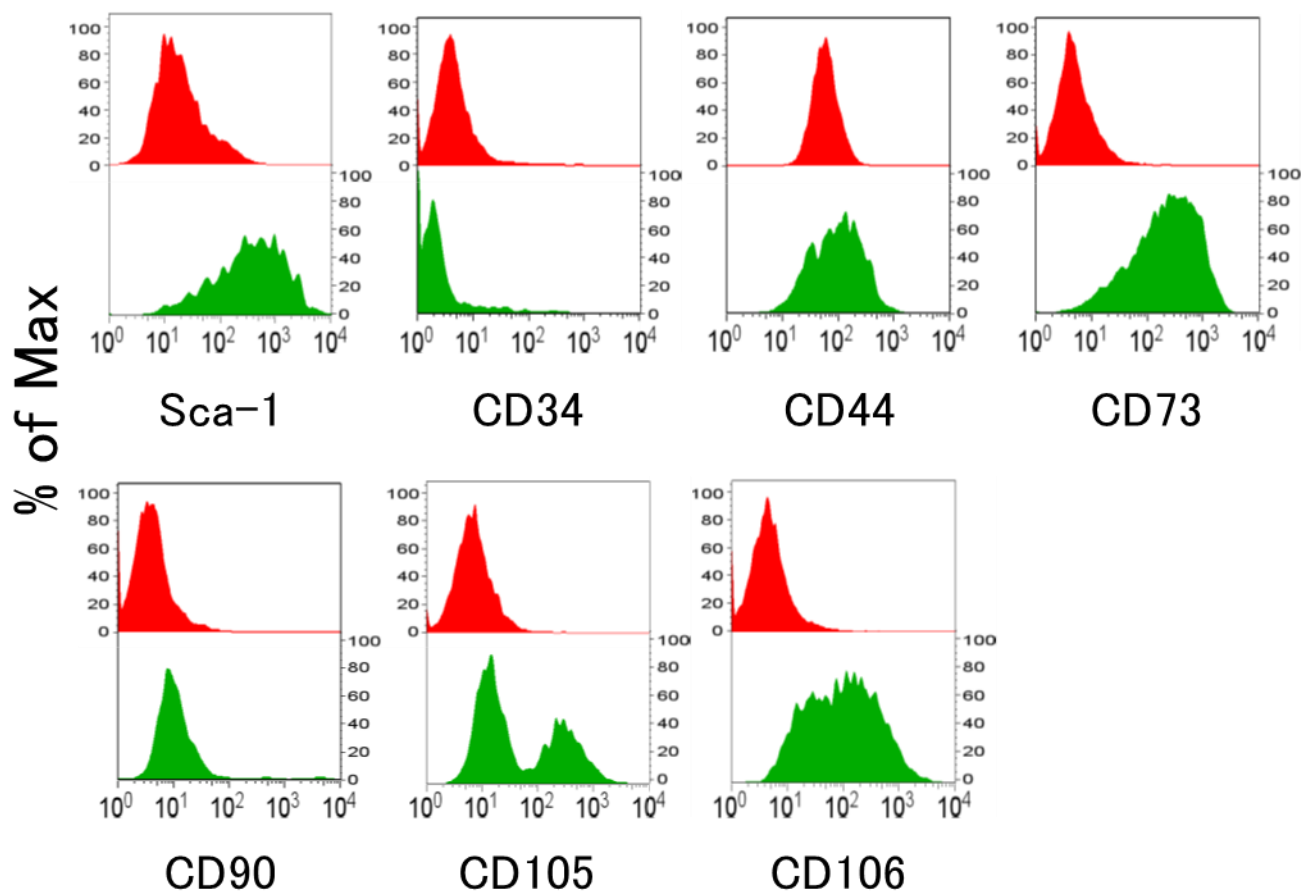


図8 AD-HipOPs に発現する細胞表面タンパクのFACS解析

脂肪細胞分化誘導培地にて培養した細胞を各種biotin化抗体と反応させた後, APC-streptavidinにて発色させた. その後, フローサイトメーターにて発現量を計測した. 緑色のヒストグラムはHipOPs, 赤色のヒストグラムはAD-HipOPsの各細胞表面マーカーの発現量を示す.

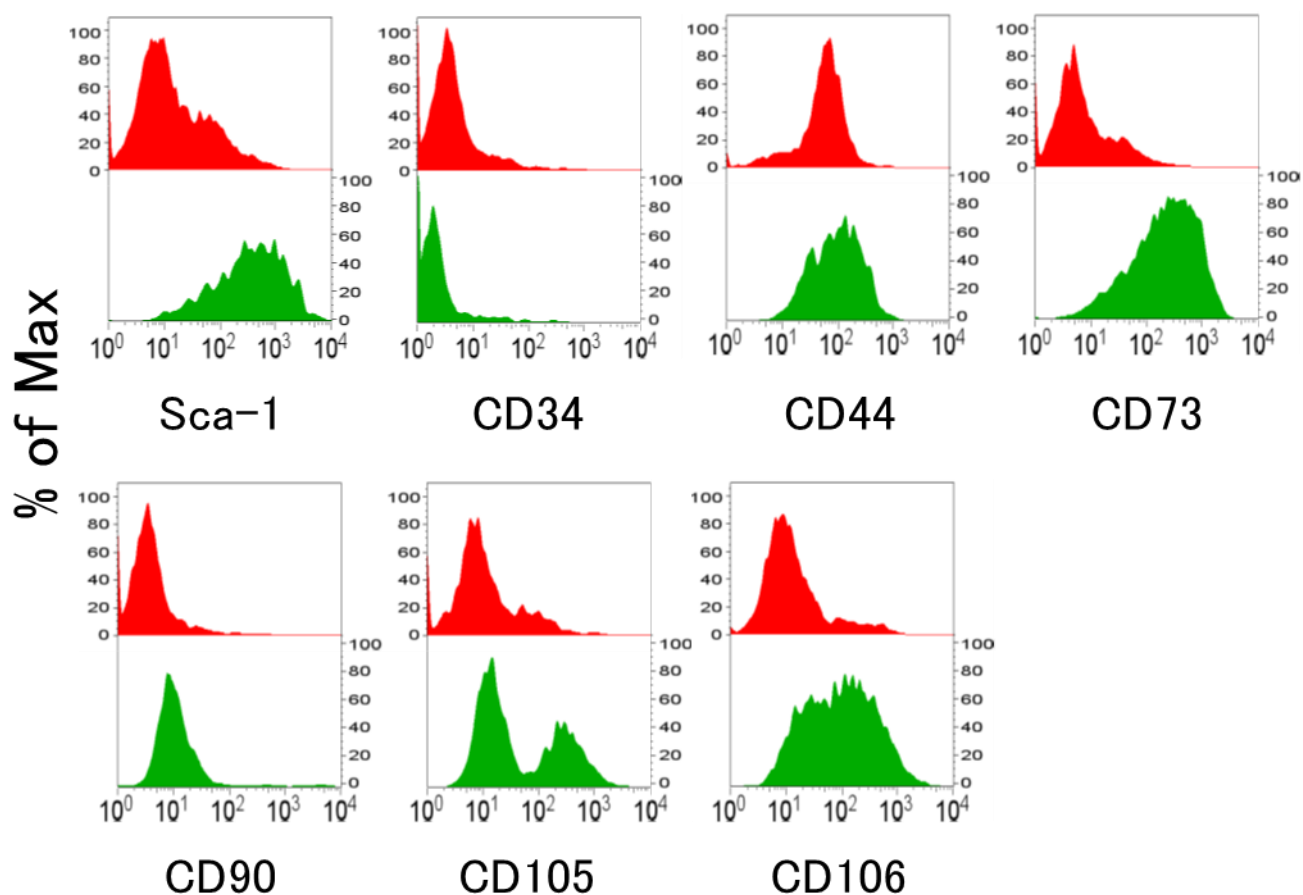


図9 Ch-HipOPs に発現する細胞表面タンパクのFACS解析

軟骨芽細胞分化誘導培地にて培養した細胞を各種biotin化抗体と反応させた後, APC-ストレプトアビジンにて発色させた. その後, フローサイトメーターにて発現量を計測した. 緑色のヒストグラムは HipOPs, 赤色のヒストグラムはCh-HipOPsの各細胞表面マーカーの発現量を示す.

表1 リアルタイムPCRに使用した各種プライマー

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>L32</i>	CAC AAT GTC AAG GAG CTG GAA GT	TCT ACA ATG GCT TTT CGG TTC T
<i>PPARγ</i>	TGA AAC TCT GGG AGA TTC TCC TG	CCA TGG TAA TTT CTT GTG AAG TGC
<i>Aggrecan</i>	GCG TGA GCA TCC CTC AAC CAT C	GGC AGT GGT CAC AGG ATG CAT G

表2 OB-HipOPs に発現する細胞表面タンパクのFACS解析結果

	Positive Cells (%)	
	HipOPs	OB-HipOPs
Sca-1	96.1 ± 2.6	6.6 ± 3.3***
CD34	6.7 ± 2.1	2.0 ± 0.8
CD44	89.4 ± 3.3	18.7 ± 8.3***
CD73	81.7 ± 9.5	44.3 ± 13.4*
CD90	7.0 ± 1.9	4.9 ± 3.6
CD105	47.0 ± 5.9	2.1 ± 0.5**
CD106	72.8 ± 4.3	3.4 ± 0.6***

独立した3回の実験の平均値と標準偏差を示す

Student's *t*-test; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.005$ (***)

表3 AD-HipOPs に発現する細胞表面タンパクのFACS解析結果

	Positive Cells (%)	
	HipOPs	AD-HipOPs
Sca-1	96.1 ± 2.6	49.7 ± 5.3***
CD34	6.7 ± 2.1	7.8 ± 1.3
CD44	89.4 ± 3.3	94.8 ± 3.2
CD73	81.7 ± 9.5	22.7 ± 2.5***
CD90	7.0 ± 1.9	5.5 ± 0.7
CD105	47.0 ± 5.9	26.8 ± 1.6**
CD106	72.8 ± 4.3	26.8 ± 7.1***

独立した3回の実験の平均値と標準偏差を示す

Student's *t*-test; $p < 0.01$ (**), $p < 0.005$ (***)

表4 Ch-HipOPs に発現する細胞表面タンパクのFACS解析結果

	Positive Cells (%)	
	HipOPs	Ch-HipOPs
Sca-1	96.1 ± 2.6	30.3 ± 11.1**
CD34	6.7 ± 2.1	3.3 ± 1.3
CD44	89.4 ± 3.3	77.9 ± 10.0
CD73	81.7 ± 9.5	20.7 ± 1.6**
CD90	7.0 ± 1.9	3.6 ± 0.9
CD105	47.0 ± 5.9	10.1 ± 0.9**
CD106	72.8 ± 4.3	16.1 ± 7.0***

独立した3回の実験の平均値と標準偏差を示す

Student's *t*-test; $p < 0.01$ (**), $p < 0.005$ (***)

