The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	密度勾配遠心分離法を用いた骨芽細胞系譜の解析
Author(s)	伊藤, 勇紀
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72247
rights	This is the pre-peer reviewed version of the following article: Itoh, Y, Itoh, S, Naruse, H, et al. Intracellular density is a novel indicator of differentiation stages of murine osteoblast lineage cells. J Cell Biochem. 2021; 122: 1805-1816, which has been published in final form at https://doi.org/10.1002/jcb.30135. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Use of Self-Archived Versions.
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　（　伊藤勇紀　）	
論文題名	密度勾配遠心分離法を用いた骨芽細胞系譜の解析

論文内容の要旨

【研究目的】

骨髄中に存在する骨髄ストローマ細胞には間葉系幹細胞が含まれており、分化誘導培地にて培養することで様々な種類の細胞に分化することが知られている。骨髄ストローマ細胞を骨芽細胞分化誘導培地で培養することで骨芽細胞へ分化が進んだ細胞集団が得られるが、これは様々な分化段階の細胞が混在する細胞集団であり、間葉系幹細胞から成熟骨芽細胞への分化の詳細に関しては未だ不明な点も多い。

我々のグループは先行研究において、密度勾配遠心分離法を用いることで、骨芽細胞が分化途中で産生する石灰化物を除去し、生細胞を回収する方法を見出している。この方法を応用して、骨芽細胞分化誘導をかけた骨髄ストローマ細胞を細胞内密度によって分画化し、得られた分画の分化度を解析することで、細胞内密度と骨芽細胞の分化段階との関連性を検証することを本研究の目的とした。

【材料と方法】

1. 骨髄ストローマ細胞の調整

4～6 週齢のC 57 BL/ 6 J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を骨髄腔中に注入し骨髄を得た。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 日毎に培養液を交換し、2 週間後に 0.25 %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（BMSC）を間葉系幹細胞集団として以下の実験に用いた。

2. 骨芽細胞の調整と Alkaline Phosphatase（ALP）染色および von Kossa 染色

10 %FCS含有α-MEMに 50 μg/ml ascorbic acid、10 mM β-Glycerophosphate、10^{-8} M Dexamethasoneを添加した骨芽細胞分化誘導培地中でBMSCを2 週間培養した。骨芽細胞への分化の進んだOsteoblastic-BMSC（OB-BMSC）に対し、Alkaline Phosphatase（ALP）染色とvon Kossa染色を行った。

3. 骨芽細胞分化マーカーの発現解析

上記の骨芽細胞分化誘導培地にて培養したOB-BMSCを培養期間 1 週間、 2 週間、 3 週間ごとにセパゾール®を用いてtotal RNAを回収した。逆転写酵素（ReverTraAce）を用いてcDNAを合成し、骨芽細胞分化マーカー *Runx2*、*Alkaline phosphatase（ALP）*、*osteopontin（OPN）*、 *osterix（OSX）*、*type-1 Collagen（Cola-1）*、*osteocalcin（OCN）*の各プライマーとPower SYBR®を用いてmRNA発現量をreal-time PCRにて試料数 3 で定量解析した。

4. Percoll® 密度勾配遠心分離法による培養細胞の分画化

10 %、30 %、50 %、70 %に調整したPercoll® を遠沈管に積層しグラジュエントを作製した。上記の骨芽細胞分化誘導培地で 2 週間培養したOB-BMSCを回収してPercoll® グラジュエント上に填入し、遠心分離を行った。各界面から生細胞を 10/30 分画（1.02-1.05 g/ml）、 30/50 分画（1.05-1.07 g/ml）、50/70 分画（1.07-1.10 g/ml）として回収し、via count® を用いて各分画の生細胞数を測定した。

5. マイクロアレイ解析

回収した 10/30 、 30/50 および50/70 分画から、セパゾール® を用いて total RNAを回収した

DNAマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイから得られたデータは解析ソフト Transcriptome viewer を用いてクラスタリング解析および発現変動遺伝子の抽出を行った。

6. 間葉系幹細胞マーカーおよび幼若前骨芽細胞マーカーの発現解析

各分画から抽出した total RNA から cDNA を合成し、間葉系幹細胞マーカー *immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat (ISLR)* および幼若前骨芽細胞マーカー *Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2)* の発現量を real-time PCR にて試料数 3 で定量解析した。

7. 細胞表面マーカーの発現解析

3 つの分画を、CD 16/32 にてブロッキングした後、仮想間葉系幹細胞表面マーカー抗Sca-1、CD44、CD73、CD105、CD106、SSEA1 抗体を各々反応させ、APC 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試料数 3 でFACS解析した。

8. 細胞形態の解析

3 つの分画を個々の細胞の大きさを示す前方散乱光（FSC）および内部構造の複雑さを示す側方散乱光（SSC）について試料数 4 でFACS解析した。

9. 統計処理

結果は平均値±標準偏差で表示した。一連の実験では 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。

【結果】

1. 骨芽細胞分化誘導培地で 2 週間培養した OB-BMSC に対して ALP 染色と von Kossa 染色を行ったところ、Colony forming unit-osteoblasts（CFU-O）の形成を確認した。 また、培養期間 2 週間の OB-BMSC は骨芽細胞分化マーカーである *ALP*、*OPN*、*OCN* の発現量が増加していた。一方、培養期間 1 週間では各マーカーの発現量の顕著な増加は認めず、培養期間 3 週間では *OCN* の発現量は増加したが *ALP*、*OPN* の発現量は減少していた。
2. 培養期間 2 週間の OB-BMSC 中の生細胞数は、30/50 分画の割合が最も高く（ 60.3±8.7 % ）、次いで 10/30 分画が高かった（ 38.3±8.6 % ）。 50/70 分画の割合は他の分画に比べ顕著に低かった（ 1.4±0.4 % ）。
3. 各分画の mRNA 発現量を比較解析したところ、 50/70 分画では骨芽細胞分化の中期～後期のマーカーである *OSX* 、*Col1a-1*、*OPN*、*OCN* の mRNA 発現量が他の分画に比べ有意差をもって上昇していた。
4. マイクロアレイ解析より各分画の遺伝子の発現パターンを比較したところ、30/50 分画の遺伝子発現パターンは 50/70 分画のパターンに近いことが確認された。また、10/30 分画では間葉系幹細胞マーカーである *ISLR* の発現および幼若前骨芽細胞マーカーである *FGFR2* の発現が高く、この結果は real-time PCR によっても確認された。
5. 各分画の細胞表面マーカーの発現量を比較したところ、分画の密度が高くなるにつれ、仮想間葉系幹細胞マーカーである CD73、CD105、CD106、Sca-1 の発現量は減少していった。各分画の FSC を比較したところ、10/30 分画の FSC が最も高く、50/70 分画は最も低く、30/50 分画はその中間にある傾向を認めた。

【考察および結論】

骨芽細胞分化マーカーの発現パターンから、骨芽細胞分化誘導培地にて培養 2 週目のOB-BMSCには様々な分化段階の骨芽細胞が含まれている可能性が高いと考えた。このOB-BMSCからPercoll® グラジュエントにより分画された 3 つの細胞集団を比較したところ、骨芽細胞分化マーカーおよび細胞表面マーカー分子の発現パターンに差が認められた。すなわち、高密度の 50/70 分画では骨芽細胞分化マーカーの発現量が増加しており、幹細胞表面マーカー分子の発現量は減少していた。一方、低密度の分画では幹細胞表面マーカー分子の発現量が増加していたことより、間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化する過程で細胞内密度が増加していくことがわかった。これは個々の細胞の大きさが縮小していくことに加え、分化に伴い細胞内小器官が発達していくことによるものと推測される。これからの結果から、細胞内密度が骨芽細胞系譜の分化度を示す新たな指標となり得ることが明らかになった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　伊藤　勇紀　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	林　美加子
	副 査	教授	豊澤　悟
	副 査	准教授	北村　正博
	副 査	講師	村上　智彦

論文審査の結果の要旨

本研究は、密度勾配遠心分離法を用いて、培養骨芽細胞集団を細胞内密度によって分画化し、それらを骨芽細胞分化マーカーおよび間葉系幹細胞表面マーカーの発現について比較解析することで、骨芽細胞の分化度と細胞内密度との関連性を詳細に検索したものである。

その結果、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化に伴い、細胞内密度が増加していくことが明らかとなり、細胞内密度は骨芽細胞系譜の分化度を示す新たな指標となり得ることが示された。

以上の研究成果は、将来の骨芽細胞の分化メカニズムの解析、および新規骨再生療法の開発を行ううえで重要な知見を提供するものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。