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

密度勾配遠心分離法を用いた骨芽細胞系譜の解析

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）

伊藤　勇紀

本論文の一部は，第 147 回日本歯科保存学会（2017 年 10 月，岩手）において発表した.

目次

I. 緒言 1

II. 材料および方法

1. 骨髄ストローマ細胞の調整 7
2. 骨芽細胞の調整と ALP 染色および von Kossa 染色 8
3. 骨芽細胞分化マーカーの発現解析 8
4. Percoll® 密度勾配遠心分離法による培養細胞の分画化 9
5. マイクロアレイ解析 10
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 11
7. 細胞表面マーカーの発現解析 12
8. 細胞形態の検討 12
9. 統計処理 13

III. 結果

1. BMSC の骨芽細胞分化誘導培地による培養期間の設定 14
2. Percoll® 密度勾配遠心分離法による OB-BMSC の分画化 15
3. 骨芽細胞分化マーカーの発現による各分画の分化度の検索 16
4. マイクロアレイ解析による各分画の包括的な遺伝子発現の検索 17
5. 細胞表面マーカーの発現解析および細胞形態の検討 18

IV. 考察 21

V. 結論 31

VI. 謝辞 32

VII. 参考文献 33

VIII. 図表 42

Ⅰ．緒言

辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎などにより失われた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り，近年では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(1-3)．歯科領域において，組織再生に重要な幹細胞として位置づけられているのは間葉系幹細胞である(4)．その理由として，間葉系幹細胞は歯槽骨や歯根膜，歯肉といった歯周組織に分化することができる幹細胞であることが分かってきているからである(5)．一般的に間葉系幹細胞は，*in vitro* において骨芽細胞，軟骨細胞，および脂肪細胞の 3 系統の細胞への多分化能を有する幹細胞と定義されており(6，7)，この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(8-17)．そして，間葉系幹細胞は主に骨髄微小環境内に存在し，間葉系細胞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司っていることが明らかとなってきている(6，18-21)．このような多様な働きから，間葉系幹細胞は，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いる．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髄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(22)．しかしながら，現在，間葉系幹細胞の単離は成功していないため，その

性状やマーカー分子については依然として不明な点が多い.

Friedenstein らは, 1970 年代に骨髄細胞の中に線維芽細胞様の形態を持つ骨形成細胞が存在することを見出した(23). その後の研究により, 骨髄中に存在する付着性の線維芽細胞様細胞は, 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(24-26). 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考えられるようになった(6, 8). 現在においても, 未だ間葉系幹細胞の特異的なマーカーは特定されていないが, 国際細胞療法学会は, これまでの知見を総括して, ヒト間葉系幹細胞は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り, CD73 や CD90　そして CD105 が陽性であるとしている(27).

このように,　間葉系幹細胞の完全な単離法は未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(28, 29). たとえば,移植された間葉系幹細胞は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(22).また, 歯科領域においては間葉系幹細胞を用いた新規歯周組織再生治療を目指した研究が進められている(30). さらには, 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, 拒絶反応が軽減されることがわかっている(31-35).

本研究では特に，間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に注目した．骨芽細胞は骨組織を形成する細胞であり，生体内の骨芽細胞は，多量の Ⅰ 型コラーゲンを産生し，そこにオステオカルシンやオステオポンチンといった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いき，軽量であるが強度のある成熟した骨が形成されていく(36)．このような働きを持つ骨芽細胞は骨欠損に対する組織再生療法における有力な移植材料として期待されており(37，38)，ヒト歯槽骨から単離された骨芽細胞は間葉系幹細胞と比較しても，より優れた骨形成能力を有しているという報告がある(39)． また，間葉系幹細胞に分化誘導をかけることにより分化した培養骨芽細胞は，足場材と共に骨欠損部に移植され，新生骨形成能をもたらす材料として利用されている(3，40，41)．

ところで，骨芽細胞は間葉系幹細胞からの分化過程で前骨芽細胞(pre-osteoblast)とよばれる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(42)．骨芽細胞分化においては，bone morphogenetic proteins(BMPs)，insulin-like growth factor 1(IGF-1)，fibroblast growth factor2(FGF-2)，parathyroid hormone(PTH)， tumornecrosis 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，間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が誘導される(43，44)．その中でも，骨芽細胞の分化を制御する基本転写因子として Runx2(runt-related trancription facter 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(45，46)，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，Runx 2 は骨基質の合成など，成熟骨芽細胞が適切に機能するために必要であることもわかっている(47)．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(48，49)．それぞれの発現については，前駆骨芽細胞（osteo-progenitor cell）は，Runx2 を発現していること，より分化の進んだ段階である前骨芽細胞では Runx2 と Osterix の両方を発現していることがわかっている(25)．しかし，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heterogeneousな集団となっている．したがって，間葉系幹細胞から骨芽細胞の分化は，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．このようにして，間葉系幹細胞から骨芽細胞までの詳細な分化メカニズム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．

細胞の詳細な分化メカニズムの解明には培養細胞の細胞表面マーカーの解析が有用であると考えられるが，培養骨芽細胞の細胞表面マーカーの詳細は明らかになっていない．これは培養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トリーによる FACS 解析を妨げてきたからである．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する．さらに，石灰化物が多量に混入した細胞をFACS 解析すると，使用した抗体がコントロール抗体であっても石灰化物の自己蛍光により陽性領域に蛍光強度のピークが出現する．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あるため，培養骨芽細胞の表面マーカーの解析は困難であった．

この問題を解決するために，近年 Yamamoto らは，Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いることで培養骨芽細胞から石灰化物を除去する方法を確立した(50)．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．これまでにも 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や(51)，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(52)，Percoll® により母体血中の有核赤血球を回収したという報告がある(53)．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，細胞毒性の低い材料であるため,将来的にも臨床応用しやすいという利点がある(54-56)．Yamamoto らは，10%-70% の 2 層の Percoll® 濃度勾配を用いることで培養骨芽細胞から石灰化物を除去し，生細胞を回収することに成功した．この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かつ安全な方法であり，また，Percoll® の濃度勾配を 10%-70% の中で細かく設定させることで，石灰化物を除去するとともに細胞集団を様々な細胞内密度に分画化することがすることが可能である．そして，Percoll® の濃度勾配を用いてマウス頭蓋骨の骨芽細胞集団を細胞内密度によって 3 つの分画に分離,解析したところ，骨の深部に存在するより成熟した骨芽細胞は細胞内密度が増加していたという報告がある(57，58)．

そこで本研究では，骨芽細胞は間葉系幹細胞からの分化過程において，その細胞内密度は変化し，細胞内密度と骨芽細胞系譜の分化度には関連性があるのではないかとの仮説を立て，検証することとした（図 1 ）． 具体的には，間葉系幹細胞集団としてマウス骨髄ストローマ細胞を用いて，骨芽細胞分化誘導培地にて分化誘導を行い，この培養細胞を Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いて細胞内密度によって分画化した．得られた分画に含まれる細胞の骨芽細

胞への分化度を骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現レベルによって評価し，さらには様々な細胞表面マーカーの発現レベルも比較検討した．すなわち，細胞内密度の異なる骨芽細胞を，骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現レベルおよび細胞表面マーカーの発現レベルについて比較することで，骨芽細胞の細胞内密度と分化度の関連性を検討することを本研究の目的とした.

Ⅱ. 材料および方法

１．骨髄ストローマ細胞の調整

4-6 週齢の C57BL/6J マウス（日本チャールス・リバー，横浜）の大腿骨および脛骨を採取し，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 を骨髄腔内に注入し，骨髄を得た．100 μm セルストレーナーを用いて軟組織を除去した後，100x20 mm Optilux Dish（Corning Life Sciences, New York, NY, USA）上で 10% Fetal calf serum（FCS; ニチレイ，東京）と 1% Penicillin-Streptomycin（sm/pc; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA）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剥離し，回収した Bone marrow stromal

cell（以下 BMSC）を間葉系幹細胞集団として以下の実験に用いた．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． 骨芽細胞の調整と alkaline phosphatase（ALP）染色および von Kossa 染色

BMSC を 10% FCS 含有 α-MEM に 50 μg/ml ascorbic acid（AA： Sigma-Aldrich Corporation）と，10 mM β-glycerophosphate（βg; 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．2 週間培養後，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．石灰化した基質（von Kossa 陽性）を伴う ALP 陽性細胞を Colony-forming units-osteoblast（CFU-O）とした．

３．　骨芽細胞分化マーカーの発現解析

BMSC を 10% FCS 含有 α-MEM に 50 μg/ml AA と 10 mM βg，そして 10^{-8} M Dex を添加した骨芽細胞分化誘導培地にて細胞を培養した．1 週間，2 週間および 3 週間後に Sepasol-RNA Ⅰ（ナカライテスク，京都）を用いて total RNA を抽出した．RNA 濃度は超微量分光光度計 Nano Drop 1000（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）で測定した．この total RNA 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．この cDNA と，骨芽細胞分化マーカーである *Runx2, Alkaline phospatase (ALP)*，*Osteopontin (OPN)*，*Osterix (Osx)*，*Type-1 Collagen (Cola-1)* および *Osteocalcin (OCN)* に特異的なプライマー（表 1），SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, California, USA) を用いて，ABI 7500 Fast System (Applied Biosystems) にて（95℃ 10 秒 / 60℃ 30 秒）　× 40 サイクルのリアルタイム PCR を行った．試料数は 3 とし，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，⊿⊿ Ct 法により行った．

４．Percoll®密度勾配遠心分離法による培養細胞の分画化

BMSC を 10% FCS 含有 α-MEM に 50 μg/ml AA と 10 mM βg，そして 10^{-8} M Dex を添加した骨芽細胞分化誘導培地にて培養した． 2 週間培養後，Phosphate-Buffered Saline （PBS; Sigma-Aldrich Corporation）にて 1 回洗浄し，Accumax®（Sigma-Aldrich Corportion）を用いて剥離した後，100 μm セルストレーナーをもちいて細胞残渣を除去し，細胞を回収した．この回収した細胞を Osteoblastic-BMSC（OB-BMSC）とした． 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%，30%，50%，70% の Percoll® 溶液を調製した．15 ml 遠沈管に各濃度の Percoll® 溶液層を濃度が高い順に積層し，濃度勾配を作製した．濃度勾配の上に 1 ml の HBSS にて懸濁した OB-BMSC の細胞懸濁液を填入し，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，それぞれ 10/30 分画，30/50 分画および 50/70 分画とした．各分画を Via count®（Merck Millipore）にて染色し，guava® easyCyte （EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA）を用いて試料数 3 で各分画に含まれる生細胞数を測定した．

５．マイクロアレイ解析

上述の方法で回収した 10/30, 30/50, および 50/70 分画の細胞から RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した。Total RNA の純度 (OD260/OD280 値) が 2.0 前後であることを確認 (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) した後, GeneChip 遺伝子発現解析アレイ (Mouse Clariom S Array, 倉敷紡績, 大阪) を用いてマイクロアレイ解析をおこなった. マイクロアレイから得られたデータは解析ソフト Transcriptome viewer (倉敷紡績, 大阪) を用いて解析を行った. 解析法としてはシグナル値 6 以上の全遺伝子を抽出し, 各分画のクラスタリング解析を行った. また, 各分画間で発現量が変動している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

10/30, 30/50 および 50/70 分画の細胞から Sepasol-RNA Ⅰ を用いて total RNA を抽出し, Oligo-dT Primer および逆転写酵素を用いて cDNA を合成した. cDNA と, 間葉系幹細胞マーカーである *Immunoglobulin superfamily*

containing leucine-rich repeat （*ISLR*）および幼若前骨芽細胞マーカーである *Fibroblast growth factor receptor 2* (*FGFR2*) に特異的なプライマー（表 1），SYBR Green PCR master mix を用いて，ABI 7500 Fast System にて（95℃ 10 秒 / 60℃ 30 秒）× 40 サイクルのリアルタイム PCR を行った．試料数は 3 とし，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，⊿⊿ Ct 法により行った．

７．細胞表面マーカーの発現解析

上述の方法で回収した 10/30，30/50 および 50/70 分画を，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，CD44，CD73，CD105，CD106，SSEA 1 抗体に各々 15 分間反応させた．その後，ビオチン化抗体を APC-streptoavidine（BD Biosciences）にて発色させた．試料数は 3 とし，各々の細胞表面マーカー分子の発現量は，guava® easyCyte を用いて解析した．

８．細胞形態の検討

10/30, 30/50, および 50/70 分画を guava® easyCyte を用いて前方散乱光（Forward Scattered Light）および側方散乱光（Side Scattered light）について試料数 4 で解析した.

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.

Ⅲ．結果

１．BMSC の骨芽細胞分化誘導培地による培養期間の設定

本研究では、便宜的な間葉系幹細胞集団として骨髄ストローマ細胞を用いた．骨髄ストローマ細胞を骨芽細胞分化誘導培地にて培養し，培養 2 週間の時点で ALP 染色および von Kossa 染色の 2 重染色行ったところ，Colony-forming Units-osteoblast（CFU-O）の形成が確認された（図 2 ）．次に，OB-BMSC を細胞内密度によって分画化するにあたり，様々な分化段階の骨芽細胞を含んだ細胞集団を対象とする必要があるため，OB-BMSC の培養期間を設定するための実験を行った．骨芽細胞分化誘導をかけていない BMSC と培養 1 週間，2 週間および 3 週間の OB-BMSC を *ALP*，*OPN*，*OCN* の発現量について比較解析したところ，培養 1 週間の OB-BMSC は BMSC と比べいずれの分化マーカーの発現量も増加していなかった（図 3 ）．培養 2 週において，はいずれの分化マーカーの発現量も増加しており，培養 3 週においては，*OCN* の発現量は著明に増加していたが，*ALP* および *OPN* の発現量は減少していた（図 3 ）．以上の結果から，本研究では，培養期間 2 週目の OB-BMSC に様々な分化段階の骨芽細胞が混在していると考え，培養 2 週目の OB-BMSC を以下の解析に用いること

とした.

２．Percoll® 密度勾配遠心分離法による OB-BMSC の分画化

図 4 に Percoll® 密度勾配遠心分離法により OB-BMSC を分画化する方法の概略図を示す．まず，Percoll® を HBSS にて希釈して 10%，30%，50%，および 70% の Percoll® 溶液を作成した．そして，70% Percoll® 溶液を遠沈管へ静かに注入し，次に 70% Percoll® 溶液の上に 50% Percoll® 溶液を静かに注入して，70% と 50% の異なった濃度の 2 層の濃度勾配を作製した．これを繰り返し，10%，30%，50%，および 70% の 4 層の濃度勾配を作製した．次に，OB-BMSC を回収後，HBSS にて懸濁した．この OB-BMSC 細胞懸濁液を Percoll® 密度勾配の上へ静かに注入した後，遠心分離した．すると，細胞懸濁液中に含まれる石灰物は遠沈管の底部に沈積し，下層の Percoll® 溶液より密度の低い細胞は層境界面にトラップされ，密度の高い細胞はさらに沈下していく．遠心分離後，各層の界面にトラップされた細胞層の存在が確認された．10% と 30% の層境界面から回収された細胞内密度の低い細胞集団を含む分画を 10/30 分画（細胞内密度：1.02-1.05 g/ml），30% と 50% の層境界面から回収された中等度の細胞内密度の細胞集団を含む分画を 30/50 分画（細胞内密

度: 1.05-1.07 g/ml），50% と 70% の層境界面から回収された高密度の細胞内密度の細胞集団を含む分画を 50/70 分画（細胞内密度: 1.07-1.10g/ml）とした．回収された全ての生細胞に対する各分画に含まれる生細胞の割合は，30/50 分画の割合が最も高く（60.3±8.7%），次いで 10/30 分画の割合が高かった（38.3±8.6%）．一方で 50/70 分画の割合は他の分画に比べて著明に低かった（1.4±0.4%）（図 5 ）．

３．骨芽細胞分化マーカーの発現による各分画の分化度の検索

Percoll® 密度勾配遠心分離法によって分離された 3 つの分画を骨芽細胞分化マーカーの発現量について比較検討したところ，10/30 分画は，*Runx2* の発現量が 30/50 分画より有意差をもって高く（図 6 A ），*Col1a-1* の発現量は 30/50 分画よりも低かった（図 6 C ）．30/50 分画は，*Runx2* の発現量が他の 2 つの分画より有意差をもって低かった．一方 50/70 分画は，*OSX, Col1a-1, OPN, OCN* の発現量が他の 2 つの分画に比べて有意差をもって高かった（図 6 B, C, E, F ）．3 つの分画において，*ALP* の発現量に有意な差は認められなかった（図 6 D ）．

４．マイクロアレイ解析による各分画の包括的な遺伝子発現の検索

Percoll® 密度勾配遠心分離法により分離された 3 つの分画をマイクロアレイによって解析した．遺伝子の発現量を示す signal 値が 6 以上である 10602 遺伝子についてデータ解析ソフト transcriptome viewer を用いてクラスタリング解析を行ったところ，遺伝子の発現パターンによって，各分画の階層構造が自動的に判定された．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（図 7 ）．このことより，30/50 分画は 10/30 分画を比べてより分化の進んだ細胞を含む集団であることが示唆された．

最も未分化に近い細胞を含む分画であると推測される 10/30 分画の特徴を検討するために，10/30 分画で特異的に発現が高い遺伝子の抽出を行った．50/70 分画と比較して，10/30 分画で 2 倍以上発現量の多い遺伝子を検索したところ，1443 遺伝子が抽出された．この中から，30/50 分画と比較しても 10/30 分画で 2 倍以上発現量の多い遺伝子を検索したところ，303 遺伝子が抽出された（図 8 ）．これらの遺伝子を 10/30 分画での発現量が多い順に調べたところ，間葉系幹細胞マーカーあるいは幼若な前骨芽細胞マーカーと考えられている 2 つの遺伝子を見出すことができた．*Immunoglobulin superfamily containing leucine rich repeat (ISLR)* は間葉系幹細胞マーカーの一つであ

り，間葉系幹細胞を未分化な状態に保つ分子の一つであるという報告がある(59)．また，*Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)* はマウス頭蓋骨骨縫合部の細胞増殖活性の高い領域に存在する幼若な前骨芽細胞に限局して発現しているという報告がある(60)．

そこで，マイクロアレイ解析により抽出された *ISLR* と *FGFR2* の 2 つの遺伝子の，各分画における発現量をリアルタイム PCR 法にて比較解析したところ，*ISLR* の発現量は 10/30 分画で有意差をもって高いことが確認された（図 9 A ）．また，*FGFR2* の発現量は 10/30 分画で最も高く，次いで 30/50 分画が高く，50/70 分画では最も低いことが確認された（図 9 B ）．これらの結果より，3 つの分画の中で，細胞内密度の低い 10/30 分画は最も未分化状態に近い細胞を含む分画であることが明らかになった．

５．細胞表面マーカーの発現解析および細胞形態の検討

次に，3 つの分画に対して細胞表面マーカーの発現について解析した．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，CD44，CD73，CD105，CD106，Sca-1，SSEA1（仮想間葉系幹細胞マーカー）について検索を行った．Percoll® 密度勾配遠心分離法によって分離した 3 つの分画に含まれる細胞

を，それぞれ各 Biotin-抗 CD44，CD73，CD105，CD106，Sca-1，SSEA1 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，CD73，CD105，CD106，Sca-1 の発現は 3 つの分画の間でその発現パターンに差異があることが明らかになった（図 10-12 ）．これらの表面マーカーの陽性率を数値化したものを図 13 に示す．CD73，CD105，CD106，Sca-1 の発現量は 10/30 分画でもっとも高く，50/70 分画でもっとも低いことが明らかをなった．すなわち，分画の細胞内密度が高密度になるのに伴い，発現が減少していく傾向を認めた．また，CD44 の発現量は 3 つの分画のいずれにおいても同等程度に高発現しており，SSEA1 はいずれの分画においても発現は認められなかった（図 13 ）．これらの結果から，細胞内密度の低い 10/30 分画が 3 つの分画の中で最も未分化状態に近く，密度の高い 50/70 分画が最も分化が進んだ細胞を含む集団であることが示唆された．中等度密度の 30/50 分画はその中間に位置すると考えられる（図 14 ）．さらに，図 15 に示すように，3 つの分画を，X 軸を細胞の大きさを示す Forward Scatter （FSC），Y 軸を細胞内の複雑さを示す Side Scatter（SSC）にて展開したところ，10/30 分画と 50/70 分画には明らかなパターンの差異を認め，30/50 分画はその中間のパターンを示した（図 15 ）．さらに，各分画のメジャーポピュレーションに含まれる細胞の FSC 値の平均値を算出し，10/30 分画の FSC 平均値を基準として

比較したところ，細胞内密度の高い分画になるにつれ，分画内の FSC 平均値は減少していくことが明らかとなった（図 16 ）.

Ⅳ. 考察

骨芽細胞は骨髄中に存在する間葉系幹細胞由来であり，前骨芽細胞と呼ばれる分化段階を経て骨芽細胞へ分化が進むと推測されている(61)．そして，*in vitro* の実験において，間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化していく過程で *Runx 2*，*OSX*，*ALP*，*Col a-1*，*OPN*，*OCN* といった骨芽細胞分化マーカーと呼ばれる遺伝子の発現パターンが変化していくことが知られている(62)．しかしながら，前骨芽細胞は分化途中の全ての細胞を含む heterogeneous な細胞集団であり，単一の分化段階を経るのみなのか，あるいは複数の分化段階を経るのかといった詳細な分化メカニズムは解明されていない．また，特定の細胞に分化している培養細胞の細胞表面マーカーの解析が，詳細な分化メカニズムの解明につながると考えられるが，培養骨芽細胞の細胞表面マーカーの詳細は明らかになっていない．これは培養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トリーによる細胞表面マーカーの解析を困難にしていたためであるが，Yamamoto らの研究によって， Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いることで培養骨芽細胞から石灰化物を除去し，細胞を回収する方法が確立された(50)．本研究では，この Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いることで，石灰化物を除去するだけでなく，培養細胞集団をその細胞内密度によって分画化すること

に成功した.

ところで，成熟骨芽細胞は骨基質を形成するため多量の細胞外基質を分泌し，そのために間葉系幹細胞に比べて細胞質中にゴルジ体や粗面小胞体を豊富に持っているといわれている．また，新生児マウス頭蓋骨に含まれる骨芽細胞を回収し，それらの細胞の細胞内の密度を Percoll® 密度勾配遠心分離法によって解析したところ，骨芽細胞はその成熟度によって細胞内密度が変化していくという報告がある(57, 58)．このような分化に伴う細胞の変化から，骨芽細胞は，間葉系幹細胞からの分化過程においても，その細胞内密度を変化させるのではないかと考えた．そこで，本研究は，培養骨芽細胞を Percoll® 密度勾配遠心分離法によって細胞内密度によって分画化し，得られた分画に含まれる細胞の骨芽細胞分化マーカー遺伝子および細胞表面マーカーの発現量を比較解析することで，骨芽細胞系譜の細胞内密度と分化度の関連性が明らかになるのではないかと考えた（図 1 ）.

本研究では，骨髄細胞から浮遊系細胞を除去することによって得られる，多分化能を持つ付着性の細胞であるマウス BMSC を便宜的な間葉系幹細胞として用いた(63)．この BMSC を骨芽細胞分化誘導培地にて培養することで骨芽細胞への分化の進んだ OB-BMSC が得られ，OB-BMSC には骨芽細胞が含まれることは ALP 染色および von Kossa 染色にて CFU-O の形成が認められたことにより確

認された（図 2 ）.

次に，培養骨芽細胞を分化段階の異なる骨芽細胞集団に分画化するためには，OB-BMSC に様々な分化段階の骨芽細胞が含まれている必要があると考え，OB-BMSC の最適な培養期間について検討した．様々な培養期間の OB-BMSC の骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現量を解析したところ，培養 2 週目の OB-BMSC では 分化初期マーカーである *ALP*，中期マーカーである *OPN*，後期マーカーである *OCN* のいずれのマーカーも BMSC に比べて有意差をもって増加していた（図 3 ）ことより，培養 2 週目の OB-BMSC に様々な分化段階の骨芽細胞が混在していると考え，本研究に用いることとした.

引き続いて，OB-BMSC を分画化するため Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いた．Yamamoto らの研究により，10% と 70% の Percoll® 密度勾配を用いることで，培養骨芽細胞から石灰化物を除去し，ほぼすべての生細胞を回収できることが確認されている(50)．本研究では，10%および 70%の密度勾配の間に，30%，50% の Percoll® 希釈液を介在させることで，OB-BMSC から石灰化物を除去するとともに，回収される生細胞集団を細胞内密度の異なる 3 つの分画に分離することに成功した.（図 4 ）.

さらに，各分画内に含まれる生細胞数を測定したところ，回収された全ての生細胞の中で 低密度分画である 10/30 分画と，中等度密度分画である 30/50

分画の生細胞数の割合が主要な割合を占め，一方で高密度な分画である 50/70 分画の割合は著明に低かった．（図 5 ）．成熟骨芽細胞は，間葉系幹細胞あるいは前骨芽細胞といった未分化に近い細胞に比べて細胞増殖能が低下しているといわれており(62，64，65)，高密度の 50/70 分画は生細胞数の少なさから，他の分画に比べて増殖能が低く，より骨芽細胞へ分化の進んだ細胞を含む集団であることが推察される．

このようにして得られた 3 つの分画に対して，遺伝子発現および細胞表面マーカーの発現について解析をおこなった．まず，各分画の骨芽細胞分化―マーカー遺伝子の発現量についてリアルタイム PCR を用いて比較解析を行ったところ，その遺伝子発現パターンには差が認められた．高密度の 50/70 分画は，*OSX*，*Col1a-1*，*OPN*，*OCN* といった骨芽細胞分化における中期から後期のマーカーの発現量が他の分画に比べて高かったことより，骨芽細胞への分化が最も進んだ細胞を含む分画であることが明らかとなった（図 6 ）．しかしながら，低密度である 10/30 分画と中等度密度である 30/50 分画の骨芽細胞分化マーカーの発現には，著明な差は認められなかったため（図 6 ），10/30 分画と 30/50 分画ではどちらがより分化の進んだ分画であるのかは，骨芽細胞分化マーカーの解析によっては明らかにならなかった．そこで，密度勾配遠心分離後に回収される生細胞の中の主要な割合を占める 10/30 分画と 30/50 分

画の差を検討するために，　マイクロアレイによる解析を行った．10602 遺伝子の網羅的なクラスタリング解析の結果，30/50 分画は，最も骨芽細胞への分化が進んでいると考えられる 50/70 分画に遺伝子の発現パターンに近いことが明らかとなり（図 7 ），中等度密度の 30/50 分画は，低密度の 10/30 分画と比べてより分化の進んだ分画であることが示唆された．

さらに，ここまでの結果から 3 つの分画の中で最も未分化状態に近いと推測される 10/30 分画の特徴について検討するため，この分画で特異的に発現が増加している遺伝子の抽出を行った．抽出された遺伝子の中から，骨芽細胞系譜の細胞の未分化性を示すマーカーとなり得る遺伝子を検索したところ，*ISLR* と *FGFR2* の 2 つの遺伝子を見出した（図 8 ）．　*ISLR* はマウス間葉系幹細胞のマーカーの 1 つであり，間葉系幹細胞を未分化な状態に保っている分子の 1 つであるという報告がある(59，66，67)．また *FGFR2* は，マウス頭蓋骨骨縫合部にある細胞増殖活性の高い領域に存在する幼若な前骨芽細胞に限局して発現しているという報告がある(60，68，69)．マイクロアレイ解析により抽出された *ISLR* と *FGFR2* の各分画における遺伝子発現の差異を検証するため，これら 2 つの遺伝子についてリアルタイム PCR による遺伝子発現量の解析を行った．*ISLR* の発現量は低密度分画である 10/30 分画で有意差をもって高いことが確認された（図 9 A ）．また *FGFR2* の発現量は 10/30 分画で最も高

く，分画が高密度になるにつれ発現は減少していくことが確認された（図 9 B ）．この結果より，3 つの分画の中で，細胞内密度の低い 10/30 分画は最も未分化状態に近い分画であることが明らかになった．

以上より，OB-BMSC より分離された細胞内密度の異なる 3 つの分画には異なる分化段階の骨芽細胞が含まれていることが明らかとなった．高密度な分画である 50/70 分画では他の分画と比較して骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現が増加しており，低密度な分画である 10/30 分画は間葉系幹細胞および幼若な前骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現が増加していたことから，密度の高い分画はより分化の進んだ骨芽細胞を含む集団であり，密度の低い分画は未分化状態に近い細胞を含む集団であることが示唆された．中等度密度の分画はその中間にあると考えられる．すなわち，間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化に伴い，細胞内密度は増加していくことが示唆された．

ところで，Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いることの利点の 1 つは，培養骨芽細胞から石灰化物を除去し，フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの発現解析が可能となる点である．そこで，各分画の分化度について FACS 解析を行い，現在マウスの仮想間葉系幹細胞マーカー(18, 70-72)と考えられている CD44, CD73, CD105, CD106, Sca-1, SSEA1 の発現を解析することで，各分画の未分化性について検討する実験を行った．Yamamoto らの研究よ

り，マウス骨髄細胞から得られる間葉系幹細胞集団にはこれらの仮想間葉系幹細胞マーカーが高発現していることが確認されている(50)．各分画の仮想間葉系幹細胞マーカーの陽性率を比較したところ，CD73，CD105，CD106，Sca-1 の陽性率は，細胞内密度が高くなるにつれ減少していく傾向を認めた（図 13，14 ）．この結果より，間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化の過程において，間葉系幹細胞マーカーの発現パターンが変化するならば，CD73，CD105，CD106，Sca-1 は真の間葉系幹細胞マーカーの候補となり得ると考えられる．また，CD44 はどの分画においても同等程度に高発現しており，SSEA1 はどの分画においても発現を認めなかった（図 13，14 ）．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線維芽細胞，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(73)，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り(74)，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(75)．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おり，本研究の結果から，CD44 は間葉系幹細胞から骨芽細胞までのいずれの分化段階においても発現しているマーカーであると考えられる．また， SSEA1 はマウス胚性幹細胞の未分化性を確認するために用いられるマーカーであり，SSEA1 は分化条件で培養することにより速やかに発現が消失するといわれている(76，77)．本研究では，

SSEA1 はいずれの分画でも発現を認めなかったことから，3 つの分画の中でもっとも未分化状態に近いと考えられる 10/30 分画も完全に未分化状態ではないことが示唆された．また，骨芽細胞分化における基本転写因子であり，分化初期のマーカー遺伝子である *Runx 2* が 10/30 分画と 50/70 分画とで同程度に発現していたことより，10/30 分画は分化初期の骨芽細胞を含む集団であると考えられる．

最後に，骨芽細胞系譜の細胞内密度を変化させる要因について検討するため，各分画を FACS 解析し，細胞の大きさを示す前方散乱光（FSC）および細胞内部の構造の複雑さを示す側方散乱光（SSC）にて展開したところ，各分画には明らかなパターンの差異が認められた（図 15 ）．各分画内のメジャーポピュレーションに含まれる細胞の FSC 値の平均値を求め， 10/30 分画の FSC 平均値を基準として比較したところ，細胞内密度が高い分画になるにつれ，その分画に含まれる細胞の FSC 平均値は減少していくことが明らかになった（図 16 ）．このことより，骨芽細胞系譜の細胞の細胞内密度の増加には，細胞の大きさの減少が関与していることが示唆された．しかし，生体内の骨芽細胞は骨髄に見られる未分化な細胞と比較して，大きい細胞であるという報告がある (78, 79)．本研究では，生体内において付着系細胞である骨芽細胞を浮遊した状態で解析しているため，50/70 分画に含まれる細胞を再度播種し，dish に

付着させた状態でどのような形態となるかを検討する実験を将来的に行うことを考えている．また，生体内の骨芽細胞には，活発にタンパク質を産生する卵円形の formative osteoblast とよばれる形態とは別に，タンパク質産生が乏しい扁平な bone lining cell という形態があるといわれている(80)．bone lining cell は休止期にある骨芽細胞で，細胞質に乏しいといわれているため(81)，本研究で解析された 50/70 分画に含まれる小さい骨芽細胞は，この bone linig cell に近い細胞である可能性がある．あるいは，50/70 分画は，骨細胞に特異的なマーカー遺伝子である *DMP1* (82, 83)の発現量が他の分画と比較して増加していたことから， 50/70 分画に含まれる分化の進んだ骨芽細胞は，骨細胞に近い細胞になっているのではないかと推測される．

本研究の結果より，間葉系幹細胞から分化しつつある骨芽細胞系譜は，その分化段階によって細胞内密度が増加していくことが明らかとなった（図 17 ）．すなわち，細胞内密度は骨芽細胞系譜の分化度を示す新たな指標であり， Percoll® 密度勾配遠心分離法という簡便かつ安価な方法を用いることにより，heterogeneous な培養骨芽細胞から特定の分化段階の骨芽細胞を分離でき，前骨芽細胞の同定や骨芽細胞の詳細な分化メカニズムの解明につながると思われる．

今後の展望としては，本研究により分離された 3 つの分画の，細胞増殖能

や細胞の微細構造，分画中での生細胞と死細胞の割合についての更なる解析を行い，各分画の特徴を検討していくことを考えている．また，これらの分画に含まれる細胞集団をマウス骨欠損モデルに移植し，移植された骨芽細胞系譜の分化度と，骨再生の関連性を検討する実験を行っていきたいと考えている．成熟した骨芽細胞は増殖能が低く，骨再生においては活発な増殖能を持つ未熟な骨芽細胞が望ましいという報告があることから(40)，本研究で得られた未分化状態に近いと考えられる 10/30 分画は，骨再生療法における細胞移植材料として適している可能性がある．骨欠損モデルへの細胞移植実験によって，骨再生に有利な分化度の骨芽細胞を解明し，その分離法を確立できれば，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

Percoll® 密度勾配遠心分離法という簡便かつ安全な方法を用いることで，heterogeneous な培養骨芽細胞集団から，細胞内密度の異なる骨芽細胞集団を分離することに成功した．分離された 3 つの分画に含まれる細胞は骨芽細胞分化マーカー遺伝子および間葉系幹細胞表面マーカーの発現レベルに差を認めたことより，異なる分化段階の骨芽細胞であることが明らかとなった．このことより，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明らかとなった.

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）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, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y, Takakura Y (2005): Tissue engineered ceramic artificial joint - ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 26(22):4654-61.

2) Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T (2003): Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton. *Novartis Found Symp* 249:118-27; discussion 27-32, 70-4, 239-41.

3) Ohgushi H, Caplan AI (1999): Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 48(6):913-27.

4) 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(7):2109-18.

5) 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(9):792-806.

6) 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(5411):143-7.

7) Meirelles Lda S, Nardi NB (2009): Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:4281-98.

8) Caplan AI (1994): The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 21(3):429-35.

9) Meirelles Lda S, Nardi NB (2003): Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123(4):702-11.

10) da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006): Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119(Pt 11):2204-13.

11) De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001): Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44(8):1928-42.

12) 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 Biol* 160(6):909-18.

13) 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(10):5807-12.

14) 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(3):101-9.

15) Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J (2002) Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 9(10):642-7.

16) Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Lowik 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(8):870-8.

17) 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.

18) 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(2):275-81.

19) Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT (1998): Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci (Lond)* 94(5):549-55.

20) 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(3):704-13.

21) 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(7):1115-22.

22) 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(1):27-35.

23) Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4(5):267-74.

24) Prockop DJ (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276(5309):71-4.

25) Bianco P, Kuznetsov SA, Riminucci M, Gehron Robey P (2006): Postnatal skeletal

stem cells. *Methods Enzymol* 419:117-48.

26) 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(4):570-85.

27) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7.

28) Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW (2004): Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 32(5):414-25.

29) Garcia-Gomez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramirez M, Castro JG, Arranz MG, Vicente A, Bueren J, Garcia-Olmo D (2010): Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther* 10(10):1453-68.

30) Hernandez-Monjaraz B, Santiago-Osorio E, Monroy-Garcia A, Ledesma-Martinez E, Mendoza-Nunez V (2018): Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences* 19(4).

31) 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(3):121-7.

32) Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O (2004): Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363(9419):1439-41.

33) Le Blanc K, Ringden O (2005): Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 11(5):321-34.

34) Nauta AJ, Fibbe WE (2007): Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110(10):3499-506.

35) 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, Ringden O, Developmental Committee of the European Group for B, Marrow T (2008): Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371(9624):1579-86.

36) Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE (2006): Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235(1):176-90.

37) Moon YJ, Yun CY, Lee JC, Kim JR, Park BH, Cho ES (2016): Maturation of cortical

bone suppresses periosteal osteoprogenitor proliferation in a paracrine manner. *J Mol Histol* 47(5):445-53.

38) Shao Z, Liu B, Peng Q, Liu W, Liu Y, Liu R, Xu Y, Liu L (2007): Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in the rabbit mandible. *Plast Reconstr Surg* 119(2):500-7.

39) Aino M, Nishida E, Fujieda Y, Orimoto A, Mitani A, Noguchi T, Makino H, Murakami S, Umezawa A, Yoneda T, Saito M (2014): Isolation and characterization of the human immature osteoblast culture system from the alveolar bones of aged donors for bone regeneration therapy. *Expert Opin Biol Ther* 14(12):1731-44.

40) Santos-Ruiz L, Mowatt DJ, Marguerie A, Tukiainen D, Kellomaki M, Tormala P, Suokas E, Arstila H, Ashammakhi N, Ferretti P (2007): Potential use of craniosynostotic osteoprogenitors and bioactive scaffolds for bone engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 1(3):199-210.

41) Ohgushi H (2014): Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 14(2):197-208.

42) Scott BL (1967): Thymidine-3H electron microscope radioautography of osteogenic cells in the fetal rat. *J Cell Biol* 35(1):115-26.

43) Long F (2011): Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(1):27-38.

44) Li H, Marijanovic I, Kronenberg MS, Erceg I, Stover ML, Velonis D, Mina M, Heinrich JG, Harris SE, Upholt WB, Kalajzic I, Lichtler AC (2008): Expression and function of Dlx genes in the osteoblast lineage. *Dev Biol* 316(2):458-70.

45) 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(5):755-64.

46) 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(5):765-71.

47) 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(8):1025-36.

48) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugghe B (2002): The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1):17-29.

49) Zhou X, Zhang Z, Feng JQ, Dusevich VM, Sinha K, Zhang H, Darnay BG, de Crombrugghe B (2010): Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(29):12919-24.

50) Yamamoto Y, Itoh S, Yamauchi Y, Matsushita K, Ikeda S, Naruse H, Hayashi M (2015): Density Gradient Centrifugation for the Isolation of Cells of Multiple Lineages. *J Cell Biochem* 116(12):2709-14.

51) Takaue Y, Watanabe T, Kawano Y, Koyama T, Abe T, Suzue T, Satoh J, Huq MA, Ohuchi T, Ninomiya T, et al. (1988): [Separation of circulating stem cells on discontinuous percoll gradients]. *Rinsho Ketsueki* 29(4):539-43.

52) Shikama Y (2013): [New fractionation method of bone marrow-derived neutrophil progenitor cells for in vivo gene expression profile analyses]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 141(2):90-4.

53) 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(1):74-7.

54) Kjellen L, Pertoft H (1978): Density gradients prepared from colloidal silical particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). II. Radioactive labeling of Percoll. *Anal Biochem* 88(1):283-4.

55) Mortimer D (2000): Sperm preparation methods. *J Androl* 21(3):357-66.

56) Fong CY, Peh G, Subramanian A, Gauthaman K, Bongso A (2009): The use of discontinuous density gradients in stem cell research and application. *Stem Cell Rev* 5(4):428-34.

57) 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 Miner Res* 6(9):969-76.

58) 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(6):701-8.

59) Maeda K, Enomoto A, Hara A, Asai N, Kobayashi T, Horinouchi A, Maruyama S, Ishikawa Y, Nishiyama T, Kiyoi H, Kato T, Ando K, Weng L, Mii S, Asai M, Mizutani Y, Watanabe O, Hirooka Y, Goto H, Takahashi M (2016): Identification of Meflin as a Potential Marker for Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep* 6:22288.

60) Johnson D, Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM (2000): Expression patterns of Twist and Fgfr1, -2 and -3 in the developing mouse coronal suture suggest a key role for twist in suture initiation and biogenesis. *Mech Dev* 91(1-2):341-5.

61) Zouani OF, Chollet C, Guillotin B, Durrieu MC (2010): Differentiation of pre-

osteoblast cells on poly(ethylene terephthalate) grafted with RGD and/or BMPs mimetic peptides. *Biomaterials* 31(32):8245-53.

62) Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990): Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143(3):420-30.

63) Itoh S, Aubin JE (2009): A novel purification method for multipotential skeletal stem cells. *J Cell Biochem* 108(2):368-77.

64) Boyce RW, Brown D, Felx M, Mellal N, Locher K, Pyrah I, Ominsky MS, Taylor S (2018): Decreased osteoprogenitor proliferation precedes attenuation of cancellous bone formation in ovariectomized rats treated with sclerostin antibody. *Bone Rep* 8:90-94.

65) Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE (1999): Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 74(4):616-27.

66) Zhang K, Zhang Y, Gu L, Lan M, Liu C, Wang M, Su Y, Ge M, Wang T, Yu Y, Liu C, Li L, Li Q, Zhao Y, Yu Z, Wang F, Li N, Meng Q (2018): Islr regulates canonical Wnt signaling-mediated skeletal muscle regeneration by stabilizing Dishevelled-2 and preventing autophagy. *Nat Commun* 9(1):5129.

67) Tice DA, Szeto W, Soloviev I, Rubinfeld B, Fong SE, Dugger DL, Winer J, Williams PM, Wieand D, Smith V, Schwall RH, Pennica D, Polakis P (2002): Synergistic induction of tumor antigens by Wnt-1 signaling and retinoic acid revealed by gene expression profiling. *J Biol Chem* 277(16):14329-35.

68) Takeshita A, Kawakami K, Furushima K, Miyajima M, Sakaguchi K (2018): Central role of the proximal tubular alphaKlotho/FGF receptor complex in FGF23-regulated phosphate and vitamin D metabolism. *Sci Rep* 8(1):6917.

69) Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM (1999): Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development* 126(24):5611-20.

70) 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(7):3213-8.

71) 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(3):219-25.

72) Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992): Cell surface antigens on human

marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13(1):69-80.

73) Underhill C (1992): CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 103 (Pt 2):293-8.

74) Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003): CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(1):33-45.

75) Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H (1996): Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271(5248):509-12.

76) Solter D, Knowles BB (1978): Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(11):5565-9.

77) Anjos-Afonso F, Bonnet D (2007): Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood* 109(3):1298-306.

78) Gohel AR, Hand AR, Gronowicz GA (1995): Immunogold localization of beta 1-integrin in bone: effect of glucocorticoids and insulin-like growth factor I on integrins and osteocyte formation. *J Histochem Cytochem* 43(11):1085-96.

79) Zouani OF, Rami L, Lei Y, Durrieu MC (2013): Insights into the osteoblast precursor differentiation towards mature osteoblasts induced by continuous BMP-2 signaling. *Biol Open* 2(9):872-81.

80) Miller SC, Bowman BM, Smith JM, Jee WS (1980): Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat Rec* 198(2):163-73.

81) Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS (1989): Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc* 3(3):953-60; discussion 60-1.

82) Kalajzic I, Braut A, Guo D, Jiang X, Kronenberg MS, Mina M, Harris MA, Harris SE, Rowe DW (2004): Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. *Bone* 35(1):74-82.

83) Fen JQ, Zhang J, Dallas SL, Lu Y, Chen S, Tan X, Owen M, Harris SE, MacDougall M (2002): Dentin matrix protein 1, a target molecule for Cbfa1 in bone, is a unique bone marker gene. *J Bone Miner Res* 17(10):1822-31.

Ⅷ. 図表

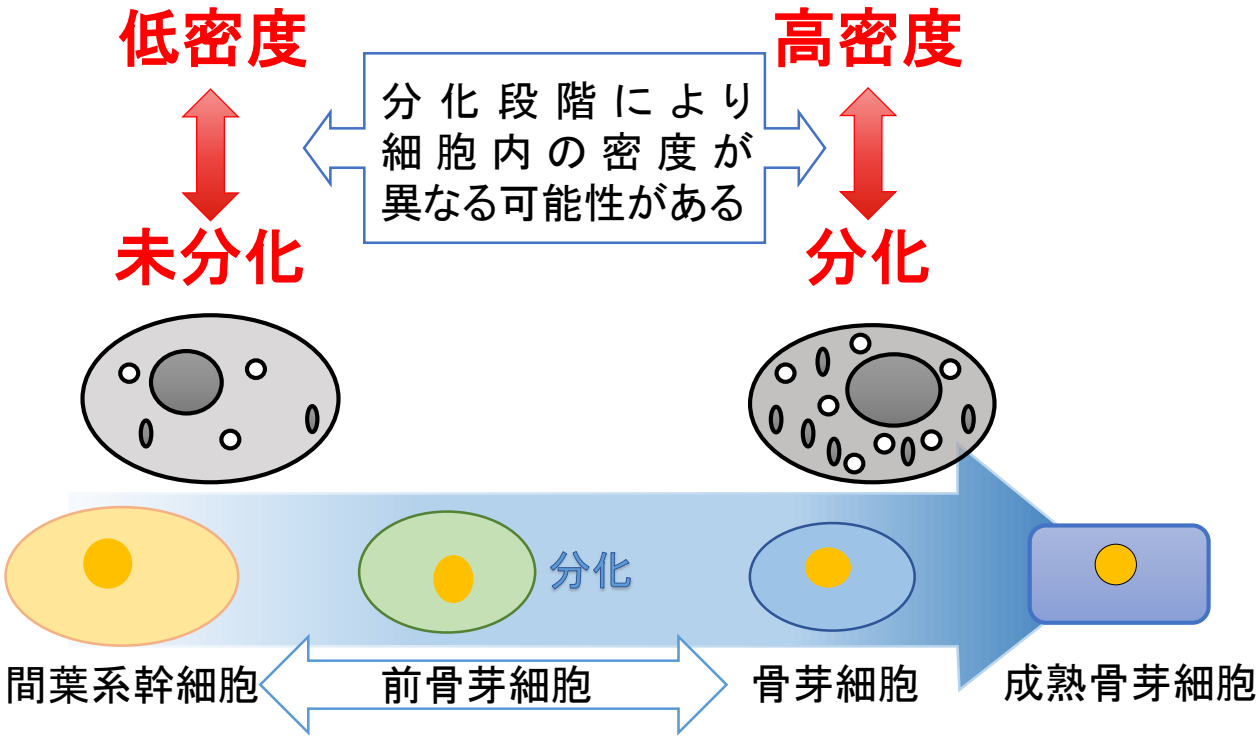


図 1. 骨芽細胞系譜の細胞内密度と分化度の関連性の仮説図

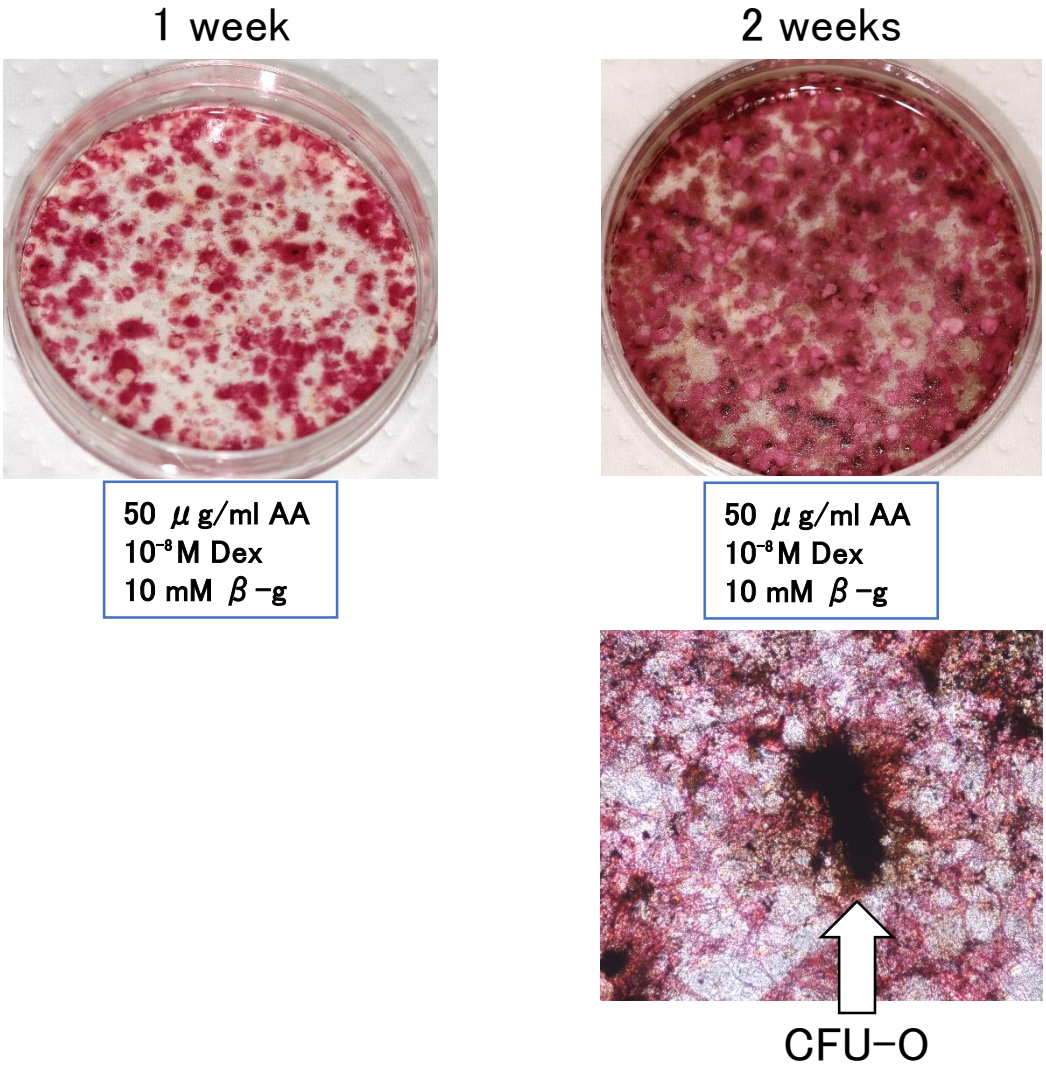


図 2. BMSC の骨芽細胞への分化の確認

骨芽細胞分化誘導培地にて 1 週間および 2 週間培養した OB-BMSC の ALP 染色と von Kossa 染色像.

培養 2 週間目で ALP 染色と von Kossa 染色共陽性である Colony-forming units-osteoblast （ CFU-O ）の形成が確認された. .

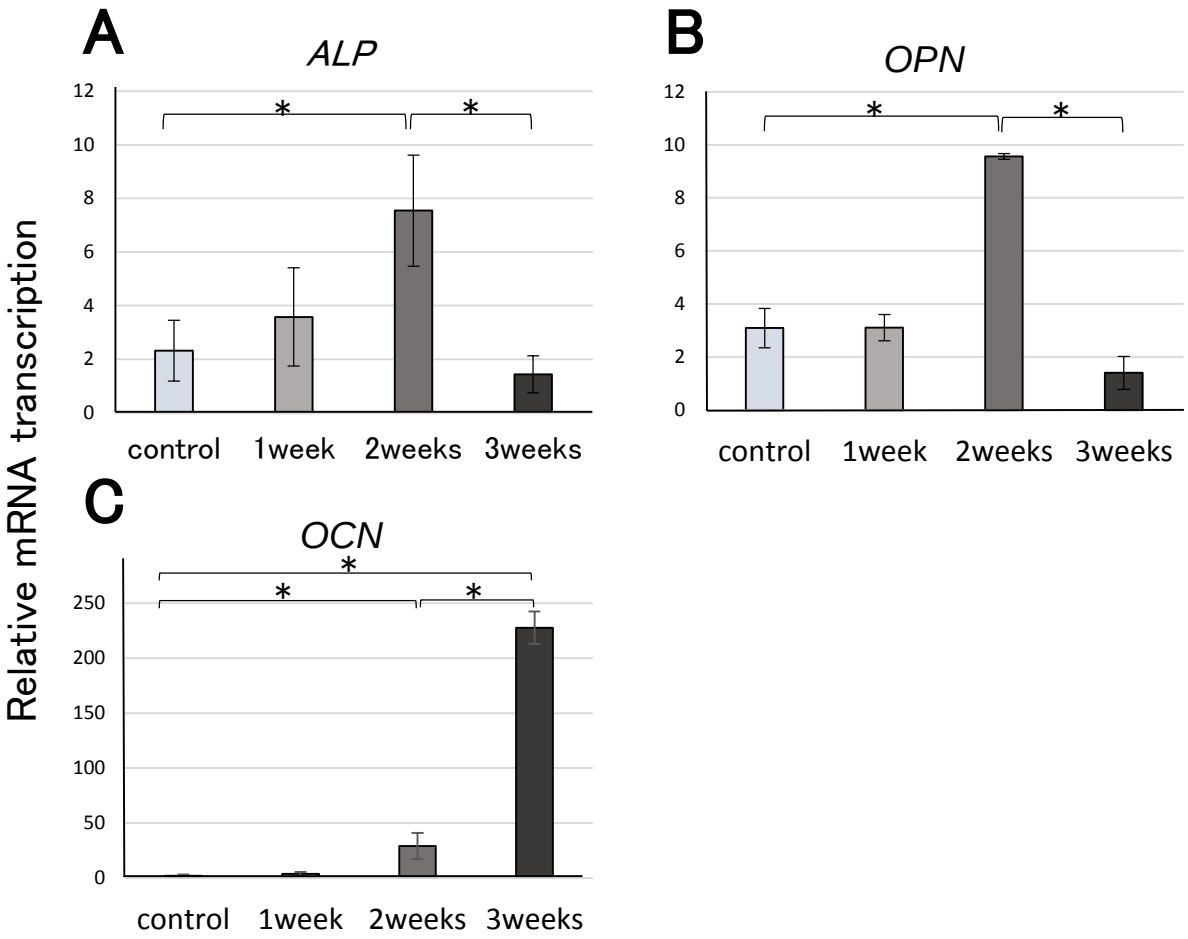


図 3. OB-BMSC の培養期間の設定

培養期間 1, 2, および 3 週間の OB-BMSC の *ALP*(A), *OPN*(B), および*OCN*(C)の mRNA 発現量.
なお, mRNA発現量は *L32* を用いて補正した(n=3).
One-way ANOVA および Turkey's test, *: $p < 0.05$

培養 1 週間ではいずれのマーカーも発現は増加しておらず,
培養 2 週間ではいずれのマーカーも発現は増加していた.
培養 3 週間では *OCN* の発現は増加していたが, *ALP* と *OPN* の発現は減少していた.

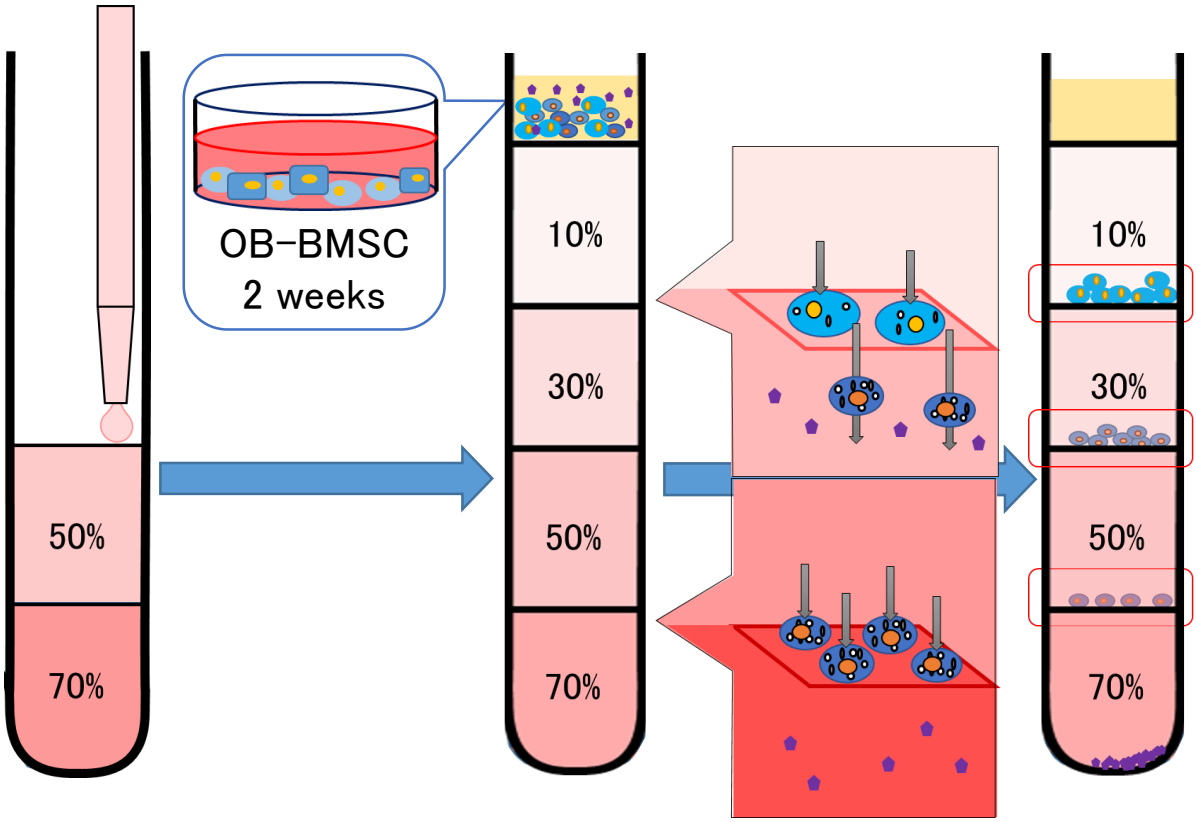


図 4. Percoll® 密度勾配遠心分離法による石灰化物の除去
および OB-BMSC の分画化の概略図

OB-BMSC の懸濁液をPercoll® 密度勾配の上に填入し, 3000 rpm で 10 分間, 4 ℃ にて遠心分離したところ, 石灰化物は遠沈管底部に沈積する. また, 下層のPercoll®希釈液よりも密度の低い細胞は層境界面にトラップされ, 密度の高い細胞はさらに沈降していくことにより, OB-BMSC は分画化される.

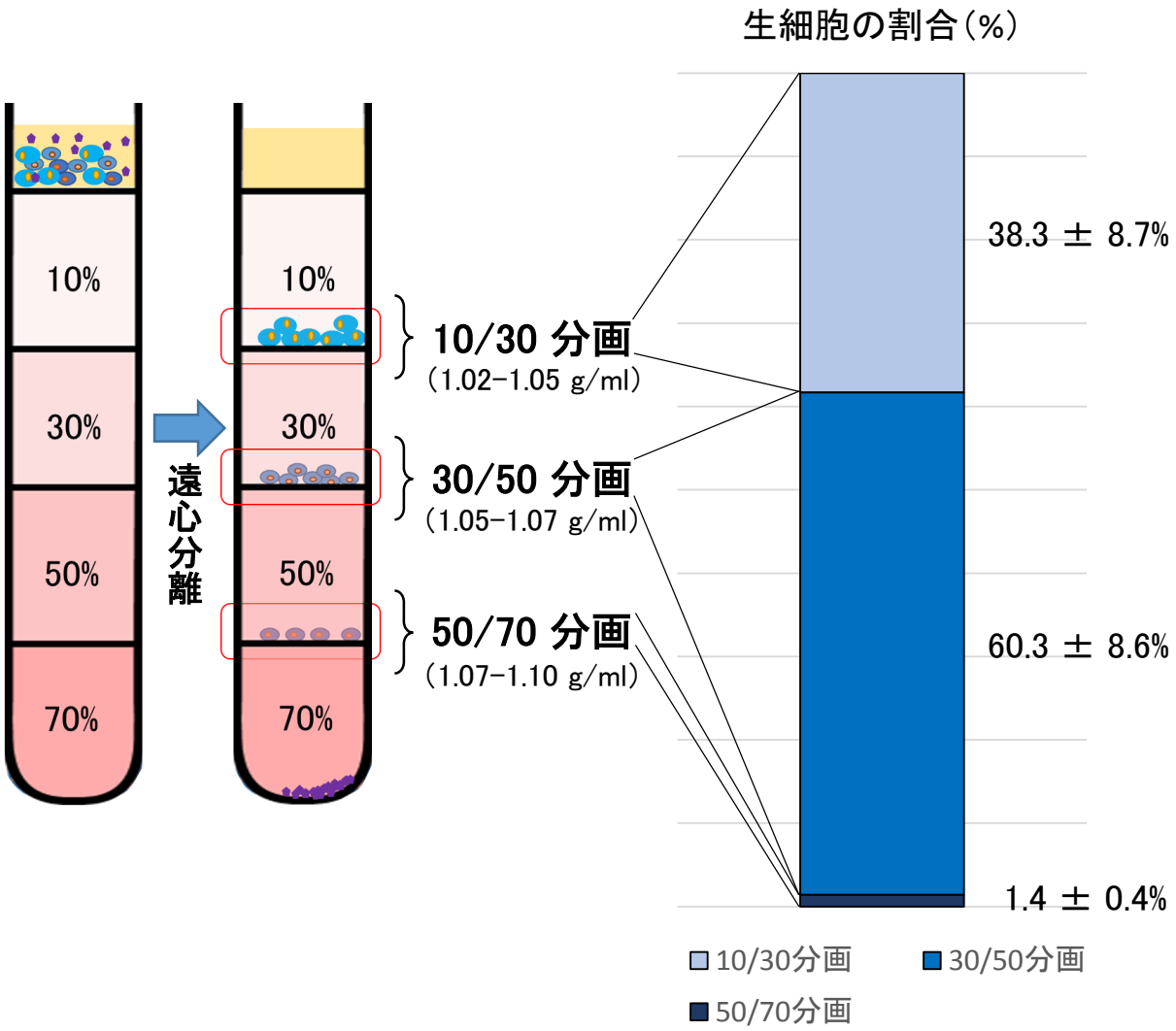


図 5. Percoll® 密度勾配遠心分離法によるOB-BMSC の分画化および各分画の生細胞数の測定

Percoll® 密度勾配遠心分離法により分離された 3 つの分画を低密度の 10/30 分画, 中等度密度の 30/50 分画, および高密度の 50/70 分画とした. 各分画に含まれる生細胞数の, 全生細胞数に対する割合を示す(n=3).

低密度の 10/30 分画と, 中等度密度の 30/50 分画が主要な割合を占め, 高密度の 50/70 分画の割合は著明に低いことが確認された.

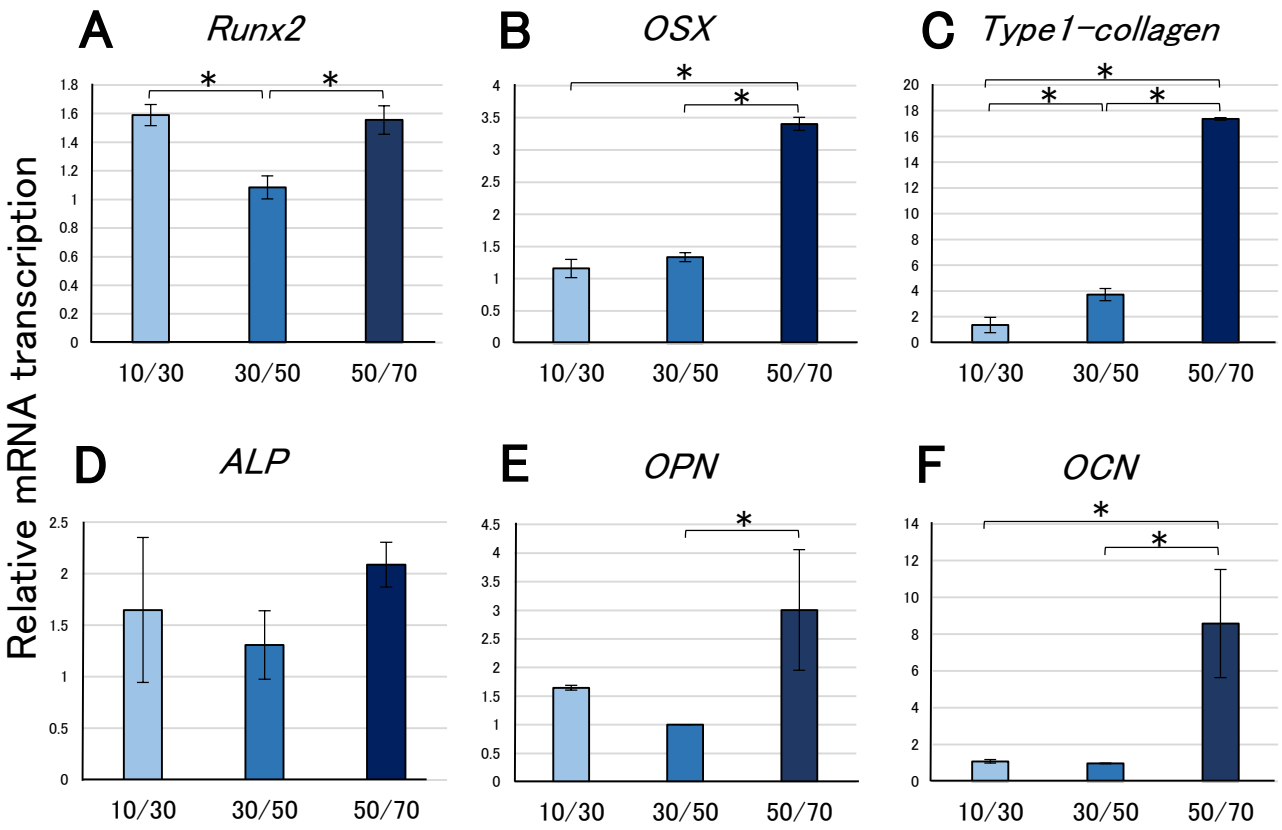


図 6. 各分画の骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現量解析

各分画 の *Runx2*(A), *OSX*(B), *Cola-1*(C), *ALP*(D), *OPN*(E), および *OCN*(F) の mRNA 発現量.
なお, mRNA発現量は *L32* を用いて補正した(n=3).
One-way ANOVA および Turkey's test, *: $p < 0.05$

10/30 分画と 30/50 分画の骨芽細胞分化マーカーの発現量の差は不明瞭であった. 一方, 50/70 分画では *OSX*, *Cola-1*, *OPN*, および*OCN* の発現量が増加していた.

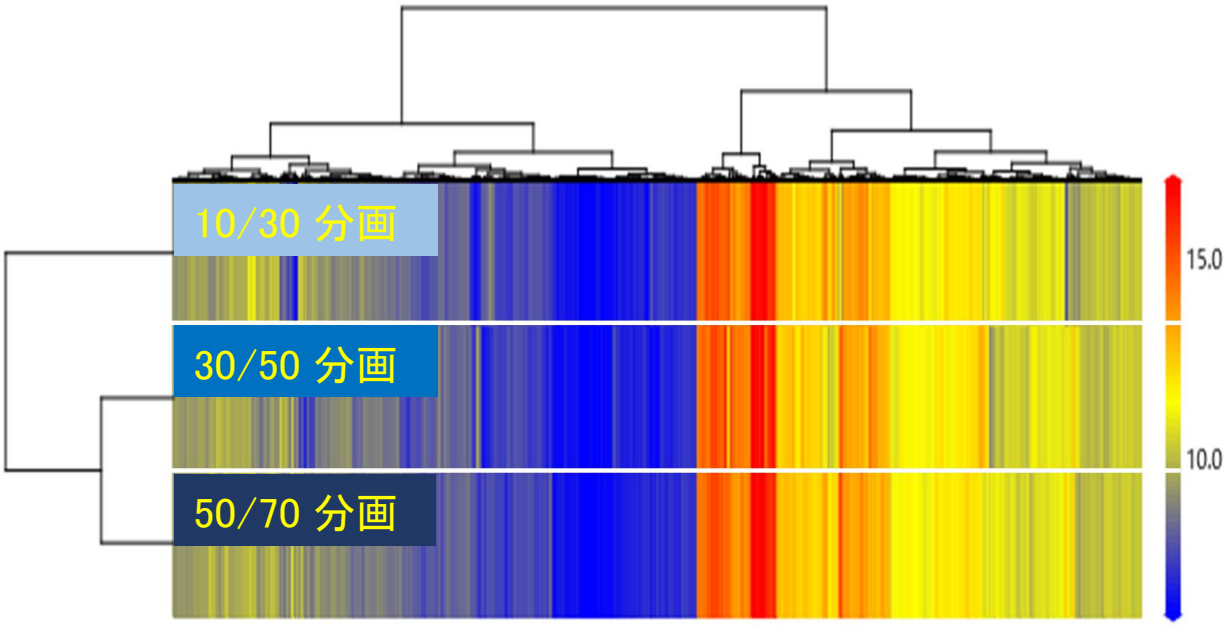
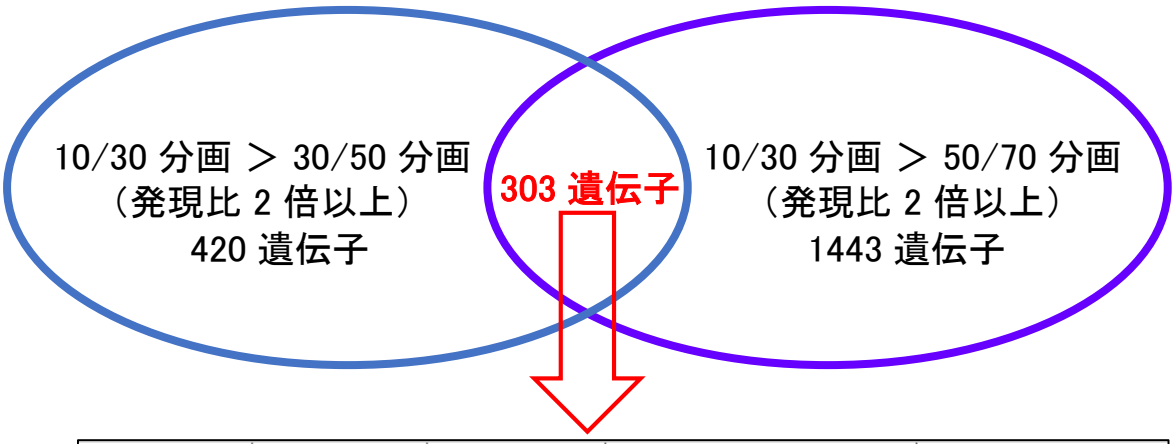


図 7. クラスタリング解析

遺伝子発現量を示す signal 値が 6 以上の 10602 遺伝子の発現パターンによって判定された, 各分画の階層構造を示す.

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.



OB-BMSC 10 30 Signal	OB-BMSC 30 50 Log Ratio	OB-BMSC 50 70 Log Ratio	Gene Accession	Gene Symbol
17.89636	-1.45814	-2.7189	NM_133977	Trf
17.73233	-1.37588	-2.3243	NM_017370	Hp
17.42528	-1.52607	-1.9246	NM_011607	Tnc
17.05391	-1.27583	-2.43949	NM_001286538	Sigmar1
17.04413	-1.21381	-3.02235	NM_007392	Acta2
16.72811	-1.74692	-1.44857	NM_008607	Mmp13
16.49687	-1.31387	-2.69103	NM_011812	Fbln5
16.45549	-1.16008	-1.76591	NM_001159518	Igfbp7
16.24666	-1.70663	-2.5869	NM_007606	Car3
16.23905	-1.90708	-3.3403	NM_001159487	Rbp4
16.14118	-1.19996	-1.16564	NM_009930	Col3a1
16.08703	-2.38518	-2.881	NM_024406	Fabp4
16.04724	-1.44131	-1.1809	NM_011581	Thbs2
15.87995	-1.05624	-2.35708	NM_009201	Slc1a5
15.84423	-1.77083	-1.23223	NM_001243008	Col6a3
15.69758	-1.0644	-1.52878	NM_054041	Antxr1
15.57487	-2.2075	-2.05478	NM_172399	Ndnf
15.55165	-1.06477	-2.17065	NM_001195431	Islr
15.25444	-1.21387	-1.89921	NM_029614	Prss23
15.16681	-1.31383	-2.0287	NM_010207	Fgfr2

図 8. 発現変動遺伝子の抽出

10/30 分画に特異的に発現が増加している 303 遺伝子を示す
（2 倍以上の発現差を認めるもの）

50/70 分画と比較して 10/30 分画で 2 倍以上発現量の多い 1443 遺伝子の中から, 30/50 分画と比較しても 10/30 分画で 2 倍以上発現量の多い 303 遺伝子を抽出した.
これらの 303 遺伝子を発現量の多い順に検索していったところ, 過去の報告より, 間葉系幹細胞マーカーおよび幼若前骨芽細胞マーカーとなり得る 2 つの遺伝子を見出した.

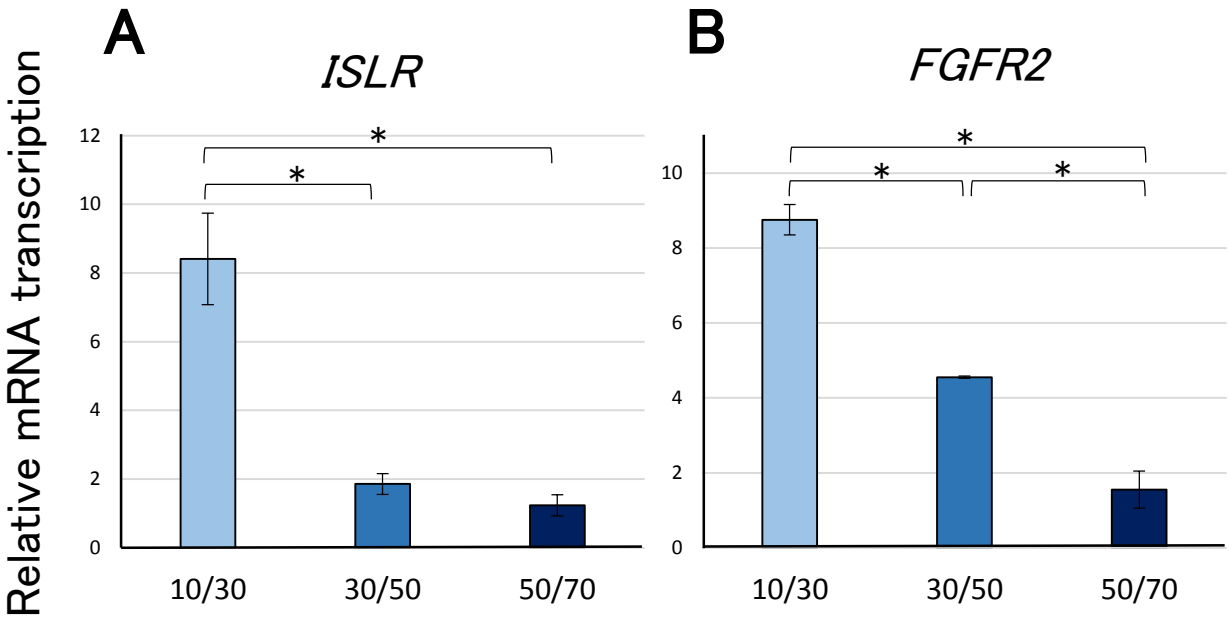


図 9. 各分画の間葉系幹細胞および幼若前骨芽細胞マーカー遺伝子の発現量解析

各分画 の *ISLR*(A), および*FGFR2*(B) の mRNA 発現量.
なお, mRNA発現量は *L32* を用いて補正した(n=3).
One-way ANOVA および Turkey's test, *: $p < 0.05$

ISLR の発現量は 10/30 分画で高く, *FGFR2* の発現量は分画の密度が高くなるにつれて減少していくことが確認された.

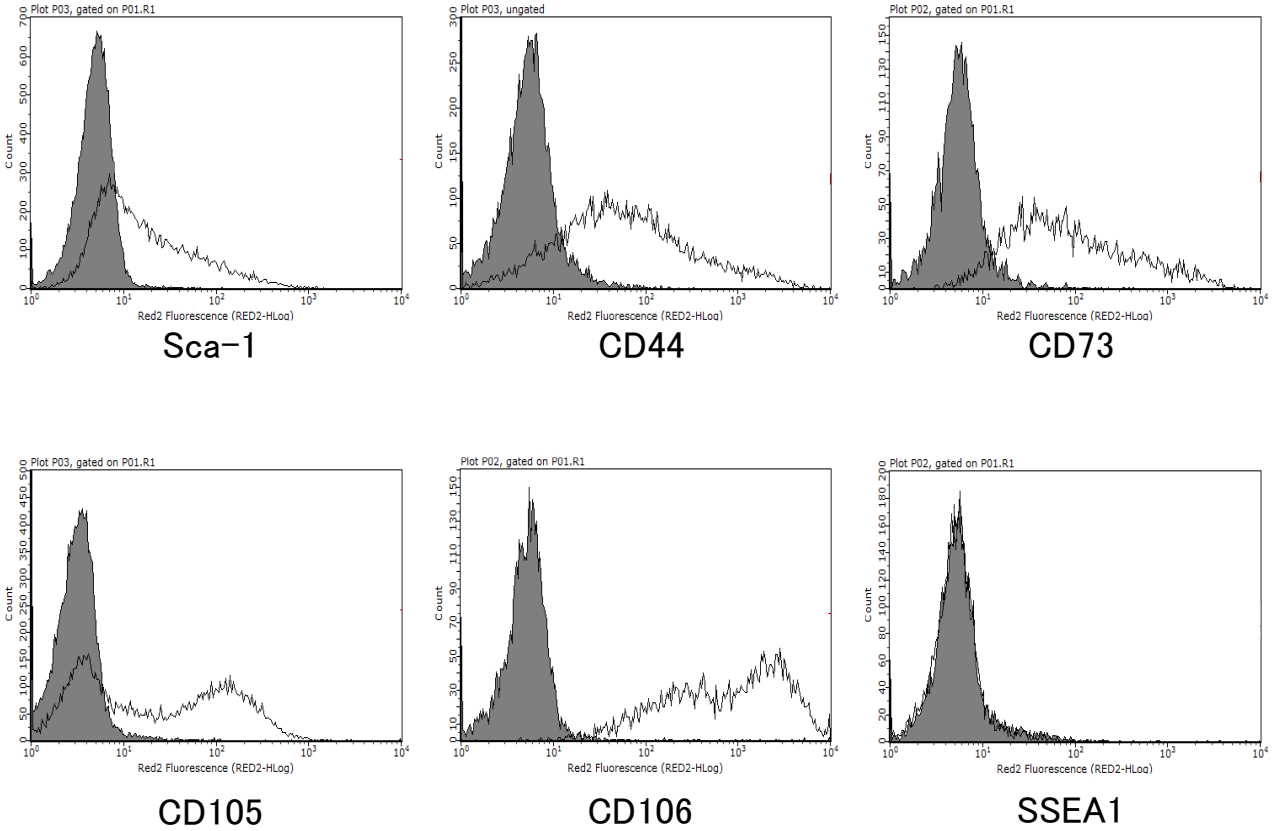


図 10. 10/30 分画に発現する細胞表面マーカーの FACS 解析

10/30 分画に含まれる細胞を各種 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, フローサイトメーターにて各細胞表面マーカーの発現量を計測した. 黒色のヒストグラムはアイソタイプコントロール, 白色のヒストグラムは各表面マーカーの発現量を示す.

CD73, CD105, CD106, およびSca-1の発現量は他の分画に比べて高いことが確認された.

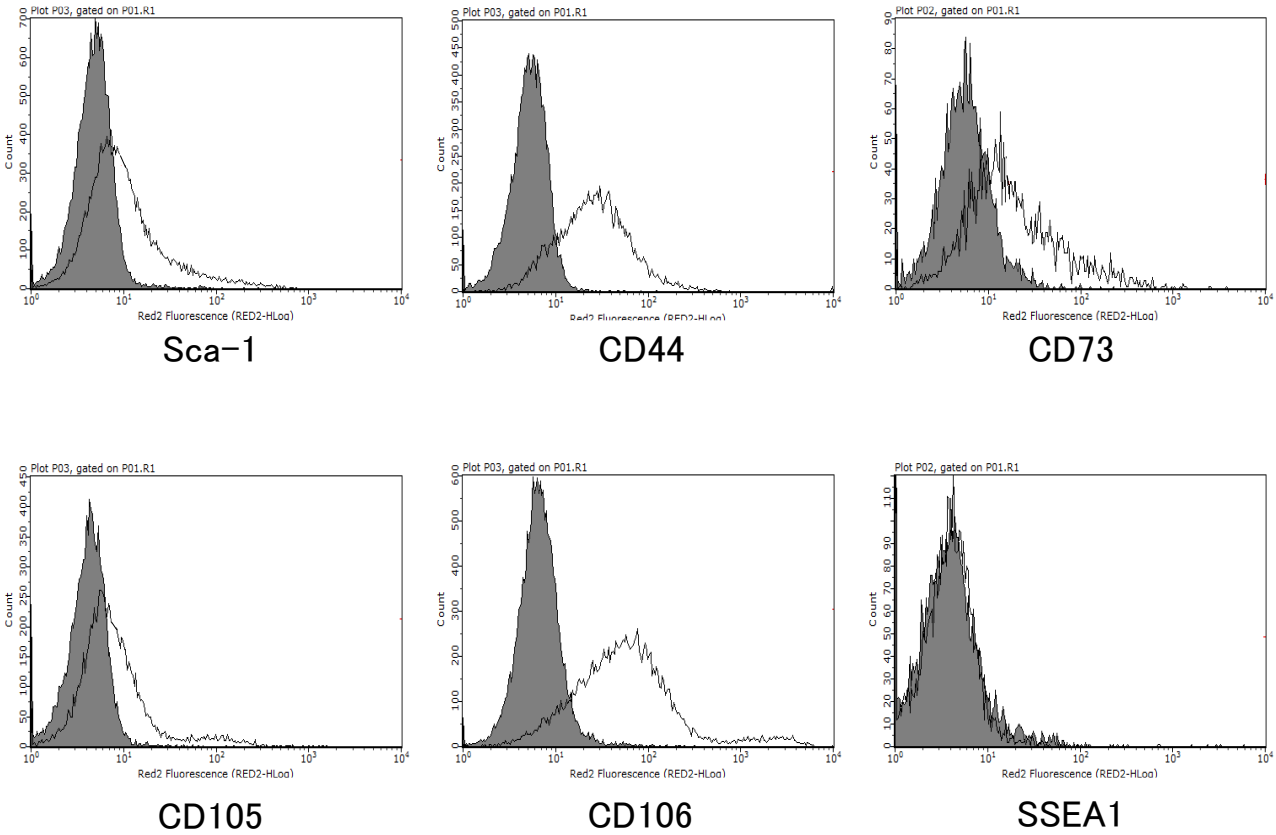


図 11. 30/50 分画に発現する細胞表面マーカーの FACS 解析

30/50 分画に含まれる細胞を各種 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, フローサイトメーターにて各細胞表面マーカーの発現量を計測した. 黒色のヒストグラムはアイソタイプコントロール, 白色のヒストグラムは各表面マーカーの発現量を示す.

CD73, CD105, CD106, およびSca-1の発現量は 10/30 分画よりも低く, 50/70 分画よりも高いことが確認された.

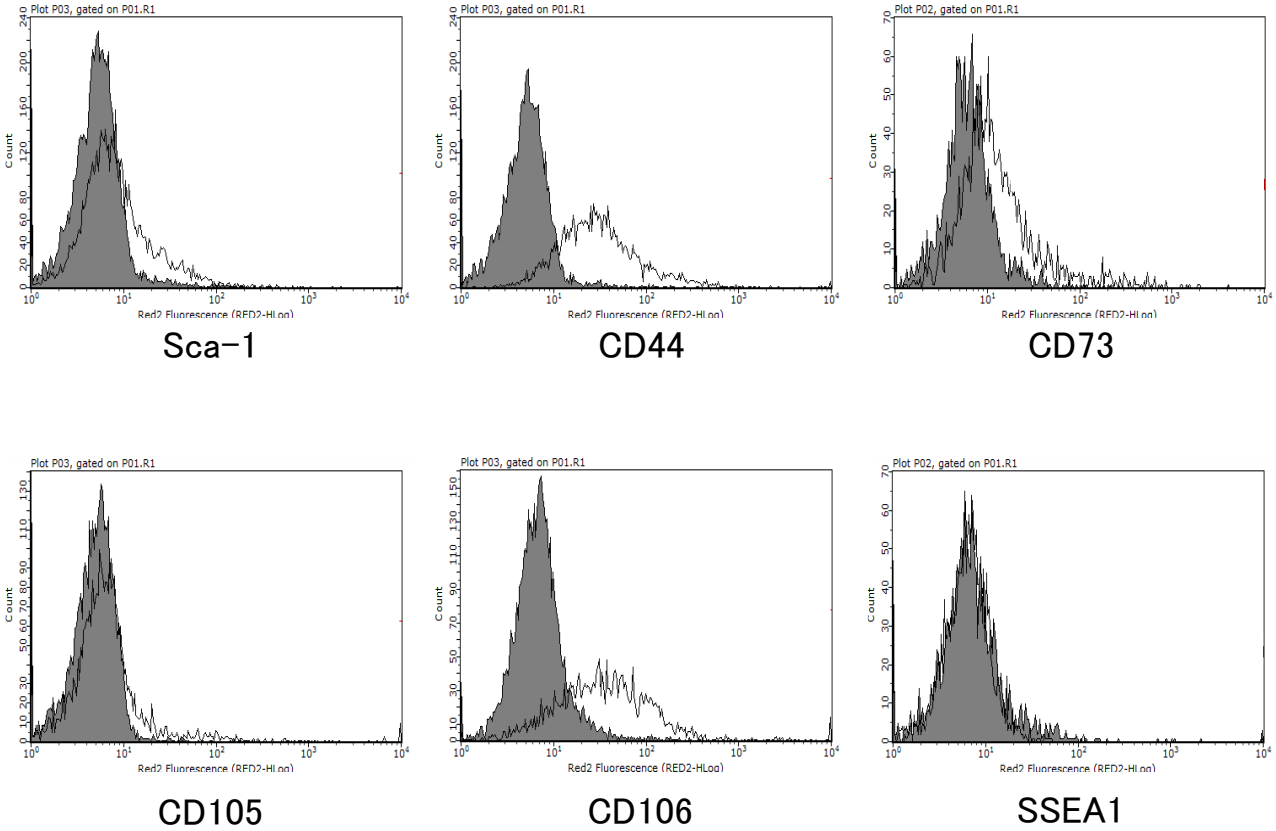


図 12. 50/70 分画に発現する細胞表面マーカーの FACS 解析

50/70 分画に含まれる細胞を各種 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, フローサイトメーターにて各細胞表面マーカーの発現量を計測した. 黒色のヒストグラムはアイソタイプコントロール, 白色のヒストグラムは各表面マーカーの発現量を示す.

CD73, CD105, CD106, およびSca-1の発現量は他の分画に比べて低いことが確認された.

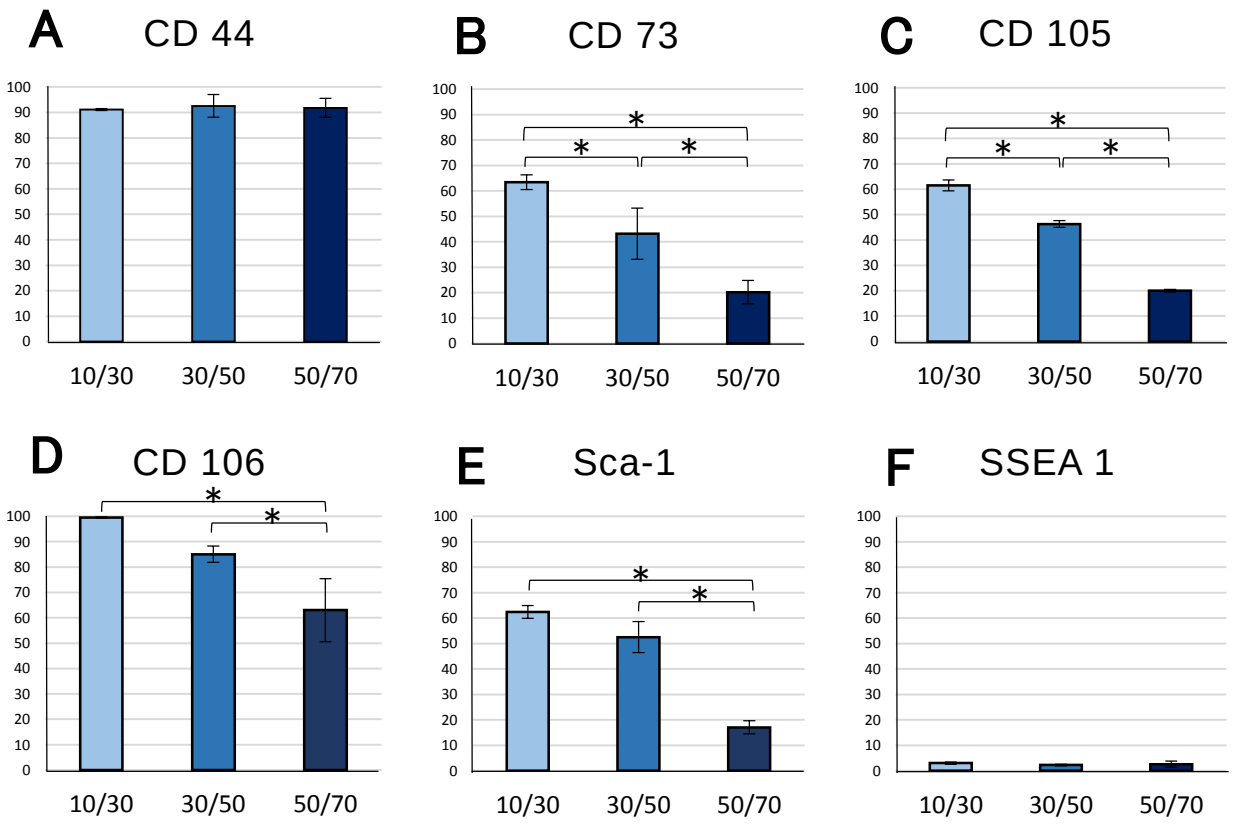


図 13. 各分画の細胞表面マーカーの陽性率の比較

各分画 の CD44(A), CD73(B), CD105(C), CD106(D), Sca-1(E), およびSSEA1(F) の陽性率を示す(n=3).
One-way ANOVA および Turkey's test, *: $p < 0.05$

CD73 , CD105, Sca-1, および CD106 は分画が高密度になるのに伴い
発現が減少していくことが確認された. また, SSEA1 はいずれの分画でも発現しておらず, CD44 はいずれの分画でも高発現であった.

	陽性細胞（%）		
	10/30 分画	30/50 分画	50/70 分画
SSEA 1	3.00±0.45	2.27±0.32	2.56±1.21
CD 73	63.43±2.92	43.17±10.11	20.17±4.58
CD 105	61.50±2.16	46.30±1.35	20.00±0.47
Sca-1	62.40±2.52	52.53±6.10	17.03±2.58
CD 106	99.57±0.25	85.07±3.18	63.03±12.40
CD 44	91.33±0.40	92.56±4.48	91.80±3.70

低

高

図 14. 各分画の細胞表面マーカーの陽性率の比較

各分画の 細胞表面マーカーの陽性率について, 独立した 3 回の実験の平均値と標準偏差をヒートマップにて示す.

CD73 , CD105, Sca-1, および CD106 は分画が高密度になるのに伴い
発現が減少していくことが確認された. また, SSEA1 はいずれの分画でも発現しておらず, CD44 はいずれの分画でも高発現であった.

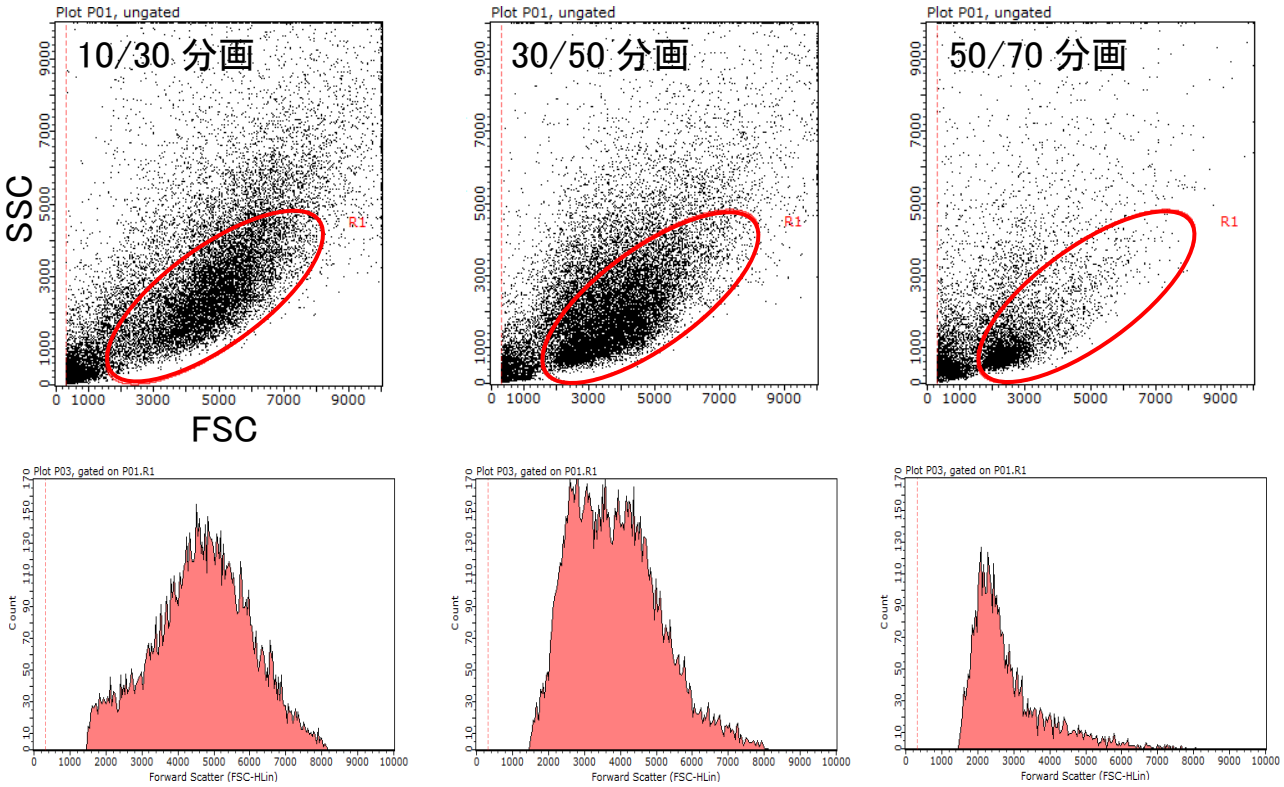


図 15. 各分画の FACs による細胞形態のFACS解析

各分画 を X 軸を前方散乱光（FSC），Y 軸を側方散乱光（SSC）によって展開した.

赤色のヒストグラムは各分画 のメジャーポピュレーションに含まれる細胞の FSC 値を示す.

各分画のメジャーポピュレーションに含まれる細胞を FSC によって展開したところ，それぞれの分画で異なるパターンを認めた.

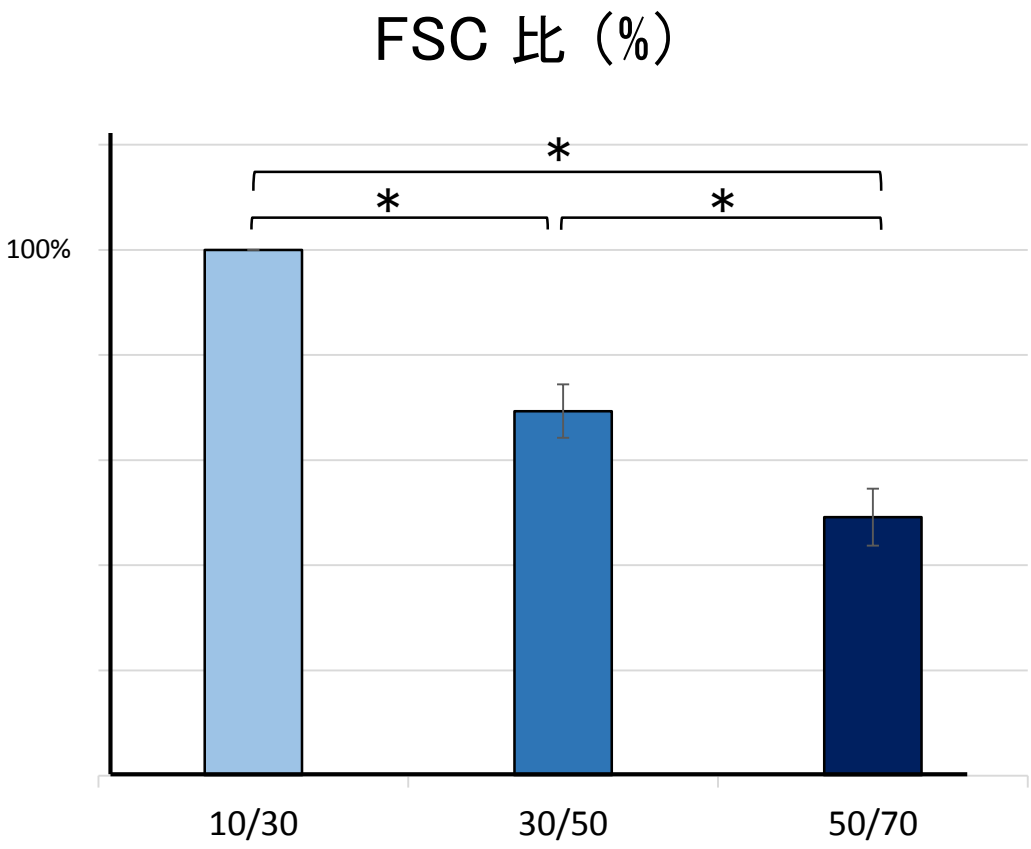


図 16. 各分画の FSC 平均値の比較 （基準: 10/30 分画）

各分画 の メジャーポピュレーションに含まれる細胞の FSC 平均値を, 10/30 分画を基準として比較した（n=4）.
One-way ANOVA および Turkey's test, *: $p < 0.05$

分画が高密度になるにつれ, 分画に含まれる細胞の大きさは減少することが明らかになった.

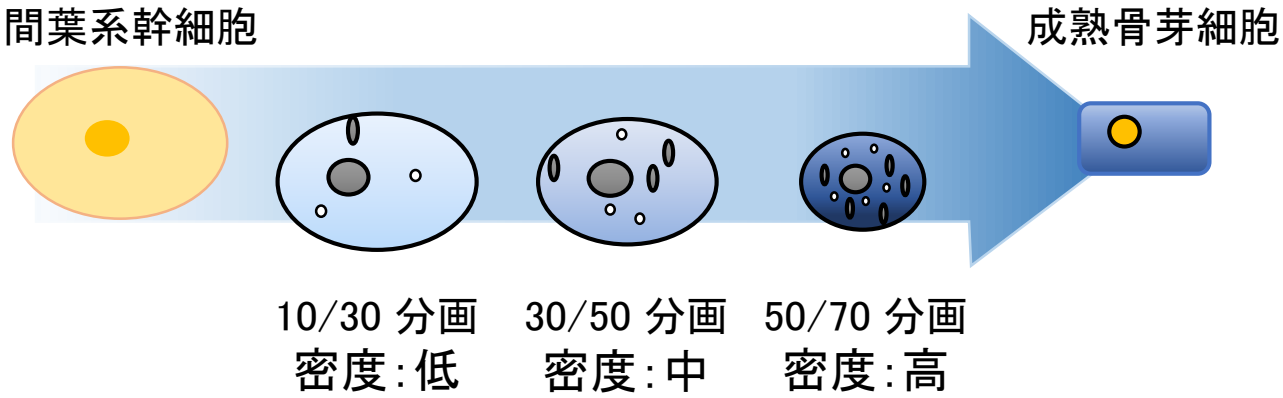


図 17. 骨芽細胞系譜の細胞内密度と分化度の関連の概念図

間葉系幹細胞から成熟骨芽細胞への分化に伴い，骨芽細胞系譜の細胞内密度は増加していくことが明らかになった.

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
L32	CACAATGTCAAGGAGCTGGAAGT	TCTACAATGGCTTTTCGGTTCT
Runx2	TGTTCTCTGATCGCCTCAGTG	CCTGGGATCTGTAATCTGACTCT
ALP	CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA	GGCTACATTGGTGTTGAGCTTTT
Osterix	ATGGCGTCCTCTCTGCTTG	TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT
Type-1 collagen	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
OPN	AGCAAGAAACTCTTCCAAGCAA	GTGAGATTCGTCAGATTCATCCG
OCN	CTGACCTCACAGATGCCAAGC	TGGTCTGATAGCTCGTCACAAG
ISLR	GCCAGTACAGGATCTGGAAAG	CATATCTCATCAGAGAGCATCTAAAA
FGFR2	GAGTTGCCAGAGGATCCAAA	GACTACTTGCCCGAAGCAAC