

# 学 位 論 文

## Clumps of MSCs/ECM complexes generated with chondro-induction medium induces bone regeneration

(軟骨誘導を施した間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSC/ECM

complexes は骨再生を促進する)

堀越 励

広島大学大学院医歯薬保健学研究科  
博士課程 医歯薬学専攻

2020年度

主指導教員：河口 浩之 教授  
(広島大学病院 歯科医学教育学)

## 謝 辞

本研究に際し、御指導ならびに御高閲を賜りました広島大学病院 歯科医学教育学 河口浩之 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、研究遂行ならびに本論文作成において、御教示、御鞭撻頂きました本学大学院 医系科学研究科 歯学専門プログラム 歯髓生物学研究室 柴 秀樹 教授、口腔外科学研究室 武知 正晃 准教授、歯科矯正学研究室 谷本 幸太郎 教授、生体材料学研究室 加藤 功一 教授、歯髓生物学研究室 武田 克浩 講師に深厚なる謝意を表します。さらに本研究の遂行、および本論文の作成にあたり終始御指導、御助言を頂きました本学大学院 医系科学研究科 歯学専門プログラム 歯周病態学研究室 加治屋 幹人 助教に深く感謝いたします。

また、本研究を進めるに際し多大なる御支持を頂きました本学大学院 医系科学研究科の皆様は厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれた父・正和、母・裕子に心から感謝致します。

2021 年 1 月

広島大学大学院 医歯薬保健学研究所

医歯薬学専攻 歯周病態学研究室

堀越 励

## 目次

第1章 緒論	5
第2章 Xeno-free/Serum-free 軟骨誘導培地で培養した C-MSCs の性質	9
第1節 Xeno-free/Serum-free 条件下での軟骨誘導 C-MSCs の作製	9
第1項 概要	9
第2項 材料と方法	9
1. ヒト MSCs の培養法	9
2. Xeno-free/Serum-free 条件下での細胞集塊 C-MSCs の作製法	9
3. ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色・サフラニン O 染色	10
4. real-time PCR 法	10
第3項 結果	11
第2節 Xeno-free/Serum-free 軟骨誘導培地で作製した C-MSCs の骨組織再生 能の検討	12
第1項 概要	12
第2項 材料と方法	12
1. SCID マウス頭蓋冠 1.6mm 骨欠損モデルへの C-MSCs 移植	12
2. micro CT 解析法	12
3. HE 染色・サフラニン O 染色	13
4. ヒト vimentin に対する蛍光免疫染色法	13
第3項 結果	14
第4項 小括	15
第3節 軟骨誘導 C-MSCs の移植先での骨化機序の解析	16

第1項 概要	16
第2項 材料と方法	16
1. SCID マウス頭蓋冠 1.6mm 骨欠損モデルへの C-MSCs 移植	16
2. micro CT 解析法	16
3. HE 染色・サフラニンO染色	16
4. ヒト vimentin に対する蛍光免疫染色法	16
第3項 結果	17
第4項 小括	18
第3章 考察	19
第4章 総括	24
参考文献	25

## 第1章 緒論

歯周炎は歯周病原細菌の感染とそれに対する宿主の免疫応答の結果生じる、歯周組織の破壊を伴う炎症性の疾患である。歯周炎が進行すると歯牙を支える歯槽骨の吸収および歯周靭帯の破壊が広がり、最終的には歯牙の喪失をもたらす。それにより、咀嚼機能低下、発音・構音障害そして審美障害を招く。また、歯周炎は糖尿病、関節リウマチ、血管疾患、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、早産/低体重児出産など様々な疾患の発症や進行との関連がある [1-6]。通常の歯周治療では、細菌バイオフィルムの除去および再付着防止のために Tooth Brushing Instruction (TBI) によるブラッシングの改善やスケーリング・ルートプレーニングを行い、さらに歯周ポケット搔爬やフラップ手術によって炎症性肉芽組織の除去が行われる。歯周治療によって感染源の除去による炎症の改善は可能であるが、喪失した歯槽骨の再生およびその機能を回復は困難である。また、破壊された歯周組織には歯周病原細菌が再感染しやすいため、健康な歯周組織と比較して歯周炎再発のリスクは高く、慢性炎症が持続しうる。結果として、歯周炎による全身への悪影響も継続する。したがって、破壊された歯周組織の構造を再生し、機能を回復することは、口腔内の炎症を軽減させるだけでなく全身の健康の維持・増進に極めて重要である。

以前より、失った組織や臓器の再生を目的とした様々な治療法が研究されている。組織工学的には組織再生に、細胞・足場・シグナル因子の3つの要素が必要である [7]。歯周組織においても既に臨床応用されている再生療法が存在する。現在、上皮の侵入を抑制することによって内在性の細胞の遊走を助け、再生の足場を提供する Guided Tissue Regeneration (GTR) 法 [8] が行われ、またサイトカインを用いた歯周組織再生療法として basic fibroblast growth factor (bFGF) [9, 10]、platelet derived growth factor (PDGF) [11-13]、bone morphogenetic protein (BMP) [14, 15] が臨床応用されている。さらに、insulin-like growth factor-I (IGF-I) [9]、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [12]、osteogenic protein-

1 (OP-1) [13]、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [16] 等のサイトカインを利用した歯周組織再生の基礎研究も行なわれている。しかしながら、サイトカイン療法は骨欠損部周囲の細胞を活性化することによって再生を誘導するため [17, 18]、周囲に十分量の細胞が存在している小・中規模の欠損が適応となる。実際に臨床において多くの症例で見られる、1 壁性骨欠損や水平性骨吸収といった広範囲にわたる大規模歯周組織の欠損では、組織再生に必要な能力を持つ細胞が不足しているため、既存の歯周組織再生療法では十分な再生効果は期待できない。そのため、歯周組織の大規模な欠損に対する新しい組織再生療法の確立が必要である。歯周組織の大規模な欠損の再生には、骨欠損部周囲に不足している機能的な細胞を生体外から補充する細胞治療が適していると考えられる。特に、歯周組織は歯槽骨・セメント質・歯周靭帯・歯肉結合組織といった様々な組織で構成されているため、これらの組織を再生させる上で、多分化能を有する幹細胞を用いた細胞治療が適していると考えられる。また、幹細胞は自己複製能も有しているため、患部に欠如している細胞を十分量供給することが可能であると期待できる。幹細胞として、組織幹細胞、胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ES 細胞) [19]、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) [20, 21] が挙げられる。ES 細胞を作製するためにはヒトの卵子が必要であり、また ES 細胞および iPS 細胞の移植は奇形種形成の危険性があるため、倫理面・安全性の問題から現時点で歯周組織再生に用いるのは困難である。一方で、組織幹細胞は脳・腸・肝臓・皮膚・骨髄・精巣などの様々な領域に存在し、通常の新陳代謝や創傷治癒において日常的に増殖・分化していると考えられている。特に間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) は骨・軟骨・筋組織・脂肪組織などの間葉組織や神経細胞に分化することが報告されており [22]、細胞治療の細胞源として期待できる。特に、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cells: BMMSCs) は臨床においても多く使用されている [23]。

これまでの基礎研究で、骨髄由来 MSCs をアテロコラーゲンゲルと混和してビーグル犬の歯周組織欠損モデルに自家移植したところ、MSCs 移植群は移植後 8 週目で対照のアテ

ロコラーゲン群と比較してセメント質、歯槽骨再生が有意に促進した [24]。また、green fluorescent protein (GFP) を遺伝子導入した MSCs を移植したところ、移植後 4 週目において再生された歯周組織の構成細胞、すなわちセメント芽細胞、骨芽細胞、骨細胞、歯周靭帯中の線維芽細胞が GFP 陽性を示した [25]。この結果から、移植された MSCs が移植部位局所で増殖・分化することで歯周組織再生に関与することが示唆された。

さらに、より効率的に骨再生を促すために、MSCs と  $\beta$  リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) を併用して移植実験を行った。その結果、移植後 4 週目から十分な新生骨の形成が得られたが、移植 8 週以降において代謝されずに残存する  $\beta$ -TCP やアンキローシスが散見された [26]。この結果は、担体として用いる人工足場材料の解決すべき問題点を示唆する。実際に、骨形成の足場材料として多く用いられているハイドロキシアパタイトは、生体内で吸収されずに残存し、もしくは炎症に伴って排出されるという報告がある [27, 28]。また、他の足場材料においても、生体適合性や細胞機能発現の制約等の問題がある [17, 29]。足場は、組織再生に重要な要素の一つであるが、人工的な足場材料を歯周組織再生に用いた場合、上記のような問題がある。そのため、人工足場材料を用いない新しい細胞移植治療法の開発は、生体組織に近い再生医療の実現に必要であると考えられる。

人工足場材料を用いない細胞移植を行うために、MSCs と細胞自身が産生する I 型コラーゲンを主とした細胞外基質(ECM) によって構成された、直径約 1 mm の三次元的人工細胞集塊 clumps of MSC/ECM complexes (C-MSCs) が考案され、研究が行われている。C-MSCs は自己産生した ECM が足場として機能するため組織欠損部に直接移植でき、また 1 つの C-MSCs を移植最小 unit として捉え、それを複数個組み合わせることで、いかなる形態や大きさの欠損組織に対しても正確な細胞移植が可能となる。実際、ラット頭蓋冠骨欠損モデルやビーグル犬根分岐部産 III 級欠損モデルにおいて欠損形態に適合させた C-MSCs の移植が可能であり、C-MSCs 移植によって組織再生が効果的に誘導されることが報告されている [30, 31]。さらに重要なことに、この C-MSCs は移植前の様々な機能調節を行うこ

とが可能である。既に、Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) により免疫調節能を向上させた C-MSCs が異種移植拒絶を抑制しながら骨再生能を発揮すること [32]、また骨分化誘導培地で培養した C-MSCs が移植体自身の骨分化と周囲組織の骨形成を誘導することで骨再生を促進することが明らかになっている [33]。

しかし、既存の歯周組織再生療法では再生困難な大規模骨欠損に C-MSCs を移植した際、移植中心部の血液供給の乏しい低栄養環境において C-MSCs が十分な細胞機能が発揮できず、期待するほどの骨再生が得られない可能性が考えられる。そこで本研究では、軟骨誘導を施した C-MSCs 移植による骨再生に着目した。関節軟骨には血管が存在しておらず、その構成成分である軟骨細胞は低栄養・低酸素環境においても生存可能であり、細胞機能を維持できることが知られている [34]。また軟骨細胞は、発生における骨の形成様式の 1 つである軟骨内骨化の主要な要素としても知られているため、軟骨誘導を施した C-MSCs 移植によって軟骨内骨化による骨再生が生じることを期待した。実際に、MSC 由来の軟骨細胞移植によって軟骨内骨化を介した骨形成が生じた報告や [35]、MSC とサイトカインを併用することで軟骨内骨化を利用した骨再生療法を行った報告がある [36]。

また本研究では、将来臨床応用可能な新規細胞移植療法の開発を目的としているため、臨床において未知の感染源を伝播させる可能性のある異種動物由来成分を含まない細胞培養法が好ましいと考える。さらに、再生療法における結果の再現性も重要な要素であるため、ロット間の組成に差異がなく、内容成分が均一である無血清培地を用いることとした。そこで本研究では、新たな骨再生細胞療法の開発を目指し、Xeno-free/Serum-free の軟骨誘導培地で培養した C-MSCs の骨再生効果を検討した。

## 第2章 Xeno-free/Serum-free 軟骨誘導培地で培養した C-MSCs の性質

### 第1節 Xeno-free/Serum-free 条件下での軟骨誘導 C-MSCs の作製

#### 第1項 概要

*In vitro* においてヒト骨髄由来 MSCs から Xeno-free/Serum-free 条件下に軟骨誘導を施した C-MSCs を作製し、その生物学的性質を検討した。

#### 第2項 材料と方法

##### 1. ヒト MSCs の培養法

細胞は Lonza から購入したヒト骨髄由来の MSCs (18TL282222) を使用した。培養液は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) に 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT, USA)、100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich)、100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) を添加したものを使用した。培養は 10 cm シャーレ (Corning, Corning, NY, USA) 上で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 気相下に細胞がサブコンフルエントになるまで行った。培地交換は 3 日毎に行った。実験には 4 代継代した MSCs を用いた。

##### 2. Xeno-free/Serum-free 条件下での細胞集塊 C-MSCs の作製法

Xeno-free/Serum-free 条件下に C-MSCs を作製するため、MSCs を 48-well プレートに  $1.0 \times 10^5$  cells/well の高密度で播種し、Xeno-free 増殖培地 (Prime-XV MSC expansion XSFM; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) で 4 日間培養し十分な ECM を産生させた。その後、well から MSCs/ECM 複合体を鈍的に剥離して浮遊させ、24-well の低接着性プレート (Non-treated MICROPLATE with Lid; AGC テクノグラス、静岡) に移動し、さ

らに Xeno-free 軟骨分化誘導培地 (MSCgo Chondrogenic-SF, XF medium; Biological Industries, Beit Haemek, Israel) にて球状になるまで浮遊培養することで細胞集塊 C-MSCs (Chondro-inductive medium treated C-MSCs: CIM-C-MSCs) を得た。また、比較群として Xeno-free 増殖培地で浮遊培養することで得られた C-MSCs (Growth medium treated C-MSCs: GM-C-MSCs) を用いた。MSCs/ECM 複合体を剥離した日から 5、10、15 日後に回収したもので組織学的解析を行い、剥離 3、5、7、10、13、15 日後に回収したもので遺伝子発現解析を行った。

### 3. ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色・サフラニン O 染色

MSCs/ECM 複合体の剥離後 5、10、15 日目で C-MSCs を回収し、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。サンプルをパラフィンに包埋し、5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切した。パラフィン切片を脱パラフィン後、HE 染色およびサフラニン O 染色を行った。脱水処理を行ったのちに Mount Quick (大道産業、埼玉) で封入し、光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W; ニコン、東京) で観察した。

### 4. real-time PCR 法

MSCs/ECM 複合体の剥離後 3、5、7、10、13、15 日目で C-MSCs を回収し、RNAiso plus (タカラバイオ、滋賀) にて全 RNA を抽出した。抽出した RNA を ReverTra Ace qPCR RT Kit(東洋紡、大阪)およびサーマルサイクラー (T100 Thermal Cycler; BIO RAD, CA)にて逆転写を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, CA) および各プライマー (表. 1) を用いて real-time PCR 装置 (STEP ONE PLUS-D; applied Biosystems) にて mRNA 発現量を定量的に解析した。それぞれの mRNA 発現量はハウスキーピング遺伝子である 18s の mRNA 発現に対する比で表した。

### 第3項 結果

軟骨誘導培地による培養が C-MSCs 内の細胞の性質に影響を与えているかを検討するために、第2章 第2項に記載した方法で Xeno-free の軟骨誘導培地または増殖培地を用いて2種類の C-MSCs を作製した。GM-C-MSCs は主に線維性の組織で構成されていることを観察した。また培養 15 日目には、培養初期に見られた球状の構造が失われ、C-MSCs が収縮するとともに不規則な形態を示した。一方で CIM-C-MSCs では、その球状構造の外縁部では線維性の組織がみられ、C-MSCs の中央部分においては多数の軟骨細胞様の細胞および細胞を取り囲む軟骨組織様の構造を認めた。さらに GM-C-MSCs とは異なり、培養 15 日目においても球状の形態が維持されており、C-MSCs の収縮もわずかであった (図. 1A)。また軟骨誘導培地で 10、15 日間培養した C-MSCs では、C-MSCs 中央部の軟骨細胞様細胞の分布と一致して、サフラニン O に濃染する軟骨基質が観察された (図. 1B)。このことから、軟骨誘導培地によって C-MSCs 内の細胞が軟骨細胞へと分化していることが示された。さらに CIM-C-MSCs において GM-C-MSCs と比較して、軟骨分化のマスター転写遺伝子として知られる Sex determining region Y-box 9 (Sox9)、軟骨内骨化の初期の軟骨細胞で発現する Aggrecan と Collagen type 2 (Col 2)、軟骨内骨化の後期の肥大軟骨細胞で発現する Indian hedgehog (IHH) と Collagen type 10 (Col 10) の mRNA 発現が有意に増加しており、これらの遺伝子が経時的に発現増加していることも観察した。また特に培養 7 日目から 10 日目にかけて、これらのマーカーの mRNA 発現の急激な上昇を認めた (図. 1C)。遺伝子学的解析においても組織学的解析の結果と同様に、軟骨誘導培地によって C-MSCs 内の細胞が軟骨細胞に分化していることが示唆され、またその一部は肥大軟骨細胞へと成熟していることが示された。

## 第2節 Xeno-free/Serum-free 軟骨誘導培地で作製した C-MSCs の骨組織再生能の検討

### 第1項 概要

Xeno-free/Serum-free 軟骨誘導培地で作製した C-MSCs を NOD/ShiJic-scidJcl (SCID) マウスの頭蓋冠骨欠損に移植し、骨組織再生能の検討を行った。

### 第2項 材料と方法

#### 1. SCID マウス頭蓋冠 1.6mm 骨欠損モデルへの C-MSCs 移植

実験には、免疫不全モデル動物の雄の SCID マウス (Charles River Laboratories Japan, 横浜) を用いた。動物実験は広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究支援分野・ライフサイエンス教育研究支援部動物実験施設の実験指針に基づいて行った。マウスに3種混合麻酔薬を腹腔内投与し全身麻酔を行った。3種混合麻酔薬には、メドミジン (ドミトール、0.3mg/kg)、ミダゾラム (ドルミカム、4mg/kg)、ブトルファノール (ベトルファール、5mg/kg) を用いた。頭頂部を剃毛、ポビドンヨード 10%綿球にて消毒後に No.15c のメスを用いて後頭骨から前頭骨までの皮膚を矢状切開した。剥離子にて皮膚を骨膜ごと剥離し、頭蓋骨を明示した。左右の頭頂骨にラウンドバーを用いて、頭蓋縫合を避けるように直径 1.6 mm の骨欠損を作製、移植床とした。骨欠損 1ヶ所に対して C-MSCs を 1つ移植し (図. 2A)、剥離した骨膜を復位した後、皮膚を 4-0 絹糸で縫合した。なお、培養日数による骨再生能の差を観察するため、移植には軟骨誘導培地で 5、10、15 日間培養した C-MSCs を用い、コントロールとして増殖培地で 5 日間培養した C-MSCs を移植した群および骨欠損に何も移植しなかった群を用いた。

#### 2. micro CT 解析法

細胞移植後 4、8、12 週目でマウスを屠殺し、頭蓋骨を回収後に 10% ホルマリン液で固

定した。サンプルを PBS で洗浄後、micro CT (Skyscan 1176, Bruker, Billerica, MA, USA) で撮影した。撮影条件は、管電圧 50 kV、管電流 0.5 mA、ピクセルサイズ 8  $\mu\text{m}$ 、ステップ角度 0.5 度、露光時間 230 ms で行った。CTVOL software 2.3.2.0 (64bit) (Bruker) を用いて画像再構成を行った。骨欠損部を含むように、直径 1.6 mm の円形  $\times$  400  $\mu\text{m}$  (25 スライス) の円柱状関心領域 (ROI) を設定し、CT-An software 1.12.0.0+ (Bruker) を用いて、Threshold 80-255 の範囲で解析を行った [37]。また、Student の t 検定を用いて各群間の差の統計解析を行った。

### 3. HE 染色・サフラニン O 染色

細胞移植後 4、8、12 週目でマウスを屠殺。頭蓋骨を回収後に 10% ホルマリン液で固定した後、10% EDTA 溶液で脱灰を行い、20% スクロース溶液で置換した。サンプルを OCT コンパウンド (Sakura Finetek USA) に包埋後、クライオスタットを用いて厚さ 8  $\mu\text{m}$  で薄切し凍結切片を作製した。凍結切片を風乾させたのちに PBS で洗浄し、HE 染色およびサフラニン O 染色を行い、光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W; ニコン) で観察した。

### 4. ヒト vimentin に対する蛍光免疫染色法

第 2 章 第 2 節 第 2 項 3. で記載した方法に従い、移植後 4、8、12 週目の頭蓋骨を OCT コンパウンドに包埋後、前頭断方向に 20  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切した。凍結切片を風乾および PBS 洗浄後、0.1% TWEEN 20/PBS 溶液に Blocking One Histo (ナカライテスク、京都) を用いて室温で 30 分間ブロッキングした。切片を PBS で洗浄後、一次抗体として、抗ヒト vimentin ラビットモノクローナル抗体 (SP20; 1:100; abcam) を 4°C で一昼夜反応させた。反応終了後、切片を PBS で洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 488 抗ラビット IgG 抗体 (1:100; ThermoFisher) を室温で 2 時間反応させた。反応終了後、切片を PBS で洗浄し、細胞核を DAPI solution (1:200; 同仁化学研究所) を用いて対比染色

した。反応終了後、切片を PBS で洗浄し、水系封入剤 (Fluoromount-G; Thermo Fisher) を用いて封入した。サンプルの蛍光シグナルを共焦点レーザー顕微鏡(Olympus FV1000D laser scanning confocal microscope; オリンパス) を用いて観察した。

### 第3項 結果

micro CT 撮影を行ったところ、非移植群では頭蓋冠欠損作製 12 週間まで、欠損部に石灰化物の形成はほとんど観察されなかった。培養 5 日の GM-C-MSCs および CIM-C-MSCs 移植群では骨欠損部周囲からの骨添加が認められた。一方で培養 10、15 日の CIM-C-MSCs 移植群では移植 4 週目の時点で周囲骨との連続性を持たない欠損中央部に石灰化物の塊を認め、移植 8、12 週間には骨断端からの骨形成および欠損中央の石灰化物の塊と一部癒合している像を観察した (図. 2B)。CT 定量の結果、培養 5 日 CIM-C-MSCs 移植群は GM-C-MSCs 移植群より有意な骨添加の増加を認め、さらに軟骨誘導 C-MSCs 移植群では培養 5 日目よりも培養 10、15 日において石灰化物の沈着量に有意差がみられた (図. 2C)。CT 画像にて欠損中央に石灰沈着していない、非移植群、GM-C-MSCs 移植群および培養 5 日 CIM-C-MSCs 移植群の HE 染色像では、CT 所見と一致して骨添加は断端部においてのみ観察され、特に C-MSCs 移植群においては骨欠損部に層状の厚い結合組織が形成されていた (図. 3A)。また蛍光免疫染色によって、移植群で見られたこの厚い結合組織は、ヒト Vimentin 陽性の移植細胞とヒト Vimentin 陰性の宿主細胞が混在して形成されていることが示された (図. 3B)。一方で培養 10、15 日の CIM-C-MSCs 移植群の HE 染色像では、移植 4 週目において骨欠損部に移植した C-MSCs 由来の細胞塊がみられ、その内部にエオジンに染まる幼若な新生骨が観察された。さらに 12 週目では、骨欠損中央部に周囲の骨と同程度の染色性を示す成熟骨が形成されていた (図. 3C)。また蛍光免疫染色像において、移植体内の新生骨を取り囲むようにヒト Vimentin 陽性の細胞が存在しており、一方その内部では移植 4 週目においてヒト由来細胞が多数存在しているが、経時的にヒト Vimentin 陰性のマウスの

細胞の割合が増加している様子が観察された (図. 3D, E)。これらの結果から、培養 10、15 日の CIM-C-MSCs は、移植先にて C-MSCs 自身が骨を形成する能力を持つことが示唆された。一方で骨断端部から伸展した新生骨内部を観察すると、新生骨内部にはヒト Vimentin 陽性の細胞は存在しておらず、マウスの細胞のみによって構成されていた (図. 3D)。そのため、骨欠損周囲からの骨再生には移植細胞は直接関与しておらず、宿主細胞自身によって生じたものである可能性が示された。また、培養 10 日移植群と培養 15 日移植群を比較したところ、培養 15 日移植群の移植 4 週目において移植体内部にサフラニン O に濃染する軟骨基質が残存していることがわかった。さらに移植 12 週目では、培養 10 日移植群では C-MSCs 自身の骨化とともに周囲骨からの旺盛な骨添加も観察されたが、それに対して培養 15 日移植群では移植体自身が大きな骨の塊を形成しており、逆に骨断端部からの骨再生はわずかであった (図. 3C)。

#### 第4項 小括

Xeno-free 軟骨誘導培地で C-MSCs を作製することで、軟骨細胞を含んだ C-MSCs を得た。さらに、軟骨誘導 C-MSCs 移植が骨組織の再生に有利に働くことが明らかとなった。

### 第3節 軟骨誘導 C-MSCs の移植先での骨化機序の解析

#### 第1項 概要

軟骨誘導 C-MSCs 移植によって、C-MSCs 内部に形成された新生骨の骨化様式を解析するため、再度 SCID マウスの頭蓋冠骨欠損への移植を行い、骨が形成されるまでの短期間の観察を行った。

#### 第2項 材料と方法

##### 1. SCID マウス頭蓋冠 1.6mm 骨欠損モデルへの C-MSCs 移植

第2章 第2節 第2項 1. で記載した方法に従い、SCID マウスの頭蓋冠骨欠損への C-MSCs 移植を行った。移植先で自身の骨形成を示した、軟骨誘導培地で 10 日間培養した C-MSCs を移植した。

##### 2. micro CT 解析法

細胞移植後 3、7、14 日目でマウスを屠殺し、第2章 第2節 第2項 2. で記載した手順で micro CT 撮影を行った。

##### 3. HE 染色・サフラニンO染色

第2章 第2節 第2項 3. で記載した方法に従い、移植 3、7、14 日後に回収した頭蓋骨で厚さ 8 $\mu$ m の凍結切片を作製し、HE 染色およびサフラニンO染色を行い、光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W; ニコン) で観察した。

##### 4. ヒト vimentin に対する蛍光免疫染色法

移植後 3、7、14 日目でマウスを屠殺し、第2章 第2節 第2項 4. で記載した方法に

従って蛍光免疫染色および観察を行った。

### 第3項 結果

micro CT 撮影を行ったところ、移植 3、7 日目では骨欠損部に石灰化物の沈着がみられなかったが、移植 14 日目では骨欠損中央部における小さな骨の形成を認めた (図. 4A)。続いて組織学的解析を行ったところ、移植 3 日目では移植前でみられた球状の形態がほぼ保たれている様子が観察され、移植体内部においても移植前と同様にサフラニン O に染まる軟骨基質を認めた。移植 7 日目では C-MSCs の形態がやや崩れて楕円形に近い形状になっており、骨断端部と移植体との間隙を満たすように線維性の結合組織が広がっていた。また C-MSCs の中央部の軟骨細胞様細胞が存在する領域に一致してエオジンにわずかに染まる骨化の初期段階と思われる像を認め、それに取り囲まれるようにしてサフラニン O に染まる軟骨基質が残存していた。移植 14 日目では micro CT の所見と一致して、移植体内にエオジンに濃染する幼若な新生骨の形成が観察され、サフラニン O 染色を行ったところ軟骨基質の存在は認められなかった (図. 4B)。以上の結果から、移植体内の軟骨細胞を中心に骨化が生じていること、さらに軟骨基質が骨へと置換されるように骨形成がみられることがわかり、移植した CIM-C-MSCs の内部で軟骨内骨化による新生骨が生じたと考えられる。また蛍光免疫染色を行ったところ、移植した C-MSCs 内部は移植 14 日後まで大部分がヒト Vimentin 陽性の移植細胞で構成されていることがわかった。しかしながら、移植 3 日目の時点で C-MSCs 中央の軟骨細胞領域にわずかながらヒト Vimentin 陰性の宿主細胞が侵入しており、移植 7、14 日目の骨化領域においてヒト Vimentin 陰性細胞の数が経時的に増加傾向にあることを確認した (図. 4C)。このことから、CIM-C-MSCs 内の骨形成に、移植したヒト由来細胞だけでなくマウスの細胞も何らかの関与をしている可能性が示唆された。

#### 第4項 小括

軟骨誘導を施した C-MSCs を骨欠損部に移植すると、C-MSCs 内の軟骨細胞が軟骨内骨化を介した骨形成を起こすことによって骨再生に寄与していることが示された。

### 第3章 考察

本研究では、Xeno-free の軟骨誘導培地によって作製したヒト C-MSCs の移植が SCID マウス頭蓋冠骨欠損を効果的に再生することを明らかにした。特に、欠損中央部の新生骨はヒト由来軟骨細胞による軟骨内骨化によって生じたものであり、軟骨内骨化にともなって外部から宿主の細胞が誘導されたと考えられる。発生における軟骨内骨化では、軟骨細胞が肥大軟骨細胞へと成熟した後に vascular endothelial growth factor (VEGF) によって血管が誘導され、血管を通して外部から骨芽細胞が侵入することで骨が形成されることが知られている。しかしながら近年の研究によって、肥大軟骨細胞自身が骨芽細胞に分化することで直接骨形成に作用することが明らかになってきた [38, 39]。これらの報告と、移植 14 日目の新生骨部にヒト由来細胞が多数残存していたことから、本移植実験においても C-MSCs 内部で軟骨細胞が肥大軟骨細胞へと成熟後、骨芽細胞に分化することによって直接新生骨を形成したのではないかとと思われる。また、C-MSCs 内部で形成された骨が成熟骨になるまで 12 週の期間を要しており、さらに 12 週目において骨内部のほとんどがマウス由来細胞で構成されていたことから、移植初期で形成された骨が宿主であるマウス自身の骨代謝を経ることによって最終的に成熟骨へと至ったのではないかと考える。

また軟骨誘導 C-MSCs 移植は、移植体内部での骨形成のみならず周囲骨の細胞を活性化することによって辺縁からの骨添加も誘導する可能性が示唆された。欠損中央部に新生骨が形成されなかった培養 5 日の CIM-C-MSCs 移植において、非移植群および GM-C-MSCs 移植群と比較して有意に骨欠損周囲からの石灰化物の沈着がみられたことから、移植した CIM-C-MSCs が宿主の細胞に何らかの影響を与えることで宿主自身の骨再生を誘導したものと思われる。そのメカニズムとして、CIM-C-MSCs を構成していた線維性の組織が骨欠損部を満たすことによって、骨伸展のための足場が形成された可能性が考えられる。細胞が骨分化誘導される要因として細胞が存在している場の硬さが 1 つの因子である

ことが知られている [40]。またこれまでの研究で、浮遊培養を行っているにもかかわらず C-MSCs を構成する細胞は、細胞自身が産生した ECM を足場にすることによって骨分化誘導がかかりやすい状態になっていることが明らかとなっている [41]。そのため、CIM-C-MSCs を構成する十分量の ECM が骨欠損部に広がることによって、宿主の細胞が骨分化しやすい微小環境が形成されて断端部からの骨再生が誘導されたかもしれない。また、宿主自身の骨形成が誘導された要因としてパラクライン因子の影響も考えられる。実際に、パラクライン因子の関与が示唆された細胞移植実験がいくつか報告されている。例えば、骨髄由来 MSCs を骨形成不全症マウスモデルの大腿骨に注入した研究では、移植細胞の骨分化が起こることを報告しており、また移植した細胞がパラクライン効果を発揮している可能性について推察している [42]。近年においても、骨分化誘導を施した MSCs を播種したコラーゲンメンブレンの移植が SCID マウス頭蓋冠骨欠損を再生し、その骨組織再生機序が移植細胞自身の骨分化と宿主細胞の骨形成誘導促進の両方によるものであることを報告している [43]。さらに C-MSCs を用いた研究においても、SCID マウスの頭蓋冠に対する骨再生効果が検討されており、脱細胞 C-MSCs で骨再生が得られなかったことからパラクライン因子の関与が示唆されている [33]。そのため、CIM-C-MSCs 移植においてもパラクライン効果による宿主細胞の活性化が生じた可能性は十分に考えられる。また CIM-C-MSCs 移植によって産生されるパラクライン因子として、軟骨内骨化で発現がみられる IHH や VEGF が挙げられる。実際、骨分化誘導を施したヒト MSCs をマウスの頭蓋冠骨欠損へ移植した際に、VEGF を分泌することによって宿主の骨再生を促進したという報告がある [44]。軟骨内骨化が生じなかった培養 5 日の CIM-C-MSCs においても宿主の骨再生が誘導されていたが、*in vitro* において IHH の遺伝子発現が増加していることから、この仮説に矛盾しないものであると考える。

CIM-C-MSCs 移植は、C-MSCs 自身の骨化と宿主細胞の骨再生を誘導することによって骨再生に有効であることを示してきたが、その骨再生効果は軟骨分化の分化程度によっ

て異なることも明らかとなった。本研究で用いた培養 5 日の CIM-C-MSCs では C-MSCs 内の骨化みられず、一方で培養 15 日の CIM-C-MSCs は欠損中央部に大きな骨の塊を形成したが、周囲骨からの骨再生は 10 日培養群と比較して緩やかなものであった。In vitro の real-time PCR の結果で示したように、軟骨分化の程度を示す遺伝子の mRNA 発現は 7 日目以降で急激に増加していた。そのため、5 日培養群では軟骨細胞への分化が十分に進んでおらず、軟骨内骨化を引き起こす能力が十分に備わっていなかったものと推察できる。また、10 日培養群、15 日培養群ではある程度保たれていた C-MSCs の形態が、5 日培養群では移植 4 週目の時点で失われていることも確認されている。このことから、培養 5 日の C-MSCs 中央部で分化していた軟骨細胞が、移植先で分散したことも軟骨内骨化が生じなかった要因の 1 つとして考えられる。一方で、15 日培養群では移植 4 週目においてもサフラニン O に濃染する軟骨基質が残存していることが確認されており、移植前の軟骨分化および軟骨基質の産生が必要以上に起こっていたものと思われる。培養 15 日という条件下では、C-MSCs 内に軟骨内骨化を引き起こす能力を持つ細胞が過剰に存在しており、その結果として移植先にて大きな新生骨を形成したものと考えた。頭蓋骨欠損モデルでは、長管骨骨折モデルと比較して周囲に血管が乏しく、供給される宿主細胞が制限された環境にある。そのため、軟骨基質の分解、CIM-C-MSCs 内の軟骨内骨化、C-MSCs 由来の新生骨の代謝に宿主細胞が消費されることで、宿主自身の骨添加が得られなかったものと考察した。本研究によって、CIM-C-MSCs 移植による骨再生効果は、適切な程度の分化を施した C-MSCs を移植することで最大限発揮できることが示された。

本研究で骨再生に最も適した C-MSCs は培養 10 日の CIM-C-MSCs であったが、MSCs の細胞株によって細胞分化能は異なるため、今回用いた細胞株 (18TL282222) 以外の細胞株を用いる際には培養日数を変更する必要がある。18TL282222 細胞株を 10 日間培養することで得られた CIM-C-MSCs は、in vitro において、IHH や Col 10 といった肥大軟骨細胞のマーカーが上昇した時点の細胞塊であることがわかっている。この結果から、本研

究で骨再生に最も効果的と判断した C-MSC は、肥大軟骨細胞に成熟したばかりの細胞を含む細胞集団であるといえる。実際に、マウスの脛骨骨折部の治癒段階にある組織から採取した肥大軟骨細胞を含む軟骨細胞塊が、マウスの脛骨離断モデルを再生した報告がある [45]。そのため将来臨床応用を考えた上で、細胞株ごとの CIM-C-MSCs 移植に適した培養期間を、簡便に検査する手技の開発が必要になると考える。

これまでに、本研究で用いたものと同様な SCID マウスの頭蓋冠 1.6mm 骨欠損モデルに Xeno-free 条件下で作製した C-MSCs を移植し、移植 8 週の時点でのほぼ完全な治癒がみられたことが報告されている [33]。一方で、本研究では、移植 12 週目においても骨欠損部の完全な再生はみられなかった。しかしながら、軟骨誘導を施した C-MSCs 移植によって、移植体自身が軟骨内骨化を介した新生骨を形成したことに本研究の意義があると考ええる。確かに今回のような小規模な骨欠損に対する再生には従来の C-MSCs が効果的であるが、多数の MSCs 移植が必要な大規模欠損においては、CIM-C-MSCs 移植が有効である可能性がある。大規模骨欠損では、骨再生にも相応の時間を要すると考えられ、また先に述べたように欠損中央部は低栄養・低酸素環境に陥りやすいと考える。そのため、従来の培養法で作製した C-MSCs を移植しても、十分な骨再生効果を得られる前に細胞死が生じるリスクがある。それに対し CIM-C-MSCs を移植した場合には、周囲骨と近接する C-MSCs が周囲の細胞を活性化することで宿主の骨再生を誘導し、一方欠損中央部では低栄養環境にも生存可能な軟骨細胞塊が、自身で軟骨内骨化を介した新生骨を形成することができる。最終的には、CIM-C-MSCs 由来の新生骨を足場にして、長期間かけて宿主の細胞が誘導され、大規模骨欠損の再生が行われることを期待できる。また重要なことに、C-MSCs は 1 つ 1 つに個別に分化誘導を施すことが可能であるため、例えば周囲骨を隣接する位置に従来の培養法で作製した C-MSCs を移植し、欠損中央部に軟骨誘導を施した C-MSCs を移植することも手技的な問題はあがるが、ある程度可能となりうる。本研究で

は骨再生に不適である培養 15 日の CIM-C-MSCs も、この方法で移植することで有利となるかもしれない。

C-MSCs の細胞加工製品としての利用を目標とした上で様々な課題があるが、IFN- $\gamma$  で処理した C-MSCs が免疫制御能を得ることで他家移植にも対応できること [32]、また Xeno-free の凍結保存剤で凍結保存した C-MSCs が解凍後も骨再生能を有すること [46]をこれまでに明らかにしてきた。そこで、これらの培養法を組み合わせることによって、事前に各々の培養法で作製した C-MSCs を凍結保存して十分量確保することができれば、特別な設備を持たない一般的な病院であっても必要な時に必要な量の C-MSCs を供給することが可能となるかもしれない。今後も、C-MSCs を用いた大規模骨欠損に対する効果的な骨再生法の開発や、安定した骨再生能を得るためのスクリーニング法の開発といった必要な課題は多いが、本研究の内容が今後の新規歯周組織および骨再生療法の開発に寄与できるものであると考える。

## 第4章 総括

C-MSCs を用いた新規歯周組織再生療法の開発を目指し、Xeno-free/Serum-free 条件下で軟骨誘導を施した C-MSCs を作製し、骨組織再生能を検討した。すなわち、ヒト骨髄由来 MSCs を用いて作製した軟骨誘導 C-MSCs の性質を評価した後、SCID マウス頭蓋冠骨欠損に移植した。そして、骨再生過程における C-MSCs 内の骨化位置と軟骨基質分布を調べることによって軟骨誘導 C-MSCs 内で形成された新生骨の形成様式の解析を行い、以下の結果を得た。

- 1) Xeno-free/Serum-free の軟骨誘導培地によって培養した C-MSCs は、その中心部の細胞が軟骨細胞に分化し、一部は肥大軟骨細胞へと成熟した。
- 2) CIM-C-MSCs 移植は SCID マウス頭蓋冠骨欠損の再生を誘導した。
- 3) CIM-C-MSCs 移植による骨再生は、骨辺縁からの骨添加と、欠損中央における C-MSCs 自身の骨形成によるものであることが示された。
- 4) CIM-C-MSCs の十分な骨再生効果を得るためには、C-MSCs に対する過不足のない軟骨誘導が必要であることが示唆された。
- 5) 移植した CIM-C-MSCs 内で形成された新生骨は、軟骨内骨化を介したものであることが示唆された。

以上のことから、Xeno-free/Serum-free の軟骨誘導培地で適切な分化誘導を施すことで得られた C-MSCs は、生体内で自らが軟骨内骨化を引き起こし、さらに宿主細胞の骨形成誘導を誘導することによって骨組織再生を促進することが示唆された。

## 参考文献

1. Pihlstrom, B.L., B.S. Michalowicz, and N.W. Johnson, *Periodontal diseases*. Lancet, 2005. **366**(9499): p. 1809-1820.
2. Kuo, L.C., A.M. Poison, and T. Kang, *Associations between periodontal diseases and systemic diseases: A review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis*. Public Health, 2008. **122**(4): p. 417-433.
3. Bassani, D.G., M.T.A. Olinto, and N. Kreiger, *Periodontal disease and perinatal outcomes: a case-control study*. Journal of Clinical Periodontology, 2007. **34**(1): p. 31-39.
4. Bartold, P.M., R.I. Marshall, and D.R. Haynes, *Periodontitis and rheumatoid arthritis: A review*. Journal of Periodontology, 2005. **76**(11): p. 2066-2074.
5. Scannapieco, F.A., R.B. Bush, and S. Paju, *Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review*. Ann Periodontol, 2003. **8**(1): p. 38-53.
6. Yoneda, M., et al., *Involvement of a periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease*. BMC Gastroenterol, 2012. **12**: p. 16.
7. Langer, R. and J.P. Vacanti, *TISSUE ENGINEERING*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-926.
8. Christgau, M., et al., *Guided tissue regeneration in intrabony defects using an experimental bioresorbable polydioxanon (PDS) membrane. A 24-month split-mouth study*. J Clin Periodontol, 2002. **29**(8): p. 710-23.
9. Kitamura, M., et al., *Periodontal Tissue Regeneration Using Fibroblast Growth Factor-2: Randomized Controlled Phase II Clinical Trial*. Plos One, 2008. **3**(7). doi: 10.1371/journal.pone.0002611.
10. Takayama, S., et al., *Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells*. Journal of Periodontal Research, 1997. **32**(8): p. 667-675.
11. Lynch, S.E., et al., *A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration*. J Clin Periodontol, 1989. **16**(8): p. 545-8.
12. Mohammed, S., A.R.C. Pack, and T.B. Kardos, *The effect of transforming growth factor beta one (TGF-beta(1)) on wound healing, with or without barrier membranes, in a Class II furcation defect in sheep*. Journal of Periodontal Research, 1998. **33**(6): p. 335-344.

13. Giannobile, W.V., et al., *Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects*. J Periodontol, 1998. **69**(2): p. 129-37.
14. Wikesjö, U.M., et al., *Periodontal repair in dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration*. J Clin Periodontol, 2003. **30**(8): p. 705-14.
15. Blumenthal, N.M., et al., *Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intrabony periodontal defects in the baboon*. Journal of Periodontology, 2002. **73**(12): p. 1494-1506.
16. Takeda, K., et al., *Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration*. Tissue Engineering, 2005. **11**(9-10): p. 1618-1629.
17. Bose, S., M. Roy, and A. Bandyopadhyay, *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. Trends in Biotechnology, 2012. **30**(10): p. 546-554.
18. Treiser, M.D., et al., *Cytoskeleton-based forecasting of stem cell lineage fates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(2): p. 610-615.
19. Thomson, J.A. and V.S. Marshall, *Primate embryonic stem cells*. Current Topics in Developmental Biology, Vol 38, 1998. **38**: p. 133-165.
20. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-872.
21. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-676.
22. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-147.
23. Colnot, C., *Cell Sources for Bone Tissue Engineering: Insights from Basic Science*. Tissue Engineering Part B-Reviews, 2011. **17**(6): p. 449-457.
24. Kawaguchi, H., et al., *Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells*. Journal of Periodontology, 2004. **75**(9): p. 1281-1287.
25. Hasegawa, N., et al., *Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects*. Journal of Periodontology, 2006. **77**(6): p. 1003-1007.
26. Nagahara, T., et al., *Introduction of a Mixture of beta-Tricalcium Phosphate Into a Complex of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Type I Collagen Can*

- Augment the Volume of Alveolar Bone Without Impairing Cementum Regeneration.* Journal of Periodontology, 2015. **86**(3): p. 456-464.
27. Liechty, K.W., et al., *Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep.* Nature Medicine, 2000. **6**(11): p. 1282-1286.
28. Hoogendoorn, H.A., et al., *LONG-TERM STUDY OF LARGE CERAMIC IMPLANTS (POROUS HYDROXYAPATITE) IN DOG FEMORA.* Clinical Orthopaedics and Related Research, 1984(187): p. 281-288.
29. Oreffo, R.O.C. and J.T. Triffitt, *Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics.* Bone, 1999. **25**(2): p. 5S-9S.
30. Kittaka, M., et al., *Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration.* Cytotherapy, 2015. **17**(7): p. 860-873.
31. Takewaki, M., et al., *MSC/ECM Cellular Complexes Induce Periodontal Tissue Regeneration.* Journal of Dental Research, 2017. **96**(9): p. 984-991.
32. Takeshita, K., et al., *Xenotransplantation of interferon-gamma-pretreated clumps of a human mesenchymal stem cell/extracellular matrix complex induces mouse calvarial bone regeneration.* Stem Cell Research & Therapy, 2017. **8**(1). doi: 10.1186/s13287-017-0550-1.
33. Motoike, S., et al., *Clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes generated with xeno-free conditions facilitate bone regeneration via direct and indirect osteogenesis.* International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(16). doi: 10.3390/ijms20163970.
34. Ernestina, S, et al., *Hypoxia in cartilage: HIF-1 $\alpha$  is essential for chondrocyte growth arrest and survival.* Genes & Development, 2001. **15**(21): p. 2865-2876.
35. Steck, E., et al., *Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to boneclose neocartilage.* Stem Cells and Development, 2009. **18**: p. 969-978.
36. Phuong, N.D., et al., *Endochondral Ossification in Critical-Sized Bone Defects via Readily Implantable Scaffold-Free Stem Cell Constructs.* Stem Cells Translational Medicine, 2017. **6**(7): p. 1644-1659.
37. Bouxsein, M.L., et al., *Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography.* Journal of Bone and Mineral Research, 2010. **25**(7): p. 1468-1486.

38. Xin, Z., et al., *Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice*. PLOS Genetics, 2014. **10**(12). doi: 10.1371/journal.pgen.1004820.
39. Y Jing., et al., *Chondrocytes Directly Transform into Bone Cells in Mandibular Condyle Growth*. Journal of Dental Research, 2015. **94**(12): p. 1668-1675.
40. Adam, J.E., et al., *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. Cell, 2006. **126**(4): p. 677-689.
41. Komatsu, N., et al., *Type I collagen deposition via osteoinduction ameliorates YAP/TAZ activity in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes*. Stem Cell Research & Therapy, 2018. **9**(1). doi: 10.1186/s13287-018-1085-9.
42. Li, F., X. Wang, and C. Niyibizi, *Bone marrow stromal cells contribute to bone formation following infusion into femoral cavities of a mouse model of osteogenesis imperfecta*. Bone, 2010. **47**(3): p. 546-555.
43. Zhou, Y., et al., *Implantation of osteogenic differentiated donor mesenchymal stem cells causes recruitment of host cells*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2015. **9**(2): p. 118-126.
44. Zhou, Y., et al., *Mesenchymal stromal cells regulate the cell mobility and the immune response during osteogenesis through secretion of vascular endothelial growth factor A*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2018. **12**(1): p. E566-E578.
45. Chelsea, S. B., et al., *Stem cell derived endochondral cartilage stimulates bone healing by tissue transformation*. Journal of Bone and Mineral Research, 2014. **29**(5): p. 1269-1282.
46. Motoike, S., et al., *Cryopreserved clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes retain osteogenic capacity and induce bone regeneration*. Stem Cell Research & Therapy, 2018. **9**(1). doi: 10.1186/s13287-018-0826-0.

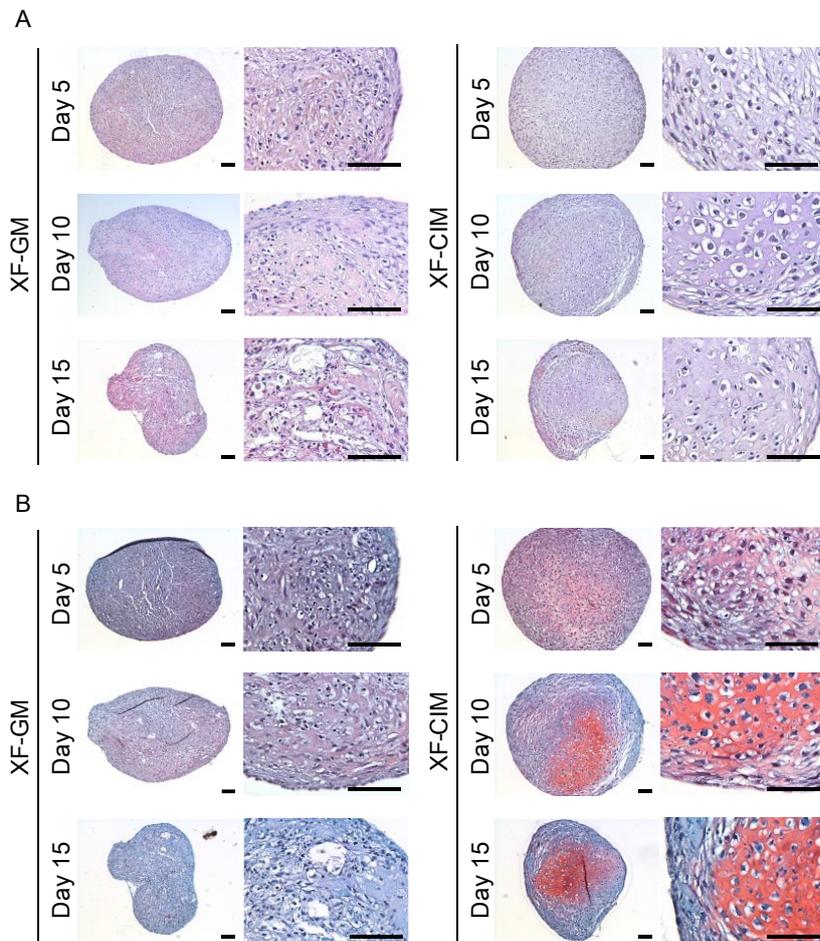


図. 1 Xeno-free/Serum-free の軟骨誘導培地による C-MSCs 作製

(A&B) 5、10、15 日目でサンプルの回収を行い、HE 染色(A)およびサフランin O 染色(B)を行った。左は増殖培地で作製した C-MSCs、右は軟骨誘導培地で作製した C-MSCs を示す。それぞれ左図が弱拡大、右図が強拡大像 (スケールバー=100  $\mu\text{m}$ ) を示す。

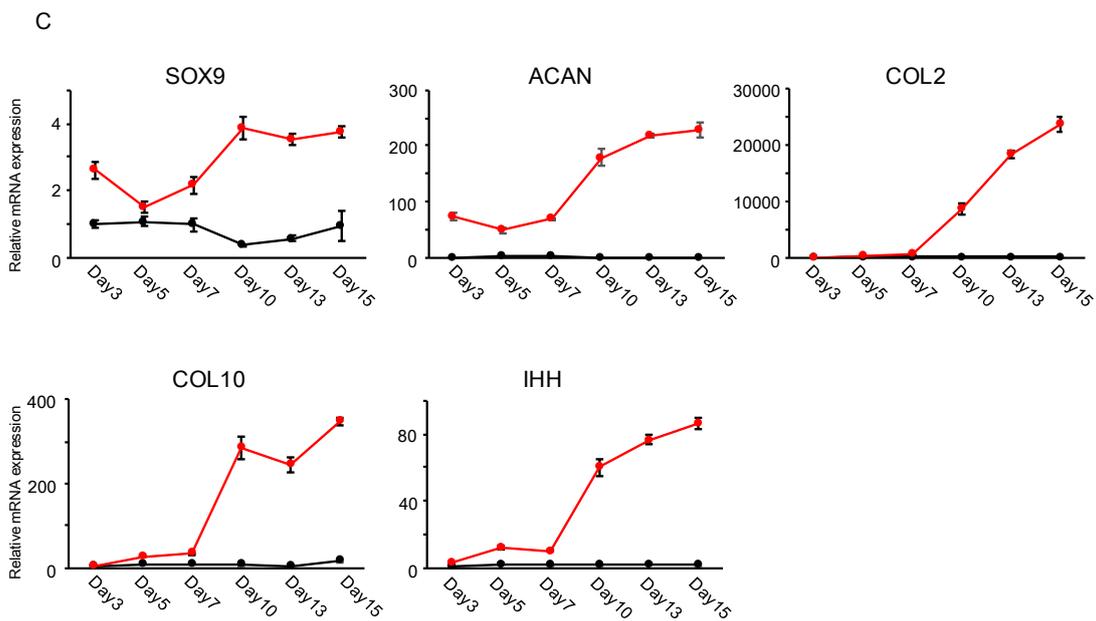


図. 1 Xeno-free/Serum-free の軟骨誘導培地による C-MSCs 作製

(C) 3、5、7、10、13、15 日目で回収を行い、real-time PCR を行った。使用したマーカーは、Sox9, Aggrecan (ACAN), Col 2, Col 10, IHH である。ハウスキーピング遺伝子として 18s を用いて、 $\Delta\Delta CT$  法により目的遺伝子の相対比を産出した。黒線が増殖培地で作製した C-MSCs、赤線が軟骨誘導培地で作製した C-MSCs を示す。

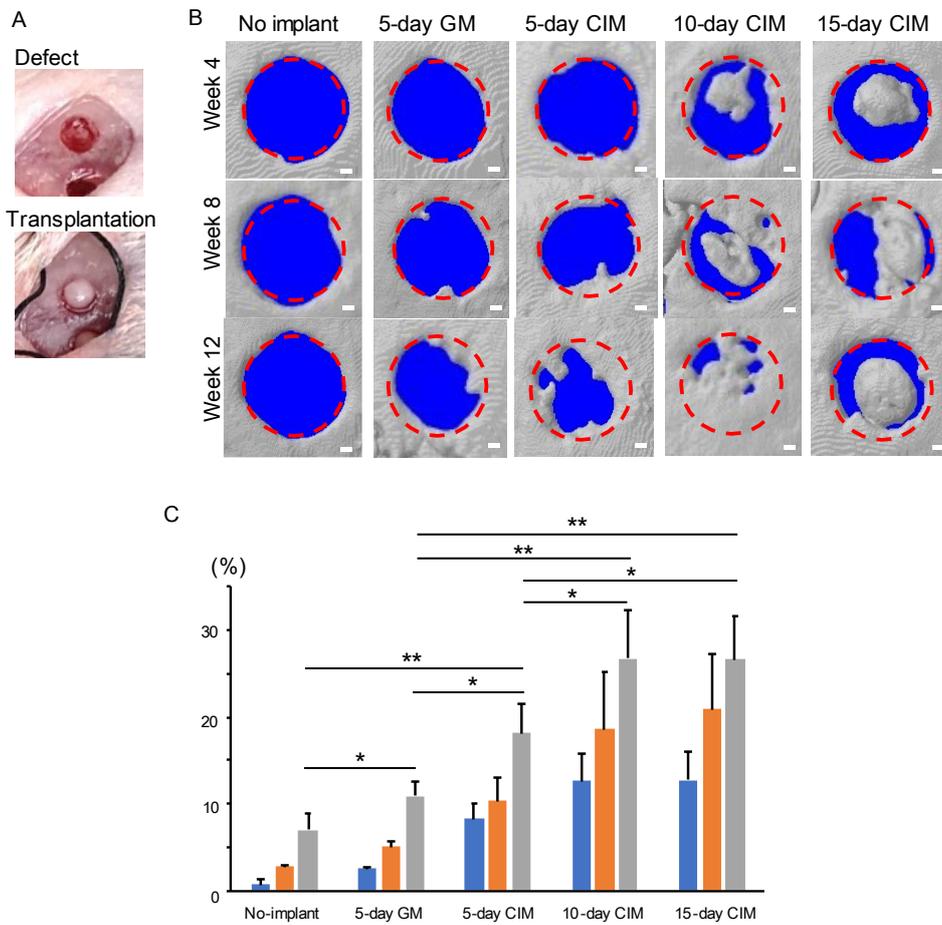


図. 2 Xeno-free/Serum-free の軟骨誘導培地で作製された C-MSCs の SCID マウスの頭蓋冠骨欠損への移植

(A) C-MSCs 移植時の肉眼所見を示す。上段が移植前、下段が C-MSCs 移植後。写真は軟骨誘導培地で 10 日間培養した C-MSCs 移植時のもの。(B) 移植 4、8、12 週後の micro CT 画像。比較として非移植群および増殖培地で 5 日間培養した C-MSCs を用いた。(スケールバー=250  $\mu$ m) (C) 移植 4、8、12 週後の骨欠損部における再生骨量 (BV)/全体組織量 (TV)。グラフはそれぞれ、左が 4 週、中央が 8 週、右が 12 週目のもの。エラーバーは S.D.値を示す。\*\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.05$

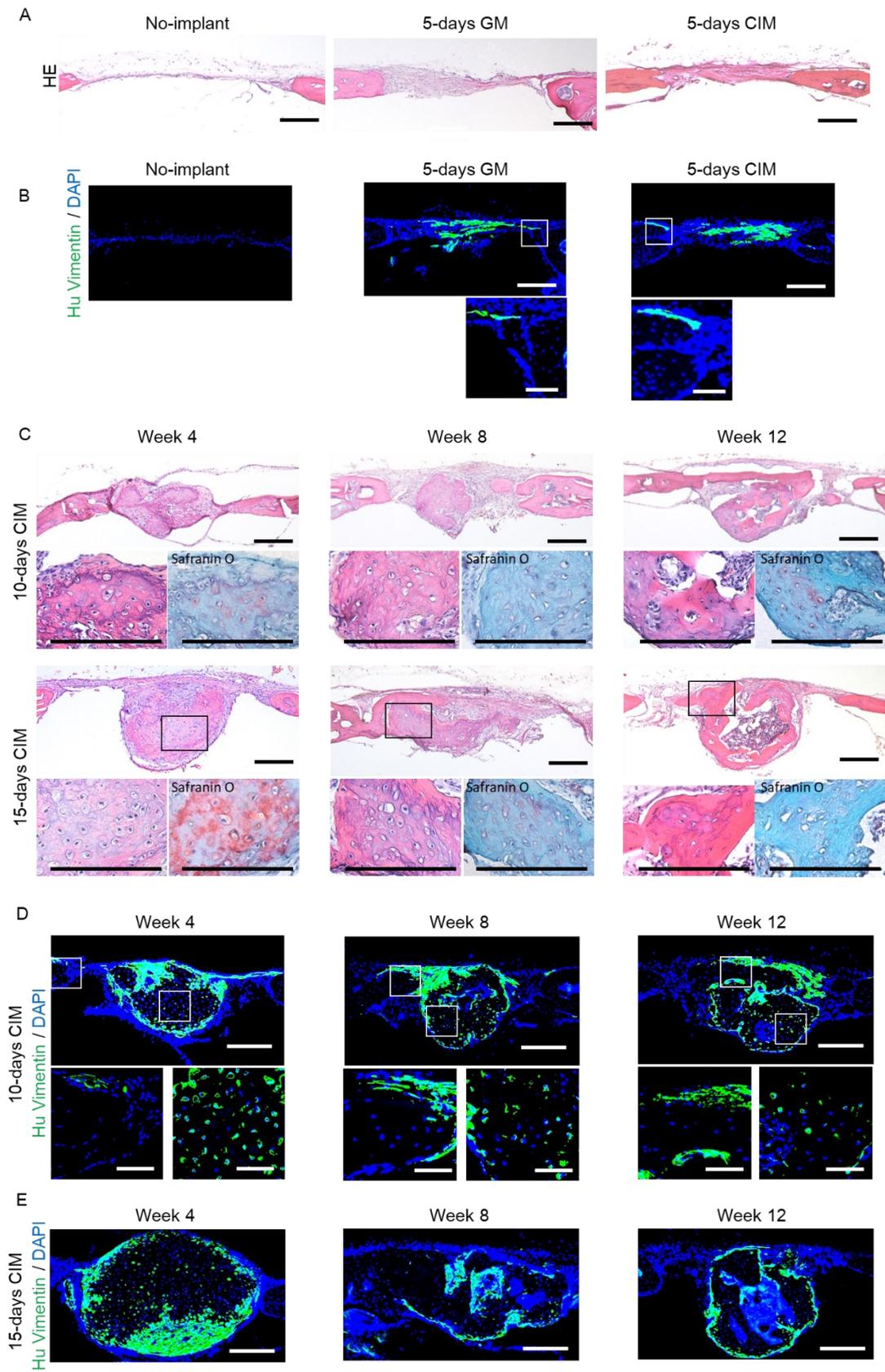


図. 3 Xeno-free/Serum-free の軟骨誘導培地で培養した C-MSCs の頭蓋冠骨欠損への移植時の組織像

(A&B) 移植 12 週後の組織像を示す。(A) 厚さ 8  $\mu\text{m}$  で切片を作製し、HE 染色を行った。(スケールバー=250  $\mu\text{m}$ ) (B) 厚さ 20  $\mu\text{m}$  で切片を作製し、抗ヒト Vimentin 抗体で蛍光免疫染色を行った。青色が細胞核、緑色がヒト Vimentin の分布を示す。上段が弱拡大 (スケールバー=250  $\mu\text{m}$ )、下段が強拡大像 (スケールバー=50  $\mu\text{m}$ )。左が非移植群、中央が通常培地 5 日培養群、右が軟骨誘導培地 5 日培養群。

(C) 移植 4、8、12 週後の組織像を示す。厚さ 8  $\mu\text{m}$  で切片を作製し、HE 染色およびサフラニン O 染色を行った。上図が軟骨誘導培地 10 日培養群、下図が軟骨誘導培地 15 日培養群を示す。それぞれ上段が HE 染色弱拡大像、下段左図が HE 染色強拡大像、下段右図がサフラニン O 染色像を示す (スケールバー=250  $\mu\text{m}$ )。左が移植 4 週後、中央移植 8 週後、右が移植 12 週後。

(D&E) 移植 4、8、12 週後の組織像を示す。厚さ 20  $\mu\text{m}$  で切片を作製し、抗ヒト Vimentin 抗体で蛍光免疫染色を行った。軟骨誘導培地 10 日培養群 (D)、軟骨誘導培地 15 日培養群 (E)。青色が細胞核、緑色がヒト Vimentin の分布を示す。上段が弱拡大 (スケールバー=250  $\mu\text{m}$ )、下段が強拡大像 (スケールバー=50  $\mu\text{m}$ )。それぞれ左が移植 4 週後、中央移植 8 週後、右が移植 12 週後。

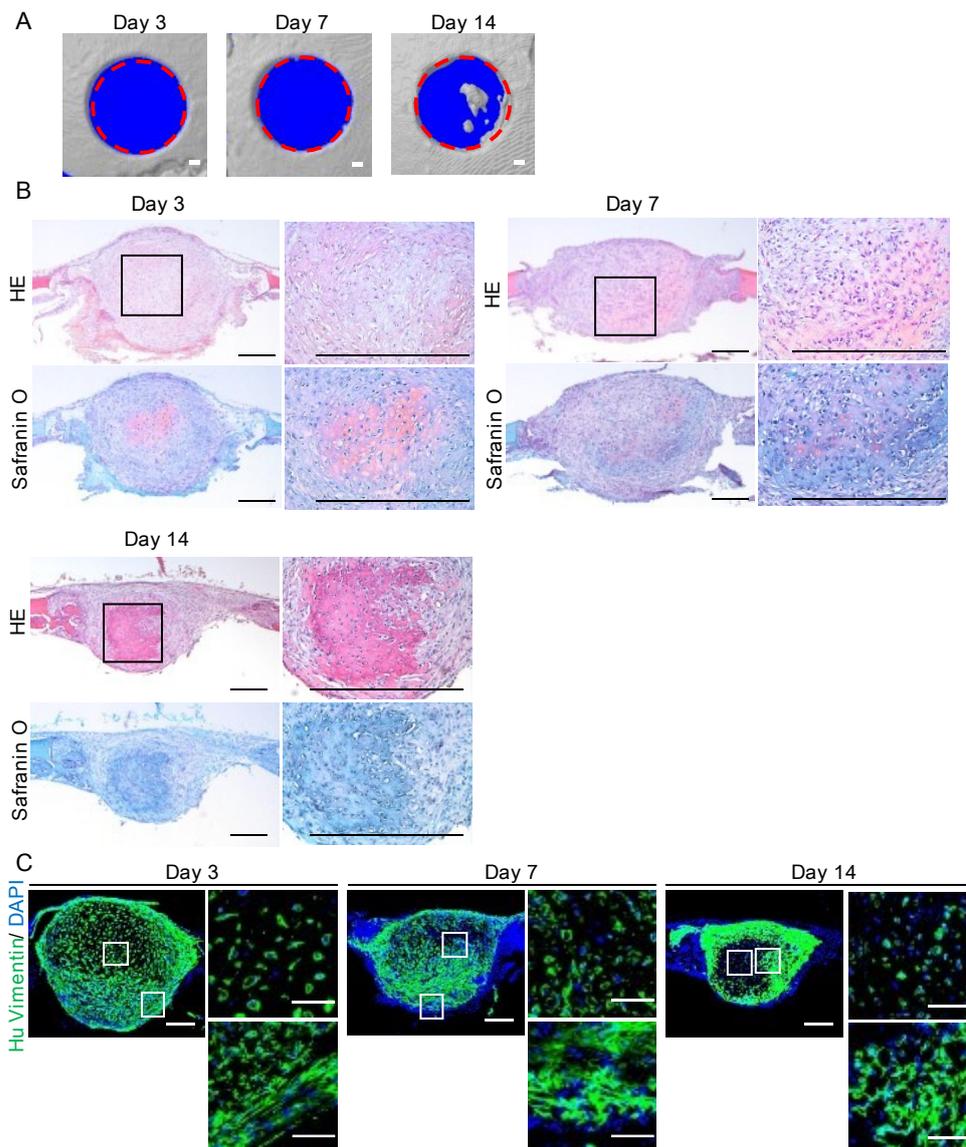


図. 4 Xeno-free/Serum-free の軟骨誘導培地で 10 日間培養した C-MSCs の頭蓋冠骨欠損への移植時の短期的な観察

移植 3、7、14 日後に観察した。(A) micro CT 画像を示す。(スケールバー=250  $\mu\text{m}$ ) (B) 上段が HE 染色像、下段がサフランin O 染色像を示す。左図が弱拡大、右図が強拡大像。

(スケールバー=500  $\mu\text{m}$ ) (C) 抗ヒト Vimentin 抗体で蛍光免疫染色を行った。それぞれ左図が弱拡大(スケールバー=500  $\mu\text{m}$ )、右図が強拡大像(スケールバー=50  $\mu\text{m}$ )。青色が細胞核、緑色がヒト Vimentin の分布を示す。

表. 1 real-time PCR プライマー

18s	F: GTAACCCGTTGAACCCCATTT
	R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG
Sox9	F: CATGAGCGAGGTGCACTCC
	R: TCGCTTCAGGTCAGCCTTG
ACAN	F: TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC
	R: GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA
Col 2	F: TTTCCCAGGTCAAGATGGTC
	R: CTTCAGCACCTGTCTCACCA
IHH	F: AACTCGCTGGCTATCTCGGT
	R: GCCCTCATAATGCAGGGACT
Col 10	F: CCCTTTTTGCTGCTAGTATCC
	R: CTGTTGTCCAGGTTTTCTGGCAC