

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24143

研究課題名(和文) 骨芽細胞の分化と細胞内密度との関連性および硬組織再生への最適化

研究課題名(英文) Relationship between osteoblast differentiation and intracellular density and optimization for hard tissue regeneration

研究代表者

伊藤 勇紀 (Ito, Yuki)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20845846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨髄由来の骨髄細胞を分化誘導培地にて培養することで培養骨芽細胞を調整し、密度勾配遠心分離法によって細胞内密度によって3つの細胞集団に分画化した。3つの細胞分画の骨芽細胞分化マーカー遺伝子および間葉系幹細胞マーカー遺伝子の発現を解析したところ、高密度分画では骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現が増大しており、低密度分画では間葉系幹細胞マーカー遺伝子の発現が増大していることが確認された。各分画に含まれる細胞の間葉系幹細胞表面マーカー分子の発現をフローサイトメトリー法によるFACS解析を用いて解析したところ、細胞内密度が低くなるにつれ間葉系幹細胞マーカー分子の発現が増大することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、これまでは困難であった培養骨芽細胞からの石灰化物の除去及びFACS解析を用いた細胞表面マーカーの解析が可能となった。また、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が進むにつれ、細胞内密度は増大していくことが示唆された。すなわち、細胞内密度は幹細胞の骨芽細胞への分化度をしめす指標となる可能性が明らかとなった。密度勾配遠心分離法を用いることで、特定の分化段階の生きた骨芽細胞を分離することが可能となり、今後の骨芽細胞の詳細な分化メカニズムの解明に向けての貢献ができたと考える。

研究成果の概要(英文)：Cultured osteoblasts were prepared by culturing bone marrow cells derived from mouse bone marrow in osteogenic induction medium, and fractionated into three cell populations according to intracellular density by density gradient centrifugation. Analysis of the expression of the osteoblast differentiation marker gene and the mesenchymal stem cell marker gene in the three fractions showed that the expression of the osteoblast differentiation marker gene was increased in the high-density fraction and the expression of the mesenchymal stem cell marker gene was increased in the low-density fraction. The expression of mesenchymal stem cell surface marker molecules in each fraction was analyzed using FACS analysis by flow cytometry. The expression of mesenchymal stem cell marker molecules increased as the intracellular density decreased.

研究分野：間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化

キーワード：間葉系幹細胞 骨芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の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分子の解析が有用であるとされているが、培養骨芽細胞の細胞表面マーカーのフローサイトメトリーを用いた解析は困難であった。これは骨芽細胞が分化中に産生する石灰化物が FACS 解析において偽陽性として検出されるためである。そこで申請者らは培養骨芽細胞から石灰化物を除去する方法として、密度勾配遠心分離法に注目した。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と細胞を分離し、生細胞を回収することに成功した。これにより培養骨芽細胞の細胞表面マーカーの FACS 解析が可能となった。

さらに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とともに、骨芽細胞集団を様々な細胞内密度に分画化することが可能となった。骨芽細胞の細胞内密度について、マウス頭蓋骨から回収された骨芽細胞集団を細胞内密度によって分離、解析したところ、より成熟した骨芽細胞では細胞内密度が増加していたという報告がある。このことより、間葉系幹細胞から分化しつつある培養骨芽細胞を細胞内密度によって分画化した時、密度の異なる各分画には異なる分化段階の骨芽細胞が含まれるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、密度勾配遠心分離法を用いて分画化した細胞内密度の異なる培養骨芽細胞の骨芽細胞分化マーカー遺伝子および間葉系幹細胞マーカー分子の発現を解析することで、骨芽細胞における細胞内密度と分化度の関連性を明らかにすることである。また、細胞内密度を変化させる要因についても解析することである。

3. 研究の方法

マウス骨髄細胞由来の骨髄間質細胞を骨芽細胞分化誘導培地にて培養することで培養骨芽細胞を調整し、さらに密度勾配遠心分離法をもちいて石灰化物を除去するとともに培養細胞を細胞内密度によって分画化し、細胞内密度のことなる細胞を含む3つの分画(高密度分画、中等度密度分画、低密度分画)を得る。

得られた3つの分画中の細胞における骨芽細胞分化マーカー遺伝子および間葉系幹細胞マーカー遺伝子の発現量を定量的リアルタイムPCR法にて解析する。

さらに、3つの分画の細胞をCD16/CD32にてブロック後、間葉系幹細胞表面マーカー分子(CD44、CD73、CD105、CD106、Sca-1、SSEA1)に対するビオチン化抗体を反応させ、APC-streptavidinにて発色させ、フローサイトメトリー法を用いて、3つの分画に含まれる細胞の細胞表面マーカーの発現量についてFACS解析を行う、さらに細胞の形態についても解析する。

4. 研究成果

マウス骨髄由来の骨髄細胞を分化誘導培地にて培養することで培養骨芽細胞を調整し、密度勾配遠心分離法によって細胞内密度によって3つの細胞集団に分画化した。3つの細胞分画の骨芽細胞分化マーカー遺伝子および間葉系幹細胞マーカー遺伝子の発現を解析したところ、高密度分画では骨芽細胞分化マーカー遺伝子(*OSX*, *Cola-1*, *OPN*, *OCN*)の発現が増大しており、低密度分画では間葉系幹細胞マーカー遺伝子(*ISLR*)の発現が増大していることが確認された。各分画に含まれる細胞の間葉系幹細胞表面マーカー分子の発現をフローサイトメトリー法によるFACS解析を用いて解析したところ、細胞内密度が低くなるにつれ間葉系幹細胞マーカー分子(CD73、CD105、CD106、Sca-1)の発現が増大することが確認された。またCD44の発現はいずれの密度の分画でも高発現していることがあきらかとなり、SSEA1の発現はいずれの密度の分画でも認められなかった。また、高密度な分画になるにつれ、分画内に含まれる細胞の大きさは減少していくことが確認された。

本研究の結果より、密度勾配遠心分離法を用いることでこれまでは困難であった培養骨芽細胞からの石灰化物の除去及びFACS解析を用いた細胞表面マーカーの解析が可能となった。細胞内密度が低い分画になるほど、間葉系幹細胞表面マーカーの発現は増大していくことより細胞内密度の低い分画には骨芽細胞への分化度の低い細胞が含まれることが明らかとなり、また高密度の分画には骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現が増大していたことより細胞内密度の高い分画にはより骨芽細胞への分化の進んだ細胞が含まれることが明らかとなった。

すなわち、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が進むにつれ、細胞内密度は増大していくことが示唆された。このことより、細胞内密度は幹細胞の骨芽細胞への分化度をしめす指標となる可能性が明らかとなった。また、分化による細胞内密度の増加にて細胞の大きさの減少が関連していることが明らかとなった。密度勾配遠心分離法を用いることで、特定の分化段階の生きた骨芽細胞を分離することが可能となり、このことにより今後の骨芽細胞の詳細な分化メカニズム解明

に貢献できたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤勇紀、伊藤祥作、成瀬陽菜、鍵岡琢実、林 美加子
2. 発表標題 Analysis of osteoblast populations separated by density gradient centrifugation
3. 学会等名 IADR(Washington, D.C. USA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤勇紀、伊藤祥作、成瀬陽菜、鍵岡琢実、林 美加子
2. 発表標題 密度勾配遠心分離法を用いた骨芽細胞系譜の解析
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会(金沢)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------