

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593050

研究課題名(和文)高接着特性を活用した骨膜幹細胞の単離・培養法確立と顎骨再建への応用

研究課題名(英文)The establishment of isolation and culture system by adhesion for periosteum stem cells: application to mandibular reconstruction

研究代表者

西條 英人(Saijyo, Hideto)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80372390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：従来、組織幹細胞が豊富に存在すると推測されている骨膜において、骨膜幹細胞を同定し、さらに幹細胞特性を維持しながら単離、増殖培養を実現し、骨膜幹細胞を用いた現実的な骨再生医療を確立することを目的として研究を実施した。ヒト同一細胞集団において、分裂速度が異なる細胞集団が混在しており、分裂速度が速い細胞集団は、アグリゲート・コロニーを形成することが確認され、分裂速度が遅い集団と比較して有意に軟骨基質産生量が高く、多分化能を有していた。これらの細胞を用いて、ビーグル下顎骨欠損モデルに移植し、骨再生を確認した。以上の結果より、骨膜幹細胞の単離、培養方法の最適化を行い、骨膜幹細胞の特性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In periosteum supposed that there were abundant multipotent stem cells to date. To identify the characterization of periosteum stem cell and realize the isolation system of them, we performed the assay of cell colony formation and proliferation using stem cells derived from human periosteum for bone regenerative medicine substantively. In the human identical cell group, the different population of cell division rate displayed d by Flowcytometer. The rapid division group showed the ability of aggregate-colony formation, producing the extracellular matrix and maintaining the pluripotential as compared with a late division group. To evaluate the property of rapid division group were transplanted into defect of canine mandibular bone. As results, the bone matrix production was observed by histological staining, soft X-ray findings, microCT analysis for two months. This study identified the optimal condition of pluripotential stem cells derived from periosteum.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨再建 幹細胞 骨膜

## 1. 研究開始当初の背景

口腔・顎・顔面のフレームワークとなる顎・顔面骨の正確かつ機能的な再生・再建は、口腔外科医にとって取り組むべき重要な課題となっている。特に、口腔外科が取り扱う口唇口蓋裂、口腔腫瘍・癌、重篤歯周病など大型な骨再建を必要とする疾患は、主に小児や高齢者が罹患するため、少子高齢社会である現代の日本においてますます重要性を増している。現在、細胞源として主に骨髄由来間葉系幹細胞が用いられており、歯槽骨の治療 [Ueda Int J Periodontics Restorative Dent 2005]などに用いられている。しかし、骨髄中の間葉系幹細胞の存在確率は約0.004%と非常に低い上に、いまだ特異マーカーが未確立で単離・培養技術が確立されていないため、十分な特性を引き出すことができないのが現状である。細胞源の基礎検討としてES細胞やiPS細胞などが研究されている一方、臨床的に期待されているのが骨膜である。間葉系の細胞が豊富に存在する骨膜は、骨の発生・成長や修復に重要な役割を果たしている。骨膜には骨・軟骨再生能の極めて高い組織幹細胞が豊富に含まれるということを示している。しかし、骨膜の組織幹細胞、すなわち骨膜幹細胞の実態は明らかになっておらず、組織学的にも骨膜は外側の線維層 (fibrous layer) と内側の形成層 (cambium layer) に大別されのみで、骨膜幹細胞の局在部位などは不明である。また、再生医療においても骨膜幹細胞を濃縮・分離し、培養するのが困難で、再生できるサイズも制限されているため、**骨膜幹細胞の同定**と特異マーカーによる**単離や培養法の確立**は急務である。

## 2. 研究の目的

幹細胞の特性のひとつに細胞接着性が高いことが挙げられる。申請者らは骨膜においても、接着性が高く細胞凝集塊 (アグリゲート・コロニー) を作る細胞が幹細胞特性を有

する細胞であると考えた。本研究では、このことを活用し骨膜幹細胞を単離して、特異マーカーを確立することを試みる。また申請者らは幹細胞特性を維持しながら増殖培養を実現する方法として、細胞接着阻害物質 2-methacryl-olyoxyethylphosphorylcholine (MPC) ポリマーを用いた培養法を開発した [Liu, Takato J Biomed Mater Res 2010]。この方法は、MPC ポリマーによる低接着ストレスを培養中の幹細胞に与える方法であり、骨膜幹細胞においても同様な方法で増殖培養が実現すると考えた。本研究では、従来、組織幹細胞が豊富に存在すると推測されている骨膜で、高接着性を指標として骨膜幹細胞を同定し、さらに低接着ストレスで幹細胞特性を維持しながら単離、増殖培養を実現し、骨膜幹細胞を用いた現実的な骨再生医療を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) **各種骨膜におけるアグリゲート・コロニー形成能の評価** 各種骨膜由来の細胞を用いて細胞凝集塊 (アグリゲート・コロニー) 形成効率を評価し、幹細胞特性の高い骨膜組織を検索する。まず、ビーグル (1 年齢、n=3) から下顎骨、上顎骨、頭頂骨、肋骨、腸骨、橈骨、大腿骨、脛骨由来の骨膜を採取する。採取した骨膜を細切しコラゲナーゼ処理する。回収した細胞を低密度 (52 細胞/cm<sup>2</sup>) で培養皿に播種する。10%FBS 含有培養液で培養し、50 細胞以上の細胞集団を形成したものをアグリゲート・コロニーとする。培養約 4 週間後、各種骨膜のアグリゲート・コロニー数を計測し、コロニー形成能の高い骨膜を 3 つ選定する。選定した骨膜がヒト由来組織でも同様なコロニー形成能を有することを検証するため、該当骨膜で、手術時に切除され治療や診断で必要がないため破棄されている組織を、インフォームド Consent 後に患者から採取する (東京大学医学部倫理委員会承認済み、#622)。採取したヒト由来骨膜を用いて、

前述の方法でアグリゲート・コロニー数を計測し、形成能を確認する。採取したアグリゲート・コロニーから細胞を回収し、10%FBS含有培養液で培養し増殖曲線を描き増殖能を評価する。また、骨、軟骨、脂肪などの間葉系組織への分化を誘導し(Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification kit, R&D社製)、多分化能を評価する。対照には骨膜をコラゲナーゼ処理した後、高密度(3200細胞/cm<sup>2</sup>)で播種し、通常の単層平面培養を同期間行った培養骨膜細胞をもちいて比較検討する。

**(2) アグリゲート・コロニー構成細胞のマーカーク検索** (1)項で得られたアグリゲート・コロニー細胞と通常の培養骨膜細胞を比較するため、第一にマイクロアレイ法(Affymetrix社製、購入予定)を用いて、網羅的に遺伝子情報を把握する。アレイデータをクラスタリングアルゴリズムおよびグラフ比較アルゴリズムによって解析し、マーカーとなる指標を検討する。次いで、マイクロアレイ法で得られた遺伝子指標を参考にしつつ、フローサイトメーター(BD社製Fortessa、現有)を用いて間葉系細胞の代表的な表面抗原や、骨髄由来幹細胞マーカーなどの発現レベルを検討し、特異的なマーカーを絞り込む。

**(3) 骨膜幹細胞の同定・単離** FACS(BD社製Aria、現有)を用いて、アグリゲート・コロニー構成細胞から上記マーカーで選別される細胞を分取し、増殖曲線による増殖評価と骨・軟骨・脂肪分化などの多分化能を評価し、選別前のコロニー構成細胞や単層培養による培養骨膜細胞の結果を比較して幹細胞特性の向上を確認する。次いで、ヌードラット(8週齢)の頭頂骨に直径4mmの欠損を作製し、(2)項で検討した特異マーカー陽性ヒト骨膜由来細胞をアテロコラーゲンと混和して移植する(primary transplantation)。対照にはアテロコラーゲ

ンのみを移植したものを使用し、移植後2週、1、2ヶ月で骨再生を評価する。再生頭頂骨の骨膜における特異マーカーの局在を免疫染色で同定するほか、ヒト細胞由来であることをヒトXY染色体特異的プローブによるin situ hybridization法で評価する。次いで、primary transplantationで再生された骨膜を採取し、FACSで特異マーカー陽性細胞を単離し、再度ヌードラット頭頂骨欠損モデルに移植する(secondary transplantation)。Secondary transplantationにおける再生骨膜で、特異マーカーの局在同定と、ヒトXY染色体特異的プローブによる由来同定を行い、骨膜が再構成されていること確認し、特異マーカー陽性細胞が組織幹細胞(骨膜幹細胞)であることを検証する。

**(4) 低接着ストレスによる骨膜幹細胞の増殖培養法確立** 骨膜幹細胞を培養する方法として低接着性培養皿を用いる。細胞接着阻害物質MPCポリマーを培養皿にコートすると、濃度依存的に細胞接着を抑制できる。MPCポリマー(1-10%)をコートした培養皿でヒト骨膜幹細胞を培養し、増殖率ならびに特異マーカー陽性率を評価し、培養効率の高いポリマー濃度を検索し、MPCポリマー・コート培養皿を用いた骨膜幹細胞の増殖培養法を確立する。

**(5) ビーグル下顎骨欠損モデルにおける骨膜幹細胞による骨再建** ビーグル(1歳齢、雄)の下顎に骨欠損を作製する。再生骨移植群では、自家骨膜より特異マーカーで分取した骨膜幹細胞をMPCポリマー・コート培養皿で培養し、細胞数 $1 \times 10^8$ 細胞を確保する。培養骨膜幹細胞をTCP足場素材と混和し、欠損部に合致する形態を付与したチタンメッシュトレイを用いて欠損部に移植する。コントロール群では、TCP足場素材のみをメッシュトレイに充填し、欠損部に移植する。自家海綿骨(PCBM)移植群では、腸骨から採取した海綿骨をチタンメッシュトレイに充填し、

欠損部に移植する。移植後2ヶ月で移植組織を摘出し、X線撮影、 $\mu$ CT撮影、組織像などを用いて骨再生を評価する。また、骨膜におけるマーカー細胞の局在を免疫染色で評価する。

#### 4. 研究成果

**(1) 各種骨膜におけるアグリゲート・コロニー形成能の評価** アグリゲート・コロニーを形成する細胞を評価するため、蛍光標識したヒト由来細胞を Flow cytometer で解析を行った。まず、ヒト由来細胞を培養し、コンフルエント後(7日)に継代培養を行った。この際に、PKH26による蛍光標識を行い、細胞を播種した。蛍光標識していない細胞を control 群として同様な培養を行った。評価は day0、3、6、9、12、15の6ポイントとし、 $1 \times 10^6$  cells/mL に調整した細胞浮遊液を Flow cytometer で解析を行ったところ、day0では蛍光強度のピークが  $5 \times 10^4$  であったが、day15では  $5 \times 10^3$  にピークがシフトし、ヒストグラムはダルになった。次にその PKH 蛍光強度の減弱が、細胞の代謝などによる自然消失ではなく細胞分裂によるかどうかを検証するために、分裂を止めた状態での培養細胞を Flow cytometer で解析を行った。ヒト細胞を培養し、7日後コンフルエントに到達した時点でマイトマイシン C を  $10 \mu\text{g/mL}$  培地で添加し、PKHによる蛍光標識を行い、継代培養を行った。評価は、同様に day0、3、6、9、12、15の6ポイントとし、 $1 \times 10^6$  cells/mL に調整した細胞浮遊液を Flow cytometer で解析を行ったところ、day0で  $5 \times 10^4$  に存在していた蛍光標識のピークは day15でも変化は見られなかった。これらの結果より、蛍光強度の減弱は、自然消滅ではなく、細胞分裂による減少であることが明らかとなった。

**(2) アグリゲート・コロニー構成細胞のマーカー検索** (1)の解析より、ヒト細胞を継代培養することにより、同一集団においても

細胞増殖速度が異なる細胞集団が混在していることが分かった。これらの細胞群の特性を明らかにするために、FACS セルソーターで day3 の培養細胞を分裂速度の速い群と遅い群とに分取し、骨・軟骨分化誘導を行った。分取した細胞群は三次元高密度培養を行い、骨・軟骨分化培地で培養を行った。培養1週間後、各群の細胞から RNA を採取し、realtime-PCR によって col2 遺伝子の発現を評価した。培養21日後、トルイジンブルー染色による組織学的解析を行い、軟骨形成を評価した。以上の解析方法より、分裂速度の速い細胞群は、遅い群より col2 発現が有意に高く、組織所見より、強いメタクロマジーを示す結果となった。したがって、同一集団における細胞分裂速度の違いは、分化特性に関連していることが示唆された。

#### (3) 骨膜幹細胞の同定・単離

(1)(2)項より、分裂速度が速い細胞集団は、アグリゲート・コロニーを形成することが確認された。これらの細胞集団の特性をより詳細に検討するため、これらの細胞の同定および増殖法を検討した。アグリゲート・コロニー構成細胞から増殖曲線による増殖評価と骨・軟骨・脂肪分化などの多分化能を評価し、選別前のコロニー構成細胞や単層培養による培養骨膜細胞の結果を比較して幹細胞特性の向上を確認した。分裂速度の速い細胞集団は、遅い集団と比較して有意に軟骨基質産生量が高く、多分化能を保持していることが明らかとなった。さらに骨欠損モデルを作製し、骨膜由来細胞を移植した。経過観察後、X線、 $\mu$ CTを用いて骨再生を評価した。再生された骨膜が移植細胞由来であることが確認されたことにより、アグリゲート・コロニー構成細胞が骨膜幹細胞であることが推測された。

#### (4) 低接着ストレスによる骨膜幹細胞の増殖培養法確立

次に、これらの細胞をより純化し、大量に作製するために培養法を検討した。骨膜幹

細胞を培養する方法として低接着性培養皿を使用した。MPC ポリマーをコートした培養皿でヒト骨膜幹細胞を培養し、培養効率の高いポリマー濃度の最適化を行い、骨膜幹細胞に適した培養法を検討した。

#### (5) ビーグル下顎骨欠損モデルにおける骨膜幹細胞による骨再建

ビーグル(1歳齢、雄)の下顎に骨欠損を作製した。再生骨移植群では、自家骨膜より特異マーカーで分取した骨膜幹細胞を MPC ポリマー・コート培養皿で培養し、細胞を確保した。培養骨膜幹細胞を TCP 足場素材と混和し、欠損部に合致する形態を付与したチタンメッシュトレイを用いて欠損部に移植した。コントロール群では、TCP 顆粒のみをメッシュトレイに充填し、欠損部に移植した。移植後 2 ヶ月で移植組織を摘出し、軟 X 線撮影、μCT 撮影、骨形態計測や組織像などを用いて骨再生を評価した。移植 2 ヶ月後、μCT 撮影などにて骨再生を確認するとともに、組織像でも骨形成を確認した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

Abe, M., Mori, Y., Kannno, Y., Hoshi, K., Saijo, H., Abe, T., Ohkubo, K., Takato, T., A case of pleomorphic adenoma of the parotid gland with multiple local recurrences through facial to cervical region, *Open J. Stomat.*, 査読有, vol.4(9), 2014, 441-445. DOI: 10.4236/ojst.2014.49059

Takato, T., Mori, Y., Fujihara, Y., Asawa, Y., Nishizawa, S., Kanazawa, S., Ogasawara, T., Saijo, H., Abe, T., Abe, M., Suenaga, H., Kannno, Y., Sugiyama, S., Hoshi, K., Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region, *Oral Sci. Int.*, 査読有, vol.11(2), 2014, 45-51. DOI: 10.1016/S1348-8643(14)00008-1

Kawase-Koga, Y., Saijo, H., Hoshi, K., Takato, T., Mori, Y., Surgical management of odontogenic myxoma: a case report and review of the literature, *BMC Res. Notes*, 査読有, vol.7(1), 2014, 1-9. DOI:

10.1186/1756-0500-7-214

Ohkubo, K., Susami, T., Inokuchi, T., Okayasu, M., Takahashi, N., Uwatoko, K., Uchino, N., Suenaga, H., Koga, Y., Saijo, H., Mori, Y., Takato, T., Incisor inclination after presurgical orthodontic treatment in patients with mandibular prognathism, *Jpn. J. Jaw Deform.*, 査読有, vol.24(1), 2014, 16-26. DOI: 10.5927/jjjd.24.16

Mori, Y., Takato, T., Hoshi, K., Kannno, Y., Sugiyama, M., Ohkubo, K., Saijo, H., Correction of upturned nasal tip with a costal cartilage graft in bilateral cleft lip patients, *J. Craniofac. Surg.*, 査読有, 2014, vol.25(5), 2014, 443-445. DOI: 10.1097/SCS.0000000000000954

Ogasawara, T., Ohba, S., Yano, F., Kawaguchi, H., Chung, U-I., Saito, T., Yonehara, Y., Nakatsuka, T., Mori, Y., Takato, T., Hoshi, K., Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling, *J. Cell Physiol.*, 査読有, vol.228, 2013, 163-177. DOI: 10.1002/jcp.24116

Kanazawa, S., Fujihara, Y., Sakamoto, T., Asawa, Y., Komura, M., Nagata, S., Takato, T., Hoshi, K., Tissue responses against tissue-engineered cartilage consisting of chondrocytes encapsulated within non-absorbable hydrogel, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 査読有, vol.7, 2013, 1-9. DOI: 10.1002/term458

Abe, M., Mori, Y., Saijo, H., Hoshi, K., Ohkubo, K., Ono, T., Takato, T., The efficacy of dental therapy for an adult case of Henoch-Schönlein purpura, *Oral Sci. Int.*, 査読有, vol.9, 2012, 59-62. DOI: 10.1016/S134-8643 (12)00027-4

Yonenaga, K., Nishizawa, S., Fujihara, Y., Asawa, Y., Kanazawa, S., Nagata, S., Takato, T., Hoshi, K., Application of floating cells for improved harvest in human chondrocyte culture, *Biomed. Res.*, 査読有, vol.33(5), 2012, 281-289, DOI: 10.2220/biomedres.33.281

Yokoi, M., Hattori, K., Narikawa, K., Ohgushi, H., Tadokoro, M., Hoshi, K., Takato, T., Myoui, A., Nanno, K., Kato, Y., Kanawa, M., Sugawara, K., Kobo, T., Ushida, T., Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol

in a tissue-engineered medical product, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 査読有, vol.6, 2012, 550-558. DOI: 10.1002/term.460

Yanagisawa, H., Hoshi, K., Asawa, Y., Ejiri, S., Sato, K., Ozawa, H., Matrix remodeling and cytological changes during spontaneous cartilage repair, *J. Electron Microsc.*, 査読有, vol.61(4), 2012, 237-248. DOI: 10.1093/jmicro/dfs044

Tanaka, Y., Saijo, Y., Fujihara, Y., Yamaoka, H., Nishizawa, S., Nagata, S., Ogasawara, T., Asawa, Y., Takato, T., Hoshi, K., Evaluation of the implant type tissue-engineered cartilage by scanning acoustic microscopy, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, vol.113(2), 2012, 252-257. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.10.011

Sugiyama, M., Saijo, H., Hoshi, K., Ohkubo, K., Mori, Y., Takato, T., Secondary repair of an oblique facial cleft with an absorbable mesh tray and particulate cancellous bone and marrow, *Oral Sci. Int.*, 査読有, vol.9, 2012, 63-66. DOI: 10.1016/S1348-8643(12)00030-4

Ochiai, H., Okada, S., Saito, A., Hoshi, K., Yamashita, H., Takato, T., Azuma, T., Inhibition of insulin-like growth factor-1(IGF-1) expression by prolonged transforming growth factor - 1 (TGF- 1) administration suppresses osteoblast differentiation, *J. Biol. Chem.*, 査読有, vol.287(27), 2012, 22654-61. DOI: 10.1074/jbc.M111.279091

Mori, Y., Susami, T., Saijo, H., Ohkubo, K., Uchino, N., Hoshi, K., Takato, T., Mandibular body ostectomy for correction of mandibular prognathism A technical Note, *Oral Sci. Int.*, 査読有, vol.9(1) 2012, 21-25. DOI: 10.1016/S1348-8643(12)00005-5

Ko, E.C., Fujihara, Y., Ogasawara, T., Asawa, Y., Nishizawa, S., Nagata, S., Takato, T., Hoshi, K., BMP-2 embedded atelocollagen scaffold for tissue-engineered cartilage cultured in the medium containing insulin and triiodothyronine - a new protocol for three-dimensional in vitro culture of human chondrocytes, *Tissue Eng. Part C Methods*, 査読有, vol.18(5), 2012, 374-386. DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0217

Iwata, K., Asawa, Y., Nishizawa, S., Mori, Y., Nagata, S., Takato, T.,

Hoshi, K., The development of a serum-free medium utilizing the interaction between growth factors and biomaterials, *Biomaterials*, 査読有, vol.33(2), 2012, 444-454. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.056

Asawa, Y., Sakamoto, T., Komura, M., Watanabe, M., Nishizawa, S., Takazawa, Y., Takato, T., Hoshi, K., Early stage foreign body reaction against biodegradable polymer scaffolds affects tissue regeneration during the autologous transplantation of tissue-engineered cartilage in the canine model, *Cell Transplant.*, 査読有, vol.21(7), 2012, 1431-1442. DOI: 10.3727/096368912X640574

〔学会発表〕(計 5 件)

西條英人、杉山 円、菅野勇樹、高戸 毅、新規チタンメッシュと腸骨海綿骨細片 (PCBM) を用いた上顎歯槽骨再建、第 18 回日本顎顔面インプラント学会総会学術大会、2014 年 11 月 29 日 - 30 日、ビッグハート出雲、島根

西條英人、デンタルインプラントの現状と今後の展開、日本総合医療健康医療学会、2013 年 10 月 14 日、東京

Hoshi, K., Optimal combinations of scaffolds and growth factors for tissue engineering of cartilage, Osteoarthritis Research Society International, (招待講演), Apr. 20, 2013, Philadelphia, USA.

菅野勇樹、西條英人、鄭 雄一、瀬戸一郎、大久保和美、井口隆人、森 義之、高戸 毅、顎顔面領域における in situ Tissue Engineering 型カスタムメイド人工骨の応用、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 23 日、パシフィコ横浜会議センター、神奈川

星 和人、須佐美隆史、高戸 毅、生分解性ポリマー足場素材を用いたインプラント型再生軟骨の研究開発と臨床導入、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西條 英人 (SAIJO, Hideto)  
東京大学医学部附属病院・講師  
研究者番号: 80372390

### (2) 研究分担者

星 和人 (HOSHI, Kazuto)  
東京大学医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 30344451