

学 位 論 文

Clumps of Mesenchymal Stem Cell/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Conditions Facilitate Bone Regeneration via Direct and Indirect Osteogenesis.

(ゼノフリー条件下に作製した間葉系幹細胞集塊 Clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes は自身の骨分化とホスト細胞の骨形成誘導を介して骨組織再生を促進する)

本池 総太

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

2019年度

主指導教員：栗原 英見 教授
(医系科学研究科 歯周病態学)

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 18 回 日本再生医療学会総会

(2019 年 3 月 兵庫)

第 62 回 春季日本歯周病学会学術大会

(2019 年 5 月 神奈川)

謝 辞

本研究に際し、御指導ならびに御高閲を賜りました本学大学院 医系科学研究科 歯学専門プログラム 歯周病態学研究室 栗原 英見 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、歯科矯正学研究室 谷本 幸太郎 教授、生体分子機能学研究室 宿南 知佐 教授、生体材料学研究室 加藤 功一 教授、広島大学病院 口腔総合診療科 河口 浩之 教授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・邦明、母・裕子に心から感謝致します。

2020 年 1 月

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科

医歯薬学専攻 歯周病態学研究室

本池 総太

目次

第1章 緒論	7
第2章 Xeno-free/Serum-free 条件下で作製した C-MSCs の性質	11
第1節 Xeno-free/Serum-free 条件下での C-MSCs 作製	11
第1項 概要	11
第2項 材料と方法	11
1. ヒト MSCs の培養法	11
2. Xeno-free/Serum-free 条件下での細胞集塊 C-MSCs の作製法	11
3. フローサイトメトリー (FCM) 解析	12
4. 組織学的解析	12
1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色	12
2) 蛍光免疫染色	13
5. アポトーシス細胞の検出	14
第3項 結果	14
第2節 Xeno-free/Serum-free 条件下で作製した C-MSCs の骨組織再生能の検討	15
第1項 概要	15
第2項 材料と方法	15
1. SCID マウス頭蓋冠 1.6mm 骨欠損モデルへの C-MSCs 移植	15
2. micro CT 解析法	15
3. HE 染色	16
4. 統計解析	16

第3項 結果	16
第3節 小括	17
第3章 C-MSCs の骨組織再生機序の解析	18
第1節 C-MSCs 移植による骨組織再生過程におけるドナー細胞とホスト細胞 の分布解析	18
第1項 概要	18
第2項 材料と方法	18
1. ヒト vimentin に対する蛍光免疫染色法	18
2. 統計解析	19
第3項 結果	19
第2節 新生骨様組織の骨質の解析	19
第1項 概要	19
第2項 材料と方法	19
1. Azan 染色法	19
2. 蛍光免疫染色法	20
1) ヒト骨基質関連タンパクの免疫染色法	20
2) 骨細胞の免疫染色法	21
第3項 結果	22
第3節 脱細胞処理を行った C-MSCs (Decell-C-MSCs) の骨組織再生能の検討	23
第1項 概要	23
第2項 材料と方法	23
1. C-MSCs の脱細胞処理法	23

2. Decell-C-MSCs の性質評価	23
1) HE 染色	23
2) 蛍光免疫染色	23
3) 変性コラーゲン染色	24
3. NOD/SCID マウス頭蓋冠 1.6mm 骨欠損モデルへの Decell-C-MSCs 移植	24
4. micro CT 解析法	24
5. 組織学的観察	24
1) HE 染色	24
2) Azan 染色	24
3) 蛍光免疫染色	24
6. 統計解析	25
第 3 項 結果	25
第 4 節 小 括	26
第 4 章 考 察	27
第 5 章 総 括	31
参考文献	32

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、歯周組織の破壊が起こる炎症性の疾患である。歯周炎の進行は、歯を支える歯槽骨の吸収、歯周靭帯の損傷を引き起こす。歯周炎を放置すると歯の喪失に至り咀嚼機能低下、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全身疾患の発症や進行に関わっている [1-6]。一般的な歯周治療としてブラッシングやスケーリング・ルートプレーニングによる細菌バイオフィルムの除去、および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。このことによって炎症を軽減させることはできる。しかし、喪失した歯槽骨や歯周靭帯の再生およびその機能を回復することは難しく、歯周炎再発のリスクは残ったままである。すなわち、破壊された歯周組織は嫌気性の歯周病原細菌に再感染しやすく、慢性炎症が持続する。その結果、歯周炎による全身への悪影響も残ったままとなる。したがって、歯周組織再生療法によって破壊された歯周組織の構造および機能を回復することは、口腔の慢性感染・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。

近年の組織工学の進歩によって、失った組織や臓器を再生するという全く新しい概念の治療が可能になりつつある。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]。現在臨床応用されている歯周組織再生療法として、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] が広く臨床応用されている。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- β (TGF- β) [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。サイトカイン療法は、内在性細胞の制御によって再生を促すため [17, 18]、小・中規模の欠損に適している。しかし、歯根の支持をほとんど失うような大規模歯周組織の欠損では組織再生に関わる細胞の数は少なく、細胞機能の制御も困難であり、十分な再生は期待できない。1 壁性骨欠損や水平性骨吸収など、広範囲にわたる歯周組織破壊が臨床的には多く認められるが、GTR やサイトカイン療法の適応ではない。そのため、歯周組織の大規模な欠損に対する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、再生に関与する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。細胞治療の最大の特徴は、生体外で細胞を加工できることである。この特徴を利用すれば、歯周組織欠損の大きさや形態に合わせて細胞を供給することができる。歯周組織はセメント質、歯周靭帯、歯槽骨、歯肉といった軟組織と硬組織で構成されており、これらの複雑な組織を再生させるために、多分化能を有する幹細胞が適していると考えられる。幹細胞として、胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ES 細胞) [19]、組織幹細胞、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ること、また ES 細胞および iPS 細胞は奇形種形成の危険性があり倫理面・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。組織幹細胞は腸、皮膚、骨髄、肝臓、大脳や膵臓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、線維、腱、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]、現時点において細胞治療の細胞源として有望視されている。特に、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cells: BMSCs) 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、骨髄由来の MSCs をアテロコラーゲンゲルと混和してビーグル犬の実験的歯周組織欠損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、歯周靱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 β リン酸三カルシウム (β -TCP) を併用して移植したところ、移植後 4 週目から十分な新生骨の形成が得られた。しかし、移植 8 週以降において、代謝されずに残存する β -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。たとえば、ハイドロキシアパタイトは骨形成の足場材料として多く用いられているが、生体内で吸収されずに在続し、場合によっては炎症に伴って排出される [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。人工の足場材料を用いない新しい細胞移植治療法が開発されれば、より本来の生体組織に近い効果的な再生医療の実現につながる。

私たちの研究室では 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) を利用して、直径約 1 mm の三次元的人工細胞集塊 clumps of MSC/ECM complexes (C-MSCs) を考案した。C-MSCs は自己産生した I 型コラーゲンが足場として機能するため組織欠損部に直接移植できる。さらに重要なことに、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 の移植が組織再生を効果的に誘導することを報告してきた [30, 31]。さらに、免疫調節能を向上させた C-MSCs は異種移植拒絶を抑制しながら骨再生能を発揮することを明らかにした [32]。

しかし、C-MSCs による骨組織再生機序については未だ十分に解明されていない。これま

で MSCs の骨組織再生機序として、移植先でドナー細胞自身が骨分化する直接的骨形成 [33] と、パラクライン効果によってホスト細胞の骨形成を誘導する間接的骨形成 [34, 35] について報告があるが、移植体毎にその見解は統一されておらず、議論が続いている。C-MSCs についても移植先での挙動を理解し、骨組織再生機序を解明することは臨床応用を目指す上で非常に重要である。一般的には、細胞移植治療の組織再生機序の解析には、高い再現性が要求されるため、ロット間の組成差によって移植体の均一性、再現性を損なわせる可能性のある血清の使用は好ましくない。さらに臨床応用を考えると、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用いずに移植体を作製できることが重要である。そこで本研究では、C-MSCs を Xeno-free/Serum-free 条件下に作製し、移植後の骨再生過程における C-MSCs 構成細胞と ECM の組織内分布を評価し骨組織再生機序の解析を行うことを目的とした。

第2章 Xeno-free/Serum-free 条件下で作製した C-MSCs の性質

第1節 Xeno-free/Serum-free 条件下での C-MSCs 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 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

細胞は広島大学倫理委員会で承認を得た上で、理化学研究所（茨城）から提供されたヒト腸骨由来の MSCs (MSCs-R41) 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% CO₂ 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 1.0×10^5 cells/well 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 ECM を産生させた。その後、ウェルから MSCs/ECM 複合体を鈍的に剥離して浮遊させ、24-well ultra low binding プレート (AGC テクノグラス、静岡) に移動し、さらに Xeno-free 骨分化誘導培地 (MSCgo

Osteogenic-SF, XF medium, Biological Industries, Beit Haemek, Israel) にて球状になるまで3日間培養することで細胞集塊 C-MSCs を得た。MSCs/ECM 複合体を剥離した日を Day0 (細胞シート)、剥離1日後を Day1、剥離3日後を Day3 (C-MSCs) とし、各時点で細胞集塊として回収し、解析を行った。

3. フローサイトメトリー (FCM) 解析

Day0 (細胞シート) の MSCs/ECM 複合体に、37°Cで20分間 accutase (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) 処理を施し、サンプルの回収を行った。細胞混濁液を得るために、回収したサンプルを 70 μm セルストレーナー (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) で濾過した。1% FBS (Hyclone, Logan) /PBS 溶液で1時間ブロッキングし、PBS で洗浄後、得られた細胞に抗体を4°Cで1時間反応させた。抗体として PE 標識抗ヒト CD105 マウスモノクローナル抗体 (SN6; 1:100; eBioscience, San Diego, CA, USA)、PE 標識抗ヒト CD90 マウスモノクローナル抗体 (5E10; 1:100; BD pharmingen, Franklin lakes, NJ, USA)、PE 標識抗ヒト CD73 マウスモノクローナル抗体 (AD2; 1:100; BD pharmingen)、PE 標識抗ヒト CD45 マウスモノクローナル抗体 (HI30; 1:100; BD pharmingen)、PE 標識抗ヒト CD34 マウスモノクローナル抗体 (563; 1:100; BD pharmingen) および PE 標識アイソタイプ・コントロール抗体 (MOPC-21; 1:100; BD pharmingen) を反応させた。PBS で洗浄後、FACScan flow cytometer (BD Biosciences) と Cell Quest software (BD Biosciences) を用いて解析を行った。

4. 組織学的解析

1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

Day 0, 1, 3 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、8 μm の厚さで薄切した。パラフィン切片を脱パラフィン後、HE

染色を行い、光学顕微鏡（ECLIPSE E600W; ニコン、東京）で観察した。

2) 蛍光免疫染色

Day 3 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後、30% スクロース溶液で置換した。C-MSCs を OCT コンパウンド（Sakura Finetek USA, Torrance, CA, USA）に包埋後、クライオスタットを用いて厚さ 20 μm で薄切し凍結切片を作製した。切片を 1 時間風乾させ、PBS で洗浄後、0.5% TRITON X-100（Sigma-Aldrich）/PBS 溶液を用いて透過化した。PBS で洗浄し、5% BSA/0.1% TWEEN 20/PBS 溶液を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。切片を PBS で洗浄後、一次抗体を 4°C で一昼夜反応させた。一次抗体として、抗ヒト I 型コラーゲン（ヒト COL I）ラビットモノクローナル抗体（EPR7785; 1:100; abcam, Cambridge, UK）、抗ヒトオステオポンチン（ヒト OPN）ヤギポリクローナル抗体（1:100; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）、抗ヒトオステオカルシン（ヒト OCN）マウスモノクローナル抗体（OCG3; 1:100; abcam, Cambridge, UK）を反応させた。反応終了後、切片を PBS で洗浄し、二次抗体を室温で 5 時間反応させた。二次抗体として、Alexa Fluor 488 抗ラビット IgG 抗体（1:100; ThermoFisher, Waltham, MA, USA）、Alexa Fluor 594 抗マウス IgG 抗体（1:100; ThermoFisher）または Alexa Fluor 594 抗ヤギ IgG 抗体（1:100; ThermoFisher）を反応させた。反応終了後、切片を PBS で洗浄し、細胞核を 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）solution（1:200; 同仁化学研究所、熊本）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。各タンパク発現及び細胞核を共焦点レーザー顕微鏡（Olympus FV1000D laser scanning confocal microscope; オリンパス、東京）を用いて観察した。

5. アポトーシス細胞の検出

Day 3 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。試料をパラフィンに包埋し、20 μm の厚さで薄切した。パラフィン切片を脱パラフィン後、DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA) を用いてアポトーシス細胞を検出した。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。アポトーシス細胞及び細胞核は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

第2章 第2項に記載した方法で Xeno-free 条件下に C-MSCs を作製した。MSCs/ECM 複合体を得るために、MSCs を Prime-XV MSC expansion XSFM で4日間培養した後、鈍的に剥離した (図 1A-a)。ウェルから細胞シートの状態で剥離した MSCs/ECM 複合体を MSCgo Osteogenic-SF, XF medium にて球状になるまで3日間培養したところ、細胞集塊 C-MSCs を得ることができた (図 1A-b)。Xeno-free 条件下での培養が MSCs の性質に影響を与えるかを確認するために、FCM 解析によって MSC マーカーの発現率を評価したところ、MSC 陽性マーカーである CD105、CD90、CD73 はいずれも 93%以上の高い発現が確認された。一方、MSC 陰性マーカーである CD45、CD34 を発現する細胞はほとんど認められなかった (図 1B)。このことから、Xeno-free 条件下の培養において、C-MSCs の MSC 特性は維持されている可能性が示唆された。HE 染色によって、剥離した MSCs/ECM 複合体は時間経過依存的に収縮し、集塊構造を形成していくことが確認された (図 1C)。C-MSCs におけるアポトーシスを評価するため TUNEL 染色を行ったところ、顕著な数の TUNEL 陽性細胞は観察されず、重篤なアポトーシスは生じていなかった (図 1D)。C-MSCs の ECM 発現について蛍光免疫染色を行ったところ、C-MSCs は豊富

なヒト COL I で構成されていることが観察された。一方で、非コラーゲン性骨基質関連タンパクであるヒト OPN とヒト OCN の発現は確認されなかった (図 1E)。

第 2 節 Xeno-free/Serum-free 条件下で作製した C-MSCs の骨組織再生能の検討

第 1 項 概要

Xeno-free/Serum-free 条件下で作製した 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 (7-8 週齢, Charles River Laboratories Japan, 横浜) 72 匹を用いた。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、メデトミジン (ドミツール、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、消毒後に 15c 番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。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。骨欠損に対して C-MSCs を 1 つ移植し、4-0 絹糸で縫合した。なお、骨欠損に何も移植しなかった群を非移植群とした。

2. micro CT 解析法

細胞移植後 1, 2, 4, 8 週目でマウスを屠殺し、頭蓋骨を回収後に 4% パラホルムアルデ

ヒド溶液で固定した。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 μm 、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 600 μm (33 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 [36]。

3. HE 染色

細胞移植後 1, 2, 4, 8 週目でマウスを屠殺。頭蓋骨を回収後に 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、前頭断方向に 8 μm の厚さで薄切した。パラフィン切片を脱パラフィン後、HE 染色し、光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W; ニコン) で観察した。

4. 統計解析

Student の t 検定を用いて 2 群間の差の統計解析を行った。

第 3 項 結果

micro CT (前頭断単層及び水平断 3D 構築画像) 撮影を行ったところ、非移植群では、頭蓋冠欠損作製 8 週間後まで、欠損部に石灰化物の形成はほとんど観察されなかった (図 2B)。この所見と一致して、HE 染色像では、その欠損部に薄い線維性組織が認められるのみであった (図 2D)。一方で、C-MSCs 移植群では時間依存的に欠損部に明らかな石灰化物の形成を認めた (図 2B, C)。HE 染色像では、移植 1 週後では欠損部に、移植した C-MSCs 由来と思われる多くの細胞と線維性の基質構造を確認した (図 2E)。移植 2 週後では基質構造の凝集と、断端部辺縁に軽微な骨組織添加を確認した (図 2E)。注目すべきことに、移植 4 週後では欠損中央部に周囲骨と同等のエオジン染色性を示す未熟な骨様組織の形成と、骨

断端部と連続する周囲からの骨様組織の形成が確認されるようになった (図 2E)。そして、移植 8 週後では欠損部を覆うように、内部に骨髄様構造を含む骨様組織の形成が確認された (図 2E)。

第 3 節 小 括

Xeno-free 条件下に C-MSCs を作製することは可能であった。さらに、C-MSCs の移植は骨組織を効果的に再生することが明らかとなった。

第3章 C-MSCs の骨組織再生機序の解析

第1節 C-MSCs 移植による骨組織再生過程におけるドナー細胞と宿主細胞の分布解析

第1項 概要

C-MSCs 移植による骨組織再生過程におけるドナー細胞と宿主細胞の分布を解析するため、ヒト vimentin 特異的抗体を用いた染色を行い、移植したドナー細胞を経時的に追跡した。

第2項 材料と方法

1. 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 1, 2, 4, 8 週目の頭蓋骨のパラフィン包埋を行い、その後、前頭断方向に 20 μm の厚さで薄切した。パラフィン切片を PBS で洗浄後、5% BSA/0.1% TWEEN 20/PBS 溶液を用いて室温で 1 時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 5 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。骨欠損中央部、辺縁部 (両側)、そして中間部 (両側) の 5 か所についてヒト vimentin 陽性ドナー細胞数と、ヒト vimentin 陰性宿主細胞数を計測した。結果を平均し、各回収段階での細胞数の定量を行った。

2. 統計解析

第2章 第2節 第2項 4. に記載した方法で行った。

第3項 結果

移植1週目では、欠損部は移植した C-MSCs 由来であることを示すヒト vimentin 陽性のドナー細胞で満たされていた (図 3A)。その後、時間経過依存的にドナー細胞数は減少したが、移植4週間または8週間後に欠損中央部に形成された骨様組織内部の細胞はヒト vimentin 陽性を示したことから、移植したドナー細胞は骨形成細胞に分化している可能性が示された (図 3A, B)。一方で、断端部辺縁から欠損部を覆うように形成された骨様組織内部はヒト vimentin 陰性の宿主細胞により構成されていた。以上の結果から、移植されたドナー細胞と宿主細胞はともに骨形成誘導に寄与していることが示唆された。

第2節 新生骨様組織の骨質の解析

第1項 概要

骨欠損部に形成された新生骨様組織の骨質の解析のため、骨成熟度の評価を行い、さらに、沈着した骨基質がドナー由来か宿主由来かを評価した。また、新生骨様組織内の細胞が骨細胞まで分化し、機能的な骨組織を構築することができるか評価した。

第2項 材料と方法

1. Azan 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1, 2, 4, 8週目の頭蓋骨のパラフィン包埋を行い、その後、前頭断方向に8 μm の厚さで薄切した。脱パラフィン後、10% トリクロロ酢酸・重クロム酸カリウム混合液 (ナカライテスク、京都) で8分間前

処理した後、アゾカミン G (ナカライテスク) で 30 分間染色した。切片をアニリンエタノールと 1% 酢酸エタノールで洗浄した後、5% リンタングステン酸水溶液 (ナカライテスク) に 3 分間浸漬した。さらに、切片をアニリン青・オレンジ G 混合液 (ナカライテスク) で 5 分間浸漬し染色した。

2. 蛍光免疫染色法

1) ヒト骨基質関連タンパクの免疫染色法

ヒトCOL I、ヒトOPN、ヒトOCNの発現を確認するため蛍光免疫染色を行った。第2章第2節 第2項 3. で記載した方法に従い、移植後1, 2, 4, 8 週目の頭蓋骨のパラフィン包埋を行い、その後、前頭断方向に20 μ mの厚さで薄切した。PBSで洗浄後、LAB solution (Polyscience, Warrington, PA, USA) を用いて室温で15分間処理し、抗原賦活化を行った。切片をPBSで洗浄後、5% BSA/0.1% Tween 20/PBS溶液を用いて室温で1時間ブロッキングした。ヒトOCNの染色では、ブロッキングの直前にMouse on Mouse blocking reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて室温で1時間前処理を行った。切片をPBSで洗浄後、一次抗体を4°Cで一昼夜反応させた。一次抗体として、抗ヒトCOL I ラビットモノクローナル抗体 (EPR7785; 1:100; abcam)、抗ヒトOPN ヤギポリクローナル抗体 (1:100; R&D Systems)、抗ヒトOCN マウスモノクローナル抗体 (OCG3; 1:100; abcam) を反応させた。反応終了後、切片をPBSで洗浄し、二次抗体を室温で5時間反応させた。二次抗体として、Alexa Fluor 488 抗ラビットIgG抗体 (1:100; ThermoFisher)、Alexa Fluor 594 抗マウスIgG抗体 (1:100; ThermoFisher) または Alexa Fluor 594 抗ヤギIgG抗体 (1:100; ThermoFisher)を反応させた。反応終了後、切片をPBSで洗浄し、Vector® TrueVIEW Autofluorescence Quenching kit (Vector) を用いて5分間処理することで血球系の自然発光をマスキングした。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。

2) 骨細胞の免疫染色法

骨細胞の細胞突起構造を確認するためF-actinの染色を行い、さらにそれらがドナー細胞由来か宿主細胞由来かを確認するためヒトvimentinの2重染色を行った。移植後1, 2, 4, 8 週目の頭蓋骨を回収し、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、30% スクローソ溶液で置換した。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20 μm で薄切し凍結切片を作製した。骨凍結切片をPBSで洗浄後、1時間風乾させた。PBSで洗浄後、5% BSA/0.1% TWEEN 20/PBS 溶液を用いて室温で1時間ブロッキングした。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) と、Alexa 594 phalloidin (1:50; ThermoFisher) を室温で5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。さらに、骨細胞ネットワーク構造を可視化するため、Z軸に0.5 μm の厚さで40スライスの断層撮影を行い、FV10-ASW image software 04.02.03.06 (Olympus) を用いて3D画像構築を行った。

第3項 結果

移植 1 週間および 2 週間後では、欠損部にアニリンブルーに青く染色される幼弱な基質を認め、ヒト COL I の染色像と一致することから、移植した C-MSCs 由来の基質であることが示された。一方で、この段階では C-MSCs 構造内部にヒト OPN、ヒト OCN の発現は確認されなかった (図 4A)。注目すべきことに、移植 4 週間後では、中央部に形成された骨様組織内部にアゾカルミン G、オレンジ G に赤く染色される密な基質構造を認めるようになり、移植 8 週間後にはその範囲の拡大が観察された (図 4A)。一方で中央部の骨様組織を覆うように断端部辺縁から形成された骨様組織内部は、欠損部周囲と同程度の密な基質により構成されていた (図 4A)。また、移植 4 週間後および 8 週間後に中央部に形成された骨様組織内部には、ヒト COL I、ヒト OCN、ヒト OPN の沈着が確認されたことから、ドナー細胞が分泌した骨基質関連タンパクが骨再生に寄与していることが示された (図 4A)。以上の結果から、移植後 2 週間から 4 週間までの間にドナー細胞の骨分化と、ホスト細胞による骨形成誘導が進行していることが確認されたため、この 2 つの回収ポイントで細胞の形態学的解析を行い、骨様組織内部の細胞が骨細胞まで分化し、真に骨組織として機能できているのか確認することとした。移植 2 週間後では、ヒト vimentin 陽性で示される C-MSCs 内部の細胞は紡錘状形態をとっており、骨細胞は認められなかった (図 4B-(b))。一方で、C-MSCs 構造の外周はストレスファイバー形態の F-actin をもつヒト vimentin 陽性細胞で覆われていた。このことから、移植 2 週間後には C-MSCs 構造の内部は強固な基質で構成されるようになっている可能性が示唆された。さらにその表面には立方状形態で示されるヒト vimentin 陰性のホスト骨芽細胞様細胞を確認した (図 4B-(a))。移植 4 週間後では、欠損部に形成された骨様組織内部に、周囲に細胞突起を伸ばしネットワーク形成をする骨細胞が観察された。注目すべきことに、欠損辺縁から形成された骨組織内部はヒト vimentin 陰性のホスト骨細胞から (図 4B-(c))、そして、欠損中央部に形成された骨組織内部には、C-MSCs 由来と思われるヒト vimentin 陽性のドナー骨細胞によって構成されていた (図 4B-

(d)。これらの結果から、C-MSCs は移植先で自ら骨分化を起こすとともに、ホストの骨形成誘導を介して骨組織再生を促進することが示唆された。

第 3 節 脱細胞処理を行った C-MSCs の骨組織再生能の検討

第 1 項 概要

C-MSCs は細胞と細胞の足場となる豊富な ECM から構成される移植体であるため、ドナー細胞成分がなくともホスト細胞が C-MSCs の ECM を足場として利用することで骨再生を誘導できる可能性がある。この仮説を検証するため、脱細胞処理を行った C-MSCs を骨欠損に移植し骨再生効果を評価することとした。

第 2 項 材料と方法

1. C-MSCs の脱細胞処理法

C-MSCs を -80°C で凍結した後、室温で解凍する操作を 4 回繰り返した。そして、 25 mM NH_4OH 水で 1 時間処理し、MilliQ 水で洗浄することで脱細胞処理を行った [37]。以下、脱細胞処理を行った C-MSCs を Decell-C-MSCs と表記する。

2. Decell-C-MSCs の性質評価

1) HE 染色

第 2 章 第 1 節 第 2 項 4. 1) に記載した方法で行った。

2) 蛍光免疫染色

第 2 章 第 1 節 第 2 項 4. 2) に記載した方法でヒト I 型コラーゲンの染色を行った。

3) 変性コラーゲン染色

第2章 第1節 第2項 4. 2) に記載した方法で、Decell-C-MSCs の凍結切片を作製した。凍結切片を1時間風乾させ、PBS で洗浄後、5-FAM-conjugated Collagen Hybridizing Peptide (F-CHP) (3Helix, Inc., Salt Lake City, UT, USA) /PBS 溶液を 15 μ M の濃度で 4°C、一昼夜反応させた。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。また、95°Cの熱湯で30分間熱処理した C-MSCs を変性コラーゲンの陽性コントロールとして設定し、同様に染色を行った。

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

第2章 第2節 第2項 1. に記載した方法で、Decell-C-MSCs の移植を行った。

4. micro CT 解析法

第2章 第2節 第2項 2. に記載した方法で行った。

5. 組織学的観察

1) HE 染色

第2章 第2節 第2項 3. に記載した方法で行った。

2) Azan 染色

第3章 第2節 第2項 1. に記載した方法で行った。

3) 蛍光免疫染色

第3章 第1節 第2項 1. に記載した方法でヒト vimentin の染色を行い、第3章 第2節 第2項 2. 1) に記載した方法でヒト骨基質関連タンパクの染色を行った。

6. 統計解析

第2章 第2節 第2項 4. に記載した方法で行った。

第3項 結果

脱細胞処理の効果を組織学的に観察するために HE 染色を行ったところ、C-MSCs と比較し、Decell-C-MSCs では核の消失と、細胞質が除去されることによるエオジン染色性の低下が確認された (図 5A)。一方で、COL I に対する免疫染色を行ったところ、C-MSCs と Decell-C-MSCs の間でその発現に明らかな変化は確認されなかった。さらに、F-CHP を用いて変性コラーゲンの染色を行ったところ、陽性コントロールとして設定した熱処理後の C-MSCs では明らかなコラーゲン変性が確認されたのに対し、C-MSCs と Decell-C-MSCs ではともにコラーゲン変性は確認されなかった (図 5A)。以上のことから、Decell-C-MSCs ではコラーゲン基質を変性させることなく、細胞成分のみを除去できていることが示された。次に、Decell-C-MSCs を SCID マウス頭蓋冠骨欠損に移植した (図 5B)。micro CT 撮影を行ったところ、移植後 8 週まで経過しても欠損部に石灰化物の形成はほとんど認められなかった (図 5C, D)。組織学的評価を行ったところ、移植 1 週間後では欠損部に Decell-C-MSCs 由来と思われるヒト COL I 陽性の基質構造を確認した。しかし、その後に骨組織形成が誘導されることはなく、基質は時間経過依存的に代謝されていった (図 5E)。注目すべきことに、移植 1 週間後において、ヒト vimentin 陰性の宿主細胞が Decell-C-MSCs 由来基質の中に入り込んでいる像が確認されたが、その後に骨組織形成が開始されることはなく、移植 8 週間後では、欠損部に疎な結合組織を認めるのみであった (図 5E)。以上の結果から、宿主細胞は C-MSCs の基質のみを足場にして、骨形成を誘導することは困難であり、C-MSCs がドナー細胞とその足場となる豊富な基質から構成される移植体であることの重要性が示唆された。

第4節 小括

C-MSCs を骨欠損部に移植すると、欠損中央部では C-MSCs 自身の骨分化が、欠損辺縁部からはホストの骨組織形成が誘導され、さらに経過するとこれらが連動して骨組織の再生に寄与することが示された。また、C-MSCs 移植による骨組織再生効果は、C-MSCs を構成する基質のみでは発揮することはできず、C-MSCs がドナー細胞とその足場となる豊富な基質から構成される移植体であることの重要性が示唆された。

第4章 考察

本研究では、Xeno-free 条件下に作製したヒト 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。そして、欠損部に形成された新生骨の一部にはドナー細胞由来のヒト骨基質関連タンパクの沈着を認め、その内部はドナー骨細胞により構成されていた。一方で、辺縁から形成された、より成熟度の高い骨組織の内部はホスト骨細胞のみから構成されていた。このことから、C-MSCs 移植による骨再生にはドナー細胞の骨分化と、ホスト細胞による骨形成誘導の両方が寄与していることが示唆された。現在までのところ、移植した MSCs の骨組織再生機序については未だ議論の対象であり、移植体毎に見解は統一されていない [38]。例えば、Linero らは、脂肪由来 MSCs とその培養上清をハイドロゲルとともにラビット顎骨骨欠損に移植することで骨組織を再生させたが、その際に移植されたドナー細胞自身は完全に消失していることを報告している [39]。このことは MSCs のパラクライン効果によって、骨組織再生が誘導されたことを示している。一方で、Li らは骨髄由来 MSCs を骨形成不全症マウスモデルの大腿骨に注入することでドナー細胞の骨分化が起こることを報告している。また同時に、移植したドナー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も推察している [40]。最近の研究では、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ドナー細胞自身の骨分化とホスト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 [41]。この報告と一致して、Xeno-free 条件下に骨分化誘導を施した C-MSCs は、ドナー細胞自身の骨分化とホスト細胞の骨形成誘導促進の両方の骨再生機序によって骨再生を誘導した。移植体毎の細胞腫、細胞の分化程度、移植方法などの様々な要素が移植先での MSCs の挙動を解析することを妨げているのかもしれない。

Decell-C-MSCs の移植は欠損部に細胞の足場となる豊富な I 型コラーゲン基質を供給したが、ホスト細胞はその基質を足場に骨基質を形成することはなかった (図 5)。このことは、C-MSCs 移植によるホストの骨組織形成誘導には、移植したドナー細胞からのパラクライン因子が必要であった可能性を示唆する。実際、bone morphogenetic protein (BMP) - 2 を発現した MSCs の移植がマウス骨折モデルに骨組織再生を誘導した報告がある [34, 42]。さらに、Zhou らは骨分化誘導培地で培養したヒト MSCs をマウス頭蓋冠骨欠損モデルに移植すると、MSCs が vascular endothelial growth factor (VEGF) -A を分泌することによって、ホスト細胞の骨分化を促し、その結果、骨再生を誘導することを報告している [43]。C-MSCs 移植によるホストの骨形成誘導には、これら BMP や VEGF-A などの骨形成/血管誘導性のパラクライン因子が寄与している可能性が考えられる。

一方で、C-MSCs による骨組織再生において、ホストマウス細胞がドナーヒト細胞の骨分化を誘導している可能性も考えられる。C-MSCs 移植の 2 週間後において、移植した C-MSCs の表面に立方状の形態を示すホスト骨芽細胞様細胞が確認され、その後、移植 4 週間後においてドナー由来骨基質蛋白の沈着とドナー細胞の骨細胞への分化が起こった (図 4)。骨芽細胞が骨形成のために様々な骨形成因子を分泌し、石灰化基質を内部に蓄えることは以前から知られており [44]、C-MSCs 移植による骨組織形成過程でもホスト骨芽細胞が移植されたドナー細胞の骨分化を促進した可能性がある。つまり、C-MSCs による骨組織再生は移植したドナー細胞とホスト細胞が連動して働くことで達成されると考えられる。今後、ドナー細胞もしくはホスト細胞からのパラクライン因子の探索について、さらなる研究が必要である。

これまでに MSCs を用いた骨組織再生治療について多くの研究がなされているが、それらのほとんどは人工足場材料を利用したものである。移植した細胞の骨再生能を向上させる生体適合性人工材料の技術は確立しつつある [45, 46] が、骨再生を誘導するには、こうした人工材料は再生過程において移植先の細胞に代謝される必要がある。この代謝過程は

細胞に負担をかけ、骨再生を遅延させる可能性がある。一方で C-MSCs では、人工材料を用いることなく、細胞の足場として細胞自身が産生した COL I を利用している。COL I は骨再生に必須の基質蛋白であることが知られおり [47]、人工足場材料のように代謝される必要がないことから、細胞は直接骨形成に寄与することができる。実際に、移植した C-MSCs には骨基質蛋白の沈着とドナー細胞の骨細胞分化が起こり、膜性骨化様の骨形成を誘導することができた。人工足場材料を利用した移植では、こうした骨形成過程は生じないかもしれない。

未だ C-MSCs 移植を四肢骨折等の大規模骨欠損へ応用した例はない。私たちは以前に、48 個の C-MSCs をビーグル犬根分岐部Ⅲ級欠損モデルに移植し、歯周組織を効果的に再生させた [31] が、脛骨の完全骨折にはさらに多く (200 個～300 個) の C-MSCs が必要になると思われる。大規模欠損において、移植された C-MSCs が保持され、骨形成能を發揮できるかはまだ不明である。今後、多量の C-MSCs を欠損部に保持させるには、C-MSCs の骨形成能を抑制しない人工材料との併用は必要となるかもしれない。

以前から、細胞移植治療法において FBS は MSCs の性質を維持し、拡大培養するために頻繁に利用されてきた。実際に、Lalu らは MSCs を用いた 36 例の臨床研究のうち、27 例で FBS が使用されていたことを報告している [48]。しかし、異種動物由来成分の利用は未知の感染源を伝播させる可能性がある他に、様々な副作用やリスクを孕むことが認知されてきている。一方、患者自己血清を利用することで FBS の使用を避けることができるが、自己血清を分離する際の患者負担が大きいことが未だ問題となる。つまり、感染リスクや患者負担を軽減させることのできる Xeno-free/Serum-free 条件下での MSCs の培養は、臨床的にも科学的にも理想的であると考えられる。本研究において、私たちは C-MSCs の培養に既製品の Xeno-free 培養液を採用した。Xeno-free 条件下に作製した C-MSCs は、従来の FBS を用いて作製した C-MSCs [30, 32, 49] と同等の骨組織再生効果を發揮した。重要なことに、私たちはこれまでに、IFN- γ 処理されたヒト C-MSCs が高い免

疫制御能を発揮し、他家移植にも有用であること [32]、さらに Xeno-free 凍結保存剤で凍結保存した C-MSCs が解凍後も細胞生存を維持し、効果的な骨再生能を発揮すること [49] を明らかにしてきた。そこで、これらを組み合わせることによって、事前に Xeno-free 条件下で他家 MSCs から C-MSCs を量産・備蓄することが可能となれば、Cell processing center (CPC) のような特別な設備を有さない病院であっても外部にオーダーするだけで、必要な数の調整された C-MSCs を既製品の細胞製剤として速やかに移植することが可能な、新規骨/歯周組織再生治療法の開発に貢献すると言える。

第5章 総括

C-MSCs を用いた歯周組織再生療法の臨床応用を目指し、Xeno-free/Serum-free 条件下に C-MSCs を作製し、骨組織再生機序の解析を行った。すなわち、Xeno-free/Serum-free 条件下に作製したヒト 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 構成細胞と ECM の組織内分布を評価し骨組織再生機序の解析を行い、以下の結果を得た。

- 1) Xeno-free/Serum-free 条件下に作成した C-MSCs は、従来の FBS 使用下に作製した C-MSCs と同様に、重篤な細胞死を認めず、細胞の足場となる豊富な I 型コラーゲンによって構成されていた。
- 2) C-MSCs の移植は SCID マウス頭蓋冠骨欠損を効果的に再生した。
- 3) C-MSCs の移植による骨組織再生機序は、欠損部におけるドナー細胞自身の骨分化とホスト細胞の骨形成誘導促進によるものであることが示唆された。
- 4) ホスト細胞は C-MSCs の基質のみを足場に骨組織形成を誘導することはできず、C-MSCs がドナー細胞と足場となる細胞自身が産生した豊富な基質からなる移植体であることの重要性が示唆された。

以上のことから、Xeno-free/Serum-free 条件下に作成した C-MSCs は、生体内で自らが骨分化し、さらにホスト細胞の骨形成誘導を介し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. Poisson, 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).
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**.
 33. Nilsson, S.K., et al., *Cells capable of bone production engraft from whole bone marrow transplants in nonablated mice.* Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(4): p. 729-734.
 34. Granero-Molto, F., et al., *Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing.* Stem Cells, 2009. **27**(8): p. 1887-1898.
 35. Tasso, R., et al., *The recruitment of two consecutive and different waves of host stem/progenitor cells during the development of tissue-engineered bone in a murine model.* Biomaterials, 2010. **31**(8): p. 2121-2129.
 36. 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.
 37. Lu, H., et al., *Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012. **100A**(9): p. 2507-2516.
 38. Shao, J., W. Zhang, and T. Yang, *Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing.* Biological Research, 2015. **48**.
 39. Linero, I. and O. Chaparro, *Paracrine Effect of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue in Bone Regeneration.* Plos One, 2014. **9**(9).

40. 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.
41. 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.
42. Ren, G., et al., *Concise Review: Mesenchymal Stem Cells and Translational Medicine: Emerging Issues*. *Stem Cells Translational Medicine*, 2012. **1**(1): p. 51-58.
43. 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.
44. Han, Y., et al., *Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts*. *Bone Research*, 2018. **6**.
45. Sobacchi, C., et al., *3D Bone Biomimetic Scaffolds for Basic and Translational Studies with Mesenchymal Stem Cells*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. **19**(10).
46. Przekora, A., *Current Trends in Fabrication of Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration: Materials Modifications and Biophysical Stimulations*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. **20**(2).
47. Leeming, D.J., et al., *Is bone quality associated with collagen age? Osteoporosis International*, 2009. **20**(9): p. 1461-1470.
48. Lalu, M.M., et al., *Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials*. *Plos One*, 2012. **7**(10).
49. 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**.

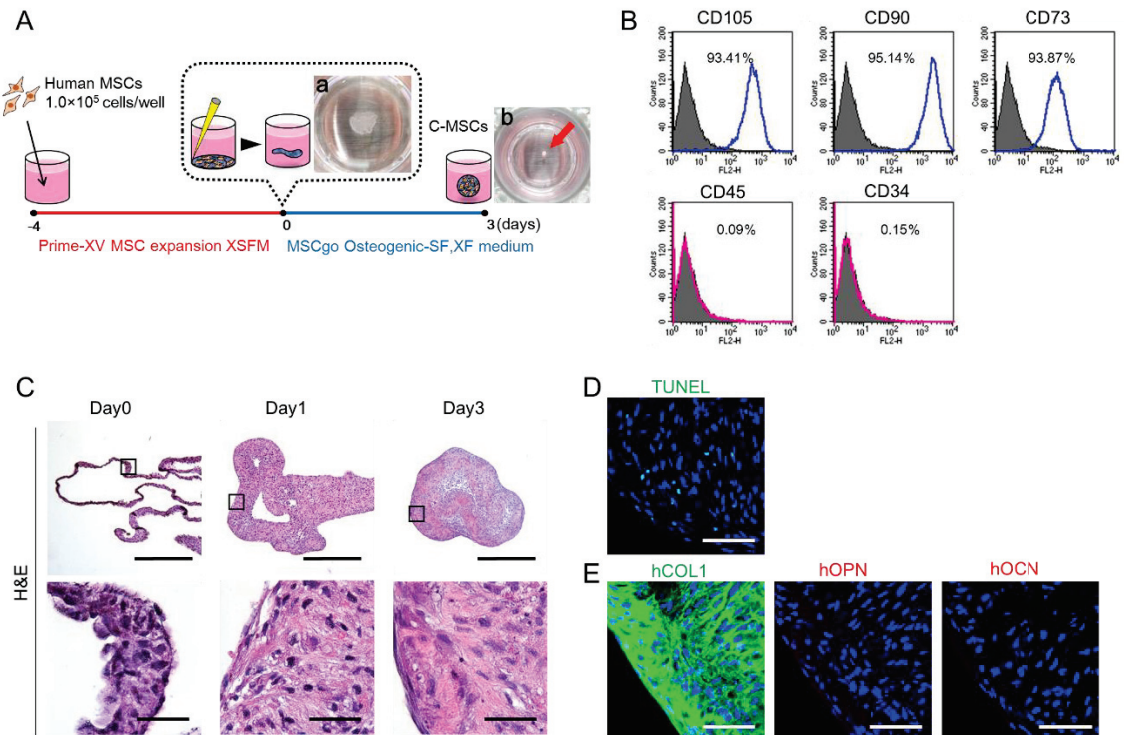


図1 Xeno-free/Serum-free 条件下での C-MSCs 作製。

(A) C-MSCs の作製過程の模式図を示す。a: Day0 (細胞シート) の肉眼所見。b: Day3 (C-MSCs) の肉眼所見。(B) Day0 (細胞シート) でサンプルの回収を行い、フローサイトメトリーを用いて MSC マーカーの発現を観察した。青もしくは赤線のヒストグラムは CD105, CD90, CD73, CR45, または CD34 陽性細胞を示す。灰色のヒストグラムはアイソタイプ・コントロール IgG を反応させた細胞を示す。(C) Day0, Day1, Day3 で C-MSCs を回収し、H&E 染色を行った。上段は弱拡大像 (スケールバー=500 μm)、下段は強拡大像 (スケールバー=50 μm) を示す。(D&E) Day3 で C-MSCs を回収し、固定後に連続切片を作製し、染色を行った。(D) TUNEL 染色の組織像。 TUNEL 陽性細胞 (緑)、細胞核 (青) (スケールバー=50 μm)。 (E) 骨基質関連タンパクの免疫染色像。 ヒト I 型コラーゲン (hCOL I) (緑)、ヒトオステオポンチン (hOPN) (赤)、ヒトオステオカルシン (hOCN) (赤)、細胞核 (青) (スケールバー=50 μm)。

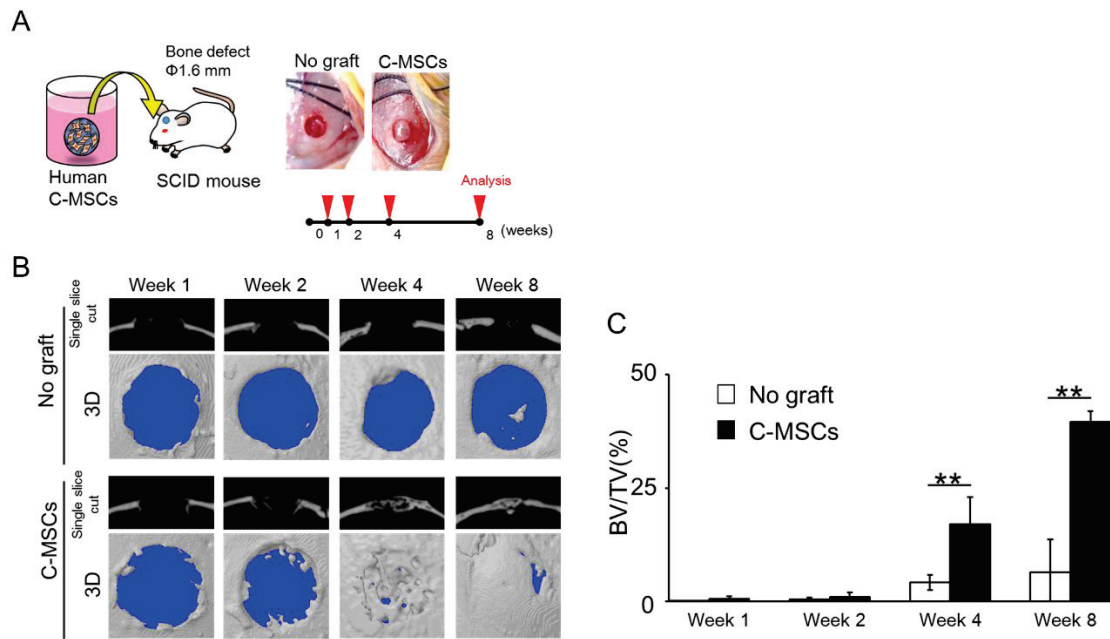


図2 Xeno-free/Serum-free 条件下で作製された C-MSCs の移植はマウス頭蓋骨を再生する。

(A) C-MSCs 移植過程の模式図を示す。C-MSCs を人工足場材料を用いずに、SCID マウス頭蓋冠 1.6 mm 欠損に移植した。コントロールとして非移植群を設定した。(B) 移植 1, 2, 4, 8 週間後の micro CT 画像。(C) 移植 1, 2, 4, 8 週間後の骨欠損部における再生骨量 (BV) / 全体組織量 (TV)。エラーバーは S.D. 値を示す。 ** $P < 0.01$

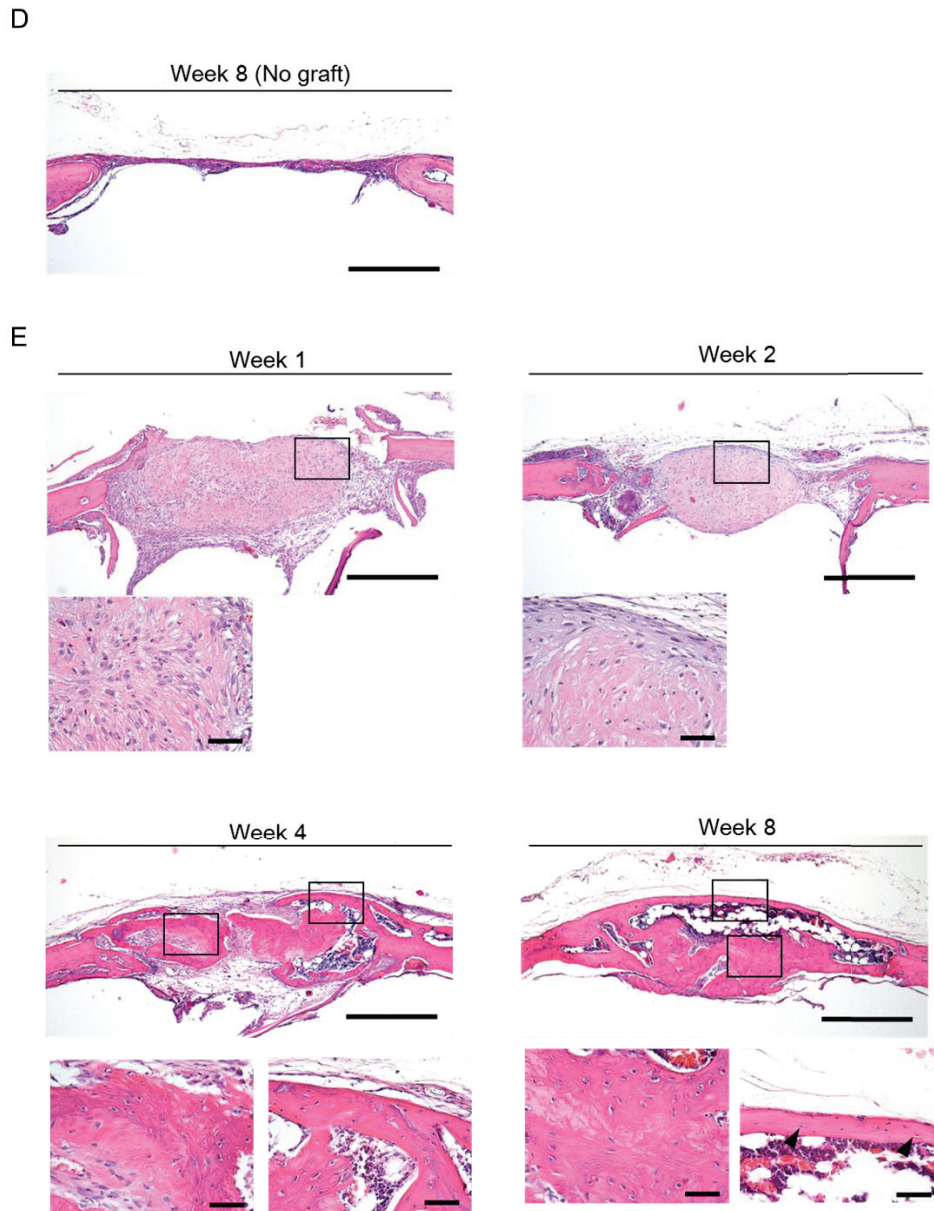


図2 Xeno-free/Serum-free 条件下で作製された C-MSCs のマウス頭蓋冠骨欠損移植後の組織像。

(D&E) 移植 1, 2, 4, 8 週間後にマウスを屠殺し、頭蓋骨を回収後に固定した。前頭断で切片を作製し、H&E 染色を行った。(D) 移植 8 週後の非移植群 (スケールバー=500 μm)。

(E) 移植 1, 2, 4, 8 週後の C-MSCs 移植群 (スケールバー=500 μm)。下段にボックス領域の強拡大像を示す (スケールバー=50 μm)。

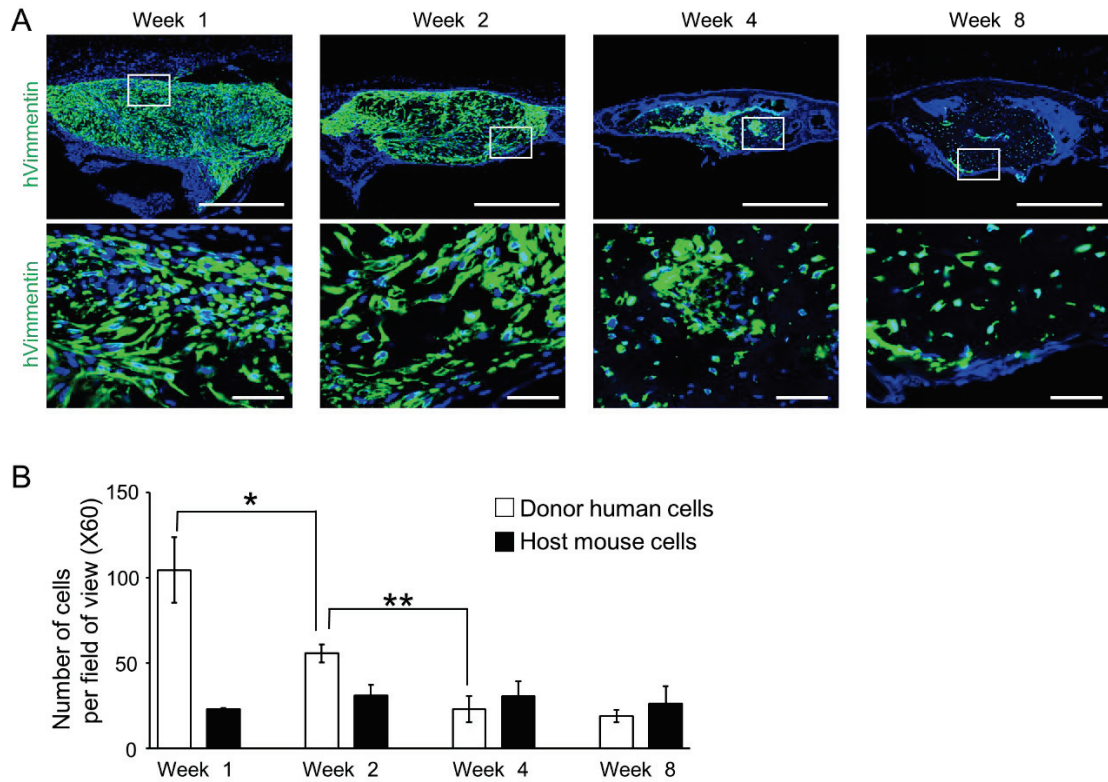


図3 C-MSCs 移植部における移植されたドナー細胞とホスト細胞の分布。

(A) 移植 1, 2, 4, 8 週間後にマウスを屠殺し、頭蓋骨を回収後に固定した。前頭断で切片を作製し、ヒト vimentin に対する蛍光免疫染色を行った。ヒト vimentin (hVimentin) (緑)、細胞核 (青)。上段は弱拡大像 (スケールバー=500 μm)、下段は強拡大像 (スケールバー=50 μm) を示す。(B) 骨欠損中央部、辺縁部 (両側)、中間部 (両側) の 5 か所について、ヒト vimentin 陽性ドナー細胞数とヒト vimentin 陰性ホスト細胞数を計測した。結果を平均し、細胞数の定量を行った。エラーバーは S.D. 値を示す。 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

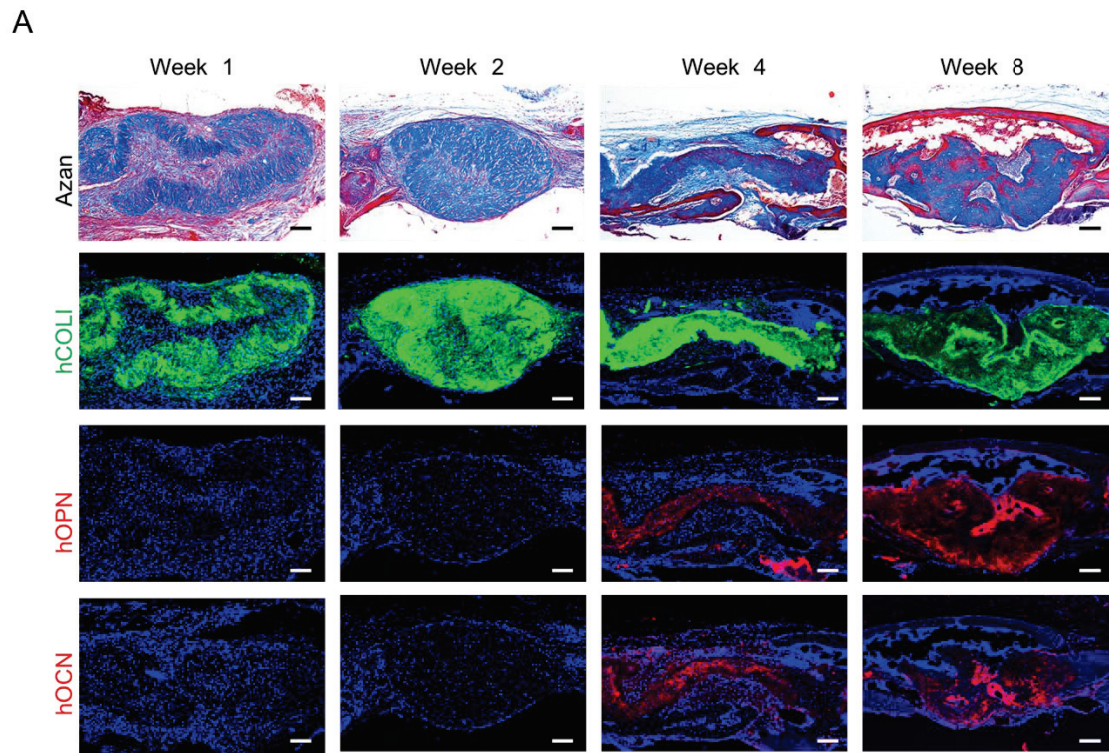


図4 C-MSCs 移植部における骨基質関連タンパクの発現。

(A) 移植 1, 2, 4, 8 週間後にマウスを屠殺し、頭蓋骨を回収後に固定した。前頭断で切片を作製し、Azan 染色とヒト骨基質関連タンパクの免疫染色を行った。ヒト I 型コラーゲン (hCOL I) (緑)、ヒトオステオポンチン (hOPN) (赤)、ヒトオステオカルシン (hOCN) (赤)、細胞核 (青)。上段は弱拡大像 (スケールバー=200 μm)、下段は強拡大像 (スケールバー=50 μm) を示す。

B

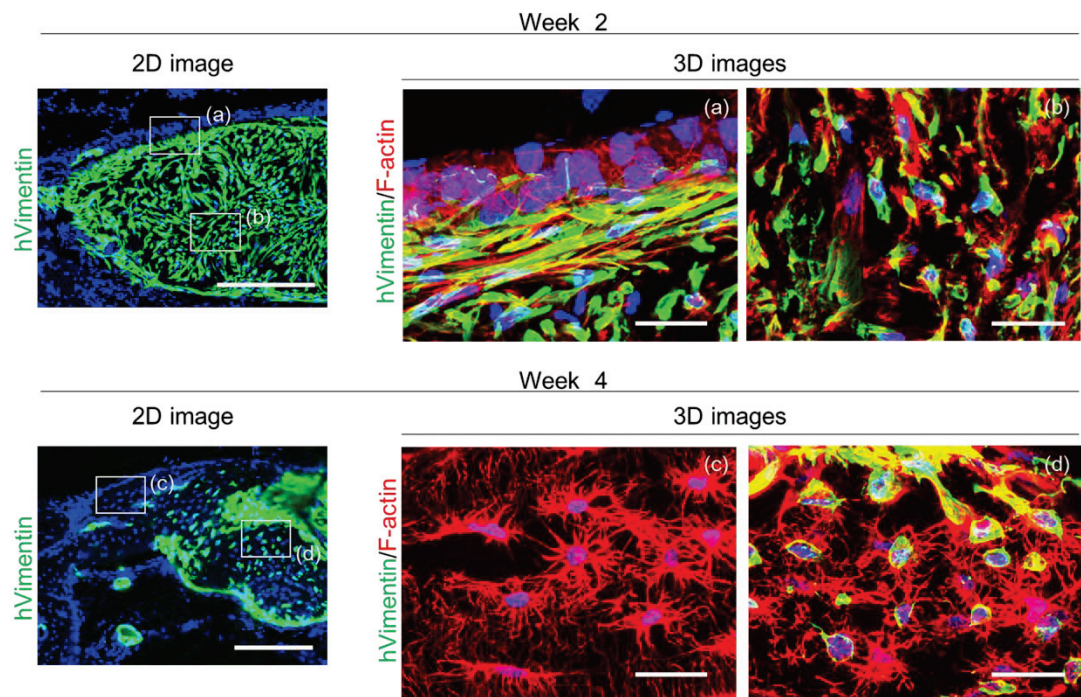


図4 C-MSCs 移植部における骨細胞形態解析。

(B) 移植 2 週間または 4 週間後にマウスを屠殺し、頭蓋骨を回収後に固定した。クライオスタットを用いて前頭断で凍結切片を作製し、ヒト vimentin と F-actin の染色を行った。ヒト vimentin (hVimentin) (緑)、 F-actin (赤)、細胞核 (青)。左に弱拡大像 (スケールバー=250 μm)、右にボックス領域 (a, b, c, d) の強拡大 3D 構築画像 (スケールバー=25 μm) を示す。

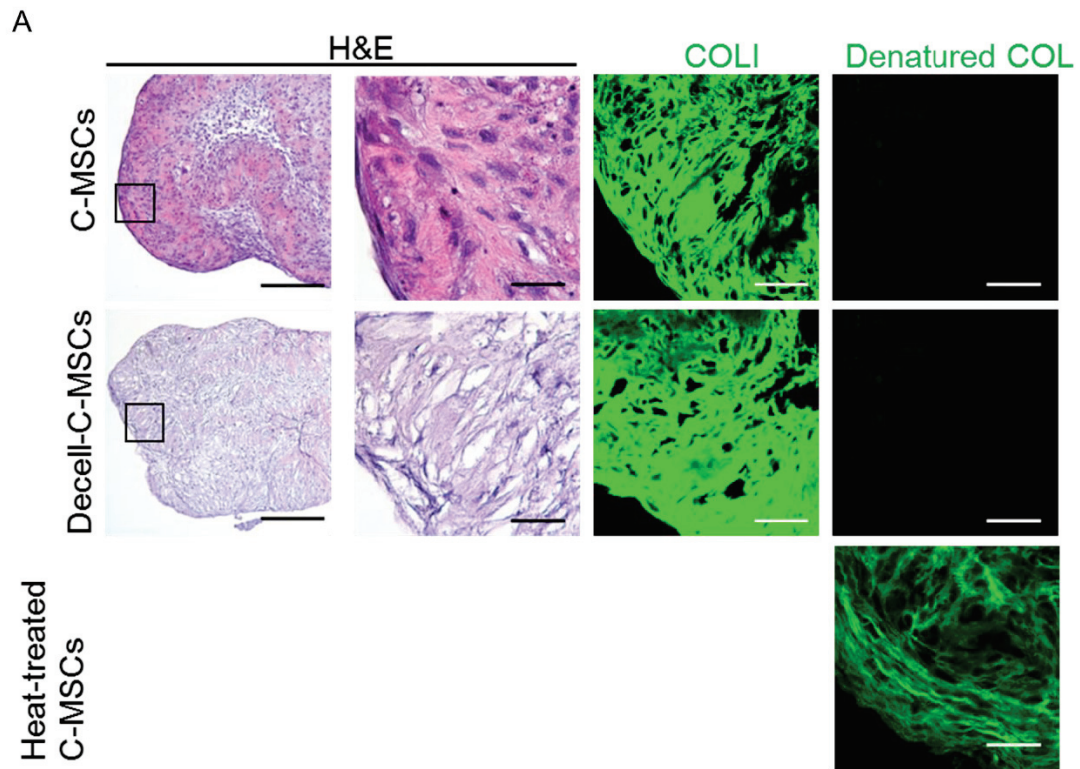


図 5 Decell-C-MSCs 移植部の組織像。

(A) C-MSCs、Decell-C-MSCs、熱処理によってコラーゲンを変性させた C-MSCs (heat-treated C-MSCs) を【材料と方法】に従い作製した。固定後に切片を作製し、H&E 染色、COL I の蛍光免疫染色、5-FAM conjugated-collagen hybridizing peptide による染色を行った。左に弱拡大像 (スケールバー=200 μm)、左から 2, 3, 4 番目にボックス領域の強拡大像 (スケールバー=50 μm) を示す。

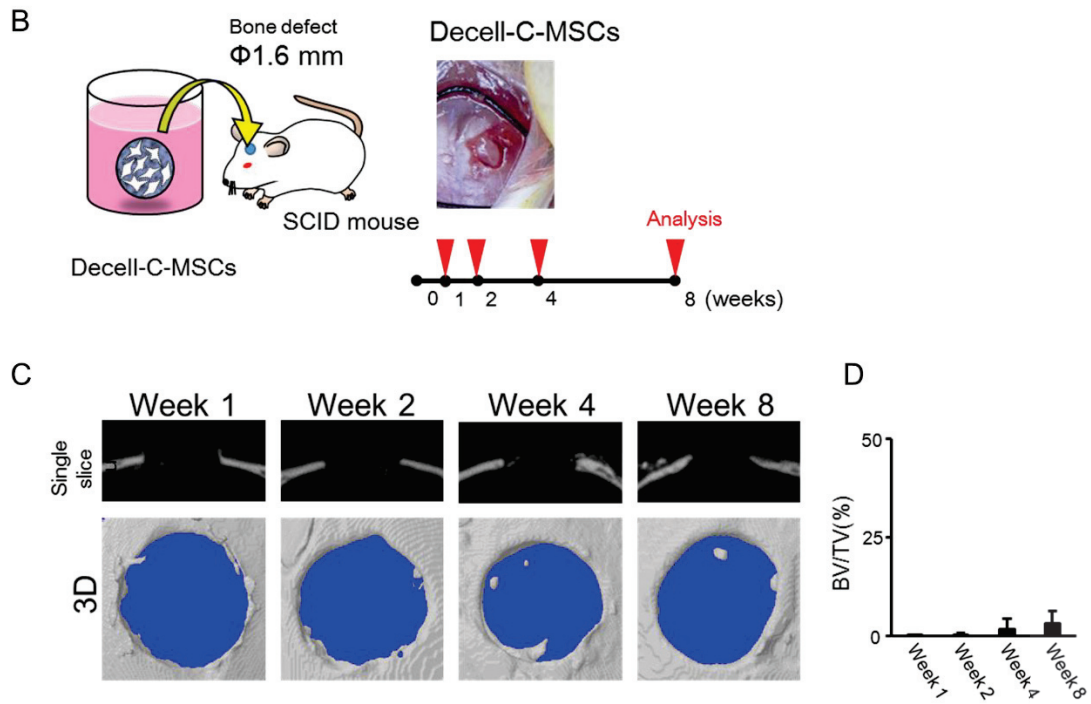


図 5 Decell-C-MSCs の移植はマウス頭蓋骨を再生しなかった。

(B) Decell-C-MSCs 移植過程の模式図を示す。Decell-C-MSCs を人工足場材料を用いずに、SCID マウス頭蓋冠 1.6mm 欠損に移植した。(C) 移植 1, 2, 4, 8 週間後の micro CT 画像。(D) 移植 1, 2, 4, 8 週間後の骨欠損部における再生骨量 (BV) /全体組織量 (TV)。エラーバーは S.D.値を示す。

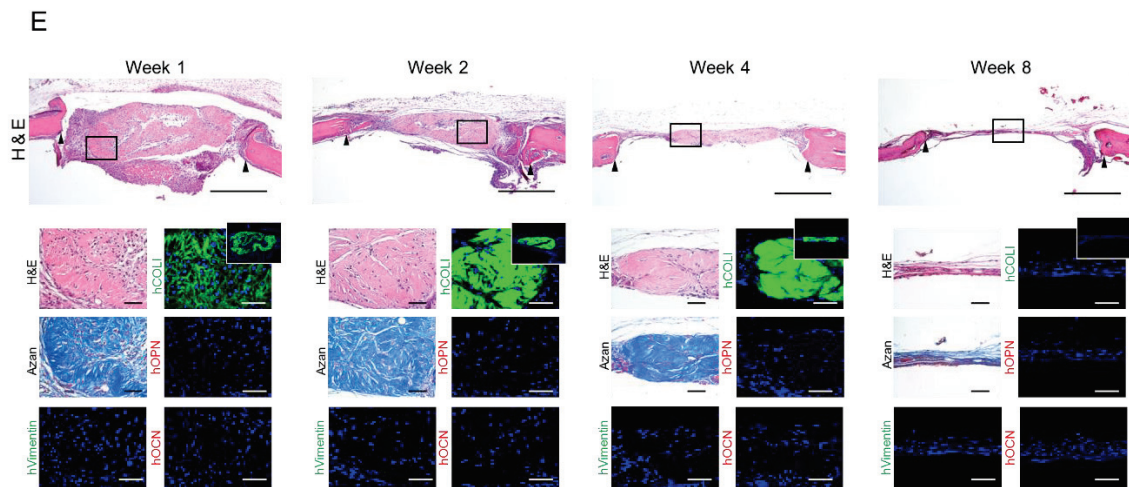


図5 Decell-C-MSCs のマウス頭蓋冠骨欠損移植後の組織像。

(E) 移植 1, 2, 4, 8 週間後にマウスを屠殺し、頭蓋骨を回収後に固定した。前頭断で切片を作製し、H&E 染色、Azan 染色、ヒト vimentin とヒト骨基質関連タンパクの蛍光免疫染色を行った。ヒト I 型コラーゲン (hCOL I) (緑)、ヒトオステオポンチン (hOPN) (赤)、ヒトオステオカルシン (hOCN) (赤)、細胞核 (青)。上段は弱拡大像 (スケールバー=200 μm)、下段はボックス領域の強拡大像 (スケールバー= 50 μm) を示す。白ボックスは骨欠損部における hCOL I の全体像を示す。