

学位論文

The Significance of Performing Osteogenic Differentiation in
Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells

(ヒト骨組織由来間葉系細胞に対して骨分化誘導を行う意義)

指導教授名 内沼 栄樹

申請者氏名 杉本 孝之

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

【要旨】

1 序論

唇顎口蓋裂は日本人の新生児約 500 人に 1 人の頻度で認められる先天異常疾患である。機能獲得から形態改善まで多岐の目的のため複数種の手術を要するが、なかでも正常な咬合の獲得は重要な治療方針である。このためには顎裂の骨欠損部に骨を形成して歯牙の適切な萌出を促す必要がある。現在、顎裂部に対する自家腸骨海綿骨移植が欠損部の骨形成に対する一般的な治療である。この顎裂部骨移植の初回手術時期は前歯が永久歯と交替する 5 から 8 歳時であるが、一度の骨移植で目的を達しえるとは限らず、低年齢で海綿骨が十分に採取できない症例や移植骨が吸収される症例などでは手術が複数回必要となる。我々は、この手術侵襲を軽減する目的で再生医工学による代替骨の開発研究を行っている。代替骨の研究では一般に cell source を骨髓穿刺により得られる間葉系幹細胞としているのに対して、我々は顎裂部骨移植時に donor として用いられる腸骨組織の余剰となった骨組織から、初代培養で out growth してくる間葉系細胞として基礎研究している。これまでに骨組織からの骨由来間葉系細胞の分離・増殖・凍結保存法を確立し得た。また、再生医工学を用い長期に凍結保存された骨由来間葉系細胞によるハイブリッド型人工骨の開発を行ってきた。臨床応用を目差し、現在までは背部皮下組織内でヒト骨組織由来間葉系細胞の骨形成能の基礎研究を行ってきた。本研究は臨床応用に則した骨組織の場でこのヒト骨組織由来間葉系細胞がどのような骨形成を期待できるかを検討した。

2 材料と方法

骨組織からヒト骨組織由来間葉系細胞の分離・増殖・凍結保存法を確立した。本研究においては 10 年以上 -80°C で凍結保存した 11 検体、男性 6 例女性 5 例で平均 8.9 歳のものを使用した。

2-1 凍結保存したヒト骨組織由来間葉系細胞の再培養と骨分化誘導

再培養後、一方は非分化誘導間葉系細胞群（非分化）とし、一方は骨分化誘導間葉系細胞群（骨分化）として培養を継続した。また細胞標識のため NEO-STEM™0.2mg/ml を移植 48 時間前に培地に付加した。

2-2 骨芽細胞マーカーの発現評価

runx-related gene 2(RunX 2), alkaline phosphatase(ALP), osterix, osteocalcin(OC),の発現を real-time RT-PCR にて測定した。

2-3 hydroxyapatite (HA) へのヒト骨組織由来間葉系細胞の播種

直径 5mm、厚さ 2mm、気孔率 85%の HA を足場とし、増殖させた細胞それぞれ 1×10^5 cells/30ul を HA に播種し、検体とした。

2-4 ノードラットへの移植

8 週令のラット頭蓋骨の左右に 5mm の全層欠損を作成し、同部位に 9 検体の hybrid 型人工骨を移植した。また control として頭蓋骨欠損モデルを作成した。移植 8 週間後検体を摘出した。

2-5 マイクロ CT 撮影

2-6 組織学的・免疫組織化学的評価

HE 染色を行い光学顕微鏡で観察した。抗ヒト osteocalcin 抗体による免疫組織化学的染色を行い

蛍光顕微鏡で観察したほか、NEO STEM™の発現も確認した。骨形成量は HE 染色検体を光学顕微鏡で観察し面積比を求めた。

3 結果

3-1 骨芽細胞マーカーの発現

ALP と Osterix が、骨分化が有意($P<0.05$)に高値であった。

3-2 マイクロ CT の結果

頭蓋骨欠損モデルには骨形成を認めなかった。ハイブリッド型人工骨移植部には骨形成を認めた。

3-3 組織学的・免疫組織化学的評価

HA 気孔内に明らかな骨新生を認めた。免疫組織化学染色では骨新生と同一部位に抗ヒト osteocalcin 抗体に陽性な細胞と NEO STEM™の発現を認めた。これによりヒト由来細胞からの骨新生を確認した。HA 気孔内の骨組織はラット由来の骨組織とヒト由来骨組織が共存し骨欠損を閉鎖しており、骨分化ではヒト由来の形成領域が広がった。また骨形成量は骨分化が有意に高値であった。

4 考察

骨芽細胞マーカーの発現は、この細胞自身が 10 年以上たった状態でも骨細胞の特性を持った前骨芽細胞に類似した細胞であることが確認できた。骨分化において osteocalcin では有意差が得られなかったことは誘導期間が短く、より後期に上昇する osteocalcin での発現の差につながらなかったと考えられた。このことは、一般の骨細胞の発生過程と矛盾しない結果であり 10 年以上凍結保存された骨由来間葉系細胞においても同様に正常な分化過程を経ていることが推察された。

移植したハイブリッド型人工骨にはいずれにおいてもヒト由来骨細胞からの新生骨形成を認めた。我々は以前マウス背部皮下で、骨分化のみの骨形成を確認したが、本研究に於いて骨格の骨組織環境下では非分化の場合でも骨形成することが可能であると確認した。しかし骨分化のほうが骨形成量が優位に高いことから、骨組織由来間葉系細胞は移植前処置に骨分化した方がハイブリッド型人工骨として効果的であると考えられた。

一方今回の研究では骨組織領域の環境下では骨誘導しない場合でも骨形成は可能であることが確認できた。このことは顎裂部や骨嚢胞部などの骨組織に包囲される移植環境下では非分化の適応も推察される。移植細胞の安全性の観点からは移植細胞への人工的誘導は最小限にすべきことは明らかであり、移植をうける骨組織欠損の状況により使い分けが可能であることが示唆された。

我々の cell source は倫理面、安全面で優れている自家組織であり、しかも 10 年以上の長期保存された骨組織由来間葉系細胞に於いても優れた骨形成能が確認できた。このことは臨床応用に展開可能な結果と結論付けられた。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 材料と方法	
2-1 初代培養とヒト骨組織由来間葉系細胞の凍結保存 -----	2
2-1-1. 骨組織からの間葉系細胞の初代培養 -----	2
2-1-2. ヒト骨組織由来間葉系細胞の凍結保存 -----	2
2-2. ヒト骨組織由来間葉系細胞の再培養と骨分化誘導 -----	2
2-2-1. ヒト骨組織由来間葉系細胞の再培養 -----	2
2-2-2. ヒト骨組織由来間葉系細胞の骨分化誘導 -----	2
2-2-3. ヒト骨組織由来間葉系細胞への NEO-STEM の付加 -----	2
2-3. 骨芽細胞マーカーの発現評価 -----	3
2-4. hydroxyapatite へのヒト骨組織由来間葉系細胞の播種 -----	3
2-5. ヌードラットへの移植 -----	3
2-6. マイクロ CT 撮影 -----	3
2-7. 組織学的評価と免疫組織化学的評価 -----	4
3. 結果	
3-1. real-time RT-PCR による骨芽細胞マーカーの発現 -----	5
3-2. マイクロ CT の結果 -----	5
3-3. 組織学的評価と免疫組織化学的評価 -----	5
4. 考察	
4-1. ヒト骨組織由来間葉系細胞の有用性 -----	6
4-2. ハイブリッド型人工骨の有用性 -----	6
4-3. 骨分化誘導の評価 -----	7
5. 総括 -----	7
6. 今後の課題 -----	7
7. 謝辞 -----	8

8. 引用文献	-----	9
9. 業績目録	-----	12
10. 図表	-----	13

1. 序論

唇顎口蓋裂は日本人の新生児約 500 人に 1 人の頻度で認められる先天異常疾患である。機能獲得から形態改善まで多岐の目的のため複数種の手術を要するが、なかでも正常な咬合の獲得は重要な治療方針である。このためには顎裂の骨欠損部に骨を形成して歯牙の適切な萌出を促す必要がある。現在、顎裂部に対する自家腸骨海綿骨移植が欠損部の骨形成に対する一般的な治療である⁵⁾⁶⁾。この顎裂部骨移植の初回手術時期は前歯が永久歯と交替する 5 から 8 歳時であるが、一度の骨移植で目的を達しえとは限らず、低年齢で海綿骨が十分に採取できない症例や移植骨が吸収される症例などでは手術が複数回必要となる。我々は、この手術侵襲を軽減する目的で再生医工学による代替骨の開発研究を行っている。代替骨の研究では一般に cell source を骨髄穿刺により得られる間葉系幹細胞としているのに対して、我々は顎裂部骨移植時に donor として用いられる腸骨組織の余剰となった骨組織から、初代培養で out growth してくる間葉系細胞⁹⁾¹⁰⁾として基礎研究している。これまでに骨組織からの骨由来間葉系細胞の分離・増殖・凍結保存法を確立し得た¹⁾。また、再生医工学を用い長期に凍結保存された骨由来間葉系細胞によるハイブリッド型人工骨の開発を行ってきた⁸⁾。臨床応用を目差し、現在までは背部皮下組織内でヒト骨組織由来間葉系細胞の骨形成能の基礎研究を行ってきた²⁾。今回は臨床応用に則した骨組織の場でこのヒト骨組織由来間葉系細胞がどのような骨形成を期待できるかを検討した。まずこのヒト骨組織由来間葉系細胞が元来どの程度の骨細胞ポテンシャルを持つか否かを in vitro で骨細胞マーカーを用い検討した。次にこの細胞が骨組織の場で移植前処置として骨分化誘導が必要か否かを in vivo で検索した。

2. 材料と方法

当研究は、北里大学倫理委員会において承認のもと施行した。各患者の保護者よりインフォームドコンセントを書面にて得て使用した。

北里大学医学部形成外科・美容外科において施行された、顎裂部骨移植時に余剰として得られる腸骨組織から初代培養で増殖してくる間葉系細胞を長期間-80℃で凍結保存したものを使用した。検体は11検体、男性6例女性5例で年齢は5歳から18歳平均8.9歳であり、感染症や特記すべき疾患は有していなかった。

2-1 初代培養とヒト骨組織由来間葉系細胞の凍結保存

2-1-1 骨組織からの間葉系細胞の初代培養

採取骨を、25-cm² flask(Sumitomo Bakelite Co, Tokyo, Japan)に播種し、培養液は α -minimum essential medium(α -MEN; Life Technologies Corporation, CA, USA)を基礎培地とし、10%FBS(Sigma-Aldrich MO, USA)、抗生物質(100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin)を添加した。これを5%CO₂、37℃の条件下で培養した。1週間に2回培地交換をした。

2-1-2 ヒト骨組織由来間葉系細胞の凍結保存

細胞は Subconfluent になったら、T-75flask に継代し、これを血清を含む CELLBANKERTM(Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd. Fukushima, Japan)に suspend し -80℃で凍結保存した。

2-2 ヒト骨組織由来間葉系細胞の再培養と骨分化誘導

2-2-1 ヒト骨組織由来間葉系細胞の再培養

凍結保存ヒト骨組織由来間葉系細胞を室温に戻し、培養液は α -minimum essential medium(α -Men; Invitrogen Corp, Carlsbad, CA)を基礎培地とし、10%FBS、抗生物質(100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin)、1 ng/ml b-FGF(R and D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA)添加した。これを5%CO₂、37℃の条件下で培養した。

2-2-2 ヒト骨組織由来間葉系細胞の骨分化誘導

1週間後 subconfluent を確認し、一方はそのままの条件下で増殖を継続し非分化誘導間葉系細胞群とし、一方は骨分化誘導として、10⁻⁷ mol/L Dexamethasone(Sigma-Aldrich MO, USA), 50 μ mol/L l-Ascorbic acid(Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan), 10mmol/L β -Glycerophosphate(Calbiochem, CA, OSA)を添加し骨分化誘導間葉系細胞群として1週間培養を継続した。培地は1週間に2回交換した。

2-2-3 ヒト骨組織由来間葉系細胞への NEO-STEM™ の付加

また細胞標識のため NEO-STEM™(Biterials Co., Ltd)0.2mg/ml を移植48時間前に培地に付加した。

2-3 骨芽細胞マーカーの発現評価

骨芽細胞として細胞活性の有無を評価するため、骨芽細胞マーカー： runt-related gene 2(RunX 2), alkaline phosphatase(ALP), osreocalcin, osterix の発現を非分化誘導間葉系細胞と骨分化誘導間葉系細胞とも real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)にて ogata らの報告⁷⁾に準じ測定した。RNeasy Mini kit(Qiagen, Valencia, CA)を用いて検体中の total RNA を抽出し、protocol 通りに操作して cDNA を得た。real-time RT-PCR にて RunX-2, ALP, osterix, osteocalcin の発現を評価した。PCR の primer sequences は GenBank より Primer 3 の software program を用いて設計した。それぞれ 11 検体を測定し、unpaired student' s t-test(P<0.05)で統計学的処理を行った。Primer sequences を Table1 に示す。

2-4 hydroxyapatite へのヒト骨組織由来間葉系細胞の播種

本研究では直径 5mm、厚さ 2mm、気孔率 85%の HA ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$; Pentax, HOYA, Tokyo, Japan)を足場として使用した。凍結保存ヒト骨組織由来間葉系細胞から増殖させた非分化誘導間葉系細胞と骨分化誘導間葉系細胞それぞれ 1×10^5 cells/30ul を HA に播種し 6-well cell culture plate(Sumilon, Sumitomo Bakelite)にのせ、5%CO₂ 37°Cの条件下で 24 時間保存し検体とした。9 検体の hybrid 型人工骨を作成した。HA に間葉系細胞を播種した検体を以下ハイブリッド型人工骨と略す。

2-5 ノードラットへの移植

9 検体のハイブリッド型人工骨を作成しラットに移植を施行した。8 週令のオスノードラット(F344/Njcl-run/run, Clea Japan. Tokyo, Japan)をミダゾラム 0.5mg/kg, ベトルフェール 0.5mg/kg, ドミトール 0.3mg/kg の混合麻酔液を筋注し麻酔した。皮膚切開は矢状正中で設定し、骨膜下まで切開し、骨膜を剥離後、骨縫合部とは関係ない部位の頭蓋骨の左右に各々外径 5mm のトレパンを用いて 5mm の穴をあけた(図 1)。頭蓋骨は全層欠損であり硬膜の損傷がないよう注意した。作成した hybrid 型人工骨を細胞播種側を硬膜側とし移植した。また control として頭蓋骨欠損モデルを作成した。移植後 8 週間で北里大学倫理基準に準じ安楽死させ外径 11mm のトレパンを用いて正常骨をつけ、検体を摘出した。

2-6 マイクロ CT 撮影

摘出検体の状態をマイクロ CT(Micro-Computed Tomography)で撮影し、X 線の吸収を観察した。

2-7 組織学的評価と免疫組織化学的評価

摘出した検体は 4%Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution(Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan)で固定し K-CX(Falma CO, Ltd, Japan)で 24 時間脱灰し、洗浄後に paraffin 包埋した。検体は中央部を矢状方向断面とし厚さ約 4- μ m に薄切して Hematoxylin Eosin(HE)染色を行い光学顕微鏡で観察した。形成された骨組織が移植したヒト細胞由来であることを確認するため Takeda らの報告に従い⁷⁾、抗ヒト osteocalcin 抗体による免疫組織化学的染色を行い蛍光顕微鏡で観察したほか、NEO STEMTM の発現も確認した。骨形成量は Image J version 1.36b(National Institutes of Health, USA <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)の解析ソフトを用いて、HE 染色検体を光学顕微鏡で観察し面積比を求めた。

3. 結果

3-1 real-time RT-PCR による骨芽細胞マーカーの発現

骨芽細胞マーカーの発現は ALP と Osterix が、骨分化誘導間葉系細胞が非分化誘導間葉系細胞と比較して有意($P<0.05$)に高値であった (図 3)。RunX2, osteocalcin はいずれの検体でも骨分化誘導間葉系細胞が非分化誘導間葉系細胞より高値を示したが、有意差は得られなかった。

3-2 マイクロ CT の結果

頭蓋骨欠損モデルには骨形成を認めなかった。ハイブリッド型人工骨移植部には骨形成を認めた(図 4)。

3-3 組織学的評価と免疫組織化学的評価

HE 染色では control 群には骨新生を認めなかったが、ハイブリッド型人工骨には HA 気孔内に明らかな骨新生を認めた。免疫組織化学染色では骨新生と同一部位に抗ヒト osteocalcin 抗体に陽性な細胞と NEO STEM™ の発現を認めた(図 5)。これによりヒト由来細胞からの骨新生を確認した。HA 気孔内の骨組織はラット由来の骨組織とヒト由来骨組織が共存し骨欠損を閉鎖しており、骨分化誘導群ではヒト由来骨組織の形成領域が広い(図 6)。また骨形成量は骨分化間葉系細胞が非分化間葉系細胞と比較して有意($P<0.05$)に高値であった (図 7)。

4. 考察

再生医工学における研究では cell source として胚性幹細胞 (ES 細胞) と間葉系幹細胞 (MSC) がよく知られている。特に代替骨の研究では一般に cell source を骨髓穿刺による骨髓液より得られる間葉系細胞としている。しかし骨髓液採取には骨髓液に含まれる MSC の比率がわずか 0.01%程度であり再生医療に必要な数の細胞を確保するための培養や様々な分化可能な MSC に骨分化誘導因子を加えて骨芽細胞に分化する必要があるなどの欠点がある。我々は以前より顎裂部骨移植時に余剰として得られる骨組織や顎変形症手術時に削除される骨組織から初代培養で out growth してくる間葉系細胞を cell source として注目し研究してきた。これまでに短期間の凍結保存された細胞での骨形成を報告したが、今回の研究では 10 年以上凍結保存された細胞について検討した。

4-1 ヒト骨組織由来間葉系細胞の有用性

in vitro での骨芽細胞マーカー発現は骨分化誘導しない状態でも各マーカー値の上昇を認め、この細胞自身が 10 年以上たった状態でも骨細胞の特性を持った前骨芽細胞に類似した細胞であることが確認できた。骨分化誘導群において ALP, osterix で有意に高い値を示し osteocalcin では有意差が得られなかったことは誘導期間が 7 日間と短く、より後期に上昇する osteocalcin での発現の差につながらなかったと考えられた。このことは、一般の骨細胞の発生過程と矛盾しない結果^{13) 14)}であり 10 年以上凍結保存された骨由来間葉系細胞においても同様に正常な分化過程を経ていることが推察される。この結果より骨由来間葉系細胞は 10 年以上の保存でも高い骨形成ポテンシャルを維持し、またこの細胞は骨再生医療工学に於ける cell source として非常に有用であると考えられた。

4-2 ハイブリッド型人工骨の有用性

我々はハイブリッド型人工骨を作成し骨欠損の環境下での骨形成を比較した。足場としては直径 5mm、厚さ 2mm、気孔率 85%の HA (Ca₁₀[PO₄]₆[OH]₂; Pentax, HOYA, Japan) の有用性を報告しており³⁾⁴⁾、今回の細胞も同 HA に培養細胞を播種し、8 週令のヌードラット頭蓋骨に 5mm の欠損を作り移植を行った。作成した 5mm の欠損は非治癒モデルとして報告されており¹¹⁾¹²⁾、我々のコントロール群においても骨形成は認められなかった。移植したハイブリッド型人工骨にはいずれにおいてもヒト由来骨細胞からの新生骨形成を認めた。我々は以前マウス背部皮下に同様の Hybrid 型人工骨を移植し、骨誘導群のみの骨形成を確認した²⁾が、本研究に於いて骨格の骨組織環境下では非分化誘導の場合でも骨形成することが可能であると確認した。しかし分化誘導群の骨形成量が優位に高いことから、骨組織由来間葉系細胞は移植前処置に骨分化誘導した方がハイブリッド型人工骨として効果的であると考えられた。

4-3 骨分化誘導の評価

一方今回の研究では骨組織領域の環境下では骨誘導しない場合でも骨形成は可能であることが確認できた。このことは顎裂部や骨嚢胞部などの骨組織に包囲される移植環境下では非分化誘導間葉系細胞の適応も推察される。移植細胞の安全性の観点からは移植細胞への人工的誘導は最小限にすべきことは明らかであり、移植をうける骨組織欠損の状況によりハイブリッド型人工骨の非分化誘導細胞群と分化誘導群の使い分けが可能であることが示唆された。

5. 総括

我々の cell source は倫理面、安全面で優れている自家組織であり、しかも 10 年以上の長期保存された骨組織由来間葉系細胞に於いても優れた骨形成能が確認できた。このことは臨床応用に展開可能な結果と結論付けられた。

6. 今後の課題

本研究では成熟した骨組織像が組織学的に得られ、長期保存されたヒト骨組織由来間葉系幹細胞の有用性が示唆された。臨床応用に際し、骨欠損部へのヒト骨組織由来間葉系幹細胞の最も有効な移植法を検討する必要があると考える。また、骨移植後に歯牙の適切な萌出を促すことが可能かを検討することが課題と考える。

7. 謝辞

本研究は文部科学省研究補助金(C) (23592942)の助成を受けて行ったものである。

本研究には北里大学医学部病態・診療系 曾根由美子様の多大な貢献があったことを特記し心から感謝を申し上げます。また、北里大学病院の多くの部署にご協力いただいたことを記し、ご助力いただいた皆様に感謝を申し上げます。

北里大学医学部形成外科・美容外科 内沼栄樹先生・山崎安晴先生のあたたかいご指導、同医局員の各先生方のご協力を賜って本研究が行えたことを深謝し心から感謝を申し上げます。

8. 引用文献

1. Orth D, Howard RD. An improved appliance for the pre-surgical orthodontic preparation of the cleft case for the secondary bone grafting. *Br J Plast Surg* 1969; 22: 90-93
2. Boyne PJ, Sands NR. Secondary bone grafting of residual alveolar and palatal clefts. *J Oral Surg* 1972; 30: 87-92
3. Wongchuensoontorn C, Liebehenschel N, Schwarz U, Schmelzeisen R, Gutwald R, et al. Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible-A case report. *J Craniomaxillofac Surg* 2009; 37: 155-161
4. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors. *J Craniomaxillofac Surg* 2012; 40: 2-7
5. Shimakura Y, Yamazaki Y, Uchinuma E. Experimental study on bone formation potential of cryopreserved human bone marrow mesenchymal cell/hydroxyapatite complex in the presence of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniofac Surg* 2003; 14:108-116,
6. Matsuo A, Yamazaki Y, Takase C, Aoyagi K, Uchinuma E. Osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured with autologous serum. *J Craniofac Surg* 2008; 19: 693-700
7. Takeda A, Yamazaki Y, Baba K, Ishiguro M, Aoyagi K, Ikemoto S, et al. Osteogenic Potential of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Cultured in Autologous Serum: A Preliminary Study. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70: 469-476
8. Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, et al. Toxicity and Tissue Distribution of Magnetix Nanoparticles in Mice. *Tox, Sci* 2005; 89(1): 338-347
9. Park KS, Tae J, Choi B, Kim YS, Moon C, Kim SH, et al. Characterization, in vitro cytotoxicity assessment, and in vivo visualization of multimodal, RITC-labeled, silica-coated magnetic nanoparticles for labeling human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Nanomedicine* 2010; 6(2): 263-276

10. Ogata S, Ogihara Y, Nomoto K, Akiyama K, Nakahara Y, Sato K, et al. Clinical score and transcript abundance patterns identify Kawasaki disease patients who may benefit from addition of methylprednisolone. *Pediat Res* 2009; 19: 577-584
11. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
12. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jianq Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
13. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 148-152
14. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705
15. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004; 431: 343-349
16. Sun H, Ye F, Wan J, Shi Y, Tu Z, Bao J, et al. The upregulation of osteoblast marker genes in mesenchymal stem cells prove the osteoinductivity of hydroxyapatite/tricalcium phosphate biomaterial. *Transplantation* 2008; 40: 2645-2648
17. Takase C, Yamazaki Y, Matsuo A, Aoyagi K, Takeda A, Uchinuma E. Differing effects of allogenic heterologous sera and scaffold structures on the bone forming ability of undifferentiated mesenchymal cells: *Kitasato Med J* 2010; 40: 122-128
18. Serro AP, Bastos M, Pessoa JC, Saramaço B. Bovine serum albumin conformational changes upon adsorption on titania and on hydroxyapatite and their relation with biomineralization. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70: 420-7
19. Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, Cowan CM, Fanq TD, Fonq KD, et al. Applications of a Mouse Model of Calvarial Healing: Differences in Regenerative Abilities of Juveniles and Adults. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 713-720

20. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology* 2004; 22: 560-5

9. 業績目録

(I) 原著

1. Sugimoto T., Yamazaki Y., Kumazawa K., Sone Y., Takeda A., Uchinuma E. The Significance of Performing Osteogenic Differentiation in Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Journal of Oral Tissue Engineering*. 11(2), (in press)
2. Kumazawa K., Sugimoto T., Yamazaki Y., Takeda A., Uchinuma E. Osteogenic Potential, Multipotency, and Cytogenetic safety of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation. *The Kitasato Medical Journal*. (in press)
3. Ishiguro M., Yamazaki Y., Baba K., Sugimoto T., Takeda A., Uchinuma E. Assessment of the Osteogenic Potential of Maxilla-Derived Mesenchymal Stromal Cells and the Utilization of Serum-Free Medium for Culture Thereof. *The Kitasato Medical Journal*. (in press)
4. 小林眞司、杉本孝之、菅原順、平川崇：唇顎口蓋裂に対する自己多血小板血漿の臨床応用。こども医療センター医学誌, 41(4)：217-219, 2012
5. Takayama A., Takeda A., Sato Y., Sakai N., Sugimoto T., Uchinuma E. Expression of melanoma antigen gene(MAGE)-A family protein in human cutaneous malignant melanoma. *The Kitasato Medical Journal*. 40(2): 103-106, 2010
6. 根本充、秋本峰克、石川心介、青柳和也、杉本孝之：上肢電撃症の臨床的検討。日本手の外科学会雑誌, 24：1191-1195, 2008

(II) 著書

なし

(III) 総説・講座

なし

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. 宮沢理恵、根本充、秋本峰克、杉本孝之、相馬一亥、内沼栄樹：消化管穿孔をきたした熱傷の1例。熱傷, 36：29-35, 2010
2. 杉本孝之、根本充、青柳和也、黒柳美里、山田直人、内沼栄樹：皮膚壊死を来たした毒ヘビ咬傷の2例。形成外科, 51(4)：469-473, 2008
3. 根本充、青柳和也、杉本孝之、永島和貴、中野香代子：ヘビ咬傷によるコンパートメント症候群について。日本手の外科学会雑誌, 23(2)：154-157, 2006

10. 図表

表 1. 骨芽細胞マーカー primer sequences

Table 1 Gene specific primers used in present study

Primer	Primer sequence	Product size (bp)
<i>Runx2</i>	Forward :5'-TTCAGGTGCTTCAGAACTGG	130
	Reverse :5'-GACTGGCGGGGTGTAAGTAA	
<i>ALP</i>	Forward :5'-GTACGAGCTGAACAGGAACAACG	151
	Reverse :5'-CTTGGCTTTTCCTTCATGGTG	
<i>Osteorix</i>	Forward :5'-TAATGGGCTCCTTTCACCTG	161
	Reverse :5'-CACTGGGCAGACAGTCAGAA	
<i>Osteocalcin</i>	Forward :5'-GACTGTGACGAGTTGGCTGA	83
	Reverse :5'-AGCAGAGCGACACCCTAGAC	

Runx2: Runt-related gene 2

ALP: Alkaline phosphatase

図 1. ノードラットへのハイブリッド型人工骨移植

- A. 頭蓋骨欠損作成
- B. ハイブリッド型人工骨移植

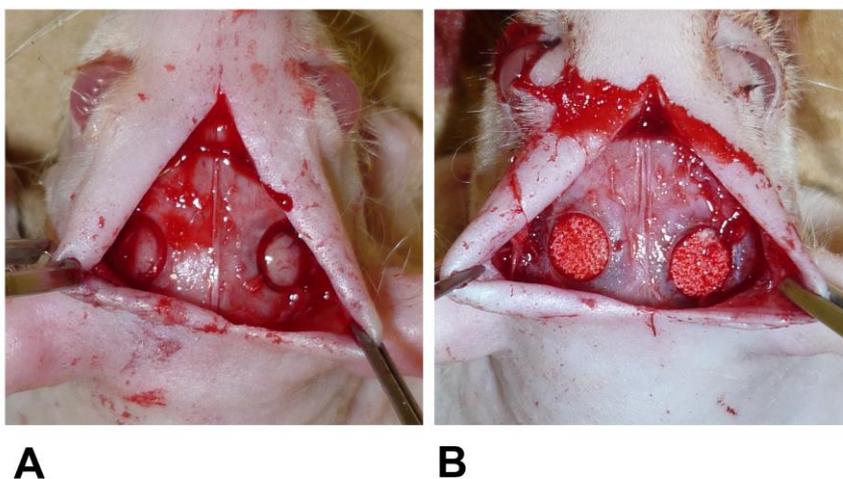


Figure 1

図 2. 実験計画

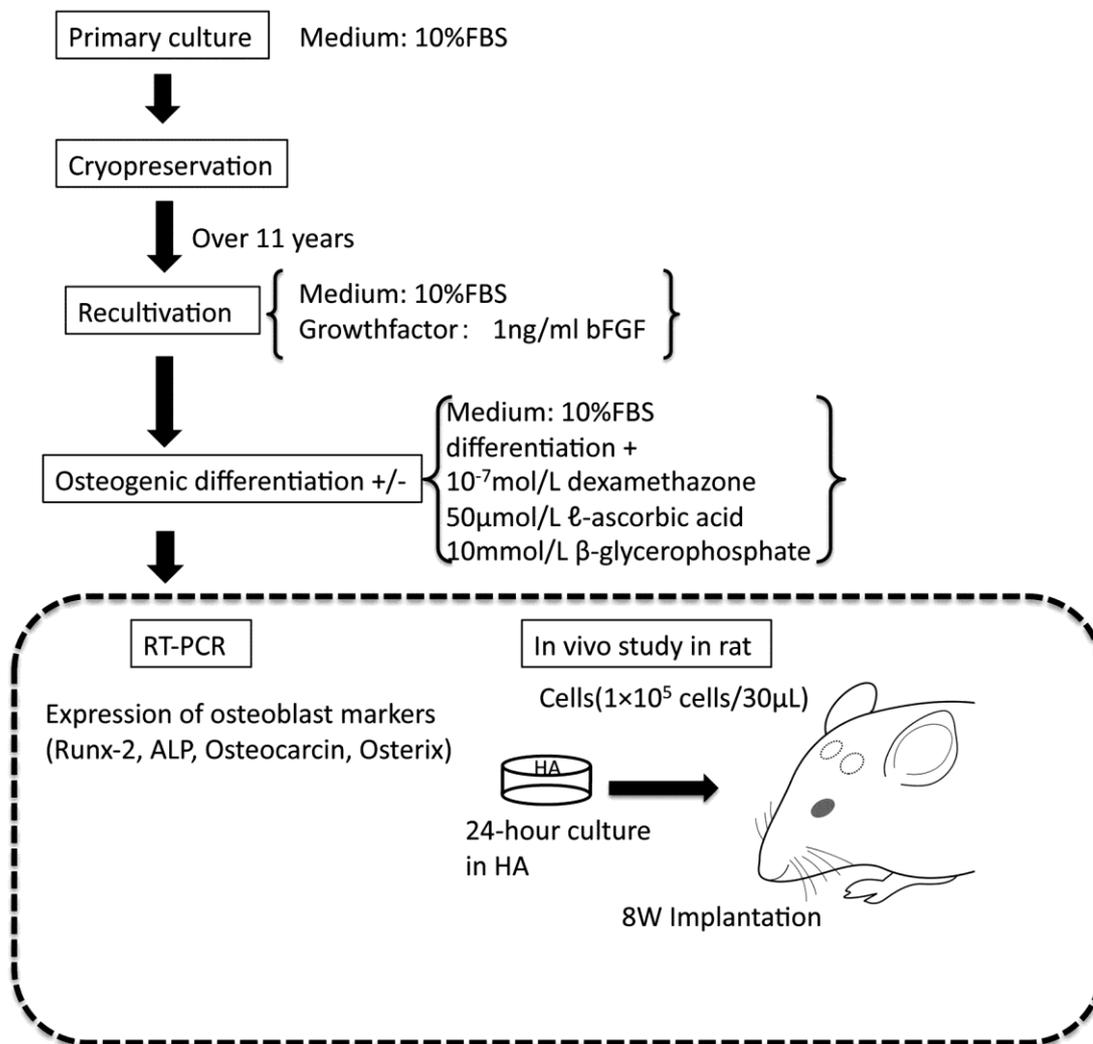


Figure 2

図 3. real time RT-PCR による骨芽細胞マーカー発現

ALP と Osterix で有意差を認めたと、Runx2 と osteocalcin では認められなかった。(* p<0.05, ** p<0.01)

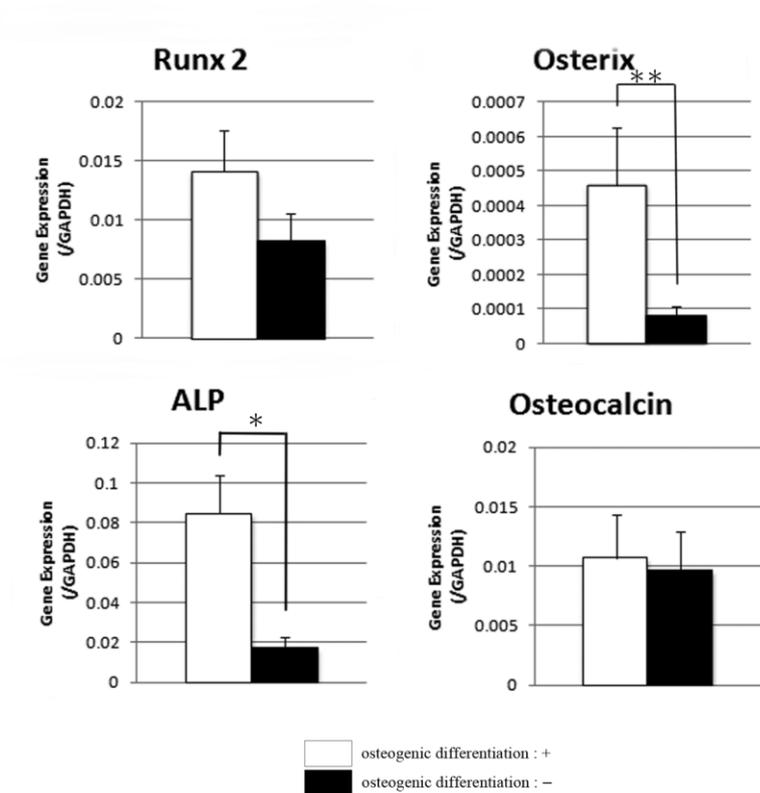


Figure 3

図 4. マイクロ CT 画像

A. 頭蓋骨欠損モデル

B. ハイブリッド型人工骨移植

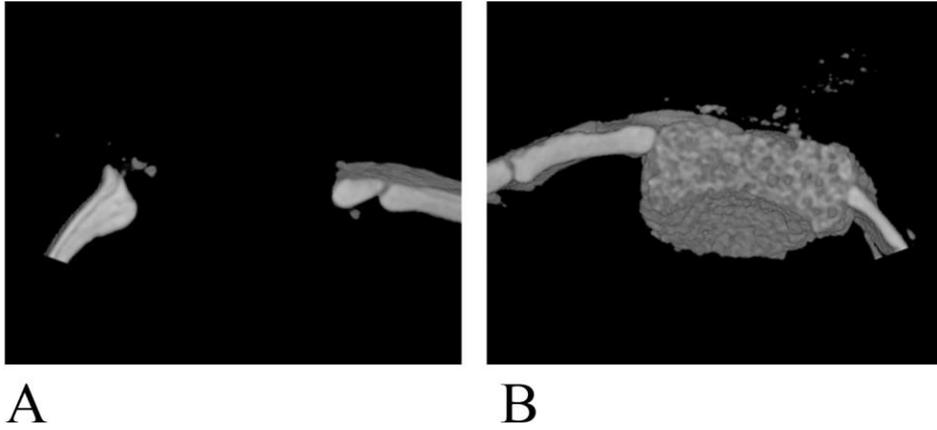


Figure 4

図 5. 組織学的染色と免疫組織化学的染色

A. HE 染色弱拡大：ハイブリッド型人工骨には HA 気孔内に明らかな骨新生を認める。

B. 免疫組織化学的染色弱拡大：抗ヒト osteocalcin 抗体

C. 免疫組織化学的染色弱拡大：NEO STEM™

骨形成部に抗ヒト osteocalcin 抗体に陽性な細胞と NEO STEM™ の発現を認め、ヒト由来細胞からの骨新生を確認した

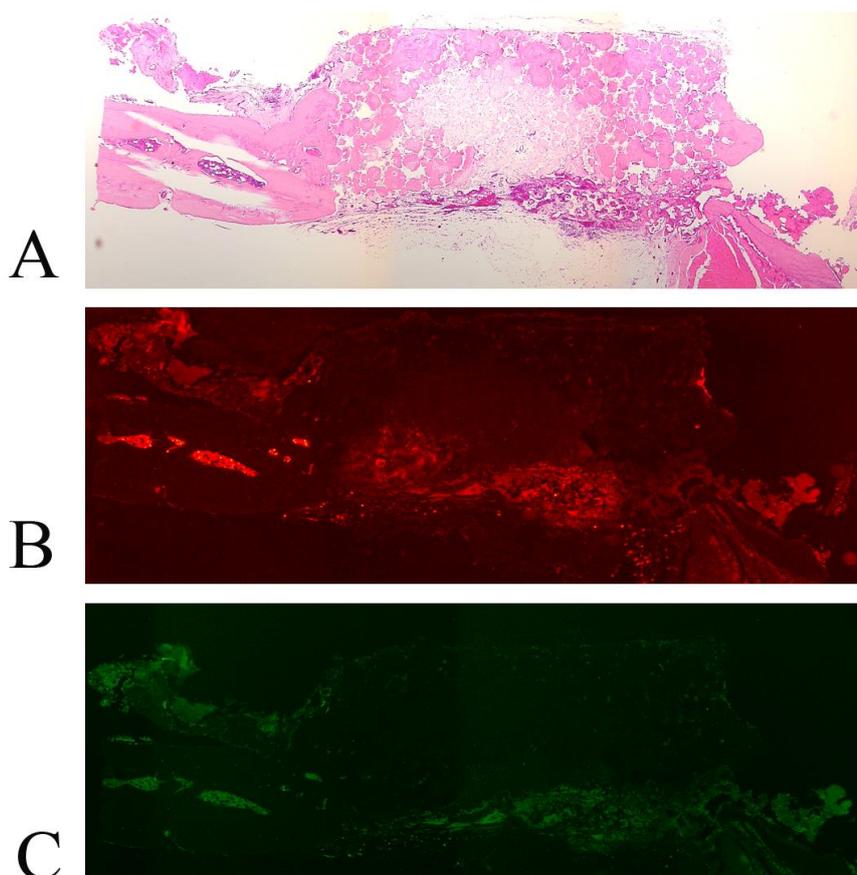


Figure 5

図 6. 組織学的染色と免疫組織化学的染色による比較

- A. 骨分化誘導細胞 HE 染色
- B. 骨分化誘導細胞抗ヒト osteocalcin 抗体
- C. 非分化誘導細胞 HE 染色
- D. 非分化誘導細胞抗ヒト osteocalcin 抗体

HA 気孔内の骨組織はラット由来の骨組織とヒト由来骨組織が共存し骨欠損を閉鎖しており、骨分化誘導群ではヒト由来骨組織の形成領域が広い

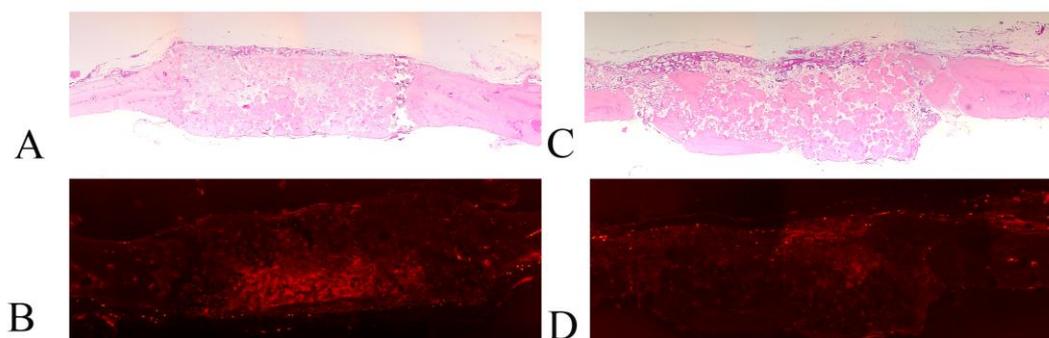


Figure 6

図 7. 骨分化間葉系細胞群と非分化間葉系細胞群の骨形成量

骨形成量は骨分化間葉系細胞が非分化間葉系細胞と比較して有意($P < 0.05$)に高値であった。

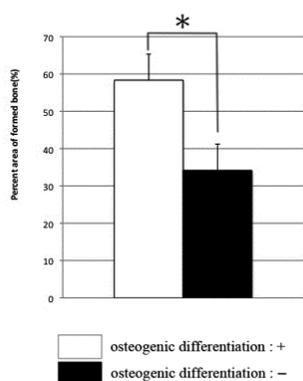


Figure 7