

学位論文

「Differences in pluripotency of jawbone- and iliac bone-derived
mesenchymal cells」

(顎骨由来および腸骨由来間葉系細胞の多分化能の差異について)

指導教授名 武田 啓

申請者氏名 森山 和の

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

〈背景〉

現在日本において口唇口蓋裂患者は新生児 500 人に 1 人、0.2% の高い頻度で出生する先天性疾患となっている。その治療において鼻咽腔閉鎖機能や良好な咬合の獲得といった機能獲得、また形態改善のため、小児期より長期に渡る治療期間と複数回の手術を要する。その中で正常な咬合の獲得は重要な治療方針である。顎裂部の骨欠損に対し、永久歯萌出のため主に 5 歳から 8 歳頃に顎裂部への骨移植を行っているが、一度に十分量の骨形成が得られずに複数回の手術を要することも少なくない。そのため、我々はその際に出る余剰海綿骨から骨組織由来間葉系細胞を得て、凍結保存を行い、その多分化能や骨形成能、安全性を確認してきた。また同様に、顔面骨の成長が終了した後に施行される顎骨骨切術の際の余剰組織からも骨組織由来間葉系細胞を得て、凍結保存してきた。しかし同じ間葉系細胞であっても由来組織による分化能に差異があり、それは発生経路による違いと考えられている。そこで本研究では、腸骨と顎骨由来間葉系細胞の生物学的特徴の検討として、骨・脂肪・軟骨分化誘導に対する差異を検討した。

〈対象・方法〉

腸骨、上顎骨、下顎骨、歯槽骨から手術時余剰となった組織を採取し、凍結保存したヒト骨組織由来間葉系細胞を供した。骨形成能の評価はカルシウム (Ca) 産性能の評価とアリザリンレッド S 染色を行なった。脂肪形成能の評価はオイルレッド O 染色を行なった。軟骨形成能の評価は HE 染色、トルイジンブルー染色、real-time RT-PCR を用いた。

〈結果〉

骨形成能については、誘導 1 週目から 6 週目まで Ca 濃度を測定したが、非分化誘導群はいずれの週でも Ca 産生を認めなかった。採取部位による分化誘導の差は Non-repeated measure ANOVA+Kruskal Wallis H-test を用いたが有意差を認めなかった ($P=0.053$)。骨芽細胞へ分化誘導した Ca の存在を示すアリザリンレッド S 染色は誘導群で確認でき、採取部位による染色の強さに差を認め、上顎骨由来間葉系細胞が一番低かった。脂肪形成能については、誘導群で染色され、その染色による脂肪滴形成能の強さは 3 群に分かれた。強さの順に腸骨由来>下顎骨由来>上顎骨由来であり歯槽骨は染色されなかった。非分化誘導群では染色されなかった。軟骨形成能については、誘導群の HE 染色では細胞の最外側は軟骨膜に類似した被膜の形成を認め、トルイジンブルー

染色ではメタクロマジーを認めた。real-time RT-PCRによる軟骨形成能の強さは3群に分かれ、強さの順に腸骨由来>歯槽骨由来>上顎骨由来=下顎骨由来であったが、歯槽骨由来は軟骨形成を認める群と認めない群に分かれた。

<考察>

我々の骨形成能の結果では採取部位による誘導の差を認めなかったが、腸骨から採取した骨を移植するより顎顔面から採取した骨を用いる方が、歯科口腔外科領域での骨移植術では良好な臨床成績を示すことが報告されている。軟骨内骨化を辿る腸骨組織と膜内骨化を辿る顎骨組織とでは、その由来を考慮し、ドナーとして選択する必要があると言える。脂肪形成能の結果では、腸骨由来間葉形細胞の分化誘導能が一番高かった。これは思春期以降造血の中心をなしていた造血髄は60歳頃より急速に減少し、脂肪髄と置き換わるが、その大部分は腸骨が多いことが影響していると考えられる。顎骨由来幹細胞より腸骨由来幹細胞の方が脂肪への分化誘導能が低いため、この事からも顎骨由来幹細胞は顎骨再建の際にドナーの選択肢として有用と考えられる。軟骨形成能の結果では、軟骨誘導される群とされない群の2群に分かれた。誘導される群のドナー年齢は16歳と20歳、誘導されない群のドナー年齢は7歳と9歳であった。歯原生組織には高い増殖能と分化能を有する様々な幹細胞が存在しているが、骨髄由来間葉系幹細胞は、成人の歯髄に存在する幹細胞や脱落した乳歯の歯髄に存在する幹細胞より高い軟骨分化能を示している事が報告されている。また、growth factorの存在下にて歯根膜由来幹細胞の脂肪分化能が高い事が報告されている。これらを踏まえると、歯槽骨にviabilityの異なる幹細胞が存在するのではなく、永久歯萌出以前と以後のドナー年齢が影響していた事が考えられた。

<結論>

腸骨由来間葉系細胞と顎骨由来間葉系細胞の採取部位による、分化誘導の差を認めた。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. ヒト骨組織由来間葉系細胞 (hBM-MCs) の培養.....	1
2-2. 骨分化誘導能.....	2
2-3. 脂肪分化誘導.....	2
2-4. 軟骨分化誘導.....	2
2-5. 分化能の評価.....	3
2-5-1. 骨分化能の評価.....	3
①アリザリンレッド S 染色.....	3
②Ca 染色.....	3
2-5-2. 脂肪分化能の評価.....	3
2-5-3. 軟骨分化能の評価.....	3
①HE 染色とトルイジンブルー染色.....	3
②Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (PCR).....	3
3. 結果	
3-1. 骨形成能.....	4
3-2. 脂肪形成能.....	4
3-2. 軟骨形成能.....	5
4. 考察	
4-1. 骨分化誘導能について.....	5
4-2. 脂肪分化誘導能について.....	6
4-3. 軟骨分化誘導能について.....	6
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

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSCs) は骨髄組織や脂肪組織等多くの組織から単離され、特定の表面マーカーや多分化能を有していることが知られている¹⁾²⁾。また同様に腸骨海綿骨から単離した間葉系細胞 (mesenchymal cells; MCs) も骨前駆細胞としての性質だけでなく、分化誘導により軟骨、脂肪への分化が可能であり、MSCs 様な性質を有している³⁾。一方顎骨からも MSCs 様な性質を有した間葉系細胞の単離が可能であり⁴⁾、臨床においては、頭蓋顎顔面外科領域の分野における臨床応用が報告されている⁵⁾⁶⁾。頭蓋顎顔面領域では胎生期に重要な役割を果たす神経堤由来幹細胞 (Neural crest stem cell: NCSC) があり、発生が進むと神経堤は消失するため、その形質を持った間葉系組織のみが残存し第四の胚葉として注目されている。この間葉系組織は、顎顔面部だけでなく四肢骨髄中の MSC の一部など全身性に存在している⁷⁾⁸⁾。これに由来する NCSC は自律神経系の神経細胞や神経膠細胞、平滑筋、骨、軟骨、脂肪、メラニン細胞、一部のホルモン産生細胞へと分化可能であるとされている。しかしながら NCSC は発生由来から定義された細胞であるのに対し、MSC は細胞の性質から定義された細胞のため、生体における NCSC と MSC が同一の幹細胞であるか否かの詳細は明らかになっていない。また、同じ間葉系細胞であっても、腸骨組織は軟骨内骨化、顎骨組織は膜内骨化の形態を辿り、発生時における起源が異なるためその生物学的活性も異なる可能性があるが、その詳細は不明である。そこで今回腸骨と顎骨の間葉系細胞の生物学的検討として、骨分化誘導、脂肪分化誘導、軟骨分化誘導に対する細胞動態の差異を、定性・定量にて検討した。

2. 方法

北里大学医学部・病院 倫理委員会によって承認された本研究は (承認番号: B12-101)、書面によるインフォームドコンセントの取得後に行われた。材料は北里大学病院 形成外科・美容外科にて施行した手術時に余剰となった組織 腸骨 4 検体、上顎骨 4 検体、下顎骨 4 検体、歯槽骨 4 検体 (上顎骨由来) を対象とした。年齢は 5 歳から 33 歳 (平均値 17 歳) であった。(Table. 1)

2-1. ヒト骨組織由来間葉系細胞 (hBM-MCs) の培養

治療目的で施行された手術において破棄される余剰骨片を用いた。乾かないように室温で手術室から培養室へ移送し、直ちに供した。リン酸緩衝液 (PBS [-]);

Wako Pure Chemical, Osaka) で洗浄後、25cm² フラスコ (Sumitomo Bakelite, Tokyo) 内で、10% fetal bovine serum; FBS (Sigma-Aldrich, MO, USA)、1ng/ml β -FGF (R&D Systems, MN, USA)、Penicillin 100 unit/mL、Streptomycin 100 μ g/ml (Pen Strep; Life Technologies, CA, USA)、 α -Minimum essential medium (α -MEM; Life Technologies, CA, USA) の培地 (以下 α -MEM 培地) を用いて 37°C 5%CO₂ インキュベータで培養した。outgrowth した細胞を継代し、第一継代の細胞を CELLBANKER® (Nippon Zenyaku Kogyo, Fukushima) でサスペンドし-80°C で凍結保存した。凍結保存細胞は凍結期間が 5 年以内の細胞を対象とし、解凍後再培養し、継代を行い第二継代の細胞を供した。

2-2. 骨分化誘導

細胞は 1×10^5 となるよう 6well プレート (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) に播種し、37°C 5% CO₂ インキュベータで培養した。細胞がサブコンフルエントになった後骨分化誘導培地 10% FBS、Penicillin 100 unit/ml and Streptomycin 100 μ g/ml、0.1 μ M Dexamethasone (Sigma-Aldrich)、10 mM β -Glycerophosphate (Calbiochem, CA, USA) and 0.05 mM Ascorbic Acid (Wako Pure Chemical, Osaka)、 α -Minimum essential medium を用い誘導を開始した。6週間分化誘導を行い、骨分化能を評価した。同様に非誘導群も α -MEM 培地で 6週間培養を行なった。培地は 3日毎に交換した (Figure. 1)。

2-3. 脂肪分化誘導

骨分化誘導と同様に細胞を播種し、骨分化誘導培地で 3週間分化誘導を行った後、脂肪分化誘導培地 10% FBS、Penicillin 100 unit/ml and Streptomycin 100 μ g/ml 1 μ M Dexamethasone、0.01mg/ml Insulin (Wako Pure Chemical, Osaka)、0.2 mM Indometac (Wako Pure Chemical)、0.5 mM Isobutylmethylxanthin (Sigma-Aldrich)、 α -Minimum essential medium で 3週間分化誘導を行い、脂肪分化能を評価した。同様に非誘導群も α -MEM 培地で 6週まで培養を行なった。培地は 3日毎に交換した (Figure. 1)。

2-4. 軟骨分化誘導

軟骨細胞への分化誘導はOscar Kらによって報告されたペレット培養法に準じて行った⁹⁾。第二継代した細胞 5.0×10^5 を15mlポリプロピレン製チューブに移し、1,000rpm、20℃、5分間遠心しペレットを形成した。24時間以上経ったのち軟骨分化誘導培地 (Mesenchymal Stem Cell Adipogenic®; PromoCell社) で3週間分化誘導を行い、軟骨分化誘導能を評価した。培地は3日毎に交換した (Figure. 1)。

2-5. 分化能の評価

2-5-1. 骨分化能の評価

① アリザリンレッドS染色

細胞表面をPBS (-) で2回洗浄後、100%エタノールで固定した。洗浄後、1.3% Alizarin Red S溶液 (Wako Pure Chemical, Osaka) を用いて2分間染色し、蒸留水で洗浄後乾燥させた。

② Ca定量

細胞表面をPBS (-) で3回洗浄後、0.5N HClでカルシウムを抽出し、エスパCa (NIPRO, Osaka) を用いアルセナゾIII法で1週毎にカルシウムの定量を行った。Mann-Whitney's U testを用いた。

2-5-2. 脂肪分化能の評価

オイルレッドO染色

細胞表面をPBS (-) で2回洗浄後、10%ホルマリンで固定した。洗浄後、60%イソプロパノールになじませ、Oil Red溶液 (Sigma-Aldrich, MO, USA) で染色し、60%イソプロパノール、PBS (-) で洗浄した。

2-5-3. 軟骨分化能の評価

① HE染色とトルイジンブルー染色

軟骨細胞塊をPBSで2回洗浄後、iPGell® (GenoStaff, Tokyo) を用いてゼリー化させ、4% PFA (Wako Pure Chemical, Osaka) で固定した。パラフィン包埋後に薄切しHE染色とトルイジンブルー (Wako Pure Chemical, Osaka) 染色を行なった。

② Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (PCR)

軟骨細胞塊は、PBS (-) で洗浄し、RiboPure™ Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用い、全RNAを抽出した。cDNAはQuantitec Reverse Transcription Kit® (QIAGEN, Hilden, Germany) で、42°C 30分、95°C 3分逆転写反応を行い合成した。Quantitative PCRは、CFX96 Real-Time System (BIO-RAD, CA, USA) で行った。条件は、以下のとおりである。cDNA (2 μ l)、2 μ l distilled water、5 μ l TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、1 μ l TaqMan Gene Expression Assay primer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、50°C-2分間、95°C-10分間、(95°C-15秒、60°C-60秒) \times 40cycle。TaqMan Gene Expression Assay primer: ACAN (Aggrecan, assay ID Hs00153936_m1)、TBP (TATA-binding protein, assay ID Hs00427621_m1)。ACANの反応生成量はhousekeeping gene として用いたTBPの値で標準化した。

3. 結果

3-1. 骨形成能

骨分化誘導培地による石灰化を示す強さでは、Ca濃度は非分化誘導群からは検出されなかったが、誘導群では2週から3週目以降に産生され、週数が増えるに従い産生量が増加した (Figure. 2)。Ca濃度では採取部位の差を認めずNon-repeated measure ANOVA+Kruskal Wallis H-testを行なったが、同様に有意差は認められなかった (P = 0.053)。骨芽細胞へ分化誘導したカルシウムの存在を示すアリザリンレッドS染色は誘導群で確認でき、その染色の強さは採取部位による差を認め、上顎骨由来間葉系細胞が一番低かった (Figure. 3A)。

3-2. 脂肪形成能

オイルレッドO染色は脂肪滴を染色しており、非分化誘導群では染色されなかったが、誘導群では染色された。一視野に認める染色された細胞の面積で評価した染色の強さは、腸骨由来間葉系細胞 (I-MCs: Iliac bone derived mesenchymal cells) > 下顎骨由来間葉系細胞 (Md-MCs: Mandibular bone derived mesenchymal cells) > 上顎骨由来間葉系細胞 (Mx-MCs: Maxillary bone derived mesenchymal cells) であり、歯槽骨由来間葉系細胞 (A-MCs: Alveolar derived mesenchymal cells) からは

脂肪への分化誘導を認めなかった (Figure. 3B)。

3-3. 軟骨形性能

誘導群の細胞塊は培養後にチューブ内で凝集し、徐々に大きさを増して球状化し、弾力性の増加が認められた。非誘導群は脆弱であり、その大きさに変化は認められなかった。細胞塊の切片標本を作成し組織学的にその分化度を検討すると、誘導群は内部が細胞外マトリックスに富み、最外側は軟骨膜に類似した線維層からなる被膜の形成を認めた (Figure. 4A)。トルイジンブルーの染色結果は、全ての細胞でムコ多糖分泌によるメタクロマジーを認め、I-MCsでは軟骨様細胞をみとめた (Figure. 4B)。real-time RT-PCRの相対発現量では軟骨誘導されたものとされていないものに分かれ、その強さの順にI-MCs \geq A-MCs>Mx-MCs=Md-MCsであった (Figure. 5)。

4. 考察

幹細胞とは自己複製能と多分化能を有する細胞であり、胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ES cells) と体性幹細胞 (stomatic stem cell) の2つに分けられる。組織構成する細胞には、その組織の主な機能を担う実質細胞とそれを支持する間葉系細胞があり、最もよく知られているのが骨髄に存在する造血幹細胞 (hematopoietic stem cells: HSCs) と間葉系幹細胞である。ヒト間葉系幹細胞は骨髄内のまれな細胞集団として存在し、有核細胞の0.001%から0.01%を占めると言われている¹¹⁾。発育中の臓器に存在する幹細胞の頻度は成熟した臓器より高いかもしれないが、乳幼児・幼少のヒトの臓器は倫理的観点から確認されていない。今回手術中に余剰となった組織を用いて行った我々の研究は、検体の採取部位が4ヶ所、かつ比較的若年者から採取されており、分化能を評価する上で適した検体であったと考えられる。

4-1. 骨分化誘導能について

我々の骨への分化誘導の結果では、採取部位による誘導の差は認められなかったが、歯科口腔外科の領域に伴う骨移植術では、口腔領域でない腸骨よりも顎顔面から採取した骨を用いる方が良好な臨床成績を示す事が報告されている¹²⁾。膜性骨化と軟骨内骨化では異なるサイトカインが必要である事も報告されており¹³⁾、発生学的な由来を考慮した骨移植の有用性が議論されている。また、大腿骨や腸骨に存在するMSCsは

ドナーの年齢が高くなるにつれて骨への分化能力が低下することが分かっている¹⁴⁻¹⁶⁾。手術時期や年齢も考慮すべきであるが、同等量の骨移植が必要であった場合、顎骨はよりドナーとして最適な部位であると考えられる。

4-2. 脂肪分化誘導能について

脂肪への分化誘導の結果では、I-MCsが脂肪への分化誘導能が高かった。思春期以降、造血の中心をなしていた脊椎の造形髄は60歳頃より急速に減少し始め脂肪髄が大半を占めるようになるが、その造血髄部分は椎体、腸骨、胸骨が多いことが影響していると考えられる。今回の結果を踏まえると、Mx-MCsとMd-MCsはI-MCsと比べ脂肪への分化誘導が低く、これは発生経路の差異と考えられる。またこの観点から顎骨再建の際に使用するドナーの選択肢として顎骨由来MCは有用であると考えられた。しかし一方で採取できる量に限界があるため、現在でも大きな範囲の骨欠損の際には体幹骨が第一選択となっている。これまで当教室では長期凍結保存したヒト腸骨海綿骨由来間葉系細胞も骨形成能、多分化能が維持される事とその安全性を確認しており¹⁷⁾、凍結保存細胞のviabilityも報告している^{4) 18) 19) 20)}。従って、今後複数回の骨移植が必要とされる臨床症例で凍結保存細胞が応用されることによって、採骨部の負担軽減が期待できると考えている。

4-3. 軟骨分化誘導能について

軟骨への分化誘導の結果では、A-MCsのreal time RT-PCRが軟骨誘導される群とされない群の2群に分かれ、そのドナー年齢は、軟骨誘導された歯槽骨由来間葉系細胞は20歳と16歳、されない群は9歳と7歳であった。神経堤由来の歯原生組織には高い増殖能と分化能を有する様々な幹細胞が存在しており、成体の歯髄に存在するDental pulp stem cell : DPSC²¹⁾、脱落した乳歯の歯髄に存在するStem cells from human exfoliated deciduous teeth : SHED²²⁾、歯根膜から同定されたPeriodontal ligament stem cell : PDLSCなどがある²³⁾。軟骨分化能で比較すると骨髄由来MSCsはSHEDとDPSCより高い軟骨分化能を示しており、軟骨分化に高レベルの遺伝子を発現している²⁴⁾。またTGF- β 1 (transforming growth factor beta 1) の存在下でPDLSCは骨髄由来MSCsより高い軟骨形成能を有している²⁵⁾。これらを踏まえると歯槽骨にはviabilityの異なる幹細胞が存在しそれが軟骨形成能の違いとなっているわけではなく、学童期にお

ける永久歯萌出前のドナーと青年期の違いが関係していたと考えられる。

5. 総括

本研究により、腸骨由来間葉系細胞と顎骨由来間葉系細胞の分化能の差異を確認できた。それぞれの特徴を踏まえ適切なドナー選択を行えば、臨床においてより少ない手術回数で患者負担が軽減できる事が期待できる。

6. 今後の課題

顎骨由来 MSCs は主に膜性骨化、腸骨由来 MSCs は主に軟骨内骨化の形態を辿り、その発生の違いにより生物学的活性の差異が生じていると考えられる。従って臨床での骨移植再建の際はこれらの性質を十分に理解し、より適した部位をドナーとして選択する事が望ましい。一方で、年齢による分化誘導の差異がある事や採取できるドナーの量に限界がある事から、今後益々この分野での再生医療技術の臨床展開が重要と考える。

また、骨膜には骨への分化能を有する Periosteum-derived stem/progeny cell : PSC が存在している²⁶⁾。血管成分に富む骨膜内層は膜性骨化による骨の成長を担っており²⁶⁾、ここには MSC も存在する。PSC は MSCs と比較して高い増殖能を有し、骨、軟骨、脂肪、筋肉線維へ分化し²⁷⁾、成長因子を添加することで優れた骨形成能を示す²³⁾。下顎骨に骨移植術を行なった際に、骨膜で被覆していない皮質骨内の骨のリモデリングは維持されず骨吸収されてしまう事からも、骨組織の維持に骨膜が重要である事が分かる²⁸⁾。今後臨床において骨移植術を行うための、移植骨組織・骨膜との関連に関する基礎的な研究が必要であり、また、間葉系細胞から神経細胞への分化誘導に対する報告があるため、採取部位による神経細胞への分化誘導の差異についての検討も今後の課題と思われる。

7. 謝辞

本研究は文部科学省研究補助金 (C) (17K11852) 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 武田啓先生・山崎安晴先生の温かいご指導、同医局員各先生のご協力を賜って本研究が行えたことを深謝し心より感謝を申し上げます。

8. 引用文献

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal stem Cells. *Science* 1999; 284: 143-146.
2. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *molecular biology of the cell* 2002; 13: 4279-4295.
3. Sottile V, Halleux C, Bassilana F, et al. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 2002; 30: 699-704.
4. Shimakura Y, Yamazaki Y, Uchinuma E, et al. 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.
5. Wongchuensoontorn C, Liebehenschel N, Schwarz U, 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.
6. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, et al. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg* 2012; 40: 2-7.
7. Takashima Y, Era T, Nakao K, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007; 129: 1377-1388.
8. Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, et al. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 1114-1119.
9. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669-1675.
10. Li R, Xu J, Wong DSH, et al. Self-assembled N-cadherin mimetic peptide hydrogels promote the chondrogenesis of mesenchymal stem cells through inhibition of canonical Wnt/ β -catenin signaling. *Biomaterials* 2017; 145: 33-43.

11. Baksh D, Song L, Tuan RS, et al. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 301-316.
12. Crespi R, Vinci R, Cappare P, et al. Calvarial versus iliac crest for autologous bone graft material for a sinus lift procedure: a histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22: 527-532.
13. Rabie AB, Dan Z, Samman N, et al. Ultrastructural identification of cells involved in the healing of intramembranous and endochondral bones. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996; 25: 383-388.
14. Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, et al. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng* 2002; 8: 911-920.
15. Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, et al. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* 1999; 17: 171-177.
16. Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* 2001; 82: 583-590.
17. Kumazawa K, Sugimoto T, Yamazaki Y, et al. Osteogenic potential, multipotency, and cytogenetic safety of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation. *Kitasato Med J* 2014; 44: 95-103.
18. Kotobuki N, Hirose M, Machida H, et al. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng* 2005; 11: 663-673.
19. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, et al. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 2004; 28: 33-39.

20. Hirose M, Kotobuki N, Machida H, et al. Osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells after thawing in culture. *Mater Sci Eng C* 2004; 24: 355-359.
21. Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531-535.
22. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5807-5812.
23. Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 369 (9429) : 149-155.
24. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *J Oral Maxillofac Surg* 2016; 45: 124-131.
25. Ansari S, Diniz IM, Chen C, et al. Alginate/hyaluronic acid hydrogel delivery system characteristics regulate the differentiation of periodontal ligament stem cells toward chondrogenic lineage. *J Mater Sci Mater Med* 2017; 28: 162.
26. Fell HB. The osteogenic capacity in vitro of periosteum and endosteum isolated from the limb skeleton of fowl embryos and young chicks. *J Anat* 1932; 66 (Pt 2) : 157-180. 11.
27. De Bari C, Dell' Accio F, Vanlauwe J, et al. Mesenchymal Multipotency of Adult Human Periosteal Cells Demonstrated by Single-Cell Lineage Analysis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1209-1221.
28. Sawako T, Akira M, Hiroshige C. Beneficial Role of Periosteum in Distraction Osteogenesis of Mandible: Its Preservation Prevents the External Bone Resorption. *Tohoku J Exp Med* 2010; 220: 67-75.

9. 業績目録

(I) 原 著

1. Moriyama K, Yamazaki Y, Sugimoto Y, Sugimoto T, Kumazawa K, Baba K, Sone Y, Takeda A: Difference in pluripotency of jaw and iliac bone-derived mesenchymal cells. *Kitasato medical journal*, (in press)
2. Baba K, Yamazaki Y, Sone Y, Sugimoto Y, Moriyama K, Sugimoto T, Kumazawa K, Shimakura Y, Takeda A: An in vitro long-term study of cryopreserved umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma containing growth factors- PDGF-BB, TGF- β , and VEGF. *J Craniomaxillofac Surg* 47:668-675, 2019

(II) 著 書

な し

(III) 総説・講座

な し

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. Shimomura M, Nemoto M, Moriyama K, Kounoike N, Takeda A: Extensive tenosynovial chondromatosis of the wrist: a case report. *Kitasato medical journal*, (in press)
2. 君塚 幸子, 山崎 安晴, 杉本 佳香, 森山 和の, 杉本 孝之, 石川 心介, 石渡 靖夫, 武田 啓: 下顎頭吸収を伴う骨格性下顎後退症に対して顎矯正手術を施行した 2 例. *北里医学*, 48 (1) : 33~40, 2018
3. 森山 和の, 鴻池 奈津子, 秋本 峰克, 武田 啓, 内沼 栄樹: 顔面 Myrocystic adnexal carcinoma (MAC) の 2 例. *日形会誌*, 34 (7) : 549-553, 2014.

10. 図表

No	Age, y	Sex	Donor site	Diagnosis	Cryopreservation period
1	5	M	Iliac crest	Lt CLP	2years and 9months
2	7	F	Iliac crest	Bil CLA	2years and 10months
3	6	M	Iliac crest	Lt.CLP	2years and 8months
4	9	F	Iliac crest	Lt CLA	3years and 2months
5	22	M	Maxilla	jaw deformity	1year and 11months
6	26	M	Maxilla	jaw deformity	2years and 6months
7	20	F	Maxilla	micrognathia	1year and 11months
8	24	F	Maxilla	jaw deformity	2years and 1month
9	22	M	Mandible	jaw deformity	1year and 11months
10	24	F	Mandible	jaw deformity	1year and 9months
11	22	M	Mandible	jaw deformity	2years and 4months
12	33	M	Mandible	jaw deformity	2years and 10months
13	20	F	Alveolar bone	Lt CLP	2years and 5month
14	9	F	Alveolar bone	Lt CLA	2years and 11month
15	7	F	Alveolar bone	impacted tooth	2years and 11month
16	16	F	Alveolar bone	jaw deformity	2years and 10month

Table 1. A total of 16 specimens were included (7 from males and 9 from females). Donors' mean age 17 years, range 5-33. Four specimens each were harvested from the iliac, maxilla, mandible, and alveolar bones (derived from the maxilla). CLP, cleft lip and palate; CLA, cleft lip and alveolus; Rt, right; Lt: left; Bil, bilateral

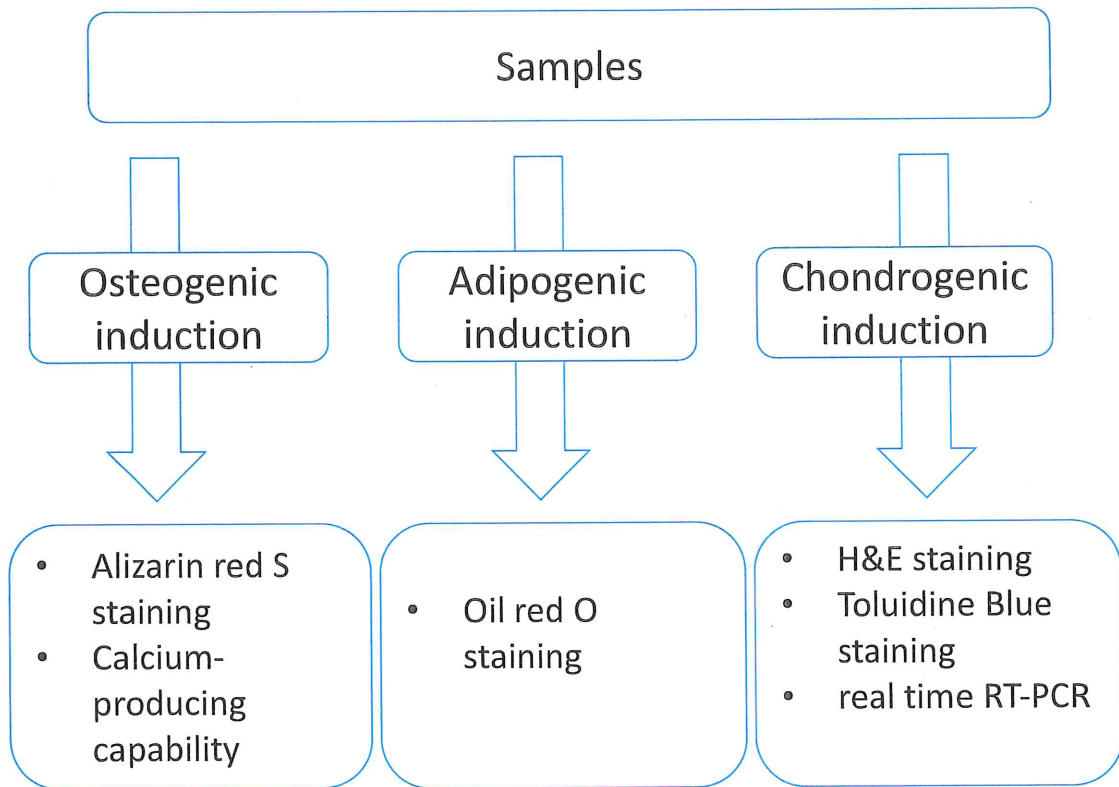


Figure 1. Protocol for differentiation induction and methods for the analysis of differentiation

Ca-producing capability

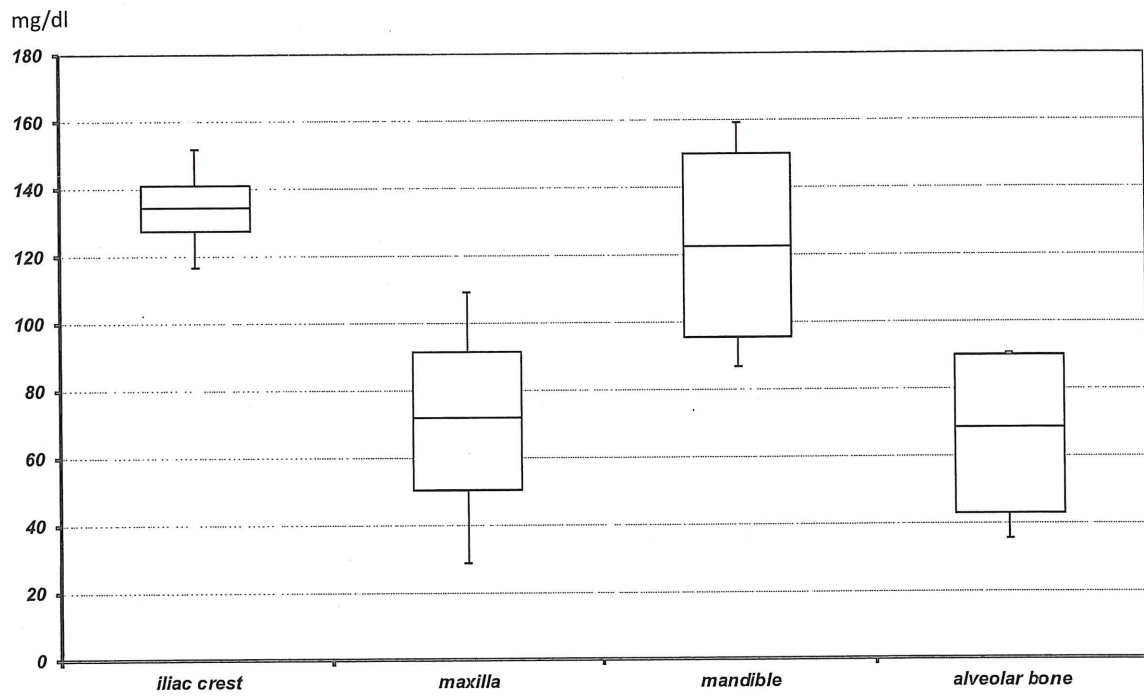


Figure 2. Ca-producing Capability

No significant differences were observed using the non-repeated measure ANOVA and Kruskal-Wallis H-test ($P = 0.053$)

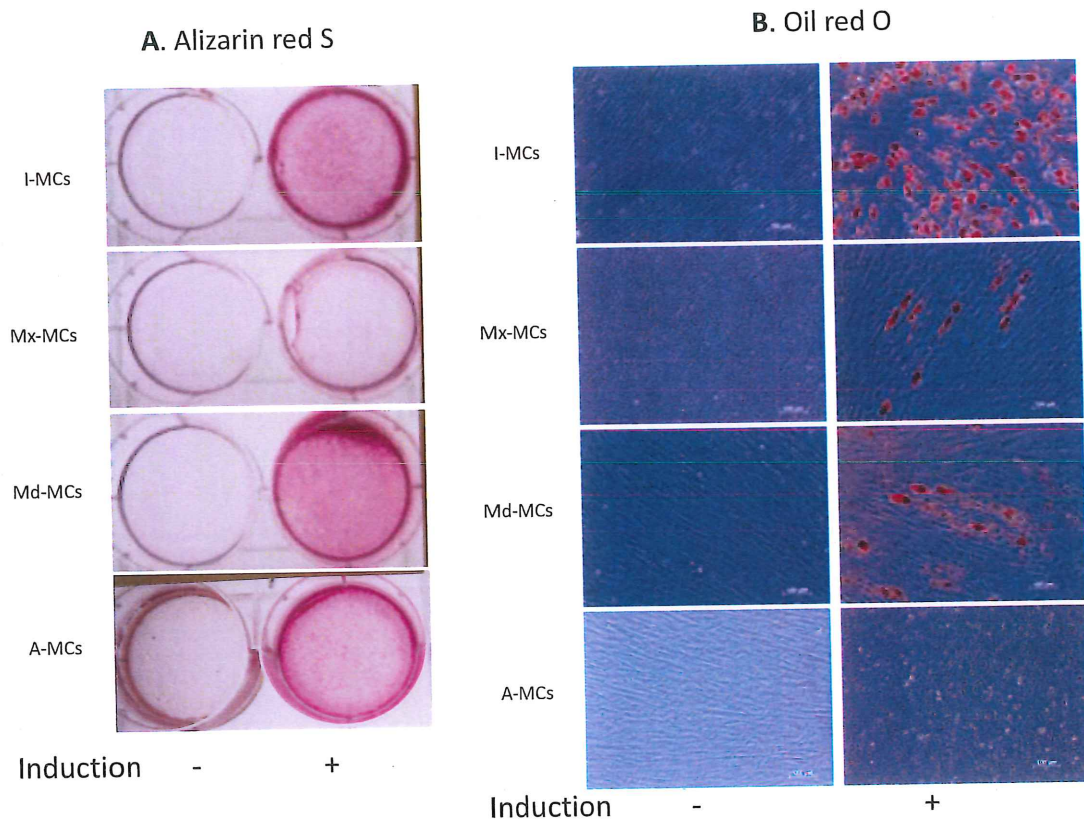


Figure 3. Osteogenesis (alizarin red S staining) and adipogenesis (oil red O staining)

A. Cells in the differentiation induction group were stained with alizarin red S.

B. Differentiation induction groups of I-MCs, Mx-MCs, and Md-MCs were stained with oil red O, and staining intensities differed depending on the harvesting site. A-MCs in the differentiation induction group were not stained

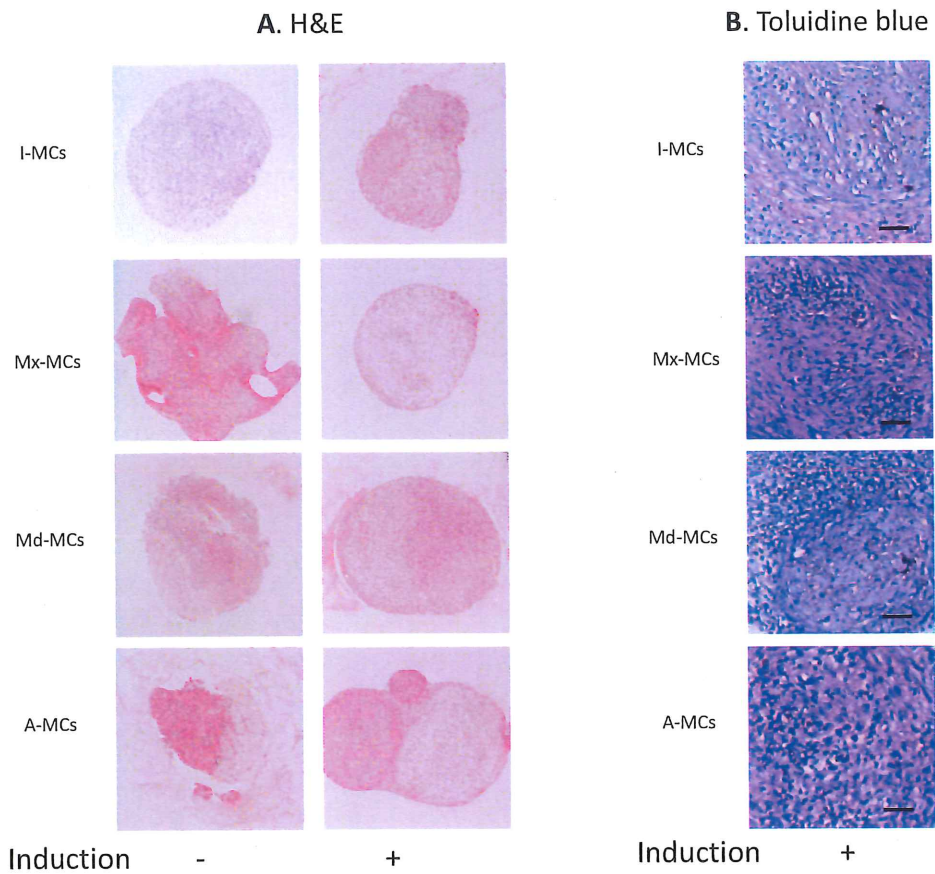


Figure 4. Staining results

A. In the differentiation group, H&E staining showed abundant extracellular matrix inside the mass and formation of an outermost capsule comprising a perichondrium-like fibrous layer ($\times 10$).

B. In the differentiation group, toluidine blue staining showed metachromasia, and chondrocyte-like cells were noted for I-MCs. Bar = 150 μm

Relative expression levels of ACAN

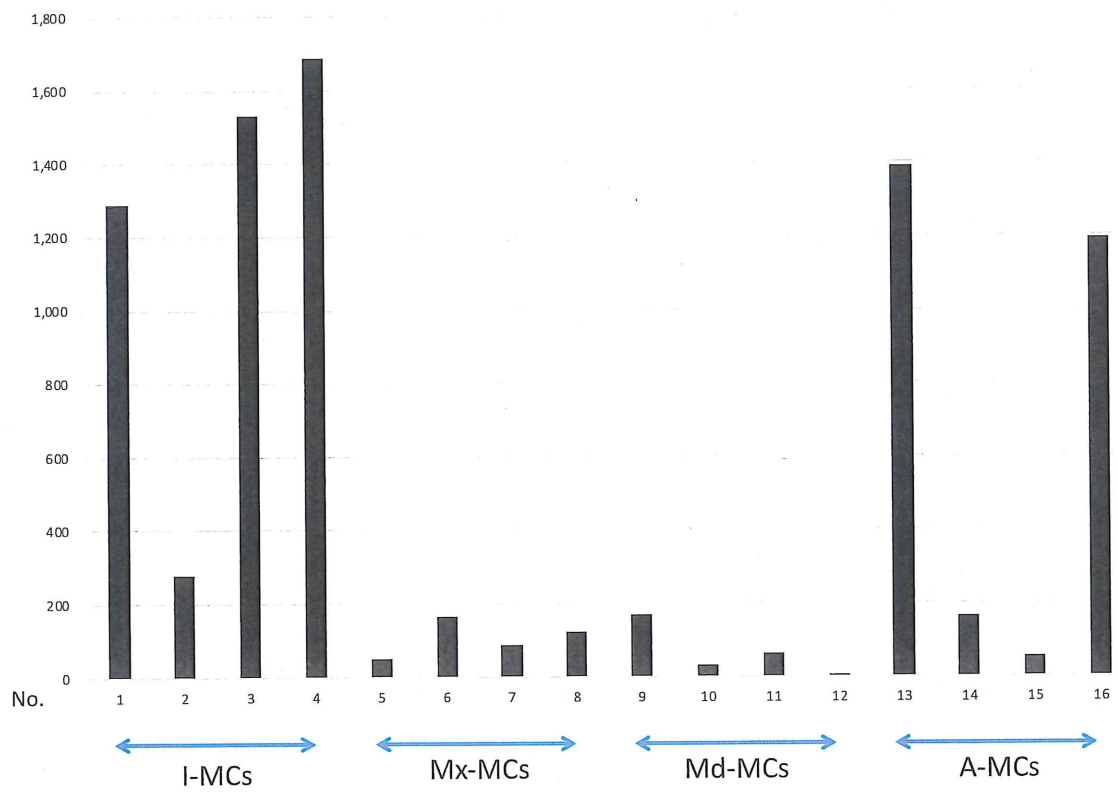


Figure 5. Relative expression levels of ACAN varied depending on the harvesting site.