

ヒト臍帯由来間葉系幹細胞を用いた再生医学的アプローチ

による早期顎裂閉鎖に向けた基礎研究

豊田 亜希子

明海大学大学院歯学研究科

歯学専攻

(指導：須田 直人 教授)

Basic Study for Early Alveolar Cleft Closure by Regenerative Approach

Using Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells.

Akiko TOYOTA

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor : Prof. Naoto SUDA)

要旨

唇顎口蓋裂児の顎裂は、口腔の形態と機能の異常の原因となる。顎裂部の骨架橋形成のために、幹細胞を用いた再生医療が有用と考えられる。そこで、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞をラットの顎裂モデルに移植し、骨形成能を検討した。ヒト臍帯から酵素法により細胞（UC-EZ）を得た後、さらに CD146 陽性細胞を磁気分離法により分離した（UC-MACS）。*In vitro* においていずれの細胞も間葉系幹細胞マーカーが陽性で、未分化維持関連遺伝子を発現し多分化能を有していた。*In vivo* ではハイドロキシアパタイトとコラーゲンの複合体から成る担体に UC-MACS を播種し、ラットの顎裂モデルへ移植した。マイクロ CT および組織染色により骨形成の評価を行ったところ、担体単独に比べて UC-MACS を加えた移植は骨形成量を増加させた。新生骨周囲にはオステオポンチン陽性の骨芽細胞様細胞が集積し、ヒト特異的ミトコンドリア陽性細胞も観察された。以上より、UC-MACS は骨組織誘導能を持ち、顎裂部骨再生の有用なバイオリソースであると考えられた。

牽引用語：顎裂，臍帯由来間葉系幹細胞，酵素法，磁気分離法，骨組織形成

欄外表題：臍帯由来間葉系幹細胞による顎裂部骨再生

Abstract

The alveolar cleft causes the morphological and functional abnormality of the oral cavity. Regenerative medicine using the mesenchymal stem cells (MSCs) is expected to be useful to form bone bridge between alveolar clefts. In this study, we examined the bone formation ability of the human umbilical cord derived MSCs by transplantation into the rat alveolar cleft model. Human umbilical cord were digested by enzymatic method and isolated cells (UC-EZ) were collected. Next, CD146-positive cells were isolated from UC-EZ using magnetic activated cell sorting (UC-MACS). Both type of cells showed MSC gene/protein expression and multipotency, *in vitro*. To evaluate bone formation *in vivo*, UC-MACS were transplanted with hydroxyapatite and collagen (HA+Col) into alveolar cleft model. The results of micro computed tomography and histological staining showed that UC-MACS induced more abundant bone formation than HA+Col implantation solely. Cells immunopositive for osteopontin were accumulated and embedded in newly formed bone. Cells immunopositive for human-specific mitochondria were observed in both mineralized and non-mineralized tissues. These findings indicate that UC-MACS are responsible for new bone formation and can be expected as an useful bioresource for regeneration in alveolar clefts.

Key words: alveolar cleft, umbilical cord mesenchymal stem cells, enzymatic digestion,

magnetic activated cell sorting, osteogenesis

緒言

唇顎口蓋裂は、口唇裂、口蓋裂および顎裂が合併した 1/500 という高い発症率の先天性疾患である^{1, 2)}。原因として、遺伝的要因と環境的要因が知られている多因子疾患である^{3, 4)}。唇顎口蓋裂児の顎裂は、これに付随した他の顎顔面領域の形態的、機能的異常の原因となり得る。形態的異常として、鼻翼基部の非対称、歯列不正、不連続な顎堤、歯列の狭窄、歯の欠如や萌出位置異常があげられ、機能的異常としては、哺乳障害、咬合障害、構音障害や鼻腔と口腔の交通、顎裂部への舌の突出があげられる⁵⁻⁷⁾。

一般的な唇顎口蓋裂の治療は、生後 3～6 カ月で口唇形成術により口唇裂を閉鎖する。引き続き 1～1 歳 6 カ月で口蓋形成術により口蓋裂を閉鎖し、5～10 歳に顎裂部二次骨移植を行う。そして、出生直後から成人するまで長期間にわたり、形成外科、口腔外科、矯正歯科、言語聴覚、摂食嚥下、補綴科、インプラント科などの種々の診療科による連携治療が必要となる。

上記の治療スケジュールの問題点として、断裂した顎堤が顎裂部二次骨移植施行まで残存し、顎裂部への舌の突出や歯の萌出や移動の制約など、種々の形態的、機能的問題が未解決のままとなる。また、顎裂部二次骨移植時に再度入院と全身麻酔下の外科手術が必要となる。そこで早期における顎堤の連続性の獲得、顎裂間の骨架橋の形成、顎裂部二次骨移植の回避を目的として、口唇形成術施行時に歯肉骨膜形成術 (gingivoperiosteoplasty : GPP) による早期の顎裂閉鎖が行われている⁸⁻¹¹⁾。しかしな

がら、GPP 施行後、5～7 歳時のコンビーム CT における三次元的評価では、顎裂部に骨架橋が形成され歯槽部の連続性が得られたものの、骨架橋形成量は臨床的に十分ではなかった¹²⁾。今後、GPP において骨架橋形成と骨組織形成量を向上させるために、再生医療を応用することが必要と考えられている¹³⁾。

Mesenchymal stem cells (MSCs) は成体マウスの骨髄吸引液中から同定され¹⁸⁾、再生医療の幹細胞移植療法の細胞源として期待された。再生医療において、幹細胞移植療法は有力な組織再生法と考えられている。MSCs は、骨髄、脂肪組織、歯周組織など様々な組織から単離されている¹⁴⁻¹⁷⁾。GPP 施行時にも乳児の骨髄移植が期待されている。しかし、骨髄由来幹細胞の分離には、乳児の腸骨骨髄穿刺を行わなければならない、負担や侵襲が大きいことが欠点と考えられている^{14,18-20)}。そこで患児にも母体にも非侵襲的に単離可能な MSCs が求められてきた。

近年、臍帯からも MSCs が分離可能と報告され、その未分化性と多分化能が注目されている²¹⁾。臍帯は出産後に不要となるため、倫理的な問題が少なく、採取においても母子に対し非侵襲的である。また human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) の特徴として、得られる細胞数が豊富で、未熟な細胞が多く、多分化能と低い免疫原性を有し、活性化した免疫細胞の増殖を抑制すると報告されている^{22, 23)}。

In vivo において、hUCMSCs を頭蓋冠に欠損を作製した動物モデルに移植し、十分な骨形成がなされたと報告された²⁴⁻²⁶⁾。特に、CD146 は高いコロニー形成能と多分化

能, 高い造血支持能を有する MSCs のマーカーとして注目されており, CD146 陽性 hUCMSCs は, 骨分化能力が高いことが知られている²⁷⁾. しかし, hUCMSCs を唇顎口蓋裂児の顎裂部に移植した報告はいまだない. そこで本研究では, hUCMSCs を用いてラットの顎裂モデルに移植し *in vivo* における骨形成能を調べた.

材料と方法

1. 細胞培養

ヒト臍帯は、産科医院で同意を取得後、健常な 25～38 歳の帝王切開を施行した満期妊産婦から採取した。臍帯を 5～6 cm 長に切断後、滅菌カミソリ（フェザー安全剃刀、大阪）にて約 2～3 mm 四方の大きさに細切した。ヒト臍帯間質細胞は、酵素法（enzymatic digestion；EZ 法）により分離した。EZ 法により得られた細胞の中から磁気分離法（magnetic activated cell sorting；MACS 法）にて CD146 陽性細胞を分離した。

EZ 法はこれまでの報告²⁸⁻³⁰⁾にしたがい行った。簡潔に記すと、細切した組織を Hanks 液（日水製薬、東京）に溶解した 3 mg/ml collagenase type I（Merck KGaA, Darmstadt, Germany）と 4 mg/ml dispase（和光純薬工業、大阪）の混合溶液（pH 7.4）35 ml 中に移し、37°C で 16 時間インキュベート後、遠心分離機（KUBOTA 5800；久保田商事、東京）にて細胞成分を分離した（430 ×g）。その後、70 μm 径のセルストレイナー（Merck KGaA）により細胞を単離し、 1×10^6 個の細胞を 100 mm 培養皿（Corning, Corning, NY, USA）に播種し、培養した。培養液（growth medium；GM）には、10% fetal bovine serum（FBS；Lot No: S13025S1780, Biowest, Nuaille, France）、100 μM glutamate（GlutaMAX I；Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）、0.1% minimum essential medium（MEM）- non-essential amino acids（NEAA）（Thermo Fisher Scientific）、50 U/ml penicillin、50 μg/ml streptomycin（Thermo Fisher Scientific）、0.25 mg/ml Fungizone（Thermo Fisher Scientific）を添加した α-MEM（Thermo Fisher Scientific）を用いた。得られた細胞を UC-EZ とし

た.

MACS 法は, Aslan ら³¹⁾の方法にしたがい行った. 簡潔に記すと, $1-2 \times 10^7$ 個の継代数 2 の UC-EZ に, 非特異的抗体結合ブロッキング剤である FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を 10 分間氷上で作用させた. CD146 マイクロビーズを 4°C , 15 分間作用させた後, 0.5% bovine serum albumin (BSA) 含有 phosphate buffered saline (PBS ; タカラバイオ, 草津) ($\text{pH}7.4$) で洗浄した. MACS セパレーター (Miltenyi Biotec) に装着された LS カラム (Miltenyi Biotec) に 3 ml の PBS を注入後, 細胞ペレットを 500 μl の同 PBS 中で再懸濁し, カラムに注入した. カラムを通過した CD146 陰性細胞は廃棄し, カラムに残った CD146 陽性細胞をプランジャーで押し出し 15 ml チューブ (Star ; 理科研, 名古屋) に回収した. 回収した CD146 陽性細胞を UC-MACS とした.

UC-EZ は 5.0% CO_2 の 37°C 湿潤下で培養した. GM は 3 日おきに新しい培地と交換した. 70~80% コンフルエントに達した後, TrypLE™ Select (1X) (Thermo Fisher Scientific) (以下 trypsin/EDTA) を用いて細胞を回収し, 1: 3 の割合で継代培養を行い, 継代数 2 または 3 の細胞を実験に供した. UC-MACS は分離後継代した細胞を実験に使用した. 以下の実験では, 少なくとも 3 人以上の異なる患者由来の細胞を用いた.

2. フローサイトメトリー

継代数 3 の UC-EZ と UC-MACS を trypsin/EDTA を用いて培養皿から回収し, 5 分

間の遠心分離後 (430 ×g), 4%パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液で 15 分間固定した。各種抗ヒト抗体を添加し室温で 1 時間インキュベートした。Baksh ら²²⁾の方法に従い、一次抗体は, fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識マウスモノクローナル抗ヒト CD14, CD45, CD73, CD105, CD146 抗体, phycoerythrin (PE) 標識マウスモノクローナル抗ヒト CD90 抗体 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), FITC 標識マウスモノクローナル抗ヒト CD34, CD44 抗体 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), FITC 標識マウスモノクローナル抗ヒト CD19 (BioLegend, San Diego, CA, USA) を使用し, 遮光し氷上にて 30 分間インキュベートした。一次抗体を使用せず PBS のみとインキュベートしたものを陰性コントロールとした。抗体と反応させた細胞を PBS で洗浄し, フローサイトメーター (SH800 ; ソニー, 東京) を使用して各抗体に対する細胞表面抗原のマーカ解析を行った。各抗体について独立した実験を 3 回繰り返し行った。

3. 遺伝子発現解析 (RT-PCR; Reverse transcription (RT) - Polymerase chain reaction (PCR))

コンフルエントまで培養した 2 種の細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して total RNA を抽出した。1 µg に調製した total RNA を用いて, High Capacity cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) により cDNA を合成し, Quick Taq HS DyeMix (東洋紡, 大阪) を用いて 20 µl の反応液を調製した。PCR 反応は 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) を用い, 94°C で 2 分間反応させた後,

94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分を 1 サイクルとして, 35 サイクル行った. 使用したプライマーを Table 1 に示す. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロールとして用いた. PCR 反応産物液は 0.5 µg/ml ethidium bromide 添加 1.8% agarose gel にて電気泳動後, 紫外線照射下で観察した.

4. 多分化能評価

1) 骨芽細胞分化誘導

過去の報告^{32, 33)}に従い, 2 種の細胞を 24 well プレートに 2×10^4 個/well となるよう播種し, GM 中で培養した. コンフルエントに達した後, 骨芽細胞分化誘導培養液として 10% FBS, 10 nM dexamethasone (Merck KGaA), 10 mM β -glycerophosphate (Merck KGaA), 100 µM L-ascorbate-2-phosphate (和光純薬工業) を添加した α -MEM (Thermo Fisher Scientific) を用いた. 陰性コントロールとして 10% FBS 含有 α -MEM 培地を用い, 同様に培養した. 培地交換は 3 日おきに行い, 誘導培養液に交換後, 3 週間培養を継続した. 分化誘導開始から 3 週間後, 石灰化結節の形成の評価を行うため, Alizarin Red S 染色を行った. まず各 well から培地を除き, PBS にて 1 回洗浄した後, 10% 中性緩衝ホルマリン (和光純薬工業) を用いて細胞を 10 分間固定した. 1% Alizarin Red S (Merck KGaA) により室温で 30 分間染色後, 洗浄し観察を行った.

2) 脂肪細胞分化誘導

過去の報告^{34, 35)}に従い, 2種の細胞を24 wellプレートに 2×10^4 個/wellとなるよう播種し, GMにより培養を行った. コンフルエントに達した後, 脂肪細胞誘導培養液として10% FBS, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Merck KGaA), 0.5 μ M hydrocortisone (和光純薬工業), 60 μ M indomethacin (Merck KGaA)を添加した α -MEM培地を用いた. 陰性コントロールとして10% FBS含有 α -MEM培地を用い, 同様に培養した. 培地交換は3日おきに行い, 誘導培養液に切り替えてから3週間培養を継続した. 分化誘導開始から3週間後, 細胞内の脂肪滴の形成評価を行うため, Oil Red O染色を行った. まず各wellから培地を除き, PBSにて2回洗浄した後, 10%中性緩衝ホルマリンを用いて室温で15分間固定した. 60% isopropanol (和光純薬工業)で1回洗浄した後, 各wellを完全に乾燥させた. 乾燥後, 0.2% Oil Red O溶液 (和光純薬工業)により室温で15分間染色を行い, 精製水で各wellを4回洗浄した. 形成された脂肪滴の観察を行った.

5. 移植による硬組織形成能評価

1) 移植材料および移植方法

今回移植に用いた担体 (リフィット ; HOYA, 東京) の組成は, ハイドロキシアパタイト (HA) : コラーゲン (Col) = 80 : 20 で, 実際の骨組織に近似した組成を持つ³⁶⁾.

16週齢雄性 Sprague Dawley (SD) ラット (日本クレア, 東京) に, 全身麻酔とし

て3種混合麻酔薬（塩酸メデトミジン（0.15 mg/kg）（明治製薬，滑川），ミダゾラム（2.0 mg/kg）（富士製薬，東京），酒石酸ブトルファノール（2.5 mg/kg）（明治製薬）を腹腔内に注射した．1%リドカイン（1.5 mg/kg）（昭和薬品化工，東京）を上顎骨の粘膜下層に局所麻酔し，外科用メスを用いて上顎骨と歯槽粘膜の境目に縦切開を加え，上顎骨の頬骨弓から同側の上顎切歯にかけて歯槽粘膜を剥離し，骨膜を露出させた．続いてこれまでの報告^{37,38)}にしたがって，手動の低速ドリルを用いて，上顎骨に $5 \times 2.5 \times 1 \text{ mm}^3$ の骨欠損を作製した．移植は，担体を単独で移植した群（以下 HA+Col 群），担体とともに UC-MACS を移植した群（以下 HA+Col+UC-MACS 群），担体も細胞も移植していない群（negative control 群）の3群に分けて行った．作製した骨欠損と同サイズの担体を移植し，HA+Col+UC-MACS 群では， 1×10^6 個の UC-MACS を移植直前に担体に播種し，移植した．その後，非吸収性縫合糸を用いて歯肉粘膜を縫合し，動物が麻酔から覚醒するのを確認した．hUCMSCs には免疫調整効果があるという過去の報告^{23,39)}に従い，免疫抑制剤は用いなかった．

2) マイクロ CT による硬組織形成評価

移植 8 週後にペントバルビタール（ソムノペンチル；共立製薬，東京）の腹腔内投与（70 mg/kg）によりラットを安楽死させた．ラットの上顎骨を摘出後，4% PFA を用いて 4°C にて3日間固定し70%エタノールに置換した．その後 CosmoScan GX II（90 kV，88 μA ，50 voxels；リガク，東京）にてマイクロ CT（ μCT ）画像を撮影した．

3) 組織学的・免疫組織化学的評価

摘出した上顎骨は 4% PFA 溶液にて固定後，通法に従い脱灰とパラフィン包埋を行い，厚さ 4 μm の切片を作製した．脱パラフィンした切片をヘマトキシリン・エオジン染色した．免疫組織化学的染色には，一次抗体として，ウサギ抗ヒト osteopontin (OPN) ポリクローナル抗体 (ab8448; Abcam, Cambridge, UK, 希釈倍率 1:200)，マウス抗 human Mitochondria モノクローナル抗体 (MAB1273; Merck KGaA, 希釈倍率 1:80) を用いた．Peroxabolish (Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) による内在性ペルオキシダーゼの不活化の後，一次抗体に応じて 10 mM クエン酸 (95°C, 30 分間) 処理による抗原の賦活化を行った．非特異的抗体結合のブロッキングは Blocking One Histo (ナカライテスク, 京都) を室温で 10 分間作用させた．前述の各一次抗体を 4°C で一晩反応させた．二次抗体には Dako EnvisionTM + Dual Link System-HRP (Dako, Glostrup, Denmark) を用い，室温で 30 分間作用させた．3,3'-diaminobenzidine using ImmPACTTM DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) による発色後，ヘマトキシリンで対比染色を行った．陰性コントロールは一次抗体の代わりに PBS を用い，同じ手順で染色した．

本研究は，明海大学歯学部倫理委員会の承認 (A1603) と，愛和病院 (産科医院) の倫理委員会の承認のもと，提供を受けた臍帯を使用して実施された．動物実験は，明海大学歯学部動物実験倫理委員会規程に則って計画し，実験動物倫理委員会の承認

後行った (A1833).

結果

1. 細胞形態

初代培養 4 日後の UC-EZ において、線維芽細胞様細胞を含む様々な形態を有する細胞集団を認めた (Fig 1A). UC-MACS では、MACS による CD146 陽性細胞の分離により、線維芽細胞様の均一な細胞集団を認めた (Fig 1B).

2. 表面抗原の発現

表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析を行った. 2 種の細胞は、CD14 (単球マーカー)、CD19 (B 細胞マーカー)、CD34 (造血幹細胞マーカー) および CD45 (白血球抗原マーカー) の発現は低く、いずれも 7% 以下であった.

一方、間葉系幹細胞マーカーである CD44、CD73、CD90、CD105 の発現は高く、2 種の細胞とも 75% 以上で陽性であった. CD146 の発現に関しては、UC-EZ で 48.8%、UC-MACS で 86.5% と後者で大きく増加した. また CD44、CD73 および CD90 の発現についても、UC-MACS は UC-EZ よりも陽性細胞の比率が高かった (Fig 2).

3. RT-PCR による遺伝子発現解析

GM で培養し、コンフルエントに達した UC-EZ と UC-MACS における種々のマーカー分子の遺伝子発現を RT-PCR で検討した. その結果、UC-EZ は未分化維持関連遺伝子の *Nanog* と *Oct3/4* は発現したものの *Sox2* は発現しなかった. 一方、UC-MACS

は *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2* をすべて発現した (Fig 3). また UC-MACS は UC-EZ より *Nanog* と *Oct3/4* の発現が強かった.

4. *In vitro* における多分化能

骨芽細胞への分化能評価では, 誘導 3 週間後の 2 種の細胞において Alizarin Red 陽性の石灰化結節の形成が認められた (Fig 4A, C). 一方, 陰性コントロールにおいては, 陽性像は認められなかった (Fig 4B, D). 両細胞間で石灰化結節の形成に差は認めなかった.

脂肪細胞への分化能評価では, 誘導 3 週間後の 2 種の細胞において, Oil Red O 陽性の脂肪小滴の形成が細胞内に認められた (Fig 4E, G). 一方, 陰性コントロールにおいては, 陽性像は認められなかった (Fig 4F, H). 両細胞間で脂肪滴の形成に差は認めなかった.

5. *In vivo* における骨形成能評価

1) μ CT 所見

ラット上顎骨に骨欠損を作製した直後の μ CT 像を観察すると, 欠損部に相当して CT 値が著しく低い領域がみられ, 境界明瞭な骨欠損が作製された (Fig 5A-C). 欠損部に担体を移植すると, その直後は周囲の硬組織と比較して明らかに骨欠損部の CT 値は低く, 担体は既存骨と識別可能であった (Fig 5D-F).

移植 8 週後において、negative control 群では骨欠損部に骨架橋形成は認められず島状の不透過像がわずかにみられた (Fig 5G-I). HA+Col 群では既存骨と連続した薄い骨架橋形成を認めた (Fig 5J-L). 一方、HA+Col+UC-MACS 群では欠損部の前方と後方の既存骨と連続した CT 値の高い不透過像がみられた。また欠損中央部において周囲の既存の皮質骨と比較し粒子状の不透過像を認めた (Fig 5M-O).

2) 組織学的所見

ヘマトキシリン・エオジン染色像より、negative control 群では骨架橋形成は認められず、顎裂モデルの骨欠損部に島状にわずかな新生骨の形成を認めた (Fig 6A, B). HA+Col 群では骨欠損部において薄い線維骨様の骨架橋形成がみられた。また新生骨中に担体が一部残存していた。欠損部断端の既存骨と新生骨は一部連続していたが、既存骨は緻密骨で層板構造を認めたのに対し、新生骨は担体周囲に不規則な線維骨の形成を認め、両者は区別が可能であった (Fig 6C, D). HA+Col+UC-MACS 群では骨欠損部の特に鼻腔・切歯側において、既存骨から連続した塊状の厚い層板骨様と線維骨様の骨組織が形成された。既存骨と新生骨の境界を区別することはできなかった (Fig 6E, F). なお、担体はわずかに残存していた。また HA+Col+UC-MACS 群の未石灰化組織には、空胞状を呈する担体があった (Fig 6E).

3) 免疫組織化学的所見

すべての群において、骨欠損部にオステオポンチン陽性細胞を認めた。特に、HA+Col 群と HA+Col+UC-MACS 群では、新生骨の骨表面と骨中に埋入されたオステオポンチン陽性細胞を認めた (Fig 7A-F)。

Negative control 群と HA+Col 群は、抗ヒト特異的ミトコンドリア抗体に対して免疫反応が陰性だったが、HA+Col+UC-MACS 群では、ヒト特異的ミトコンドリア陽性細胞を新生骨中および担体周囲の未石灰化組織中に認めた (Fig 7G-I)。

考察

顎裂部の骨再生の実現に向けた再生医療技術の確立を目指し、ヒト MSCs であるヒト臍帯幹細胞に注目した。本研究では、hUCMSCs を分離・培養し、その MSCs 特性を *in vitro* と *in vivo* において細胞生物学的および組織化学的に解析した。

MACS のマーカーとして使用した CD146 は、血管内皮細胞の活性化や血管新生において重要な細胞接着タンパク質であり、多能性を持つ MSCs を同定するマーカーとして知られている⁴⁰⁾。また *In vitro* において高いコロニー形成能と早期の骨芽細胞分化能を有することが報告された⁴¹⁾。*In vivo* においてマウスに CD146 陽性骨髄間質細胞を移植すると造血微小環境が形成された⁴²⁾。またラット頭蓋骨欠損モデルに多孔性リン酸カルシウムセメントとともに CD146 陽性 hUCMSCs を移植すると、骨形成と血管新生が経時的に増加した²⁷⁾。このように CD146 陽性 hUCMSCs は高い造血支持能を有し、良好な骨形成能を持つことが報告されている²⁷⁾。

細胞形態より、初代培養 4 日後の UC-EZ では線維芽細胞様細胞を含む様々な形態の細胞が観察されたが、MACS により分離した CD146 陽性細胞の UC-MACS は線維芽細胞様細胞の比率が高いと考えられた。この点は過去の報告と一致し、酵素法でのみ分離した細胞集団は、幅広く扁平な筋線維芽細胞様細胞と長細い紡錘形の線維芽細胞様細胞を有する細胞集団と報告されており、筋線維芽細胞様細胞は、初期の培養のみ存在し、徐々に減少するか、または継代に伴って線維芽細胞に置き換えられると考えられている⁴³⁾。

フローサイトメトリーにおける細胞表面抗原解析では、2種の細胞でMSCs マーカーである CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 の発現が認められた。この結果はこれまでの報告と一致し、MSCs の特性を有する細胞が存在することを示唆している²²⁾。一方で、CD14 (単球マーカー)、CD31 (内皮細胞マーカー) および CD34 (造血幹細胞マーカー) の発現は低く、単離した2種の細胞には血液系細胞はほぼ含まれていなかったと考えられる。Tsang ら²⁷⁾の報告と同様に、本研究で用いた磁気分離法は、CD146 陽性細胞を 48.8% より 86.5% に増加させ、CD44 (85.0% より 99.9%)、CD73 (87.1% より 99.9%) および CD90 (91.5% より 99.7%) の発現も増加させ、MSCs の高率化に有効なアプローチ法と考えられる。

分化誘導前の RT-PCR により、ES 細胞や iPS 細胞の多分化能の維持に關与する転写因子として知られている *Nanog*, *Oct3/4* および *Sox2* を解析した。UCMSCs はこれらの幹細胞と比較して、*Nanog*, *Oct3/4* および *Sox2* の発現率が低いことが知られている⁴⁴⁾。本研究で UC-EZ の *Sox2* の発現が認められなかったのも、このような UCMSCs の特性と考えられる。また UC-EZ の *Nanog*, *Oct3/4* および *Sox2* の発現強度と比較して UC-MACS の各遺伝子の発現が亢進していることから、UC-MACS はより純度の高い間葉系幹細胞であると考えられた。

多分化能の評価に関しては、骨芽細胞、脂肪細胞への各種分化誘導により、両細胞は組織特異的染色に陽性を示し、骨芽細胞と脂肪細胞への分化が認められた。この結

果はこれまでの報告と一致し²²⁻²⁵⁾、両細胞は多分化能を有していることが明らかとなった。

In vivo における骨形成能の評価において、実験動物のサイズより、骨欠損作製はマウスでは手技的に困難なためラットを用いた。16週齢を用いた理由としては、この顎裂モデルでは8週齢以下のラットでは骨修復の速度が速すぎるため、欠損部の評価が困難と考えられているためであった³⁷⁾。

今回使用した担体は、ヤギの腸骨欠損モデルにおいて移植直後はエックス線上で透過像を示し、移植4週間後には旺盛な仮骨形成がエックス線上で不透過像として確認できると報告されている³⁶⁾。移植12週間後には大部分の担体が吸収され、24週間後ではほぼ完全に吸収され新生骨に置換される。また β -TCPなどの骨補填材と比較し、多孔質で湿潤時に弾力性を有し、母床骨と間隙が生じることなく骨が形成されると報告されている³⁶⁾。しかしながら本研究の結果では、移植8週間後も新生骨中に担体が一部残存しており、今後長期にわたる研究が必要だと考えられる。

移植8週後のHA+Col群は担体周囲に不規則な幅の薄い線維骨の形成を認め、既存骨と識別可能だったのに対し、HA+Col+UC-MACS群では骨欠損部において、既存骨から連続した塊状の厚い層板骨様と線維骨様の骨組織が形成され、既存骨との識別はできなかった。以上より、UC-MACSが移植8週後に観察された緻密な新生骨形成に関与していると考えられる。

オステオポンチンは骨芽細胞、破骨細胞およびマクロファージなどから産生される

非コラーゲン性骨基質タンパク質であり，骨芽細胞の初期分化過程に大きく関わっていることが知られている⁴⁵⁾．免疫組織化学的所見より，すべての群の新生骨中とその周囲にオステオポンチン陽性細胞を認めたから，石灰化度がやや低い骨組織である可能性があり，石灰化度が高い骨質が形成されるにはもう少し時間がかかると考えられる．また HA+Col+UC-MACS 群では，形成された新生骨内や周囲の未石灰化組織中にヒト特異的ミトコンドリア陽性細胞が観察されたことから，移植した UC-MACS が骨組織形成の誘導に関与していると考えられる．

結論

本研究で得られた2種類のヒト臍帯由来間葉系細胞は、間葉系幹細胞マーカーに陽性で、未分化維持関連遺伝子を発現し、多分化能を有することから、間葉系幹細胞の存在が示唆された。UC-EZ から分離した CD146 陽性の UC-MACS は硬組織形成能を有していたことから、唇顎口蓋裂児の顎裂部の歯槽骨再生に有用なバイオリソースと考えられた。

謝辞

本論文を執筆するにあたり，全過程において御指導頂きました明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野 須田直人教授に心より感謝申し上げます。また，本論文をご精読頂き有用な御助言を賜りました明海大学歯学部形態機能成育学講座解剖学分野 天野修教授，口腔生物再生医工学講座生化学分野 友村明人教授，形態機能成育学講座口腔小児学分野 星野倫範教授に深謝致します。本研究に対して多くの御協力を頂いた明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野の教室員の皆様，口腔生物再生医工学講座微生物学分野 天野滋准教授ならびに埼玉医科大学形成外科学講座 時岡一幸准教授に厚く御礼申し上げます。なお，本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究 15K15759）および2018年度宮田研究奨励金（E）の助成により行われた。

引用文献

- 1) Brito LA, Meira JG, Kobayashi GS and Passos-Bueno MR : Genetics and management of the patient with orofacial cleft. *Plast Surg Int*, doi:10.1155/2012/782821, 2013
- 2) 幸地省子 : 本邦における口唇口蓋裂の発生頻度と治療評価法の検討. *日口蓋誌* **32**, 1-9, 2007
- 3) Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ and Shaw WC : Cleft lip and palate. *Lancet* **374**, 1773-1785, 2009.
- 4) 高橋症二郎 : 口唇裂・口蓋裂の発症機序と発症原因. *日口蓋誌* **15**, 49-61, 1990
- 5) Menezes C, de Arruda JA, Silva LV, Monteiro JL, Caribé P, Álvares P, Almeida MC, Coelli JC, Goldemberg F, Silveira M, Sobral AP and Bueno DF : Nonsyndromic cleft lip and/or palate : A multicenter study of the dental anomalies involved. *J Clin Exp Dent* **10**, e746-750, 2018
- 6) Paradowska-Stolarz A and Kawala B : Occlusal disorders among patients with total clefts of lip, alveolar bone, and palate. *Biomed Res Int*, doi:10.1155/2014/583416, 2014.
- 7) Sasaki R, Arakaki K, Tamura F, Kinutani T and Sunakawa H : Analysis of tongue movements during sucking by infants with cleft lip and palate using a diagnostic ultrasound device: Changes during the six months after birth. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol* **26**, 456-463, 2014
- 8) Hopper RA and Al-Mufarrej F : Gingivoperiosteoplasty. In: *Comprehensive Cleft Care*

- Second Edition. Losee JE and Kirschner RE, eds, vol 2, Taylor & Francis, Florida, pp1309-1320, 2015
- 9) Millard DR, Latham R, Huifen X, Spiro S and Morovic C : Cleft lip and palate treated by presurgical orthopedics, gingivoperiosteoplasty, and lip adhesion (POPLA) compared with previous lip adhesion method: a preliminary study of serial dental casts. *Plast Reconstr Surg* **103**, 1630-1644, 1999
- 10) Wang YC, Liao YF and Chen PK : Outcome of gingivoperiosteoplasty for the treatment of alveolar clefts in patients with unilateral cleft lip and palate. *Br J Oral Maxillofac Surg* **51**, 650-655, 2013
- 11) 松本美樹, 真野樹子, 中谷地舞, 三條恵介, 藤本舞, 時岡一幸, 中塚貴志, 鐘ヶ江晴秀, 須田直人 : 術前顎矯正後に歯肉骨膜形成術と口唇形成術及び Furlow 変法による口蓋形成術を施行した片側性唇顎口蓋裂 5 例の顎態と歯列に関する短期的評価. *日口蓋誌* **38**, 277-284, 2013
- 12) 真野樹子, 時岡一幸, 松本美樹, 田中恵理, 長谷川紘也, 品川令, 箕田碧, 富田至保, 中塚貴志, 須田直人 : 歯肉骨膜形成術を施行した唇顎口蓋裂児の顎裂部の三次元評価. *日口蓋誌* **39**, 201-208, 2014
- 13) Safari S, Mahdian A and Motamedian SR : Applications of stem cells in orthodontics and dentofacial orthopedics: Current trends and future perspectives. *World J Stem Cells* **10**, 66-77, 2018

- 14) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craiq S and Marshak DR : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147, 1999
- 15) Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H and Bieback K : Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**, 1294–1301, 2006
- 16) Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H and Sato S : In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology* **101**, 121-132, 2013
- 17) Shinagawa-Ohama R, Mochizuki M, Tamaki Y, Suda N and Nakahara T : Heterogeneous human periodontal ligament-committed progenitor and stem cell populations exhibit a unique cementogenic property under in vitro and in vivo conditions. *Stem Cells Dev* **26**, 632-645, 2017
- 18) Friedenstein AJ, Gorskaja JF and Kulagina NN : Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* **4**, 267–274, 1976
- 19) Bianco P and Gehron Robey P : Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* **105**, 1663–1668, 2000
- 20) Caplan AI : Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* **213**, 341–347, 2007
- 21) Romanov YA, Svintsitskaya VA and Smirnov VN : Searching for alternative sources of

- postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* **21**, 105-110, 2003
- 22) Baksh D, Yao R and Tuan RS : Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* **25**, 1384–1392, 2007
- 23) Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, Troyer D and McIntosh KR : Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* **26**, 2865-2874, 2008
- 24) Chen W, Liu J, Manuchehrabadi N, Weir MD, Zhu Z and Xu HH : Umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cell seeding on macroporous calcium phosphate for bone regeneration in rat cranial defects. *Biomaterials* **34**, 9917-9925, 2013
- 25) Wang P, Liu X, Zhao L, Weir MD, Sun J, Chen W, Man Y and Xu HH : Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium. *Acta Biomater* **18**, 236-248, 2015
- 26) Kargozar S, Mozafari M, Hashemian SJ, Milan PB, Hamzehlou S, Soleimani M, Joghataei MT, Gholipourmalekabadi M, Korourian A, Mousavizadeh K and Seifalian AM : Osteogenic potential of stem cells-seeded bioactive nanocomposite scaffolds: A comparative study between human mesenchymal stem cells derived from bone, umbilical cord Wharton's jelly, and adipose tissue. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **106**,

61-72, 2018

- 27) Tsang WP, Shu Y, Kwok PL, Zhang F, Lee KK, Tang MK, Li G, Chan KM, Chan WY and Wan C : CD146+ Human umbilical cord perivascular cells maintain stemness under hypoxia and as a cell source for skeletal regeneration. *PLoS One* **8**: e76153, 2013
- 28) Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC and Chen CC : Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **22**, 1330-1337, 2004
- 29) Can A and Balci D : Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol* **698**, 51-62, 2011
- 30) Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, Schmidt BT, Askew Y, Nance JJ, Evron JM, Peault B and Deasy BM : High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol*, doi: 10.1155/2009/789526, 2009
- 31) Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D and Gazit Z : Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells* **24**, 1728-1737, 2006
- 32) Wang KX, Xu LL, Rui YF, Huang S, Lin SE, Xiong JH, Li YH, Lee WY and Li G : The effects of secretion factors from umbilical cord derived mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* **10**, e0120593, 2015

- 33) Cheng H, Qiu L, Ma J, Zhang H, Cheng M, Li W, Zhao X and Liu K : Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts. *Mol Biol Rep* **38**, 5161–5168, 2011
- 34) Saben J, Thakali KM, Lindsey FE, Zhong Y, Badger TM, Andres A and Shankar K : Distinct adipogenic differentiation phenotypes of human umbilical cord mesenchymal cells dependent on adipogenic conditions. *Exp Biol Med* **239**, 1340–1351, 2014
- 35) Ali H, Al-Yatama MK, Abu-Farha M, Behbehani K and Al Madhoun A : Multi-lineage differentiation of human umbilical cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells mediates changes in the expression profile of stemness markers. *PLoS One* **10**, e0122465, 2015
- 36) 早乙女進一, 阿江啓介, 松本誠一, 新井嘉容, 真鍋淳, 小柳広高, 吉井俊貴, 大川淳 : 多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体 (HAp/Col). *臨整外* **50**, 959-966, 2015
- 37) Mostafa NZ, Doschak MR, Major PW and Talwar R : Reliable critical sized defect rodent model for cleft palate research. *J Craniomaxillofac Surg* **42**, 1840-1846, 2014
- 38) Nguyen PD, Lin CD, Allori AC, Schachar JS, Ricci JL, Saadeh PB and Warren SM : Scaffold-based rhBMP-2 therapy in a rat alveolar defect model : implications for human gingivoperiosteoplasty. *Plast Reconstr Surg* **124**, 1829-1839, 2009

- 39) Nagamura-Inoue T and He H : Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells* **26**, 195-202, 2014
- 40) Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J and Péault B : A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301-313, 2008
- 41) Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE and O'Connor KC : In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* **28**, 788–98, 2010
- 42) Harkness L, Zaher W, Ditzel N, Isa A and Kassem M : CD146/MCAM defines functionality of human bone marrow stromal stem cell populations. *Stem Cell Res Ther*, doi:10.1186/s13287-015-0266-z, 2016
- 43) Coskun H and Can A : The assessment of the in vivo to in vitro cellular transition of human umbilical cord multipotent stromal cells. *Placenta* **36**, 232-239, 2015
- 44) Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B and Troyer D : Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*, doi: 10.1186/1477-7827-4-8, 2006
- 45) Kojima T, Freitas PH, Ubaidus S, Suzuki A, Li M, Yoshizawa M, Oda K, Maeda T, Kudo

A, Saito C and Amizuka N : Histochemical examination on cortical bone regeneration induced by thermoplastic bioresorbable plates applied to bone defects of rat calvariae.

Biomed Res **28**, 219-229, 2007

Figure legends

Fig 1 Morphological characteristics of UC-EZ and UC-MACS. **A:** Heterogenous population of hUCMSCs isolated from the umbilical cord by enzymatic digestion and cultured for 4 days. Arrow heads indicate spindle-shaped fibroblastic cells. Arrows indicate flattened fibroblastic cells. **B:** More homogeneous population after purification with CD146 antibody using MACS system. Scale bars=200 μm .

Fig 2 Flow cytometric analysis of cell surface antigen expression in UC-EZ and UC-MACS. Expression of CD14, CD19, CD34, CD45, CD44, CD73, CD90, CD105 and CD146 in UC-EZ and UC-MACS. The yellow area shows the profile of the negative control. Representative results of three independent experiments are shown.

Fig 3 Gene expression profiles in UC-EZ and UC-MACS. Marker genes for pluripotent stem cells (*Nanog*, *Oct3/4* and *Sox2*) were examined by RT-PCR before induction of cell differentiation. Both cell populations expressed *Nanog* and *Oct3/4*. The expression of *Sox2* was seen in UC-MACS but hardly in UC-EZ.

Fig 4 *In vitro* multilineage differentiation of UC-EZ and UC-MACS. All cells of inductive group were cultured in the osteogenic induction medium for 3 weeks. Negative control group

were cultured in α -MEM supplemented with 10% FBS for 3 weeks. **A, C:** Alizarin red S staining indicating the deposition of mineralization in UC-EZ and UC-MACS. **B, D:** No mineralized nodule formation was observed in control cultures. Scale bars=100 μ m.

All cells of inductive group were cultured in the adipogenic induction medium for 3 weeks.

Negative control group were cultured in α -MEM supplemented with 10% FBS for 3 weeks.

E, G: Oil red O staining indicating lipid clusters in UC-EZ and UC-MACS. **F, H:** No lipid clusters were observed in control cultures. Scale bars=100 μ m.

Fig 5 μ CT images of the 16-week-old rat maxillary defects immediately and at 8 weeks after operation. **A-F:** Representative μ CT images immediately after operation. **G-O:** Representative μ CT images at 8 weeks after operation. Ventral view of 3D reconstructed maxilla (**A, D, G, J, M**), axial cross-section (**B, E, H, K, N**) and coronal cross-section (**C, F, I, L, O**) of maxillary defects. Dotted lines of 3D images (**A, D, G, J, M**) illustrate a position of coronal sectioning. Maxillary defects of negative control (**A-C, G-I**), receiving scaffold solely (**D-F and J-L**) and scaffold with UC-MACS (**M-O**). The defected areas are highlighted by white lines in **A-O**. The border of each defect was clearly distinguished from the undissected host bone by lacking orderly tissue continuity. Arrow heads in **K** and **N** indicate new bone formation showing high CT value. Arrow in **N** indicates particulate new bone. Asterisk in **E** indicates scaffold.

Fig 6 Histological observation of the 16-week-old rat maxillary defects at 8 weeks after operation. Hematoxylin and eosin staining of negative control groups (**A, B**), scaffold solely transplanted groups (**C, D**), and scaffold with UC-MACS transplanted groups (**E, F**). Boxed areas in **A, C** and **E** are shown in higher magnification in **B, D** and **F**, respectively. Scaffolds are shown by arrowheads in **D** and **F**. Boxed areas in **D** and **F** are shown in higher magnification in each inset highlighting the appearance of remained scaffolds. Arrow in **E** indicates absorbed scaffolds. Asterisks indicate the nasal cavity. (**A, C, E**) Scale bars=1 mm; (**B, D, F**) Scale bars=200 μ m. Black dotted lines indicate the border of new bone with a woven appearance. Red dotted lines indicate the border of host bone with lamella appearance. Note abundant new bone seen in HA+Col+UC-MACS group which was indistinguishable from the host bone. Abbreviations: NB; new bone. HB; host bone.

Fig 7 Immunohistochemical staining of the 16-week-old rat premaxilla defects at 8 weeks after operation. Immunohistochemical staining for osteopontin (**A-F**) and human specific mitochondria (**G-I**). Negative control groups (**A-B**), scaffold solely transplanted groups (**C, D**), and scaffold with UC-MACS transplanted groups (**E-I**). Boxed areas in **A, C** and **E** are shown in higher magnification in **B, D** and **F**, respectively. Black arrow heads in **B, D** and **F** indicate OPN-positive cells along the newly formed bone. Red arrow heads in **D** and **F**

F indicate OPN-positive embedded cells in newly formed bone. Arrows in **B** and **D** indicate OPN-positive fibroblastic cells in non-mineralized tissue. Arrows in **H** indicate human specific mitochondria-positive embedded cells in newly formed bone. Arrow heads in **I** indicate human specific mitochondria-positive cells in non-mineralized tissue. (**A, C, E, G**) Scale bars=500 μm ; (**B, D, F, H, I**) Scale bars=50 μm . Abbreviations: OPN; osteopontin, NB; new bone. Asterisks indicate the nasal cavity. (**A, C, G**)

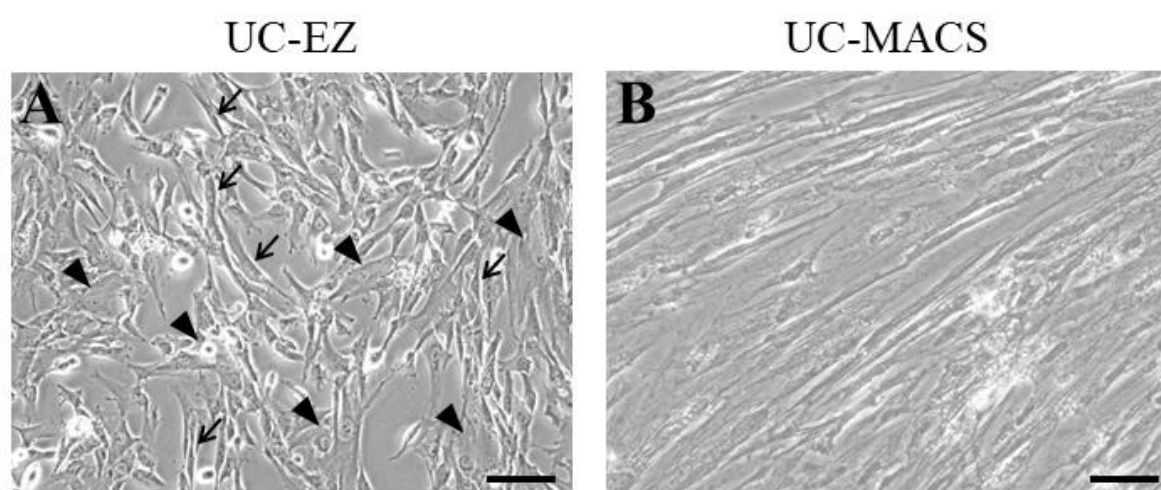


Fig 1

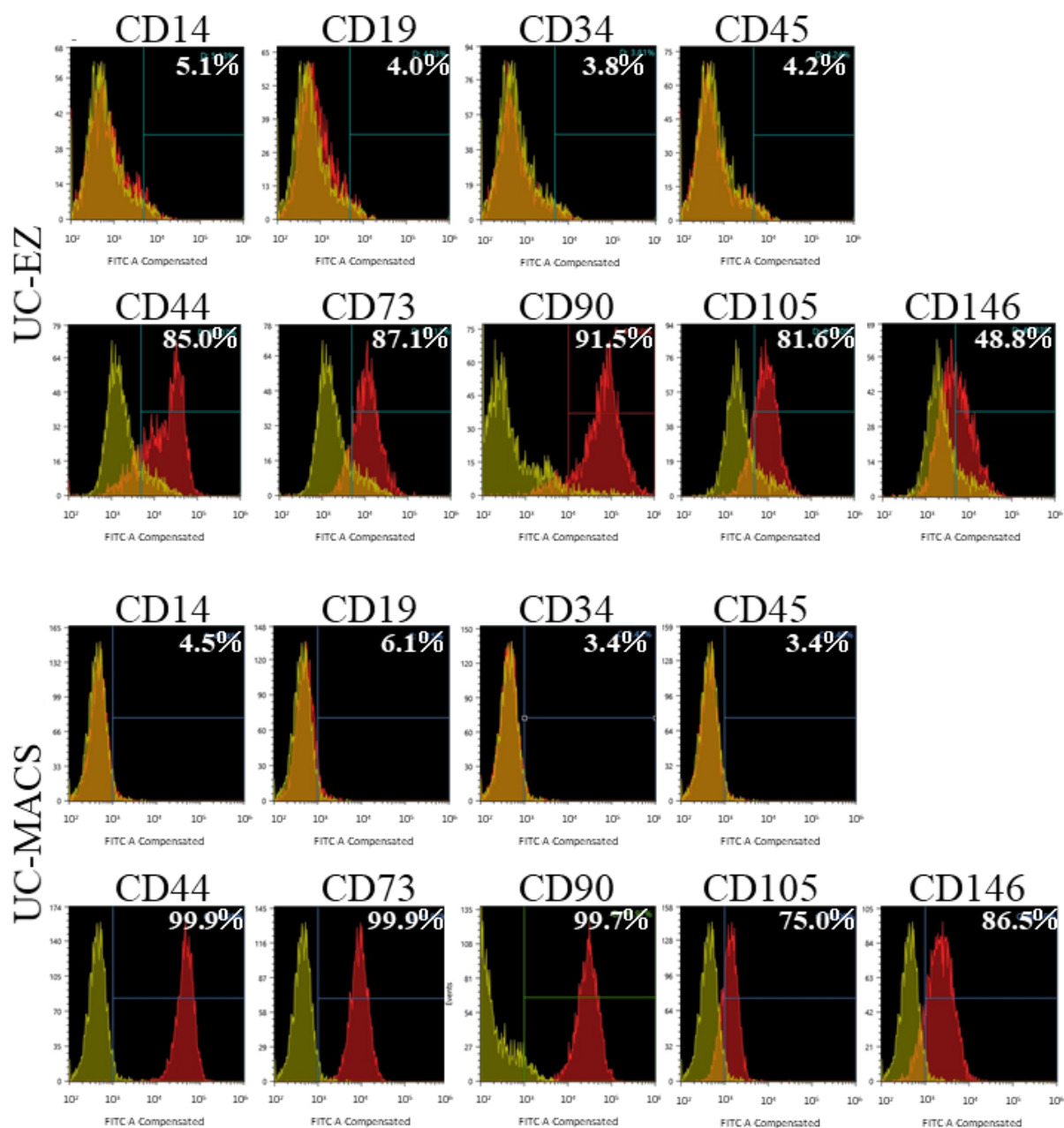
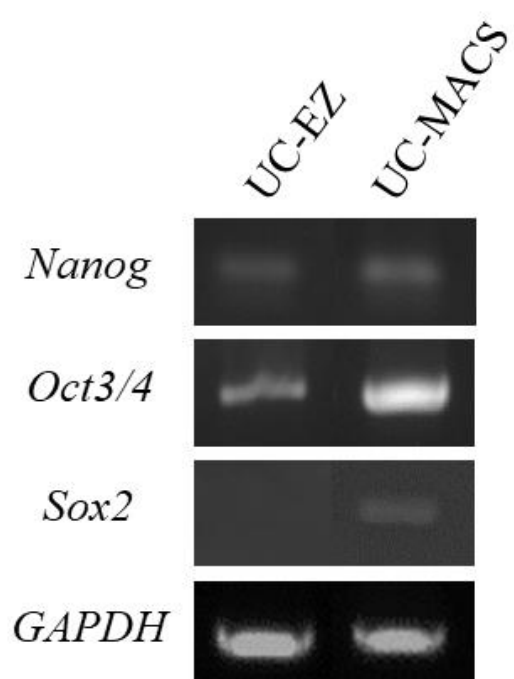


Fig 2

**Fig 3**

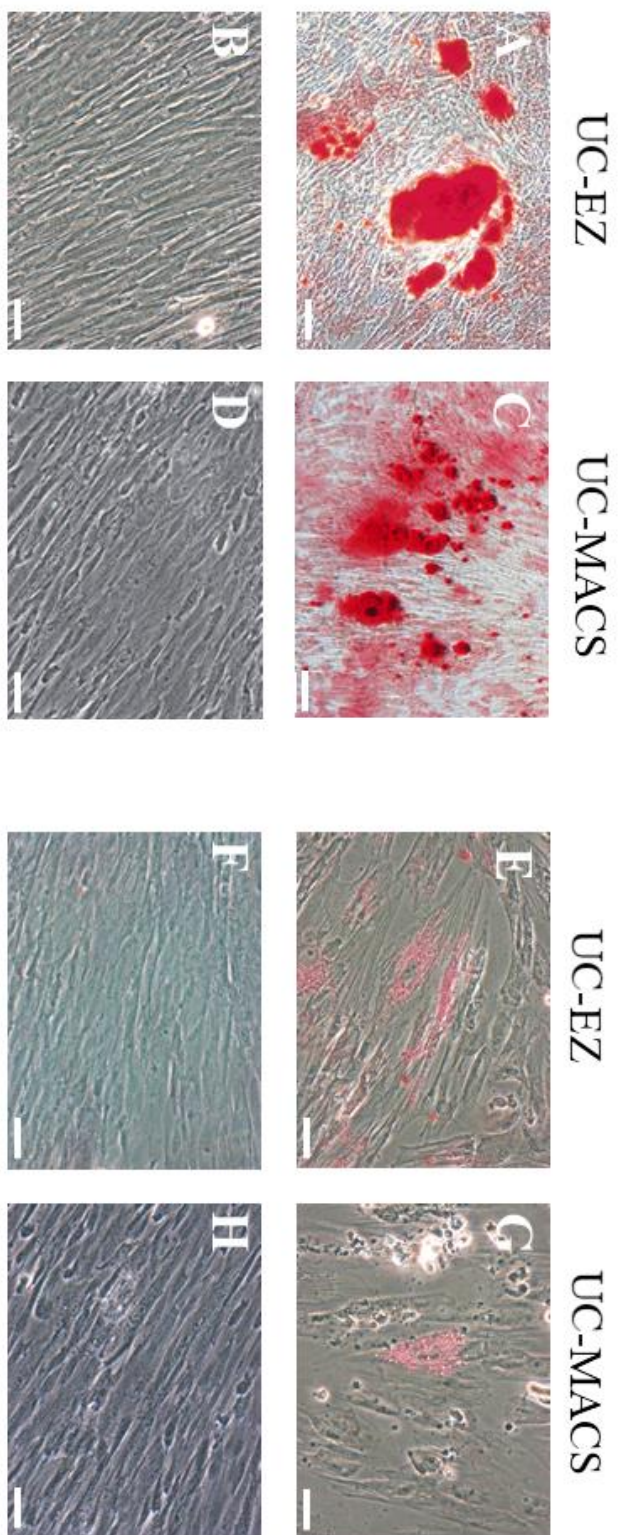


Fig 4

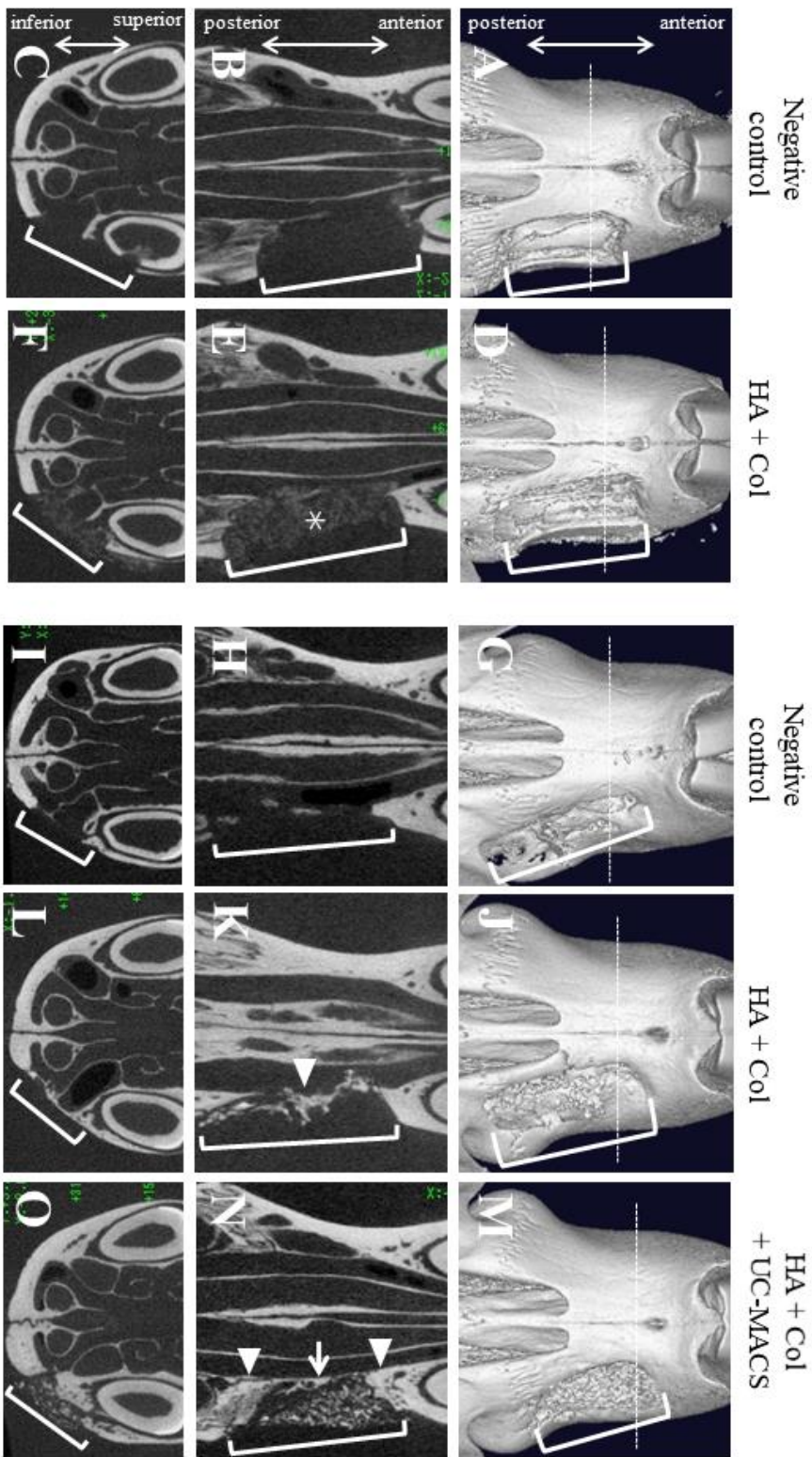


Fig 5

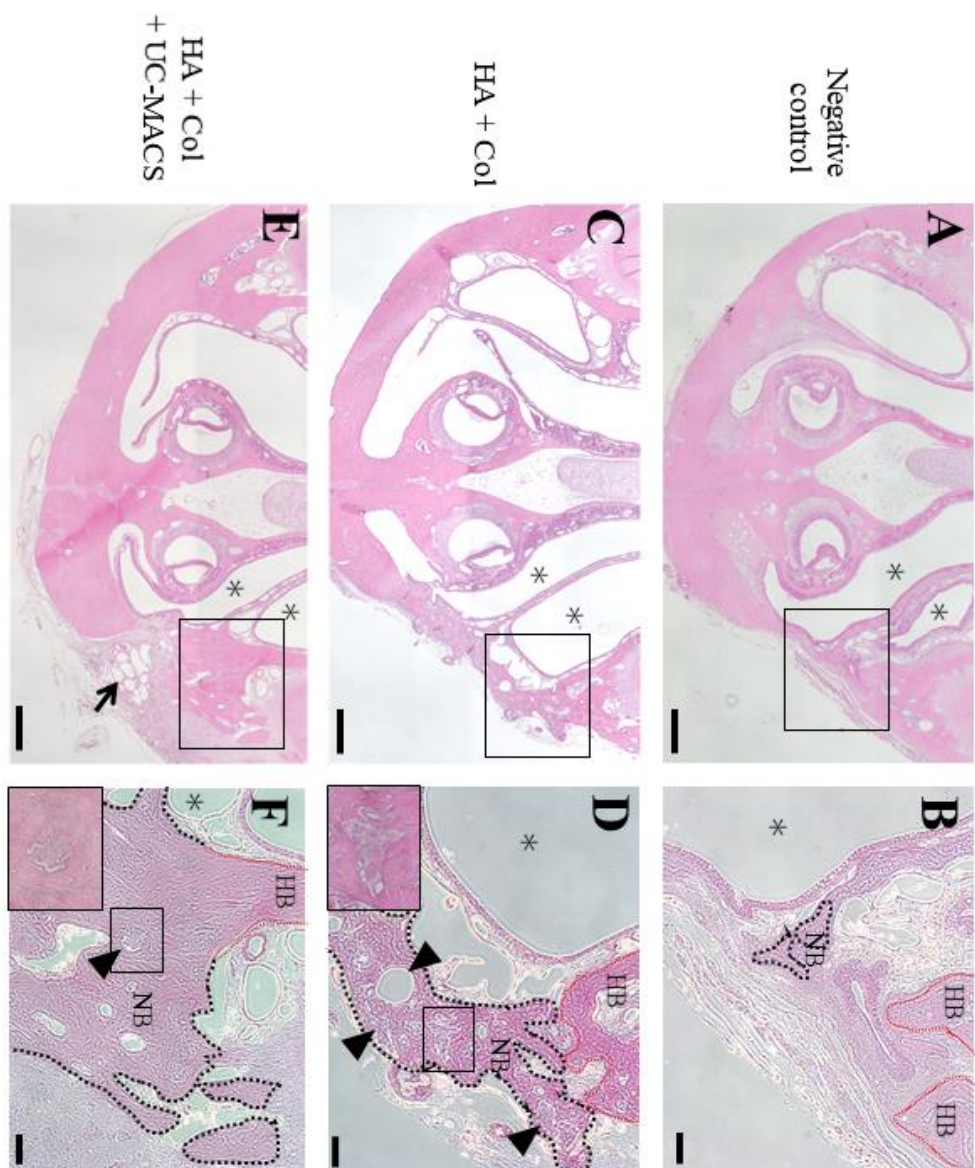


Fig 6

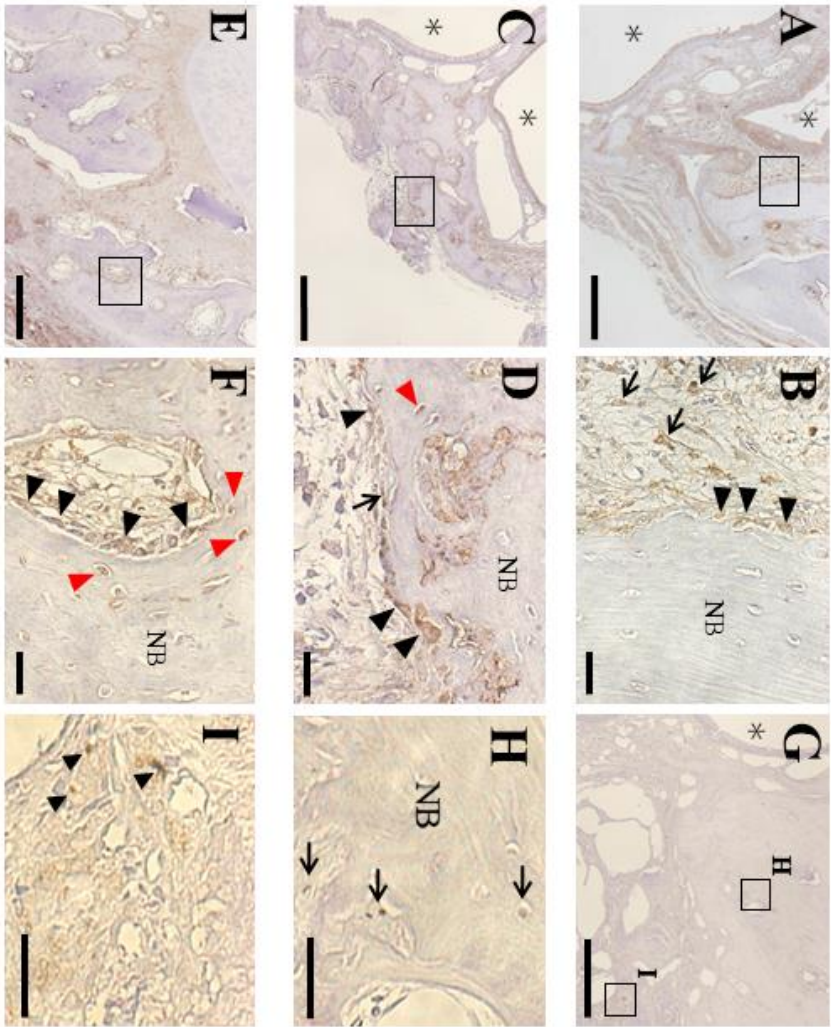


Fig 7

Table 1 Primer sequences for RT-PCR analysis

<i>Genes</i>		<i>Primer sequence (5'→3')</i>	<i>Product size (bp)</i>	<i>Accession number</i>
Nanog	Forward	CAGAAGGCCTCAGCACCTAC	111	NM_024865.3
	Reverse	ATTGTTCCAGGCTGGTTGC		
Sox2	Forward	AACCCCAAGATGCACAACCTC	152	NM_003106
	Reverse	CGGGGCCGGTATTTATAATC		
Oct3/4	Forward	AACCCAGAACTTAGCAGCTT	861	NM_001173531
	Reverse	ACCTTCCCAAATAGAACCCCC		
GAPDH	Forward	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	613	NM_001289746.1
	Reverse	GCTTCACCACCTTCTTGATG		

GAPDH, gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.