

cells, resulting in enhancement of periodontal tissue regeneration.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Drs. K. Tsuji, project manager, Two Cells, and Y. Kato, board member, Two Cells, for their excellent technical support, comments, and discussion on the manuscript.

#### REFERENCES

- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997;64:278-294.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001;153:1133-1140.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875-884.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10711-10716.
- Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:413-419.
- Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004;75:1281-1287.
- Arai T, Matsumoto K, Saitoh K, et al. A new system for stringent, high-titer vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector induction by introduction of Cre recombinase into stable prepackaging cell lines. *J Virol* 1998;72:1115-1121.
- Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6:1282-1286.
- Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, et al. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 2002;23:109-119.
- Caplan AI, Reuben D, Haynesworth SE. Cell-based tissue engineering therapies: The influence of whole body physiology. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33:3-14.
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999;283:534-537.
- Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001;7:393-395.
- Kramer PR, Nares S, Kramer SF, Grogan D, Kaiser M. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res* 2004;83:27-34.
- Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:474-484.
- Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M, Kubo T. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *J Histochem Cytochem* 2005;53:207-216.
- Milbrandt T, Berthoux L, Christenson V, et al. Tracing transduced cells in osteochondral defects. *J Pediatr Orthop* 2003;23:430-436.
- Baragi VM, Renkiewicz RR, Qiu L, et al. Transplantation of adenovirally transduced allogeneic chondrocytes into articular cartilage defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:275-282.
- Ikeda T, Kubo T, Nakanishi T, et al. Ex vivo gene delivery using an adenovirus vector in treatment for cartilage defects. *J Rheumatol* 2000;27:990-996.

Correspondence: Dr. Naohiko Hasegawa, Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8553, Japan. E-mail: nhase@hiroshima-u.ac.jp.

Accepted for publication December 12, 2005.

# Promotion of Functioning of Human Periodontal Ligament Cells and Human Endothelial Cells by Nerve Growth Factor

Wan-Peng Xu,\* Noriyoshi Mizuno,\* Hideki Shiba,\* Katsuhiko Takeda,\* Naohiko Hasegawa,\* Shinitiro Yoshimatsu,\* Takafumi Inui,\* Yoshitaka Ozeki,\* Miyuki Niitani,\* Hiroyuki Kawaguchi,\* Koichiro Tsuji,† Yukio Kato,†† and Hidemi Kurihara\*

**Background:** We have previously shown that cultured human periodontal ligament (HPL) cells produce nerve growth factor (NGF) and express mRNA of tyrosine kinase receptor (trkA), a high-affinity receptor of NGF. These findings suggest that NGF modulates the differentiation and proliferation of the periodontal ligament cells by paracrine and autocrine functions in vivo. Endothelial cells also express NGF and trkA. Therefore, NGF may regulate functions of periodontal ligament cells and endothelial cells during periodontal tissue regeneration.

**Methods:** Effects of NGF on expressions of bone/cementum-related proteins (osteocalcin [OC], bone sialoprotein [BSP], bone morphogenetic protein [BMP-7], core binding factor alpha [Cbfa-1], and type I collagen), calcification in HPL cells, and proliferation and mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), an endothelial cell mitogen, in human microvascular endothelial cells (HMVECs) were examined.

**Results:** NGF elevated mRNA levels of OC, BSP, BMP-7, Cbfa-1, and type I collagen and enhanced mineral deposition in cultures of HPL cells. Furthermore, NGF stimulated mRNA expressions of VEGF-A and VEGF-B and cell proliferation in HMVEC.

**Conclusion:** These findings suggest that the functional regulation of periodontal ligament cells and endothelial cells by NGF might result in the acceleration of periodontal tissue regeneration in vivo. *J Periodontol* 2006;77:800-807.

## KEY WORDS

Angiogenesis; endothelial cells; nerve growth factor; periodontal ligament; regeneration.

\* Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima, Japan.

† Two Cells, Hiroshima, Japan.

†† Department of Dental and Medical Biochemistry, Division of Molecular Medical Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences.

Biologic functions of neurotrophins have been recognized as regulating differentiation and survival of neurons in central and peripheral nerve systems.<sup>1,2</sup> Neurotrophins in mammals consist of four members: nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin (NT-3), and NT-4/5. NGF is the first and best-characterized member of the neurotrophins.<sup>1,3</sup> NGF exerts its biologic functions by binding to its high-affinity receptor, tyrosine kinase receptor (trkA), and low-affinity receptor, p75. NGF and trkA have been found during bone fracture healing and tooth development.<sup>4,5</sup> NGF stimulates human lymphocyte proliferation and induces B-cell differentiation into immunoglobulin-secreting plasma cells.<sup>6</sup> NGF also enhances phagocytosis and superoxide production in neutrophils.<sup>7</sup> Thus, NGF was widely expressed in many non-neural tissues and plays versatile roles besides the pivotal role of NGF in the development of neural cells.<sup>8</sup>

The ideal goal of periodontal tissue regeneration requires anatomical and functional reconstruction of periodontal tissue, including cementum, periodontal ligament, and alveolar bone. Periodontal ligament is a connective tissue between cementum and alveolar bone. Periodontal ligament cells, which consist of heterogeneous cell populations,

have osteoblast-like properties, including high levels of alkaline phosphatase (ALP) and bone/cementum-related proteins.<sup>9</sup> It has been suggested that periodontal ligament cells can differentiate into osteoblasts or cementoblasts.<sup>10-13</sup> Therefore, periodontal ligament cells are implicated in the regeneration of cementum, periodontal ligament, and alveolar bone. Our previous studies have shown that human periodontal ligament (HPL) cells produce NGF and express *trkA* mRNA.<sup>14</sup> These findings suggest that NGF modulates the differentiation and proliferation of periodontal ligament cells by paracrine and autocrine functions in vitro and in vivo. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) showed that NGF increased mRNA levels ALP, bone morphogenetic protein (BMP-2), and osteopontin (OPN), which are involved in periodontal tissue regeneration in HPL cells.<sup>14</sup>

Osteocalcin (OC), which is a major non-collagenous protein present in cementum and bone, influences bone mineralization.<sup>15-17</sup> Bone sialoprotein (BSP) is a mineral-associated protein, promoting connection of both osteoblasts and osteoclasts, and acts as a nucleator of hydroxyapatite crystal formation in cell-free systems.<sup>18</sup> The use of human recombinant BMP-7 in animals leads to regeneration of new bone that is biologically and biomechanically functional.<sup>19</sup> Furthermore, recombinant BMP-7 implants as a bone graft substitute have been evaluated in vivo.<sup>20</sup> Core binding factor alpha (Cbfa-1) is a transcriptional osteoblast differentiation factor required for bone formation.<sup>21</sup> Type I collagen is a major component of the extracellular matrix in cementum and bone, and it is also abundant in periodontal ligament.<sup>22</sup> Examination of the effect of NGF on expressions of the bone/cementum-related proteins and ALP, OPN, and BMP-2 might prove the importance of its action in periodontal tissue regeneration.

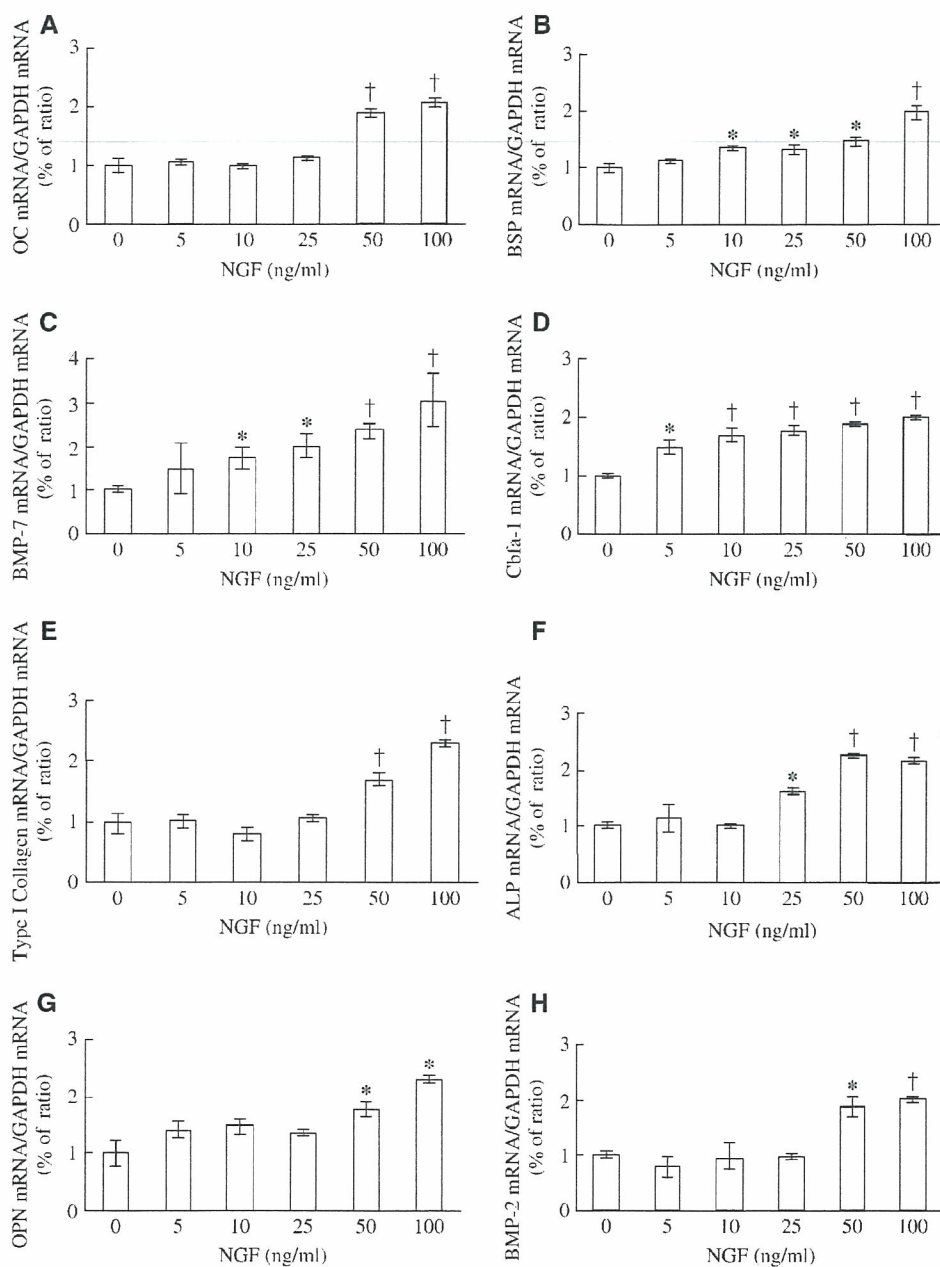
Neovascularization and matrix synthesis in periodontal tissue are also essential for periodontal tissue regeneration. Endothelial cells express NGF and *trkA*.<sup>23,24</sup> Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an endothelium-specific mitogen and a regulator involved in the formation of new blood vessels.<sup>25,26</sup> NGF may regulate VEGF expression in endothelial cells.

**Table 1.**  
**Primers and Probes Used in Real-Time PCR**

Gene	Sequence
OC	F: 5'-GCCTCCTGAAAGCCGATGT-3' R: 5'-AAGAGACCCAGGCGCTACCT-3' P: 5'-CCAACCTCGTCACAGTCCGGATTGAGCT-3'
BSP	F: 5'-AGCGAAGCAGAAGTGGATGAA-3' R: 5'-CTGCATTGGCTCCAGTGACA-3' P: 5'-AAACGGCAACGGCAGCAGCG-3'
BMP-7	F: 5'-GCTTCGTCAACCTCGTGGAA-3' R: 5'-CAAACCCGGAACCTCTCGATGGT-3' P: 5'-ATGACAAGGAATCTTCCACCCACGCTAC-3'
Cbfa-1	F: 5'-TGGACGAGGCAAGAGTTTCAC-3' R: 5'-CCCGAGGTCCATCTACTGTAACCT-3' P: 5'-CATAACCGTCTTCCACAAATCCTCCCCAAGT-3'
Type I collagen	F: 5'-TCTGAAGTCTCTCAACAACCAGATTG-3' R: 5'-GGGTGGCTGAGTCTCAAGTCA-3' P: 5'-CTCTAGAAAGAACCCAGCTCGCACATGC-3'
ALP	F: 5'-CGAGATACAAGCACTCCCCTTC-3' R: 5'-CTGTTCAAGTCTCGTACTGCATGTC-3' P: 5'-CCTGGCTCGAAGAGACCCAATAGGTAGTCC-3'
OPN	F: 5'-CAGGCTGATTCTGGAAGTTCTGA-3' R: 5'-GGCTAGGAGATTCTGCTTCTGAGA-3' P: 5'-CAACAAATACCCAGATGCTGTGGCCA-3'
BMP-2	F: 5'-CCAACACTGTGCGCAGCTT-3' R: 5'-AGAAGAATCTCCGGTGTGTTTC-3' P: 5'-CACCATGAAGAATCTTGGGAAGAACTACCA-3'
VEGF-A	F: 5'-TACCTCCACCATGCCAAGTG-3' R: 5'-GATGATTCTGCCCTCCTCCTT-3' P: 5'-TCCCAGGCTGCACCCATGGC-3'
VEGF-B	F: 5'-ACCAAGTCCGGATGCAGATC-3' R: 5'-TGATTCACTGGCTGTGTT-3' P: 5'-ATCCGGTACCCGAGCAGTCAGCTG-3'

F = forward; R = reverse; P = probe.

We thought that NGF might have the potential of regenerating periodontal tissues by regulating the functions of endothelial cells and periodontal ligament cells. Effective regulation of periodontal ligament cells and endothelial cells will succeed in periodontal tissue regeneration. In the present study, to address advantageous effects of NGF in periodontal tissue regeneration, we examined the effect of NGF on the mRNA expressions of OC, BSP, BMP-7, Cbfa-1, and type I collagen in cultures of HPL cells and the expressions of VEGF and cell proliferation in cultures of human microvascular endothelial cells (HMVECs).



**Figure 1.**

Dose-dependent effects of NGF on mRNA expressions of OC (A), BSP (B), BMP-7 (C), Cbfa-1 (D), type I collagen (E), ALP (F), OPN (G), and BMP-2 (H) in HPL cells. HPL cells were exposed to various concentrations of NGF for 24 hours before the end of incubation on day 10. The mRNA expressions of OC, BSP, BMP-7, Cbfa-1, type I collagen, ALP, OPN, and BMP-2 were examined by real-time PCR. The graphs show the ratio of each bone (cementum)-related protein mRNA to GAPDH mRNA. Values are means  $\pm$  SD of three cultures. There was significant difference (\* $P < 0.05$ ; † $P < 0.01$ ) from the control.

## MATERIALS AND METHODS

### NGF

Recombinant human NGF<sup>§</sup> was used.

### Cell Culture

HPL cells were obtained by explant cultures of the healthy periodontal ligament of the mid-root of

premolars extracted from patients under orthodontic treatment with their informed consent (enrollment date: August 12, 2004) according to a protocol approved by ethical authorities at Hiroshima University. HPL cells were cultured to confluence in 35-mm-diameter plastic culture dishes with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplement with 10% fetal calf serum (FCS),<sup>||</sup> 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 1  $\mu$ g/ml amphotericin B (medium A). When HPL cells formed a confluent monolayer, the cells were harvested with 0.05% trypsin and 0.02% EDTA and transferred to a 100-mm-diameter plastic culture dish. HPL cells at the sixth passage were used in the following experiments.

HMVECs<sup>¶</sup> were a primary cell culture line cryopreserved at the third passage. The HMVECs were maintained in endothelial basal medium (EBM-2) supplement with fetal bovine serum, fibroblast growth factor (FGF-2), epidermal endothelial growth factor, hydrocortisone, insulin-like growth factor, ascorbic acid, VEGF, and amphotericin B (medium B). HMVECs at the sixth passage were used for the following experiments.

### Isolation of Total RNA

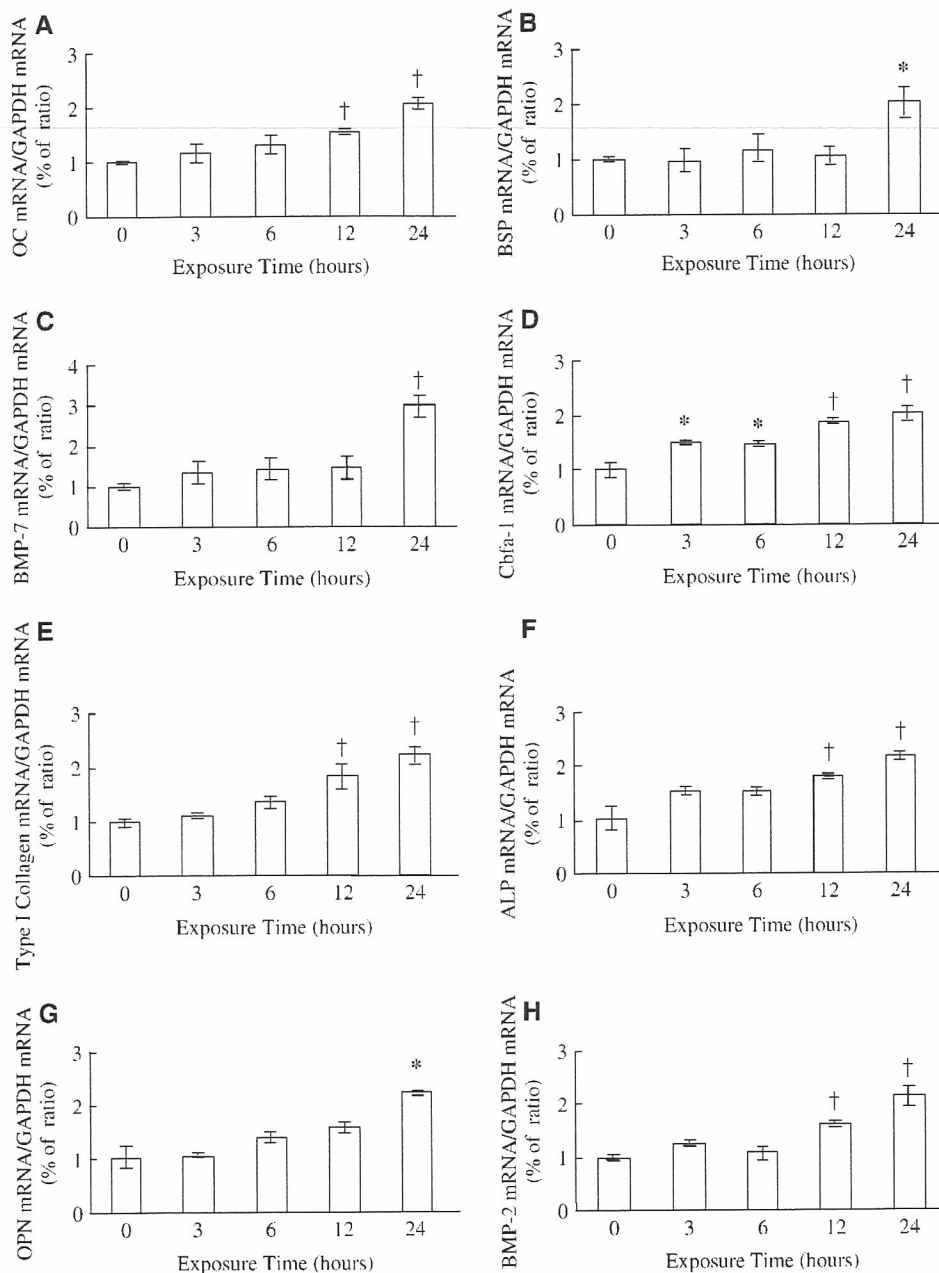
HPL cells in cultures at the sixth passage were harvested, seeded at a density of  $35 \times 10^4$  cells per 60-mm plastic tissue culture dish coated with type I collagen, and maintained in medium

A supplement with 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid (medium C). HPL cells were exposed to various concentrations of NGF for 24 hours or exposed to 100 ng/ml NGF for the indicated times before the end of incubation at day

<sup>§</sup> R&D Systems, Minneapolis, MN.

<sup>||</sup> Biological Industries, Beit Haemek, Israel.

<sup>¶</sup> Cambrex, Walkersville, MD.



**Figure 2.**

Time-course effects of NGF on mRNA expressions of OC (A), BSP (B), BMP-7 (C), Cbfa-1 (D), type I collagen (E), ALP (F), OPN (G), and BMP-2 (H) in HPL cells. HPL cells were exposed to NGF (100 ng/ml) for the indicated times before the end of incubation on day 10. The mRNA expressions of OC, BSP, BMP-7, Cbfa-1, type I collagen, ALP, OPN, and BMP-2 were examined by real-time PCR. The graphs show the ratio of each bone (cementum)-related protein mRNA to GAPDH mRNA. Values are means  $\pm$  SD of three cultures. There was significant difference (\*P < 0.05; † P < 0.01) from non-exposure to NGF.

10 in DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 1  $\mu$ g/ml amphotericin B, and 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid (medium D). Total RNA from each culture was extracted using reagent<sup>#</sup> on day 10 and quantified by spectrometry at 260 and 280 nm.

HMVECs in cultures at the sixth passage were harvested, seeded at a density of  $30 \times 10^4$  cells/60 mm in a plastic tissue culture dish coated with type I collagen, and maintained in medium B. HMVECs were exposed to various concentrations of NGF for 24 hours before the end of incubation on day 7 in EB2 medium supplement with ascorbic acid. Total RNA from each culture was extracted using reagent<sup>\*\*</sup> on day 7 and quantified by spectrometry at 260 and 280 nm.

**Real-Time PCR**

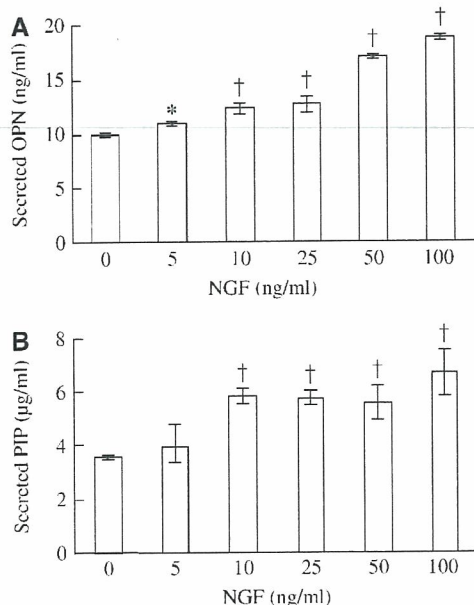
Real-time PCR was performed with a sequence detection system.<sup>††</sup> Using a core reagent kit,<sup>††</sup> reactions were carried out according to the manufacturer's protocol. The probe, sense primers, and anti-sense primers used for detection of OC, BSP, BMP-7, Cbfa-1, type I collagen, ALP, OPN, BMP-2, VEGF-A, and VEGF-B are listed in Table 1. Human, commercially available GAPDH<sup>§§</sup> was used for real-time PCR.

**Measurement of OPN and Procollagen Type I C-Peptide**

HPL cells in cultures at the sixth passage were harvested, seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well in a 48-well plastic culture plate coated with type I collagen, and maintained in 0.2 ml of medium C. After 10 days, cells were washed three times with DMEM. HPL cells at confluent cultures were then exposed to various concentrations of NGF in medium F

for 24 hours before the end of incubation on day 11. OPN levels in the conditioned media from HPL

# Isogen, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan.  
 \*\* Isogen, Wako Pure Chemical Industries.  
 †† ABI 7700, Applied Biosystems, Tokyo, Japan.  
 ††† TaqMan EZ RT-PCR Core Reagent, Applied Biosystems.  
 §§ Applied Biosystems.



**Figure 3.**

Effect of NGF on secreted levels of OPN (A) and PIP (B) in cultures of HPL cells. HPL cells were exposed to various concentrations of NGF for 24 hours before the end of incubation on day 10. The levels of OPN and PIP in the conditioned media were determined by ELISA. Values are means  $\pm$  SD of three cultures. There was significant difference (\* $P < 0.05$ ; † $P < 0.01$ ) from control.

cell cultures were determined using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.<sup>¶¶</sup> Type I collagen synthesis was estimated by measuring the level of procollagen type I C-peptide (PIP) in the media with a sandwich ELISA kit.<sup>¶¶</sup>

#### Mineralization Assay

HPL cells in cultures at the sixth passages were harvested and seeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells/well in 24-well plastic culture plates coated with type I collagen and maintained in 0.5 ml of DMEM with 10% FCS containing 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50  $\mu$ M ascorbic acid, and 0.1  $\mu$ M dexamethasone (mineralizing medium) in the absence or presence of NGF for 21 days. The medium was replaced twice a week. Mineralized formation was identified by von Kossa staining.<sup>27</sup>

#### DNA Synthesis

DNA synthesis was estimated by measuring incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) using a cell proliferation ELISA system.<sup>\*\*</sup> HMVECs and HPL cells in cultures at the sixth passage were harvested, seeded at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well in 96-well plastic culture plates coated with type I collagen, and maintained in 0.1 ml of medium B for HMVECs and medium C for HPL cells. After 9 days, each cell was incubated in fresh EBM or DMEM with or without NGF for 24 hours. BrdU (10  $\mu$ M) was added 4 hours

before the end of incubation. Immunodetection of the incorporated BrdU into cells was performed according to the manual supplied with the cell proliferation ELISA system.<sup>\*\*\*</sup>

#### Cell Number

Cell number in each culture was calculated by cell proliferation assay.<sup>†††</sup>

#### Statistical Analysis

Data are expressed as means  $\pm$  SD. The study on the effect of NGF in HPL cells and HMVECs between control and groups tested was analyzed with analysis of variance. Values of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  were considered statistically significant.

#### RESULTS

Figure 1 shows the effect of increasing concentrations of NGF on the mRNA expressions of OC, BSP, BMP-7, Cbfa-1, type I collagen, ALP, OPN, and BMP-2 after 24 hours of treatment in cultures of HPL cells. NGF stimulated the mRNA expressions of the bone/cementum-related proteins examined in a time-dependent manner. NGF at 100 ng/ml caused a 2.1-fold increase in OC mRNA expression, a 2.0-fold increase in BSP mRNA expression, a 3.0-fold increase in BMP-7 mRNA expression, a 2.0-fold increase in Cbfa-1 mRNA expression, a 2.3-fold increase in type I collagen mRNA expression, a 2.0-fold increase in ALP mRNA expression, a 2.3-fold increase in OPN mRNA expression, and a 2.0-fold increase in BMP-2 mRNA expression.

Figure 2 shows the effect of the exposure length to NGF on the mRNA expressions of OC, BSP, BMP-7, Cbfa-1, type I collagen, ALP, OPN, and BMP-2 in HPL cells. NGF at 100 ng/ml increased the mRNA levels of all of the bone/cementum-related proteins examined in a time-dependent manner until 24 hours.

NGF increased the secreted levels of OPN in a dose-dependent manner up to 100 ng/ml (Fig. 3). Adding NGF to the HPL cell cultures resulted in an increase in PIP levels. The maximal effect was seen at 100 ng/ml (Fig. 3B).

Figure 4 shows the effect of NGF on the mineralized tissue formation in cultures of HPL cells. Mineralized tissues were identified by von Kossa staining. NGF enhanced the total amount of von Kossa-positive substances in a dose-dependent manner (Fig. 4A). Phase-contrast micrographs showed that mineralized nodule-like substances were detected with 100 ng/ml NGF but were not detected without NGF (Fig. 4B).

Figure 5 shows the effect of increasing concentrations of NGF on the mRNA expressions of VEGF-A

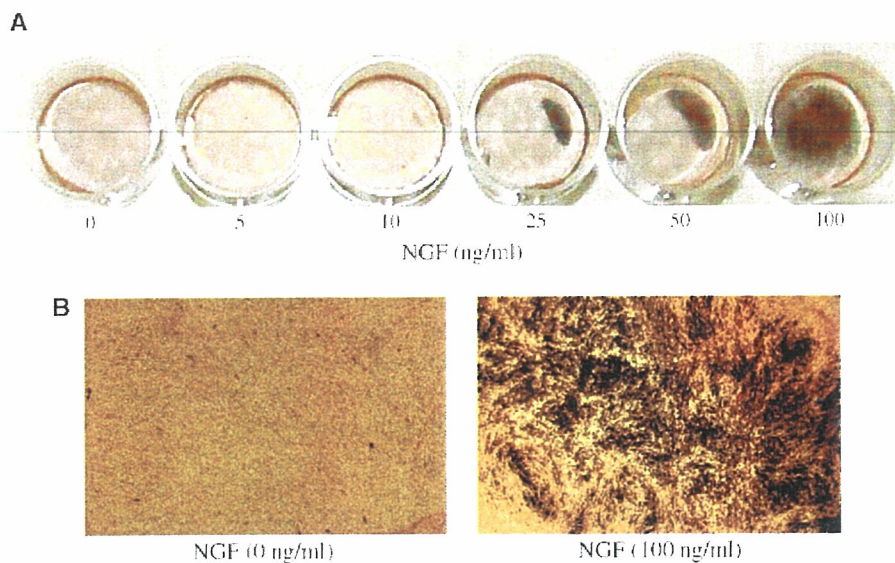
¶¶ Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan.

¶¶ Takara, Tokyo, Japan.

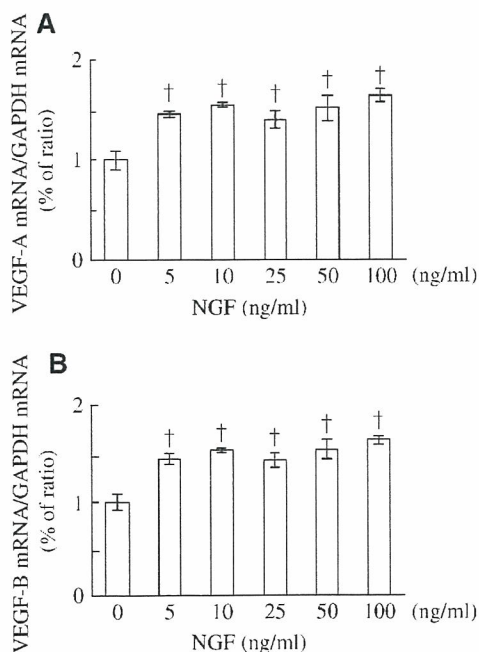
\*\* Version 2, Amersham Pharmacia, Little Chalfont, U.K.

\*\*\* Version 2, Amersham Pharmacia.

††† CellTiter 96 Aqueous One Solution, Promega, Madison, WI.



**Figure 4.** Effect of the increasing concentrations of NGF on mineralization in HPL cell cultures. HPL cells were seeded at  $3 \times 10^4$  cells/well in a 24-well plastic culture plate, grown in the mineralizing medium, and fixed. Mineral deposition was stained using the von Kossa technique. **A)** Whole view of 24-well plate after von Kossa staining. **B)** Phase-contrast micrographs. The experiment was repeated three times with similar results.



**Figure 5.** Dose-dependent effects of NGF on VEGF-A (**A**) and VEGF-B (**B**) mRNA expressions in HMVECs. HMVECs were exposed to various concentrations of NGF for 24 hours before the end of incubation on day 7. The mRNA expressions of VEGF-A and VEGF-B were examined by real-time PCR. The graphs show the ratio of VEGF-A or VEGF-B mRNA to GAPDH mRNA. Values are means  $\pm$  SD of three cultures. There was significant difference ( $\dagger P < 0.01$ ) from no exposure to NGF.

(Fig. 5A) and VEGF-B (Fig. 5B). NGF increased the expression of VEGF-A and VEGF-B mRNA in a dose-dependent manner. The maximum effect was seen at 100 ng/ml.

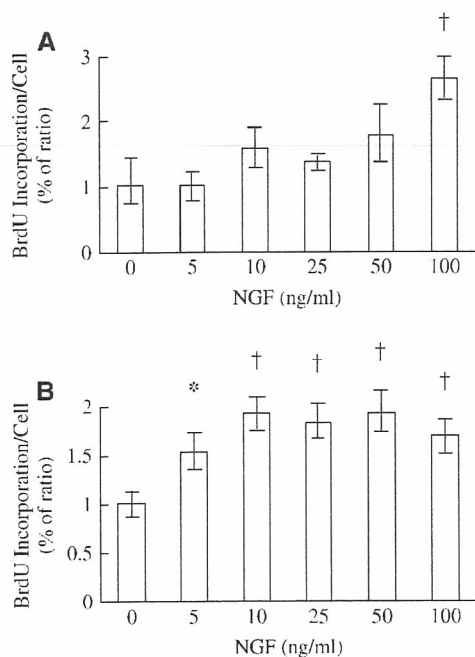
Figure 6 shows the effect of NGF on the incorporation of BrdU into HMVECs and HPL cells. NGF increased BrdU incorporation in HMVEC and HPL cells. The effective concentrations of NGF differed among these cells. The maximum effects in HMVEC and HPL cells were seen at 100 and 10 ng/ml, respectively.

**DISCUSSION**

The present studies have shown that adding NGF to HPL cell cultures results in elevated mRNA expressions of OC, BSP, BMP-7, Cbfa-1, and type I collagen and increased mineral deposition in HPL cells. In addition, NGF increases mRNA levels of ALP, OPN, and BMP-2 from the previous<sup>14</sup> and present studies. Thus, the stimulated mineralization in HPL cells may be related to the increased expression of the bone/cementum-related proteins by NGF. NGF is suggested to be actively involved in hard tissue metabolism in addition to the traditional functioning of this peptide. NGF could stimulate the formation of cementum and alveolar bone in vivo by regulating bone/cementum-related protein expression.

Previous studies have shown that NGF increases mRNA of VEGF and accumulation of VEGF protein in rat PC12 pheochromocytoma, suggesting that the existence of tumors with smaller areas of necrosis and increased vital tumor volume is due to angiogenesis by the increased VEGF production.<sup>28</sup> To our knowledge, there is no report on an effect of NGF on the expression of VEGF in endothelial cells, although endothelial cells express NGF and trkA.<sup>23,24</sup> In the present study, NGF increased the mRNA levels of VEGF-A and VEGF-B in HMVECs. Furthermore, NGF stimulated proliferation in HMVECs in the same way as human umbilical vein endothelial cells, rat brain capillary endothelial cells, and human choroidal endothelial cells.<sup>23,24,29</sup> These data suggest that NGF stimulates angiogenesis through stimulated proliferation of endothelial cells and increased VEGF production.

NGF stimulates DNA synthesis in HPL cells in a dose-dependent manner up to 10 ng/ml NGF.<sup>14</sup> From



**Figure 6.**

Effect of increasing concentrations of NGF on DNA synthesis in cultures of HMVECs (A) and HPL cells (B). Each cell was exposed to various concentrations of NGF for 24 hours on day 10. DNA synthesis was determined by incorporation of BrdU using an ELISA kit. Values are means  $\pm$  SD of three cultures. There was significant difference (\* $P < 0.05$ , † $P < 0.01$ ) from the control.

the present study with 5 to 100 ng/ml NGF, the stimulated effects of NGF on DNA synthesis in HPL cells has been found to reach a plateau at 10 ng/ml NGF in vitro.

NGF stimulates cell proliferation of normal human keratinocytes.<sup>30,31</sup> On the other hand, this peptide does not influence cell proliferation of MC3T3E1, a mouse osteoblastic cell line.<sup>32</sup> NGF decreased the DNA synthesis in human gingival epithelial cells, which are keratinocytes, and increased the DNA synthesis in human osteoblasts (unpublished data). Effects of NGF on cell proliferation in keratinocytes and osteoblastic cells may vary depending on cell source and culture condition.

The biologic effect of NGF is mediated through trkA and p75.<sup>33</sup> HPL cells express p75 mRNA and trkA mRNA in HPL cells (unpublished data). Because it is unclear whether NGF functions through trkA and p75 in HPL cells, it is intriguing how NGF signals through the two receptors to elicit biologic functions in periodontal ligament cells.

BMP-2, FGF-2, and BDNF, one of the neurotrophin family-like NGFs, promote periodontal tissue regeneration.<sup>34-36</sup> The application of FGF-2 and BDNF results in enhancement of periodontal tissue regeneration without ankylosis and epithelial cell down-growth. On the other hand, ankylosis is observed at

regenerated periodontal tissues by BMP-2. It is preferable that NGF enhances cell proliferation in periodontal ligament cells and inhibits it in gingival epithelial cells because apical migration of gingival epithelial cells prevents the regeneration of new attachment of periodontal ligament cells to the denuded root surface. Therefore, it is intriguing whether the NGF action on proliferation in the two types of cells would render NGF the most effective medicament of periodontal tissue regeneration among the four factors.

## CONCLUSION

Because NGF effectively regulates functions of periodontal ligament cells and endothelial cells, it might offer the great advantage of periodontal tissue regeneration.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Two Cells for its financial support of this research. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Encouragement of Young Scientists (B) (Nos. 16791314 and 15791239) from the Japan Society for the Promotion of Science. Koichiro Tsuji is a project manager and Yukio Kato is a board member at Two Cells.

## REFERENCES

- Chao MV. Neurotrophin receptors: A window into neuronal differentiation. *Neuron* 1992;9:583-593.
- Barrett GL. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 2000;61:205-229.
- Wiesmann C, de Vos AM. Nerve growth factor: Structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:748-759.
- Grills BL, Schuijers JA. Immunohistochemical localization of nerve growth factor in fractured and unfractured rat bone. *Acta Orthop Scand* 1998;69:415-419.
- Nosrat CA, Fried K, Lindskog S, Olson L. Cellular expression of neurotrophin mRNAs during tooth development. *Cell Tissue Res* 1997;290:569-580.
- Otten U, Ehrhard P, Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:10059-10063.
- Boyle MD, Lawman MJ, Gee AP, Young M. Nerve growth factor: A chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol* 1985;134:564-568.
- Bonini S, Rasi G, Bracci-Laudiero ML, Procoli A, Aloe L. Nerve growth factor: Neurotrophin or cytokine? *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131:80-84.
- Basdra EK, Komposch G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: An in vitro analysis. *Eur J Orthod* 1997;19:615-621.
- Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Arch Oral Biol* 1990;35:241-247.
- Somerman MJ, Shroff B, Argraves WS, et al. Expression of attachment proteins during cementogenesis. *J Biol Buccale* 1990;18:207-214.



12. McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontol Res* 1991;26:144-154.
13. Nohutcu RM, McCauley LK, Koh AJ, Somerman MJ. Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro. *J Periodontol* 1997;68:320-327.
14. Kurihara H, Shinohara H, Yoshino H, Takeda K, Shiba H. Neurotrophins in cultured cells from periodontal tissues. *J Periodontol* 2003;74:76-84.
15. McKee MD, Zalzal S, Nanci A. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: Localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *Anat Rec* 1996;245:293-312.
16. Macneil RL, Sheng N, Strayhorn C, Fisher LW, Somerman MJ. Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1597-1606.
17. Hoang QQ, Sicheri F, Howard AH, Yang DS. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* 2003;425:977-980.
18. Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, et al. Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem* 2003;278:7949-7955.
19. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces **new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein** and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 1992;267:20352-20362.
20. Cook SD, Dalton JE, Tan EH, Whitecloud TS, Rueger DC. In vivo evaluation of recombinant human osteogenic protein (rhOP-1) implants as bone graft substitute for spinal fusions. *Spine* 1994;19:1655-1663.
21. Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89:755-764.
22. Matsuura M, Herr Y, Han KY, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. *J Periodontol* 1995;66:905-914.
23. Cantarella G, Lempereur L, Presta M, et al. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J* 2002;16:1307-1309.
24. Moser KV, Reindl M, Blasig I, Humpel C. Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, **express NGF receptors and secrete NGF after inflammation**. *Brain Res* 2004;1017:53-60.
25. Ikuta T, Ariga H, Matsumoto K. Extracellular matrix tenascin-X in combination with vascular endothelial growth factor B enhances endothelial cell proliferation. *Genes Cells* 2000;5:913-927.
26. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18-32.
27. Chaplin AJ, Grace SR. Calcium oxalate and the von **Kossa method with reference to the influence of citric acid**. *Histochem J* 1975;7:451-458.
28. Middeke M, Hoffmann S, Hassan I, Wunderlich A, Hofbauer LC, Zielke A. In vitro and in vivo angiogenesis in PC12 pheochromocytoma cells is mediated by vascular endothelial growth factor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002;110:386-392.
29. Steinle JJ, Granger HJ. Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. *Auton Neurosci* 2003;108:57-62.
30. Pincelli C, Sevigiani C, Manfredini R, et al. Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1994;103:13-18.
31. Pincelli C, Marconi A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2000;22:71-79.
32. Yada M, Yamaguchi K, Tsuji T. NGF stimulates differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1187-1193.
33. Ebendal T. Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J Neurosci Res* 1992;32:461-470.
34. King GN, Hughes FJ. Effects of occlusal loading on ankylosis, bone, and cementum formation during bone morphogenetic protein-2-stimulated periodontal regeneration in vivo. *J Periodontol* 1999;70:1125-1135.
35. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, et al. **Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs**. *J Periodontol Res* 2003;38:97-103.
36. Takeda K, Shiba H, Mizuno N, et al. Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng* 2005;11:1618-1629.

Correspondence: Dr. Noriyoshi Mizuno, Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan. Fax: 81-82-257-5664; e-mail: mizuno@hiroshima-u.ac.jp.

Accepted for publication November 9, 2005.

## II. 臨床に向けた応用

# 軟骨修復に用いられる 間葉系幹細胞の基本的性質

加藤幸夫 加家壁正知 Pan Haiou 五十嵐 晃 堤 真一 松原全宏  
河本 健 辻 紘一郎 中村耕三 高岸憲二

**Key words** : MSC, cartilage repair, bone marrow, marker genes, osteocalcin

## Basic step

### 自家/他家のMSC移植による 再生医療

骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell ; MSC) は、各種の骨髄<sup>1)</sup>、骨膜、脂肪組織、滑膜などから分離でき、軟骨、骨、脂肪へ分化する以外に、筋肉、セメント、歯周靱帯<sup>2)</sup>、腱にも分化できる。また神経、肝臓実質細胞にも分化できる広い可塑性をもつ。したがって、軟骨欠損以外に、骨欠損、歯周病、心筋梗塞、難治性皮膚潰瘍などの治療に自家MSCが臨床応用されている。さらに動物モデルでは、脳梗塞や腎臓疾患などにも有効であるとされている。

一方、MSCは臓器移植での拒絶反応を抑制する<sup>3)</sup>。自家MSC以外に、他家のMSCを再生医療

で使用する試みが米国で進行しているのは、MSCが拒絶反応を抑制するためである。他家MSCを用いると、拒絶や感染のリスクはあるが、患者ごとの安全性/品質検査が必要でなくなるのでコスト面で有利である。

### MSCの性質はわかっているか？

MSCの移植が骨/軟骨再生に有効であることはよく知られているが、それではMSCがどのような細胞であるかという明確な定義はない。主として臨床面からMSCの研究が進んできたため、基礎的なMSCの研究が遅れている。

そして、MSCが幹細胞か前駆細胞かについてもいまだに議論がある。幹細胞とは、一般に、

Characterization of transplantable mesenchymal stem cells that are useful for cartilage regeneration

0286-5394/06/¥400/論文/JCLS

Y. Kato, T. Kawamoto : 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 ; H. Pan, A. Igarahi, K. Tsuji : (株) ツーセル ; T. Matsubara, K. Nakamura : 東京大学医学部整形外科 ; M. Kayabe, S. Tsutsumi, K. Takagishi : 群馬大学医学部整形外科

自己複製能をもち、かつ増殖能と多分化能を失わない細胞と定義されるが、MSCは、胚性幹細胞とは異なり、培養すると増殖能と多分化能が著しく低下する。FGF-2,あるいは基底膜細胞外基質コート培養皿を用いる著者らの超増幅法では、長期間にわたってMSCの増殖能と多分化能を維持することができるが(図1),それでも半永久的にMSCを増やし続けることはできない<sup>4),5)</sup>。すなわちMSCは、従来の幹細胞の定義とは一致しない。だからといって、MSCが幹細胞ではなく単なる前駆細胞であるとは著者らは考えていない。成体(組織)幹細胞に対しては、従来とは別の定義が必要かもしれない。

### MSCは均質な細胞集団か?

細胞移植治療において、細胞の均質性と同一性が保証されていなければ、臨床成績が不安定であるし、臨床効果を評価することもできない。移植用MSC集団に、線維芽細胞やほかの細胞が混入すれば、治療成績が低下するだけでなく、治療にコントロールできない不確定要素を残す。したがって、厚生労働省も細胞治療の「基

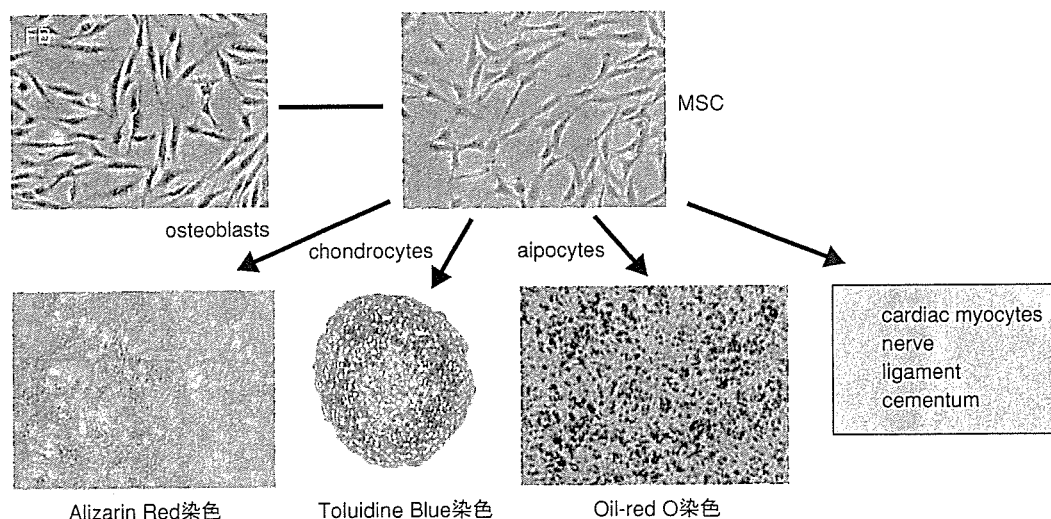
本的考え方」および「指針」において、「同一確認試験」や「細胞の純度試験」を求めている

軟骨修復のための移植用細胞として、骨中の培養皿に接着して増殖した細胞が用いられている<sup>6)~8)</sup>。造血系細胞は培養皿に接着せず1~2回の培地交換で除かれる。したがってMSCは培養皿接着細胞(plastic-adherent cells)もよばれる。しかし、培養皿接着細胞が均一細胞かヘテロな細胞集団であるかはまだ不明である。これまで、ある1つの論文は均一性を示唆しているが<sup>9)</sup>、多くの研究はMSCの均質性を示唆している<sup>10),11)</sup>。

培養皿接着細胞には、MSC以外に、分化しない線維芽細胞様の細胞、骨/軟骨/脂肪へ方向だけの分化能をもつ前駆細胞などが存在する<sup>10)</sup>。また形態や増殖能の異なる2種類のMSCが存在する<sup>11)</sup>。ただし生体の骨髄には幹細胞が存在しているが、培養すると前駆細胞へと変化するか、あるいは線維芽細胞へと脱分化する可能性があるため、「MSCの不均質性」は未完全培養技術、分化技術の反映かもしれない。で著者らは、以下のような検討を行った。

図1 FGF-2で超増幅したMSCの多分化能

FGF-2で超増幅したMSCは、分化誘導に反応してほぼすべての細胞が多分化能を示した。一方、線維芽細胞はMSCと形態的にできないもののこれらの分化能を示さなかった。



## 骨髄MSCに「線維芽細胞」は存在するか？

皮膚由来線維芽細胞を10%血清とFGF-2存在下で培養すると100世代以上増殖した。一方、多数の患者由来の骨髄培養皿接着細胞は25~50世代までに増殖が停止した。もしMSC細胞群に、1%でも「線維芽細胞」が存在するとしたら、骨髄培養皿接着細胞は少なくとも90世代まで増殖して、線維芽細胞に置き換わるはずである。しかしすべてのMSC株は25~50世代で増殖が停止して、しかも増殖停止時にすべての細胞が骨分化能を維持していた。このことは、骨髄液由来の培養皿接着細胞に「線維芽細胞」は存在しないことを示唆している。

この点をさらに追究するために、骨髄液中の細胞を培養皿に低細胞密度で播種し、細胞クローンを分離し、各クローン株のMSCマーカー遺

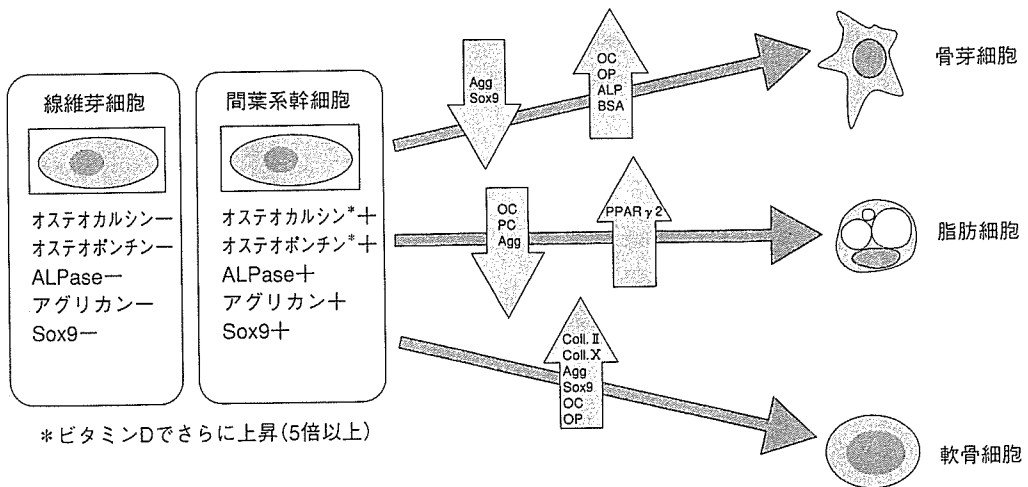
伝子発現パターン(後述)を検討した。その結果、いずれのクローン株も線維芽細胞とは異なる遺伝子発現パターンを示した。これらの結果も、骨髄液には「線維芽細胞」は存在しないことを示唆している。

## 骨髄MSCに「前駆細胞」は存在するか？

間葉系幹細胞が分化すると、それぞれの系列に特徴的な遺伝子の発現が亢進するとともに、他系列の分化マーカーの発現は抑制される(図2)。そこで、骨髄液由来の培養皿接着細胞を低密度で播種して、クローンごとに分離培養した。そして各クローン株の分化マーカー遺伝子の発現レベルを比較した。骨のマーカーであるオステオカルシン、軟骨マーカーであるアグリカンとSox9、軟骨/骨の共通マーカーであるオステ

図2 MSC, 前駆細胞および分化細胞でのマーカー遺伝子の発現レベル

MSCが各系列に分化を開始し始めると、それぞれの系列の遺伝子の発現が亢進し始めるとともに、他系列の遺伝子の発現が抑制される。一方、MSCは未分化段階から、3分化方向のマーカー遺伝子のいくつか(すべてではなく)低レベルで発現していたが、線維芽細胞ではこれらのマーカー遺伝子はほとんど発現していなかった。前駆細胞あるいは分化細胞でみられるはずの、どれか単一分化系列のみのマーカー遺伝子の発現は、すべてのMSCクローン株で、観察できなかった。つまりMSC集団に前駆細胞は存在していなかった。



オポンチンとアルカリホスファターゼ、脂肪マーカーであるPPAR- $\gamma$ は、未分化なMSCですでに部分的に発現していた。そしてそれらは各クローン間で類似した発現パターンを示した。

一方、前駆細胞、分化細胞の特徴である、単一系列のみが充進した遺伝子発現パターンを示すクローン株はまったく存在しなかった。これらの結果は、骨髓液由来の培養皿接着細胞に「前駆細胞」あるいは「分化細胞」は存在しないことを示唆している。

### 骨髓MSCの均質性/同一性検査の方法

移植に使用するMSCが均質かどうかを検定するには、親株から分離した各クローン株の遺伝子発現パターンが一致していれば、そのMSC細胞集団が均質であることを証明できる。

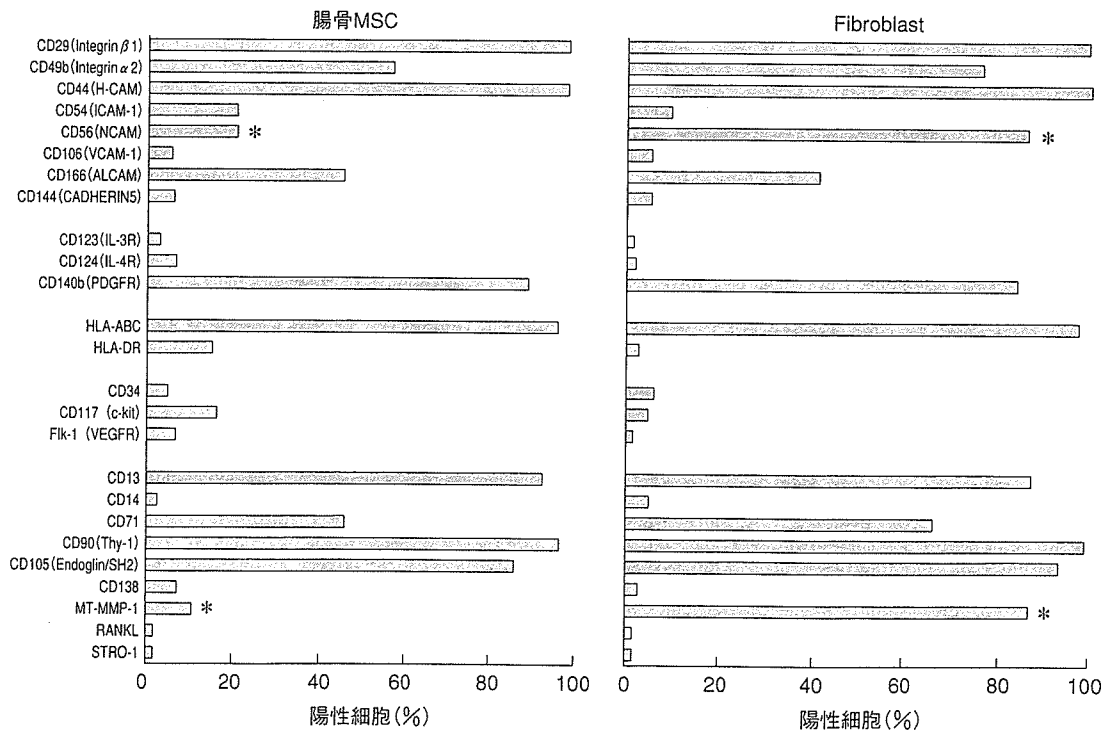
そこで、多くのMSCクローン株の遺伝子発現

パターンを分析したところ、多数のMSCマーカー遺伝子(次項で詳述)の発現パターンは、クローン間で同一であり、線維芽細胞やその他の細胞でのパターンとは明らかに異なっていた。すなわち、著者らの開発した培養法では、均質なMSC(あるいは均質性が保証されたMSC: gMSC/ツール社の商標)が得られることが判明した。

### MSCのマーカー遺伝子の同定

多くの論文で、MSCの細胞表面抗原の発現パターンが造血系細胞と異なることが示され、それがMSCである証拠であると主張された。しかし著者らはこれまで使用されている26種類以上の細胞表面抗原について検討したところ、いずれの抗体もMSCと線維芽細胞との区別に役立たなかった(図3)。つまり、既存の「MSCマーカー」

図3 ヒト腸骨由来MSCおよび線維芽細胞の細胞表面抗原の発現レベルの比較  
これらの抗原のいくつかは造血系細胞とは発現レベルが異なっていたが、線維芽細胞と区別できる細胞表面抗原は見出せなかった。



では、線維芽細胞と区別できないということである。

そこで著者らは、ヒト骨髄MSCと皮膚あるいは歯肉の線維芽細胞からRNAを分離して、DNA microarrayを用いて遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、4種類の遺伝子がMSCで発現が亢進して、9種類の遺伝子がMSCで発現が低下していた。またこれらのマーカー遺伝子は、移植用MSCに線維芽細胞が混入していないことを確認するのに役立った(表1)<sup>12)</sup>。

しかし、4つのポジティブマーカーだけではMSCの特徴を明らかにするには不十分であるため、さらに多くの候補遺伝子に対して大規模な定量的PCRを行った。今回は96種類の遺伝子発現レベルを一度に定量できるLow Density Array Cardを用いた。その結果、線維芽細胞と比較してMSCで発現が亢進している28個のポジティブマーカー遺伝子を見出した。

次に、大腿骨と脛骨の間葉系幹細胞のマーカー遺伝子の発現レベルを比較した。その結果、大腿骨、脛骨、腸骨でのMSCマーカーの発現パターンは一致していたが、歯槽骨ではパターンが一部分異なっていた。歯槽骨は外胚葉の神経

冠由来であり、大腿骨、脛骨、腸骨は中胚葉由来である。歯槽骨に特徴的なMSCマーカーの発現パターンは、発生経路の違いに起因すると推察される<sup>1), 12)</sup>。

## MSCのオステオカルシン応答能

MSCは線維芽細胞とはホルモンや成長因子への応答能が異なると予想される。著者らはとくにビタミンD応答性について興味をもった。

1,25水酸化ビタミンDは、MSCの増殖および骨、脂肪、軟骨への分化を抑制する。さらに骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞の増殖、あるいはマトリックス/蛋白合成に影響する。骨芽細胞では、ビタミンDがオステオカルシンおよびオステオポンチン合成を促進することが知られている。しかし、MSCにおけるオステオカルシンの合成については不明である。

オステオカルシンは骨、象牙質など硬組織のみに存在する代表的な非コラーゲンマトリックス蛋白であり、骨分化の後期にその合成が亢進する。またオステオポンチンも、硬組織で高レベルに合成される非コラーゲンマトリックス蛋

表1 ヒトMSCの遺伝子マーカーを利用した品質検査

患者から培養したMSC/培養皿接着細胞と、標準MSC、標準線維芽細胞の遺伝子発現を比較した。これらの遺伝子の発現レベルから、培養MSCの品質を検査できる。

遺伝子名	遺伝子発現レベル								標準MSC	標準fibroblast
	patient-1	patient-2	patient-3	patient-4	patient-5	patient-6	patient-7			
MHC-DR- $\alpha$	1561	1851	3582	22950	31004	7446	1022	582 $\pm$ 402	2 $\pm$ 2	
MHC-DR- $\beta$	2121	30	1004	6788	55	10248	1992	563 $\pm$ 769	2 $\pm$ 1	
tissue factor pathway inhibitor-2	9	13	37	251	40	33	25	23 $\pm$ 17	4 $\pm$ 4	
adrenomedullin	3	2	1	2	2	1	2	1 $\pm$ 1	15 $\pm$ 5	
apolipoprotein D	14	2	8	4	2	5	2	3 $\pm$ 2	426 $\pm$ 326	
collagen, typeXV, alpha 1	1	3	1	1	2	23	26	no signal	82 $\pm$ 27	
C-type lectin, superfamily member-2	3	1	3	2	1	3	2	5 $\pm$ 4	231 $\pm$ 191	
CUG triplet repeat, RNA-binding protein-2	7	12	8	2	4	1	1	6 $\pm$ 5	148 $\pm$ 107	
MMP-1	28	23	73	7	2	1	1	9 $\pm$ 10	1206 $\pm$ 1097	
Sam68-like phosphotyrosine protein	no signal	no signal	no signal	2	no signal	1	2	no signal	3 $\pm$ 2	

白であり、細胞遊走や骨吸収に関与している。

著者らは、MSCにおけるオステオカルシン、オステオポンチンなどの骨関連遺伝子の発現に及ぼすビタミンDの影響を検討した。MSCではビタミンD存在下でのみオステオカルシンとオステオポンチン合成が24時間以内に著明に亢進した。しかしビタミンDはアルカリホスファターゼなどほかの骨関連遺伝子の発現には影響しなかった。また石灰化を抑制した。

一方、1,25水酸化ビタミンD存在下でも、線維芽細胞はオステオカルシンとオステオポンチンを産生しなかった。したがって、MSCのオステオカルシン産生能は、移植用MSCに線維芽細胞が混入していないことを検定するのに有用であった。

### MSC移植による ウサギ関節軟骨欠損の修復

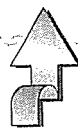
脇谷らは、ウサギ関節軟骨の全層欠損モデルにおいて、コラーゲンゲルに埋入した自家骨髄MSCの移植が修復を促進することを報告した<sup>7)</sup>。加家壁らも、ウサギ関節軟骨の全層欠損モデルに、FGF-2存在下、あるいは非存在下で増幅し

たMSCを、ヒアルロン酸スポンジ(高分子ヒアルロン酸を凍結乾燥したもの：電気化学工業社からの提供)とともに、移植した。

手術12週間後において、無処置のコントロール群では、組織欠損部は線維性の組織で充填され軟骨細胞は存在しなかった。一方、ヒアルロン酸担体のみ、担体+細胞(FGF-)、担体+細胞(FGF+)群では、多くの軟骨細胞が出現した。Wakitani scoreで組織を評価すると、コントロール群に対して、担体+細胞(FGF+)群のみが有意差( $p < 0.05$ )を示し、正常関節軟骨に類似した組織像を呈した。

なお、ヒアルロン酸スポンジとアテロコラーゲンは、MSC存在下では同程度の軟骨修復を示した。これらの結果は、アテロコラーゲンとともに、ヒアルロン酸スポンジが軟骨修復用の担体として有用であることを示唆している。またFGF-2存在下で増幅したMSCが従来法のMSCよりも高い軟骨修復能をもっていることを示している。

一方、堤らはウサギ関節軟骨全層欠損モデルで、関節腔へのMSCの注射が軟骨修復を促進することを観察している(未発表)。



### Bonus Step

自家軟骨細胞の移植は軟骨欠損に対して有用であると報告されている。一方、自家MSC移植も変形性関節症などに用いられているが、その評価は固まっていない。それは軟骨修復の臨床評価法が確立していないからである。軟骨修復の評価法とともに、MSCの最適な培養法/分化法および最適

な担体が開発されれば、MSC移植が有力な軟骨修復治療法の1つとなるかもしれない。自家MSCの培養には人手とコストがかかり、ヒト細胞専用の培養室も必要であるが、自動培養装置の使用などで産業化できればコストは下がり、普及可能な医療技術に発展するものと期待できる。

◆文 献◆

- 1) Matsubara T, Nakamura K, Kato Y, et al : Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine : differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 20 : 399-409, 2005.
- 2) Kawaguchi H, Hirachi A, Kurihara H, et al : Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*, 75 : 1281-1287, 2004.
- 3) Aggarwal S, Pittenger MF : Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105 : 1815-1822, 2005.
- 4) Tsutsumi S, Takagishi K, Kato Y, et al : Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 288 : 413-419, 2001.
- 5) Matsubara T, Tsutsumi S, Kato Y, et al : A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, 313 : 503-508, 2004.
- 6) Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, et al : Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae : two case reports. *Cell Transplant*, 13 : 595-600, 2004.
- 7) Wakitani S, Goto T, Caplan AI, et al : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg*, 76-A : 579-592, 1994.
- 8) Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al : Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*, 10 : 199-206, 2002.
- 9) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284 : 143-147, 1999.
- 10) Muraglia A, Cancedda R, Quarto R : Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci*, 113 (Pt 7) : 1161-1166, 2000.
- 11) Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ : Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 : 7841-7845, 2001.
- 12) Ishii M, Koike C, Kato Y, et al : Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 332 : 297-303, 2005.



# 再生医療の潮流と歯科への応用

加藤幸夫<sup>1~3)</sup> 辻 紘一郎<sup>3)</sup>

Yukio KATO

Koichiro TSUJI

1) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔生化学講座 2) 科学技術振興機構 3) 株式会社ツーセル

再生医療は、失われた組織を再生させる医療です。歯科では、歯槽骨、顎骨、歯周靭帯、歯肉、セメント、象牙質、歯髄、あるいは歯全体の再生をめざします。

## テクニックとメカニズム

細胞、成長因子、生体材料や人工材料を組み合わせ、失われた組織を再構築します。いわゆる「組織工学」です。細胞のみを移植する場合は「細胞治療」です。

たとえば骨を再生させるには、現状では腸骨の骨片を切除してそれを移植しますが、この方法では患者の苦痛が激しく、採取できる骨量が少ないのが問題です。一方、再生医療では、骨髓液から分離した間葉系幹細胞を試験管内で超増幅したうえで患者に移植して骨を再生させます。

**注目点:**再生医療でとくに注目されるのは、幹細胞による「細胞治療」です。これまで臓器移植法はありましたが、幹細胞を試験管内で増やしてから移植する方法はありませんでした。

## 幹細胞の発見とその培養技術

幹細胞とは、組織／臓器のもとになる細胞です。胚性幹細胞（ES細胞）は、全組織へと分化できる能力のある全能性の幹細胞です。胚性幹細胞は、受精卵が発生して胚盤胞となったときに内部細胞

塊のなかにも出現します。1980年代にカリフォルニア大学のG. Martinら数グループが、胚性幹細胞の発見、分離／培養に成功しました。胚性幹細胞は、テロメラーゼ活性が高く、フィーダー細胞や白血病阻止因子 leukemia inhibitory factor (LIF) によって無限に増殖させることができます。この細胞を用いて、神経、骨、軟骨、肝臓、心臓、膵臓などがすでにつくられています（表1）。

ところで、最近韓国の黄教授は、成人の細胞の核を脱核した卵子に移植して胚をつくり、そこからヒトES細胞株を高効率で樹立したと報告しました。しかし、この報告は虚偽だったことがわかりました。もともと黄教授の報告には疑問がありました。なぜならマウスのES細胞株を効率よく樹立できるのは、奇形種をつくりやすい特殊な系統のマウスだけだったからです。遺伝子背景に大きな個体差があるヒトでどのヒトからも効率よくES細胞株をつくれるということ自体、以前の学問的知見と矛盾していました。

いずれにせよ、ES細胞は発生過程のごく短い段階からしか分離できません。一方、大人の組織には各種の成体幹細胞（組織幹細胞あるいは体性幹細胞とも呼ばれる）が存在しています。たとえば、骨髓間葉系幹細胞、骨髓造血幹細胞、神経幹細胞、肝臓幹細胞などです。これらの成体幹細胞は、患者自身から分離できるので倫理的問題も少

表① 細胞治療の開発状況

- ・ヒト ES 細胞 (GERON 社) すい臓細胞、パーキンソン病
- ・ヒト・豚すい臓細胞 (AmCyte 社) 免疫隔離アルジネート膜使用
- ・ヒト造血幹細胞 (StemCell 社) 造血促進、骨髄移植の代わりとする、心臓疾患にも有効
- ・ヒト血液由来細胞 APC (EPC) (心臓疾患) 1 人死亡だが他 93% は回復
- ・ヒト MAPC (ミネソタ大学グループ) 豚心臓疾患モデルで有効
- ・ヒト神経幹細胞 (StemCell 社) 動物モデルの脊髄損傷で有効、再ミエリン化の促進
- ・肝臓幹細胞 2N を維持している。全体の 0.5% の細胞、CK19+, teromerase+, lhh+ ; 肝実質細胞からの増殖阻害因子によるフィードバック抑制が強いから肝臓以外の組織に移植するとよい。ホロファイバーで培養、ドイツで臨床応用研究
- ・ヒト臍帯血由来細胞 (CD34+CD133+) をウサギの角膜再生に利用した
- ・ヒト間葉系幹細胞 (骨髄由来、脂肪由来、臍帯血由来) 骨、軟骨再生、心筋梗塞、脳梗塞などにも有効

なく、かつ ES 細胞のように奇形種をつくる心配もなく、移植用の細胞として現実的でありかつ有望です。

ところが、成人幹細胞の培養は困難であり、たとえば間葉系幹細胞も、従来の培養方法ではすぐに増殖能と分化能を失いました。そこで私たちは、基底膜細胞外基質あるいは FGF-2 (Fibroblast growth factor-2) を利用した間葉系幹細胞の超増幅法を開発しました<sup>1-5)</sup>。私たちの超増幅法では、多分化能を維持したまま間葉系幹細胞を 500 億倍に増殖させることができました。しかも、患者自身の血清を用いて (プリオン病の危険があるウシ血清でなく)、間葉系幹細胞を安全に増殖させることに初めて成功しました。つまり、成体幹細胞の大規模な基礎研究や多数の細胞を移植する臨床研究が、超増幅法により容易になりました。

なお、米国では 250 社以上の再生医療の会社が設立されており、300 件以上の臨床試験が開始されています。表 1 に、現在試行されている幹細胞治療を例示しました。

### 新バイオ技術のための ルールとモラル

遺伝子組み換え技術は、1970 年代でのスタンフォード大の P. Burg による制限酵素の発見以後、

急速に発展して、現在では製薬、バイオ、医学の分野でなくてはならない研究手段となっています。しかし当初は、この技術で生物を操作することについて大議論がありました。

宗教的問題のほかにも、新しい生物 (細菌) による環境汚染についての心配がありました。しかし、その後新しいルールがつけられて、現在では法規制に基づいて遺伝子組み換えが行われています。

幹細胞研究/治療にも宗教的、社会的問題があります。宗教によっては、受精卵や胚は人 (baby) と同等であるとみなされているので、それを操作したり、他人の利益 (健康) のために利用したり、金銭で売買してはいけないという考え方があります。つまり、人の価値として、認知、自覚、思考、精神、心理があり、それらを生み出さうる生命原理は、個々の細胞一つひとつに備わっているの、胚の細胞も生命として扱うべきとの議論です。

さらに胚をつくるための卵子をだれが提供するのか、という問題もあります。提供される卵子には限りがあるので、樹立した ES 細胞株から卵子をつくろうとする計画もあります。

一方、細胞治療の臨床試験の開始にあたって、その安全性や有効性については、十分な科学的根拠に基づくことが求められています。

バイオ技術ではないものの、類似した問題が原子力についてもあり、厳しいルール/モラルのもとでのみ原子力や放射性同位元素の利用が許可されています。現在、イランや北朝鮮での原子力開発は政治的問題ともなっています。したがって、幹細胞技術が普及するには、科学的/政治的/社会的/宗教的に妥当なルールとモラルの整備が必要です。

### 間葉系幹細胞による歯槽骨、 セメント質、歯根膜の再生

間葉系幹細胞は骨髄や脂肪組織から分離できます。間葉系幹細胞の歴史は、1966 年に骨髄由来の

表② 間葉系幹細胞を用いた細胞治療ですでに病院で実施されているもの

骨欠損
人工関節の骨への固定
軟骨欠損
歯周病
歯科用インプラントの支持骨形成
心筋梗塞
難治性皮膚潰瘍
造血支持
臓器移植での拒絶反応

細胞を筋肉に移植すると骨が形成されたというFriedensteinらの報告に始まりました。1974年にはFriedensteinらは骨髄由来の細胞が骨分化能を有すると報告しました。その後、骨髄の間葉系幹細胞は、軟骨、脂肪、筋肉に分化すること、さらに神経や肝臓へも分化できることが示されました。したがって、間葉系幹細胞は各種の疾患に対してすでに臨床応用されています(表2)。

一方、広島大学歯周病科の栗原英見教授と私たちの口腔生化学のグループは、骨髄由来の間葉系幹細胞を、欠損した歯周組織へ移植すると、歯槽骨のみならず、セメント質および歯周靱帯の細胞へも分化することを見出しました<sup>6)</sup>。またビーグル犬の歯槽骨欠損モデルで、自家骨髄間葉系幹細胞の移植は、歯周組織の再生を促進することを見出しました<sup>7)</sup>。そして歯周病患者に対する細胞治療を開始しています。

### 歯科での間葉系幹細胞の利用と将来の歯科再生医療

名古屋大学口腔外科の上田 実教授らは、骨髄の細胞を移植することにより、顎骨の再建が可能であることを報告しています。また上田グループは、歯全体の再生を目指した研究も行っています。長寿研の中島美砂子らは、歯髄のSP細胞を幹細胞として利用する試みを開始しています。また私たちは、歯周病以外に、顎骨再建や口蓋裂における骨補填に間葉系幹細胞を使用することを計画しています。これらの細胞治療はまだスタートした

ばかりですが、新しい歯科医学のために重要な領域であると考えています。



### 歯科での成長因子治療

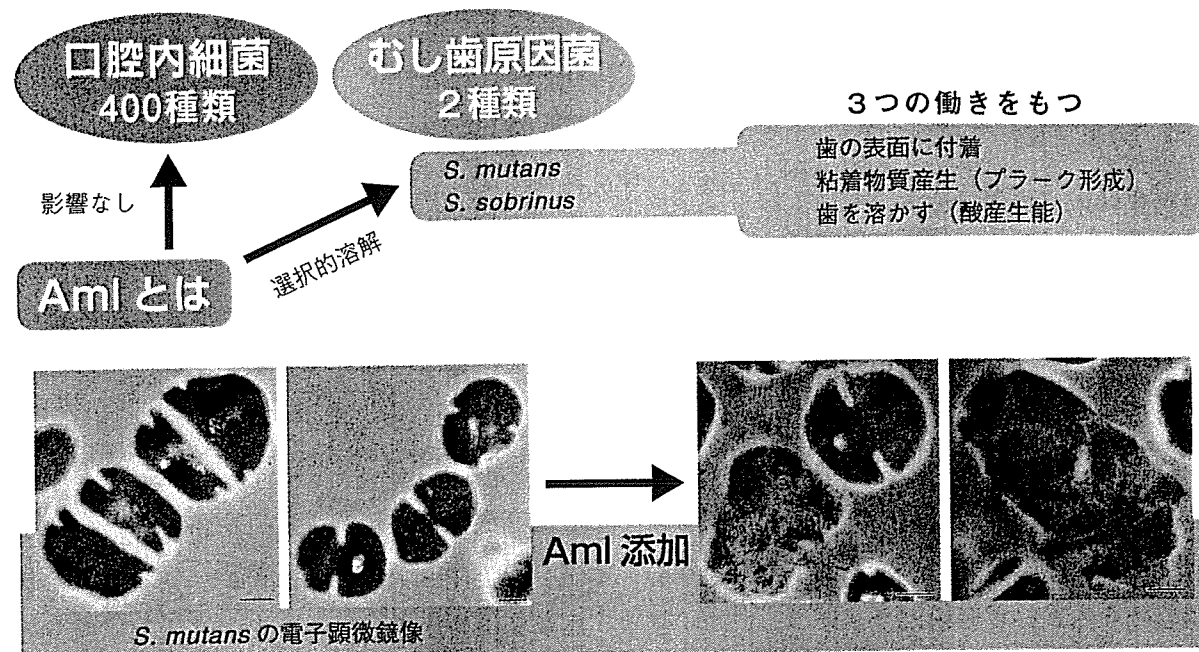
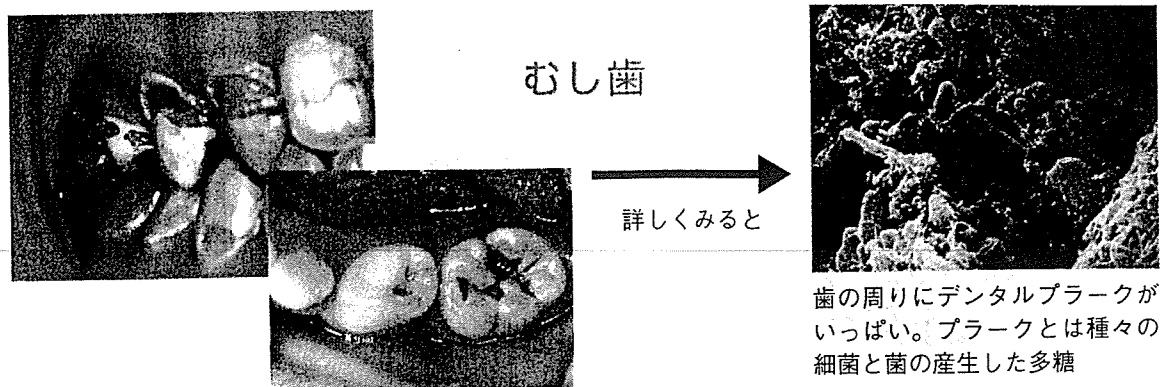
BMP、FGF-2、PDGF、BDNF、アメロジェニンなどの成長因子/生理活性物質は、骨/セメント質などの再生促進能をもつことから、歯周病での組織修復に有用かもしれません。BMPについては東京医科歯科大学、FGF-2については大阪大学、BDNFについては広島大学のグループなどが研究を続けています。市場にはアメロジェニンを主成分とするエムドゲインがもっとも早く出ましたが、昨年米国ではPDGF製剤も売り出されました。今後、多種類の成長因子が歯科で使用されることになると予想されます。ただし、大きな組織欠損には成長因子だけでは不十分で、細胞も補填する必要があります。



### 歯科/整形外科分野での ツーセル社のとりのくみ

ツーセルの前身は、2000年に発足した科学技術振興機構(プレベンチャー事業)の「骨/軟骨組織の再生医療チーム」です。再生医療チームは、3年間の研究開発期間を経て、株式会社ツーセルに変身しました。ツーセルは広島大学発のバイオベンチャーとして、歯科、整形外科の新しい製品の開発に挑戦しています。

ツーセルは、前述の間葉系幹細胞を利用した歯周病(重症)の治療を病院型再生医療として実現したいと考えています。また、BDNFを用いた歯周病(軽症)の治療については栗原教授およびデンツプライ社との共同研究を進めています。この他、図1に示す新しいむし歯予防法は、広島大学の菅井基行教授らが開発を進めているもので、むし歯原因菌(*S. mutans* と *S. sobrinus*)を選択的に溶解するAmlを用いて幼児のむし歯を予防するものです。再生医療のほかにも、ツーセルは



図① 新しいむし歯予防法。虫歯原因菌特異的溶菌酵素 (Aml) の臨床応用

歯科メーカーと共同して Aml 製剤の開発を進めようとしています。また整形外科分野では、変形性関節症、骨補填、骨粗鬆症を対象とした細胞治療の研究開発を進めています。

【参考文献】

- 1) 加藤幸夫, 加家壁正知, Pan Haiou, 五十嵐 晃, 堤真一, 松原全宏, 河本 健, 辻 紘一郎, 中村耕三, 高岸憲二: 軟骨修復に用いられる間葉系幹細胞の基本的性質, 関節外科, 5: 63-69, 2006.
- 2) Tsutsumi S, Takagishi K, Kato Y, et al.: Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. Biochem Biophys Res Commun, 2001 288: 413-419, 2001.
- 3) Matsubara T, Tsutsumi S, Kato Y, et al.: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. Biochem Biophys Res Commun, 313: 503-508, 2004.
- 4) Matsubara T, Nakamura K, Kato Y, et al.: Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. J Bone Miner Res, 20: 399-409, 2005.
- 5) Ishii M, Koike C, Kato Y, et al.: Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun, 332: 297-303, 2005. (優秀論文賞: トップ10ダウンロード回数2005)
- 6) Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H: Behavior of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. J Periodontol, in press.
- 7) Kawaguchi H, Hirachi A, Kurihara H, et al.: Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. J Periodontol, 75: 1281-1287, 2004.
- 8) Yoshimura G, Komatsuzawa H, Kajimura J, Fujiwara T, Ohara M, Kozai K, Sugai M: Zymographic characterization of bacteriolytic enzymes produced by oral streptococci. Microbiology and Immunology 48: 465-469, 2004.