

び癌抑制遺伝子の変異についても研究が少ない。小児の主要な肉腫である Ewing sarcoma (EWS) では MSC における EWS 遺伝子と FLI-1 などの Ets ファミリー転写因子遺伝子の転座および EWS-FLI-1 融合蛋白の産生があり、その結果 Cav-1, Id2, などが過剰に誘導されるとともに apoptosis が抑制されている¹²⁾。しかしこの融合蛋白をヒト MSC で強制発現すると老化したが形質転換は起こらなかったという報告もあり議論が一致していない。おそらく Ewing sarcoma の発症には、EWS と Ets 関連遺伝子以外に、第二の遺伝子変化が必要である。またこの肉腫は神経マーカーの一部を発現することから ectodermal 由来である可能性もある。

3.5 各種組織から間葉系幹細胞 (MSC) が分離できる

最初は Friedenstein により骨髄から MSC が分離され¹³⁾、その後に脂肪組織、滑膜、骨膜からも MSC が分離された。しかし最近になって、成体のほとんどの臓器、組織(肺臓、腎臓、肝臓、脾臓などを含む)から、骨、軟骨、脂肪分化能をもつ MSC 様細胞が分離された^{14, 15)}。これらの観察は、MSC が多様な組織に広く分布しているか、あるいは人工的な環境で培養することにより、各種の細胞が MSC へ戻りうることを示唆している。

3.6 各種分化細胞は、基本状態である MSC へ戻りうる

軟骨細胞あるいは骨芽細胞を、試験管内で分化刺激なしに長期間培養すると、骨、軟骨、脂肪分化能をもつ MSC 様細胞へと変換することが幾つかのグループから報告された¹⁶⁾。脂肪細胞も MSC 様細胞へと回帰するようである。

このような現象は、最終分化段階の軟骨細胞が骨芽細胞へと変化する観察や、骨膜の骨前駆細胞が脂肪細胞へと変換することと関係している。分化細胞は MSC 段階へ一旦脱分化した後で他 lineage の細胞へと変換するが、場合によっては MSC 段階へ戻らなくても他 lineage への分化転換が可能である。この場合、骨前駆細胞は、脂肪分化能をも維持しており、脂肪分化刺激により分化転換する。いずれにせよ、試験管内で観察される分化細胞の MSC への回帰や分化転換は、発生のある段階や病的状況では、生体内でも起こるかもしれない。このように間葉系由来細胞の可塑性は極めて高い。

3.7 各種組織から分離した MSC の性質の違い

DNA microarray にて遺伝子発現プロファイルを比較すると、骨髄由来 MSC と滑膜由来 MSC とでは、MSC 特異的遺伝子群に関しては約 50% 一致していた。しかしその他の遺伝子発現パターンはかなり異なっていた。

同様に骨髄由来 MSC と脂肪由来 MSC の遺伝子発現プロファイルについても類似点と相違点

が見いだされた。この結果は、MSCの発現プロファイルに組織依存性の多様性があることを示唆している。

MSCは骨髄で造血を支持するが、他組織では造血を支持しない。骨髄由来MSCと他のMSCの発現プロファイルの違いは組織機能の違いを反映している。また培養系で脱分化してできたMSCはMSCの特徴的遺伝子を発現するとともに、もとの組織(脂肪など)の遺伝子発現の特徴を一部残しているかもしれない。

3.8 MSCの分子マーカーの同定

私たちは、MSC、線維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞の遺伝子発現プロファイルをDNA microarrayにて比較して、MSCでのみ高レベルに発現している148遺伝子を同定した。さらに定量的RT-PCR法にて、アレーの結果を確認した。

3.9 MSCの生体内分布

DNA microarrayにて同定した骨髄MSCマーカー分子に対する9種類の抗体セットを用いて、マウス胎仔、新生仔、成体の多くの組織におけるMSCマーカーセットの発現を免疫染色によって検討したところ、胎生マウス、新生仔マウスの骨膜と軟骨膜、新生仔マウスおよび成体マウスの骨髄にMSCが存在した。更には、これらのマーカー抗体を種々に組み合わせて二重染色すると、骨髄MSCはこれらのマーカーセットを同時に産生していた。

一方、成体マウスの骨格以外の多くの組織(脂肪を含む)を検討したが、マーカー抗体によりセットとして染色される細胞は存在しなかった。この結果は、非骨格組織から分離されたMSCは、脱分化MSCであり、非骨格組織にはネイティブMSCはほとんど存在しないことを示唆している。あるいは非骨格組織のMSCは骨髄MSCとは発現プロファイルが著しく異なる可能性もあるが、前者の可能性が高い。

3.10 MSCとニッチェおよび血流への流出

胎生および新生仔マウスの骨膜、軟骨膜のMSCは、紡錘形の細胞であった。また新生仔マウスの骨髄でも多くのMSCは、紡錘形で長く伸びていた。一方、成体マウスでは、骨膜、軟骨膜のMSCの数が著明に減少していた。また成体マウスの骨髄のMSCの多くは骨髄の中央に存在して球形の形態を示した。

一般に、紡錘形の細胞は、細胞外基質あるいは隣接細胞に接着することで長く伸びたと考えられ、増殖が可能である。一方、球形の細胞は細胞外基質との接着が弱く静止期の細胞である。

つまり、MSCは骨の発生と成長が盛んな時期では、紡錘形で増殖可能な細胞であり、骨成長

が停止すると、骨髄の真ん中にのみ残り、球形の静止細胞 (reserved cell) となることを示唆している。しかし球形の MSC は、細胞外基質への接着力が弱いためかつ血管系に近いため、組織傷害が起こった時にはすみやかに血流へと遊離して傷害部へと遊走すると推察される (図 1)。実際に、血流中の MSC は大規模な皮膚傷害によって増加したとの報告がある¹⁷⁾。一方、骨髄の MSC は、骨折によって 50% 減少する一方で、血液中の MSC 数が増加したと学会発表されている。プレオマイシン投与 (線維化誘発剤) で肺への MSC の集積が促進されること、脳外傷 / 梗塞で脳への MSC の集積が促進されるとの報告もある。傷害組織からはなんらかの MSC 動員因子 (GM-CSF など) が放出されて、それが骨髄に働いて MSC が循環系へと動員される。傷害組織の周囲では、MSC 遊走因子のパラクライン作用で MSC が傷害部へと遊走する¹⁸⁾。ただし MSC 動員因子や MSC 走化性因子の完全な同定には至っていない。

一方、傷害がない場合は、成体骨髄 MSC は造血幹細胞あるいは造血前駆細胞などと相互干渉していると推察される。

ニッチェとは幹細胞の増殖あるいは分化を制御する微小環境である。細胞外基質あるいは他細胞がニッチェをつくりだしているが、ニッチェは発生段階や病気により変化する。造血系幹細胞 (HSC) の場合、骨芽細胞がつくりだす微小環境 (N-cadherin を含む) が年齢依存性に HSC の未分化状態を維持している。なおこれには異論もある。

一方、MSC のニッチェについては不明である。著者らの研究では、骨髄 MSC は成長中では紡錘形で、成長停止後は球形の形態をとることから、骨髄 MSC のニッチェも年齢とともに変化すると考えられる。成長中でのみ MSC の一部は骨内膜へ接着しうるので、骨内膜は MSC の骨分化を促すニッチェとして働く。一方、骨膜、軟骨膜の MSC ニッチェは増殖シグナルを送って

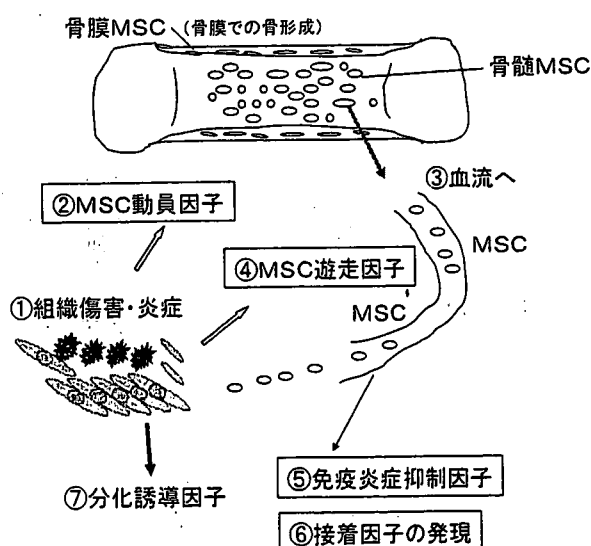


図 1 骨髄および骨格での MSC の分布および傷害組織への動員

第10章 間葉系幹細胞

いと推察される。顎骨頭の軟骨膜での観察によれば、軟骨膜で増殖した紡錘形のMSCと考えられる細胞が、次第に軟骨分化を開始して軟骨基質を産生する軟骨芽細胞へと変化する。この観察は、軟骨側からMSC(軟骨膜細胞)へ分化制御シグナルが送られていることを示唆している。またPTH-rpノックアウトマウスの骨膜では、MSC(骨膜細胞)が骨芽細胞へ異所的に分化したことから、PTH-rpやIhhなどのパラクライン因子が、MSCの未分化状態/骨分化を制御していると推察される。このように、MSCのニッチェでは、細胞外基質、隣接細胞およびパラクライン因子が作動しているようである。今後MSCのニッチェを構成する因子を解明できれば、骨格形成の時空間的制御機構が明らかになるかもしれない。私たちのMSCマーカー抗体セットは、MSCのニッチェを解析する道具として役立つものと期待される。

3.11 MSCシステムの転写因子

148個のMSC特異的遺伝子のなかには9種類の転写因子が含まれていた。またこれらの転写因子のsiRNAによるノックダウンによって、MSCの発現プロファイルが大きく変化した。つまり、これらの転写因子は、MSC独自の遺伝子発現パターンの維持に重要であった。しかもこれらのsiRNAはMSCの増殖能および多分化能を低下させた(図2)。さらに著者らは、骨前駆細胞から骨芽細胞への分化に必須の新規転写因子群を発見している(図2)。

3.12 MSCマーカーによる品質検査

多くの患者から分離した骨髄由来MSCでのMSCマーカーの発現レベルを、線維芽細胞株を基準として(発現レベルを1とする)、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞と比較すると、すべての患者由来MSC株がこれらのMSCマーカーを高レベルに発現していた(図3)¹⁹⁾。さらに移植前の母集団から、単細胞を分離してクローン毎に遺伝子発現を検討すると、MSCマーカー遺伝子

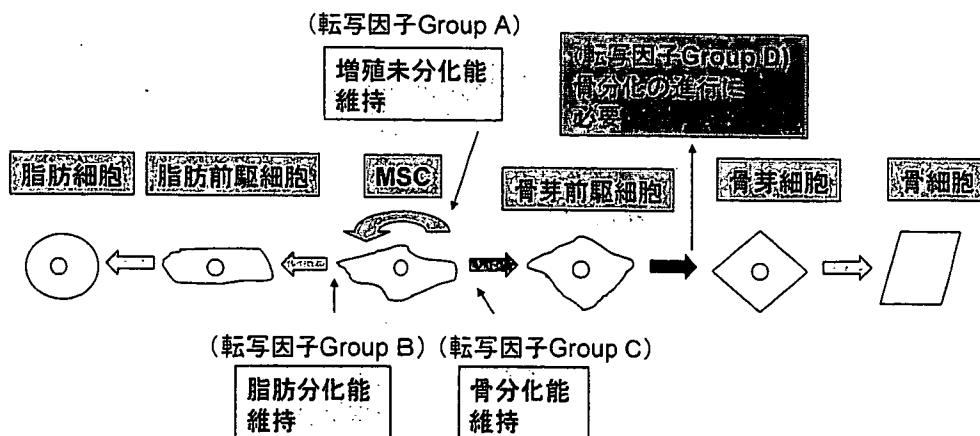


図2 MSCを維持する転写因子および骨前駆細胞の転写因子

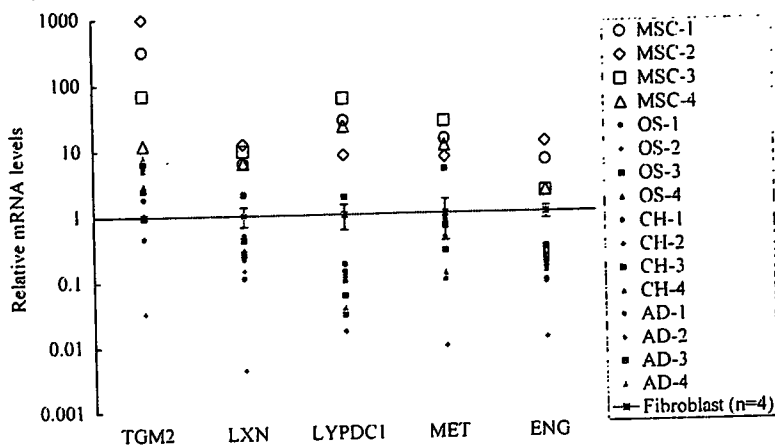


図3 MSCの品質検査(仕様の決定と目的細胞であることの検査)

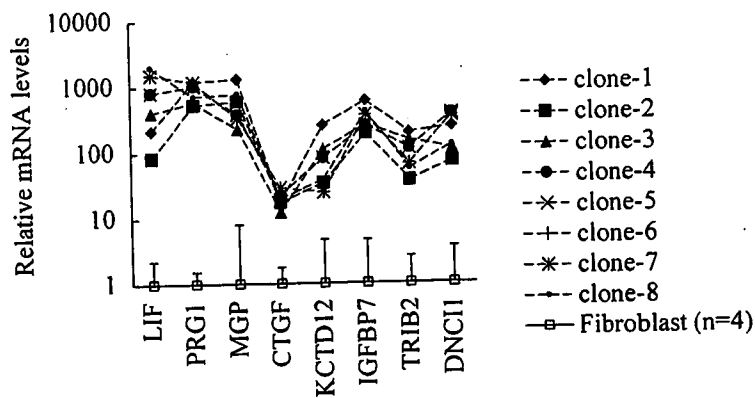


図4 MSCの均質性検査(各単細胞クローン間の遺伝子発現プロファイルの共通性)

はどのクローンでも同一の発現パターンを示した(図4)。つまり、これらの分子マーカーは、移植用の細胞が「目的の細胞である」こと、他細胞の混入がないことを検査するために役立つことが判明した。

3.13 MSCの可塑性—MSCは肝細胞へ分化するか?—

移植した骨髄細胞が肝細胞になることが発表され、その後骨髄中の造血系幹細胞(HSC)がマクロファージ、顆粒球に分化した後に、細胞融合により肝臓細胞となると報告された。骨髄移植による肝臓の機能の回復が細胞融合によるものなのか分化転換なのかは今なお議論がある²⁰⁻²²⁾。一方、寺井らは、山口大学で肝硬変患者へ自家骨髄細胞移植を10数例行い、良好な臨床成績を得ている(アルブミン産生の回復と繊維化の抑制)。佐藤らはヒトのMSC, CD34+細胞, 非MSC/CD34-細胞の3種類の細胞をラットの肝障害モデルの肝臓へ直接注射したところ(免疫抑制剤の存在下)、MSCのみがアルブミンなどを産生する肝細胞となることを報告した²²⁾。しか

もこれは細胞融合の結果ではなかった。なおこの系では MSC は血管内皮細胞 (CD31) あるいはクッパー細胞 (CD68) への分化は観察されなかった²²⁾。その他のグループも試験管や生体内で MSC が肝細胞へと分化すると報告している。骨髄中の肝分化能を持つ細胞が、MSC, HSC, 血管内皮前駆細胞 (EPC) あるいはその他の細胞かの結論はでていないが、私としては MSC による肝硬変治療の可能性 (あるいは単核球細胞 Fraction と MSC の併用) に注目したい。本来中胚葉系の骨髄 MSC がどうして内胚葉系の肝細胞へ分化するのは不思議であるが、胎児の肝臓と骨髄はいずれも造血支持機能をもっている点では共通している。ある条件下では胚の肝臓内に軟骨が出現した。

3.14 線維症と MSC あるいは myofibroblast

肝線維症では、コラーゲン産生細胞が集積して本来の肝機能を障害する。肺、腎および皮膚の線維化も組織再生を障害する。しかし線維化の担当細胞は未だ不明である。Myofibroblast (筋線維芽細胞) は、創の収縮の役割を果たすと考えられている。筋原繊維などの平滑筋の特徴のいくつかを備え、また一時的に III 型コラーゲンを産生するとされている。肝硬変では、コラーゲンを産生する細胞の多く (20 ~ 70%) が骨髄由来 myofibroblast 様細胞であると報告されている。ただしこの myofibroblast は hepatic stellate cell とは異なり alpha-smooth muscle actin (SMA) を発現していなかった。動物実験でも、肺、腎臓、皮膚の癒着化には骨髄由来 myofibroblast が関与していると報告されている (異論もある)。骨髄由来 myofibroblast の起源は MSC あるいは HSC が疑われているが今のところ不明である。血流を巡回している fibrocyte も線維化に関与しているかもしれないが、その起源は CD45 + であることから HSC である可能性がある。いずれにせよ動員された MSC の変化が線維症の病態に関係しているかもしれない。このように MSC, myofibroblast や fibrocyte は血流を循環しうが、通常の組織 fibroblast は組織に局在して体内を巡回しないと考えられている²⁰⁾。つまり骨髄中の MSC, HSC, myofibroblast/fibrocyte, EPC は体内を循環して線維修復に関与する。

Ortis-LA によると肺の繊維症のモデルマウスへの MSC の静脈投与により、MSC は傷害肺に集積して上皮様細胞へと分化し、さらに炎症 (MMP 発現) を抑制し、かつコラーゲンの蓄積が減少した。Myofibroblast が線維化を促進する一方で MSC が線維化を抑制するメカニズムは不明であるが、一部は MSC の抗炎症作用によると思われる。

一方、変形性関節症や関節リウマチでの滑膜細胞は病的に変化した MSC である。滑膜 MSC は、骨膜 MSC と類似しているかもしれないが、MMP を高レベルに産生して炎症を仲介する点で正常の骨膜 MSC とは異なる。また滑膜 MSC はヒアルロン代謝関連遺伝子の発現プロファイルが骨髄 MSC とは大きく異なっていた。

変形性関節症や関節リウマチではコラーゲンの分解が亢進する点で線維症とは違うが正常なコラーゲンとは異なる型のコラーゲンや正常とは組成の異なるマトリックスが形成される点では線維症に似ている。線維症でも関節症でも MSC の関与が疑われる。この問題を追求するためには、癒痕部（線維化組織）および関節症の fibroblast と正常 fibroblast, および MSC の比較が必要で、そのような研究から線維症、癒痕や関節症の治療戦略がうまれると期待できる。

3. 15 MAPC と MSC の関係

Multi-potent adult progenitor cells (MAPC) は Velfaillie らにより骨髄など多くの組織から単離された幹細胞であり、中胚葉、外胚葉、内胚葉系の多数の組織へと分化できるきわめて分化能力が高くかつ増殖能の高い細胞である。MSC と異なり、10%血清存在下では維持できず、2%血清と成長因子の組み合わせによって増殖する。また MSC よりも分化レパートリーが広く、たとえば造血系の幹細胞としての機能もある。低酸素に耐性で、ES 細胞なみの能力をもつにもかかわらず奇形種をつくらないことで注目されている。この細胞が生体内で存在するか人工産物かは不明であるが、MAPC のデータの一部に対して否定的なコメントが最近新聞発表された。

3. 16 MSC とペリサイト (血管周囲細胞), 筋上皮細胞との関連

MSC は血管周囲に存在するのではないかという議論があり、かつペリサイトの少なくとも一部は mesoangioblast stem cell であり、筋肉再生能がある²²⁾。ペリサイトは、比較的未分化で、線維芽細胞やマクロファージ、または平滑筋細胞になることもある。しかしペリサイト由来細胞 (mesoangioblast stem cell) の遺伝子発現プロファイルは、MSC とは大きく異なっていた²²⁾。一方、筋上皮細胞は、上皮系であるにも関わらず収縮機能をもち (唾液分泌などとも関係する)、かつ骨、軟骨への多分化能があると示唆されている。筋サテライト細胞にも、骨軟骨分化能がある。これらは、いずれも MSC との類似性が注目されている。

3. 17 MSC の免疫抑制作用および炎症抑制作用

MSC は各種の免疫担当細胞 (T cells, 抗原提示細胞, NK cells, B cells) の活性を抑制する。MSC は Toll-like receptors を発現して、それらのリガンドへ応答する。さらに IFN-gamma 刺激により抗原提示細胞として働く¹⁰⁾。

MSC は抗原刺激などによるリンパ球の増殖に対して、リンパ球のサブセット毎に異なる影響を及ぼすが、全体的には増殖やサイトカイン産生を抑制する¹⁰⁾。しかし MSC が体内でも生理的な免疫制御作用をもった細胞として機能しているかどうかは不明である。

MSC は prostaglandins, IL-10, indoleamine2,3-dioxygenase などの抗炎症物質を産生する²⁴⁾。

また MSC 移植部位で、炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6) の産生を抑制する。MSC の炎症抑制作用は組織再生を促進するのに有利である。

3.18 MSC 研究への期待

MSC の研究は、研究のための研究で終わってはならない。再生医療への応用のみならず、間葉系組織の発生、成長、修復、腫瘍化、炎症、老化において MSC は生理的 / 病理的役割を果たしているに違いないので、新しい医学分野への突破口となるような研究が必要である。つまり MSC の基礎研究は、医学や生物学において予想以上の広がりをもたらす可能性がある。さらに MSC の臨床研究は、当初多くの困難があったとしても、難治病に治療オプションを与えるという大きな意義があるので、多施設での研究と協力が必要である。また MSC 移植によって、改善が期待できるのは、現在検討されている疾患以外にも多くの病気があると考えられる。したがって今日までの MSC の基礎および臨床研究で得た成果はまだ氷山の一角にすぎず、今後大きな発展が望めるのではないだろうか。

文 献

- 1) Al-Khaldi *et al.*, *Gene Ther*, 10, 621 (2003)
- 2) G. Wang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 186 (2005)
- 3) A. Giordano *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 211 (2007)
- 4) T. Morishita *et al.*, *Artif. Organs*, 30, 115 (2006)
- 5) S. Wakitani *et al.*, *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 199 (2002)
- 6) Y. Yamada *et al.*, *Tissue Eng.*, 10, 955 (2004)
- 7) H. Kawaguchi *et al.*, *J. Periodont.*, 75, 1281 (2004)
- 8) A. Bartholomew *et al.*, *Exp. Hematol*, 30, 42 (2002)
- 9) E. M. Horwitz *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 8932 (2002)
- 10) J. Stagg, *Tissue Antigens*, 69, 1 (2006)
- 11) H. M. Lazarus *et al.*, *Biol Blood Marrow Transplant*, 11, 389 (2005)
- 12) N. Riggi *et al.*, *Cancer Res.*, 65, 11459 (2005)
- 13) A. J. Friedenstein *et al.*, *Exp. Hematol*, 4, 267 (1976)
- 14) M. Mastrogiacomo *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 204, 594 (2005)
- 15) L. de Silva Meirelles *et al.*, *J. Cell Sci.*, 119, 2204 (2006)
- 16) R. dela Fuente, *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 297, 313 (2004)
- 17) E. Mansilla *et al.*, *Transplantation Proc.*, 38, 967 (2006)

- 18) Y. Ozaki *et al.*, *Stem Cell Dev.*, **16**, 119 (2007)
- 19) A. Igarashi *et al.*, *Tissue Eng.* in press (2007)
- 20) S. Terai *et al.*, *J. HBP Surg*, **12**, 203 (2005)
- 21) Y. N. Kallis *et al.*, *Gut*, Online (2006)
- 22) Y. Sato *et al.*, *Blood*, **106**, 756 (2005)
- 23) M. Sampaolesi *et al.*, *Nature*, **444**, 57 (2006)
- 24) J. M. Ryan *et al.*, *J. Inflamm (Lond)*, **26**, 2 (2005)

ヒト間葉系幹細胞

～培養と品質管理のストラテジー

加藤幸夫, 五十嵐晃, 金輪真佐美

最近, ヒト骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSC) 株が入手可能となった (各種 MSC 株の入手のためのアドレスを稿末に示した)。われわれも理研の細胞バンクに多数のヒト骨髄 MSC 株を寄託している。ここではヒト MSC 株の活用方法のほかに, その規格, 均質性 (純度), 遺伝子マーカーによる品質検査などについて述べる。

はじめに

～ヒト MSC 株の有用性

軟骨細胞や骨芽細胞は, 軟骨/骨の再生に有用であるものの, これらを採用するには健常部の損傷や疼痛を伴う。一方, MSC は骨髄から少ない苦痛で採取できる。したがって変形性関節症, 骨欠損, 骨形成不全に対して, MSC の細胞治療が行われている。さらに MSC 移植は, 歯周病¹⁾, 心筋梗塞, 難治性皮膚潰瘍に対しても有効であった。

また骨髄 MSC は造血細胞の増殖と分化を支持しており, 骨髄, 臍帯血, 造血幹細胞の移植後の *in vivo* での造血促進作用や造血幹細胞の増殖を促進する作用が報告されている²⁾。

また MSC は異種リンパ球混合反応でのリンパ球の活性化を抑制するなど, 同種アロ細胞*1への拒絶反応つまり GVHD (graft-vs-host disease) を強く抑制した。したがってアロの皮膚移植後の壊死と脱落を MSC が抑制した。臨床試験でも MSC は同種アロ細胞*1への拒絶反応を抑制した³⁾。この免疫修飾能を利用して他家 MSC による再生医療が米国のオサイリス社で開発が進められている。心筋梗塞や脳梗塞では, 自家 MSC の増幅が間に合わないので, 他家 MSC の利用が考えられている。他家 MSC の認可はハードルが高いものの, 生命にかかわる疾患に対して認可される可能性がある。

興味深いことに MSC は創傷部位に選択的に遊

走するので, ドラッグデリバリー担体としても注目されている。例えばインターフェロン発現ベクターや BMP 発現ベクターを組み込んだ MSC を移植する治療が模索されている。

さらにヒト骨芽細胞, 軟骨細胞, 筋肉細胞, 肝臓細胞は入手が困難であるが, ヒト MSC はこれらの細胞へと *in vitro* で分化できるので, 創薬のスクリーニング系での活用が考えられる。

当然ながら, ヒト MSC は幹細胞の基礎研究で有用である。ヒト MSC には個体差や年齢差があるので, 基礎/臨床研究のために, 多様な MSC 株をバンクする意義は大きい。

1. MSC 株の安定的増殖

MSC の大量増幅は困難であったが, われわれの超増幅法でそれが可能になった。すなわち線維芽細胞増殖因子 2 (fibroblast growth factor-2 : FGF-2) あるいは基底膜細胞外基質でコートした培養皿を用いることで, 多分化能を維持したまま MSC を 500 億倍に増やすことができるようになった。またウサギの関節全層欠損モデルにおいて, 従来法で調製した MSC ではなく, 超増幅した MSC を移植した場合のみが対照に比較して軟骨の修復が有意に亢進した⁴⁾。しかもヒト血清でも FGF-2 を添加すれば MSC の培養が可能となった。つまり自家 MSC を自家血清で培養できるようになった。なお自家血清を安全に閉鎖系で調製するための血液パックは, JMS 社, ツーセ

*1 : アロ細胞
他家移植に用いる細胞。移植の際, 自己の組織, 細胞を自己の他の場所に移し変える場合は自家移植と呼ばれ, ドナーとレシピエントは同一であるが, これに対して自己以外の組織, 細胞を他人に移し変える場合は他家移植と呼ばれ, ドナーとレシピエントは異なる。他家移植には人間の組織, 細胞を用いる同種移植 (allograft transplantation) と人間以外の組織, 細胞を用いる異種移植 (xenograft transplantation) に分けられる。

ル社、広島大学の共同研究で開発されている。

ヒト MSC の増殖には、血清のドナーおよび細胞ドナーの個体差と年齢差の影響がでるが、FGF-2 を使用することでそれらを減少できる。ウシ胎児血清には FGF などの成長因子が高濃度に存在するが、ヒトやウマ血清では濃度が低く個体差が大きい。したがって FGF-2 の MSC 増殖促進作用は、ウシ胎児血清含有培地で見られるよりも、ヒトやウマ血清の場合でより明確に現れる。

2. ドナーの年齢の影響

ドナーの年齢が、MSC の骨、脂肪、軟骨分化能に影響するかを検討することは、再生医療で重要である。MSC の増殖や骨分化に対する年齢の影響について多くの研究があるが、一致した結論は得られていない。われわれの経験では、ドナーの加齢は腸骨由来 MSC の増殖能を低下させるようである。つまり同様な培養条件で若い MSC はより速い増殖を示した。また 50 歳を過ぎると顎骨 MSC の分離培養の成功率が低下した⁵⁾。

一方、大串らは、高齢者からの腸骨 MSC が骨再建のための移植用細胞として十分有効であると報告している。加齢や骨粗鬆症が骨髄 MSC の数と増殖能に影響しないという報告もある。われわれの研究では、加齢は腸骨 MSC の骨分化および脂肪分化能にほとんど影響しなかったが、軟骨分化能を低下させた。加齢の影響は骨と軟骨分化能で異なるかもしれない。

3. MSC の採取部位の影響

MSC は、骨髄以外にも、脂肪、滑膜、骨膜、臍帯血などからも分離できる。しかし採取部位が MSC の増殖、分化能にどのように影響するのかについては研究が少ない。一般には、脂肪由来の MSC は脂肪になりやすいものの骨、軟骨分化能が低く、滑膜由来の MSC は骨髄 MSC と類似しているが軟骨になりやすいといわれている⁶⁾。

おなじ骨髄でも、腸骨、顎骨、大腿骨と脛骨では MSC の性質は異なるかもしれない。実際、歯槽骨/顎骨 MSC の骨分化能は腸骨 MSC とほ

ぼ同等であるものの、脂肪、軟骨分化能が腸骨 MSC よりも明らかに低かった⁵⁾。一方、大腿骨と脛骨の MSC は腸骨 MSC と同等の骨、軟骨、脂肪分化能を示した。顎骨は外胚葉の神経冠細胞由来であるのに対して、腸骨、大腿骨と脛骨は中胚葉の体節由来である。この発生の由来の違いが顎骨 MSC の異なる性質に関係しているかもしれない。以上の知見は MSC の採取部位が、再生医療に影響しうる要因の 1 つであることを示唆している。

4. 移植細胞が目的の細胞であることの証明

移植細胞が目的の細胞であることを示すためには、MSC の規格化が必要である。われわれは、MSC が以下の図 1 のような遺伝子発現パターンを示すことを見出した。このパターンは線維芽細胞と異なり (図 1)、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞とも異なっていた。すなわち遺伝子発現パターンによって MSC を規格化できることが判明した。

5. MSC の純度

われわれは歯周病患者への MSC 移植の前に、線維芽細胞が混入していないことを 2 種類の方法で検査している。1 つは MSC マーカー遺伝子を利用する方法である⁷⁾。もう 1 つは活性型ビタミン D に対するオステオカルシン応答を利用する方法である。

しかしより正確に MSC の純度を検定するには、目的の細胞集団から数十個の細胞を無差別によりだしてクローニングし、すべてのクローンがいずれも母集団と同一の遺伝子発現パターンを示すことを証明する必要がある。われわれはこの方法で、超増幅した MSC が均質な細胞集団であることを明らかにした。すなわち骨髄液から分離した培養皿接着細胞は、老化の程度に関して不均質であったが、FGF-2 存在下では若い MSC のみが選択的に増殖して増えるため 1 ~ 2 回の継代後は均質な細胞集団となった。また

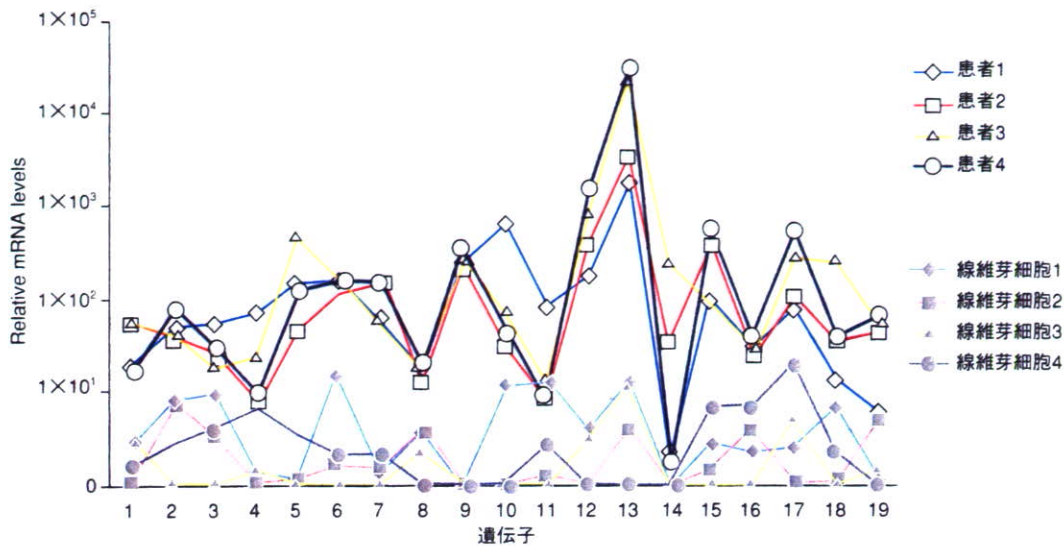


図1 ●ヒトMSCの規格化

4名の遺伝子発現レベルはQ-PCR法で測定したヒトMSC株の遺伝子発現プロファイルをヒト線維芽細胞と比較した

従来法では、MSCが次第に多分化能を失い不均質になるのに対して、FGF-2存在下ではすべての細胞が多分化能を維持するので継代後は均質な細胞集団となった(図2)。

6. MSCの病的変化

正常ドナー、歯周病ドナー、バージャー病ドナー由来のMSCの分化能力を比較したが、例数は少ないものの、これらの病気はMSCの多分化能に大きな影響を及ぼさなかった。一方、脂肪由来のMSCを1年間近く培養すると癌化したという報告が1つあるので⁸⁾、長期間培養したMSCについては癌化の有無を判定する必要がある。

7. MSC治療の安全性

MSCを移植するには、安全性を保証する必要がある。そのための検査の項目を表に列挙した。なおMSCと倫理⁹⁾、MSCの「stemness」¹⁰⁾およびMSCの基本的性質¹¹⁾については、最近のわれわれの総説を参照していただきたい。

おわりに

将来、ヒトMSCによる再生医療が自家および

他家細胞を利用して行われるようになる。他家MSCは心筋梗塞、脳梗塞などの急性かつ生死にかかわる病気や造血支持のためおよび遺伝性骨不全¹²⁾や代謝病¹³⁾へ適応され、自家MSCは、慢性だがQOLを著しく障害する歯周病、骨疾患、関節症などの治療に用いられる。皮膚の再生医療でも自家と他家細胞移植の両者があり長い歴史もあるが、ビジネスとしての拡大は遅かった。これは細胞治療そのものが悪いのではなく、皮膚再生では異種動物細胞を培養のフィーダー細胞^{*2}として用いる点や熱傷の患者数(<10,000人)が少ないことが障害となっていた。その点MSCの培養には異種動物細胞は不必要であるし、MSC治療の対象疾患と患者数は非常に多い(>4,000万人)。したがって、MSCによる再生医療

表●MSCの検査項目

① 細胞の感染	細菌、真菌、ウイルスの否定
② 血清の感染	プリオン、ウイルスなどの否定
③ 細胞の同定	目的の細胞であること MSC規格に一致すること 線維芽細胞否定試験
④ 純度	クローン分析など
⑤ 分化能	骨、軟骨、脂肪分化能など
⑥ 病的変化	癌化/炎症の否定

*2:フィーダー細胞
増殖や分化を起こさせようとする目的の細胞の培養条件を整えるために用いる。補助役を果たす他の細胞種を示す言葉。通常フィーダー細胞は増殖しないようにあらかじめガンマ線照射や抗生物質によって処理しておく。ES細胞の場合は、マウス胎仔由来の線維芽細胞が用いられ、この細胞の未知の液性因子などがES細胞培養に必要なと考えられている。実験の目的や細胞によってさまざまな細胞種がフィーダー細胞として用いられる。

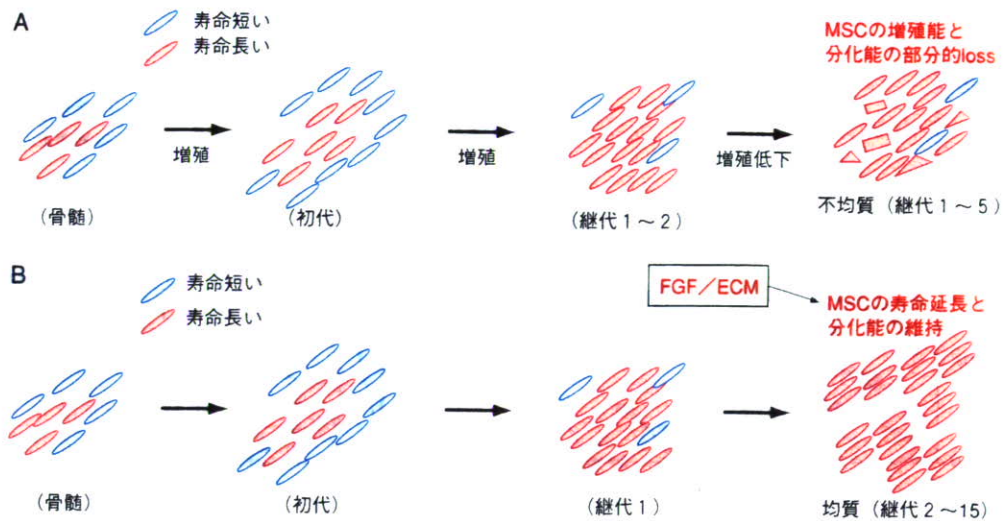


図2 ●超増幅法による均質 MSC 集団の大量培養 (従来法と超増幅法の比較)

A) 試験管内での MSC の増殖 (従来法)。MSC 細胞群の増殖寿命は短い。また、MSC は細胞ごとにさまざまな速度で、潜在的な分化能/増殖能を失うので継代しても不均質な細胞集団のままである。B) 超増幅法。MSC 以外の不均質な細胞群の増殖寿命が短いため、継代培養の 1~2 代以後には MSC だけのほぼ均質な細胞集団となる。しかも MSC の分化能/増殖能は細胞分裂中も維持されるので最後まで、均質な細胞集団として増幅される。

は、いったん認可が成立すれば大きく広がるものと予想され、それに向けて基礎/臨床研究で証拠を積み重ねることが今日求められている。

文献

- 1) Kawaguchi, H. et al. : J. Periodontol, 75 : 1281-1287, 2005
- 2) Robinson, S. N. et al. : Bone Marrow Transplant, 37 : 359-366, 2006
- 3) Blanc, L. et al. : Lancet, 363 : 1439-1441, 2004
- 4) Kayakabe, M. et al. : Cytotherapy, 8 : in press
- 5) Matsubara, T. et al. : J. Bone Mineral Res, 20 : 399-409, 2005
- 6) Sakaguchi, Y. et al. : Arthritis Rheum, 52 : 2521-2529, 2005
- 7) Ishii, M. et al. : BBRC, 332 : 297-303, 2005 (トップ10ダウンロード優秀論文)
- 8) Rubio, D. et al. : Cancer Res, 65 : 3035-3039, 2005
- 9) 加藤幸夫 & 辻紘一郎 : デンタルダイヤモンド, 31 : 70-73, 2006

- 10) 加藤幸夫 ほか : 腎と骨代謝, 印刷中
- 11) 加藤幸夫 ほか : 関節外科, 25 : 63-69, 2006
- 12) Horwitz, E. M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 8932-8935, 2002
- 13) Koc, O. N. et al. : Bone Marrow Transplant, 30 : 215-222, 2002

■ MSC 株などの入手のためのアドレス ■

- ヒト骨髓由来 MSC
理研バイオリソースセンター ;
<http://www.brc.riken.jp/index.shtml>
http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/search_hms.cgi
- ラット骨髓由来 MSC
大日本住友製薬株式会社 ; <http://labopro.ds-pharma.co.jp/hm/search/category/category2.html>
- ヒト脂肪由来 MSC
Zen-bio, Inc ; <http://www.zen-bio.com/>
- ヒト骨髓由来 MSC
Cell Applications, Inc ; <http://www.cellapplications.com/HMSC.htm#top>



加藤幸夫 (Yukio Kato)

広島大学大学院歯薬学総合研究科教授、株式会社ツーセル取締役。
1977年大阪大学大学院歯学研究科修了後、カリフォルニア大学サンフランシスコ校とロックフェラー大学へ留学した(1982~1984年)。1991年より現職。
現在、幹細胞生物学と時間生物学に興味をもっている。

Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Implantation Induces Angiogenesis and Bone Regeneration in a Patient With Compartment Syndrome

Takashi Umemura, MD; Kenji Nishioka, MD; Akira Igarashi, PhD*;
Yukio Kato, PhD*; Mitsuo Ochi, MD†; Kazuaki Chayama, MD**;
Masao Yoshizumi, MD; Yukihito Higashi, MD

A 28-year-old man developed compartment syndrome in the right lower leg after fracture of the tibia and fibula. Despite fasciotomy, many arteries collapsed and union of the tibial and fibula fractures did not occur. Autologous bone marrow mononuclear cell (BMMNC) implantation for therapeutic angiogenesis and subsequent bone regeneration was performed and 4 weeks later, angiography showed a marked increase in collateral vessels surrounding the tibial fracture, and union was completed 6 months later. BMMNC implantation therapy might provide therapeutic angiogenesis and osteogenesis in patients with compartment syndrome. (*Circ J* 2006; 70: 1362–1364)

Key Words: Angiogenesis; Bone marrow mononuclear cells; Bone regeneration; Compartment syndrome

Angiogenesis plays an important role in normal bone development and adult bone healing. Experimental studies have shown that angiogenesis induced by adjunctive modalities, such as angiogenic factors, cytokines, and stem or progenitor cells, contributes to regeneration of bone and repair of fractures.^{1–3} Recently, it has been shown that autologous bone marrow mononuclear cell (BMMNC) implantation increases collateral vessel formation in ischemic limb models and in patients with limb ischemia.^{4–6} We present a case of intractable tibia fracture followed by compartment syndrome. In this case, autologous BMMNC implantation promoted angiogenesis, leading to bone regeneration.

Case Report

In January, 2004, a 28-year-old man was involved in a traffic accident. On arrival at the hospital, his right tibia and fibula were fractured and acute compartment syndrome had developed rapidly. Fasciotomy was immediately performed to decompress all compartments of his right leg to prevent ischemic damage to muscles, nerves, blood vessels, and bones. Unfortunately, it was not sufficient and many of the arteries collapsed (Fig 1), causing permanent tissue damage. His right toes became gangrenous, requiring partial foot amputation and split-thickness skin grafts were harvested from his left outer thigh to cover the wound. Although an external fixation device was used to stabilize and align the fractured bones, the tibia did not heal and he could not

walk on his foot 6 months later (Fig 2A). Angiography showed severe arterial injury and poor collateral vessel formation in the right lower leg (Fig 3A).

There was no option for conventional therapy, and autologous BMMNC implantation for therapeutic angiogenesis and subsequent bone regeneration was therefore performed. Under general anaesthesia, 700 ml of bone marrow was aspirated from the ileum and collected into plastic bags containing heparin. The BMMNC were immediately sorted using a CS3000-plus blood-cell separator (Baxter, Deerfield, USA) and concentrated to a final volume of approximately 50 ml containing 1.1×10^9 BMMNC. The cells were then



Fig 1. Angiography and radiography show many collapsed arteries and the decreased blood supply below the fractured tibia and fibula, as well as the severe swelling of the gastrocnemius on arrival at hospital.

(Received April 24, 2006; revised manuscript received July 14, 2006; accepted August 2, 2006)

Departments of Cardiovascular Physiology and Medicine, *Dental and Medical Biochemistry, **Medicine and Molecular Science and †Orthopaedic Surgery, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima, Japan

Mailing address: Yukihito Higashi, MD, Department of Cardiovascular Physiology and Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan. E-mail: yhigashi@hiroshima-u.ac.jp

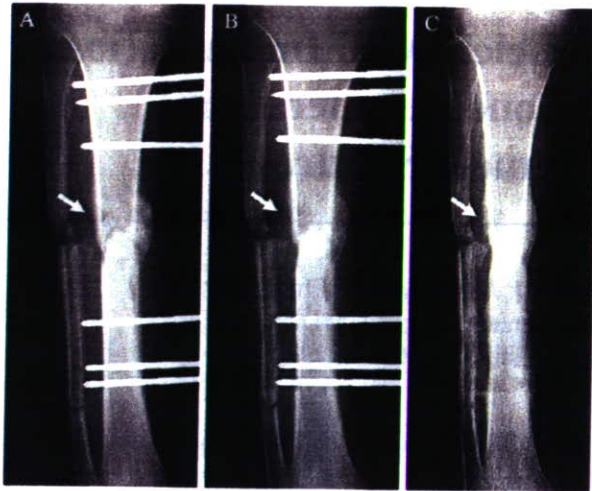


Fig 2. Radiographs of the fractured bones before (Panel A), at 1 month after (Panel B), and 6 months after (Panel C) autologous bone marrow mononuclear cell implantation.

implanted into the gastrocnemius muscle around the fractured bone as previously described.^{5,6} Four weeks later, there was marked formation of collateral vessels around the tibial fracture (Fig 3B) and a slight increase in the external callus (Fig 2B). Thereafter, union of the fracture gradually proceeded, and remodeling could be seen. The tibial fracture healed completely and the external fixation device was removed 6 months later (Fig 2C). Furthermore, BMMNC transplantation accelerated wound healing and the open wound on his right foot was completely repaired by partial plastic surgery.

The therapy was approved by the Ethics Committee of the Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences and the patient gave written informed consent.

Discussion

Fracture of a long bone associated with crushing of structural muscles can often trigger acute compartment

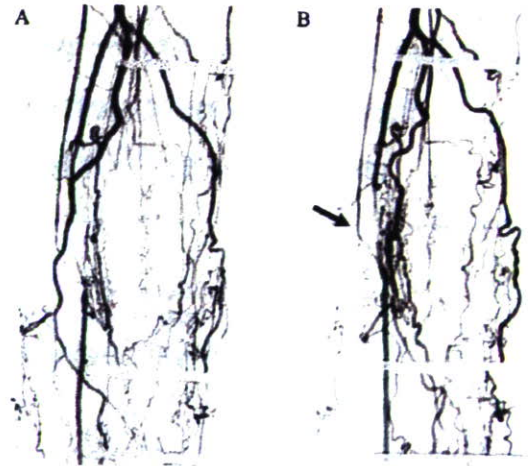


Fig 3. Angiographs of the artery in the injured leg before (Panel A) and at 1 month after (Panel B) autologous bone marrow mononuclear cell implantation.

syndrome. Although fasciotomy is a useful treatment, delay or insufficient treatment leads to irreversible injury to the muscles, nerves, blood vessels, and bones. There is no option for conventional therapy in cases of poor blood supply in an injured leg. Restoration of bioactivity in the fractured site is thought to be essential for the treatment of a non-union bone fracture. Recently, the effects of various modalities, such as angiogenic factors, cytokines, and stem or progenitor cells, on osteogenesis in animal models have been investigated.¹⁻³

In the present case, despite immediate fasciotomy, collateral vessel formation remained poor and bone union was impaired in the injured leg. At 6 months after onset, bioactivity of the fractured site was almost lost, and there was little possibility of union of the fracture. Therapeutic angiogenesis by BMMNC implantation has recently been investigated in experimental ischemic limb models and in patients with severe peripheral arterial disease.⁴⁻⁶ It improves limb ischemic symptoms according to angiography in

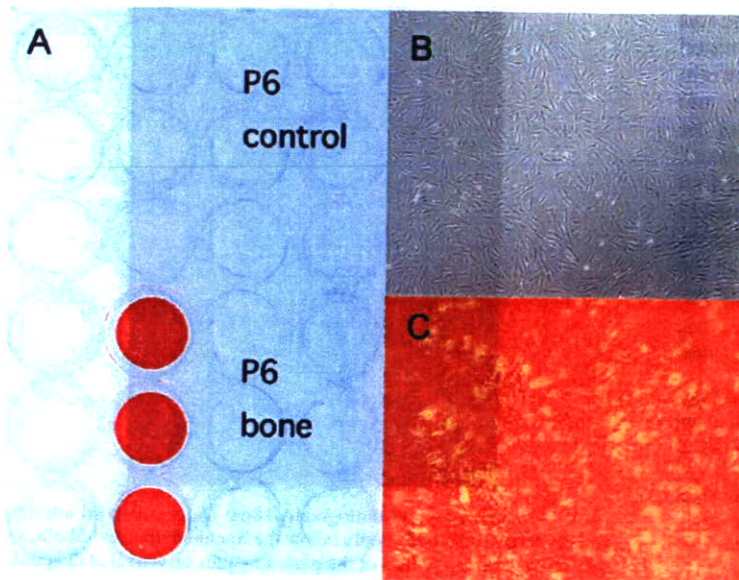


Fig 4. In vitro differentiation of attached cells derived from bone marrow mononuclear cells (BMMNC) into osteocytes. (A) Alizarin red staining after osteogenic differentiation in osteogenic induction medium or control medium. (B) Attached cells derived from BMMNC before osteogenic differentiation. (C) Attached cells after osteogenic differentiation are stained red and form mineralized nodules.

patients with limb ischemia.^{5,6} In addition, the therapy is safe and feasible.^{5,6} It is well known that bone fracture healing requires a blood supply, so BMMNC implantation might be useful not only for revascularization, but also for subsequent bone regeneration. Indeed, in the present study clinical and functional healing of bone fracture was achieved after BMMNC implantation.

Some possible mechanisms by which BMMNC implantation induces angiogenesis and bone regeneration are postulated. BMMNC include endothelial progenitor cells and other cell populations, including osteoblasts. We did the following experiment to confirm that the BMMNC differentiated into osteocytes in the present patient. The BMC, including erythrocytes, were seeded at a density of 1×10^6 cells per 35-mm tissue culture dish (Corning, Nagog Park Acton, MA, USA) and maintained in 10 ml Dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT, USA), 100 U/ml penicillin G (Sigma), and 100 μ g/ml streptomycin (Sigma) at 37°C in a 5% CO₂ incubator. After 4 days in culture, non-adherent cells were removed and fresh medium was added. Attached cells were fed with fresh medium every 3 days. Passages were performed when the cells were approaching confluence.⁷ Osteogenic conversion of these cells from the 6th passage culture was identified as previously described.⁸ For osteogenic differentiation, cells were seeded at 4×10^4 cells/16-mm well (2.3×10^4 cells/cm²) and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 10 mmol/L glycerophosphate (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan), 100 nmol/L dexamethasone (Sigma), and 50 μ g/ml ascorbic acid-2-phosphate (Sigma, osteogenic induction medium). Cultures maintained in the osteogenic induction medium or in the control medium (DMEM supplemented with 10% FBS) were stained with alizarin red on day 21. Mineralized matrix (alizarin red staining) was observed in the osteogenic induction medium but not in the control medium (Fig 4). After BMMNC implantation, endothelial progenitor cells and osteoblasts will differentiate to mature endothelial cells and bone. In addition, the implanted cells might release several angiogenic factors and cytokines, such as fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-1, leading to an increase in blood supply and bioactivity in the process of bone regeneration.^{9,10} Interestingly, these cytokines promote bone healing by activation of osteogenesis, resulting in union of the fracture. We speculate that the process of bone healing in this case was mainly by bone regeneration after angiogenesis. However, we cannot rule out the possibility that angiogenesis and bone regeneration occurred at

the same time after BMMNC implantation.

A non-union bone fracture is defined as one that has not healed after a certain period of time. If non-union is still evident at 6 months post-injury, the bone fracture will remain unhealed. In the present case because the tibial fracture had not healed at 6 months after onset, it is unlikely that the course of bone healing was a natural course. We believe that the union of the bone fracture was largely because of the BMMNC implantation therapy.

In conclusion, it is obvious that increased blood flow helped maintain the structural and functional integrity of peripheral tissue and facilitated bone regeneration in this case. Angiogenesis in cartilage might contribute to bone repair, as well as the increase in blood flow. BMMNC implantation therapy might be a novel treatment for patients with compartment syndrome.

References

1. van den Dolder J, Farber E, Spauwen PH, Jansen JA. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2003; **24**: 1745–1750.
2. Kawaguchi H, Nakamura K, Tabata Y, Ikada Y, Aoyama I, Anzai J, et al. Acceleration of fracture healing in non-human primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 875–880.
3. Hisatome T, Yasunaga Y, Yanada S, Tabata Y, Ikada Y, Ochi M. Neovascularization and bone regeneration by implantation of autologous bone marrow mononuclear cells. *Biomaterials* 2005; **26**: 4550–4556.
4. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001; **103**: 897–895.
5. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al; Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 2002; **360**: 427–435.
6. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 2004; **109**: 1215–1218.
7. Tsutsumi S, Shimizu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **288**: 413–419.
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas S, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143–147.
9. Kinnard T, Stabile E, Bumet MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; **94**: 678–685.
10. Globus RK, Plouet P, Gospodarowicz D. Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology* 1989; **124**: 1539–1547.



Effects of overexpression of basic helix–loop–helix transcription factor *Dec1* on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells

Tomoyuki Iwata^{a,b}, Takeshi Kawamoto^{a,*}, Eri Sasabe^a, Kazuko Miyazaki^a,
Katsumi Fujimoto^a, Mitsuhide Noshiro^a, Hidemi Kurihara^b, Yukio Kato^a

^aDepartment of Dental and Medical Biochemistry, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Hiroshima 734-8553, Japan

^bDepartment of Periodontal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Hiroshima 734-8553, Japan

Received 14 July 2005; received in revised form 29 November 2005; accepted 17 December 2005

Abstract

We recently reported that forced expression of basic helix–loop–helix transcription factor *Dec1* accelerated chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC) in pellet cultures (Shen, M., Yoshida, E., Yan, W., Kawamoto, T., Suardita, K., Koyano, Y., Fujimoto, K., Noshiro, M., Kato, Y., 2002. Basic helix–loop–helix protein *DEC1* promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages. *J. Biol. Chem.* 277, 50112–50120). Since MSC have multilineage differentiation potential, we investigated the roles of *Dec1* in osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow-derived MSC. After osteogenic induction of MSC in medium containing dexamethasone, β -glycerophosphate, and ascorbic acid, *Dec1* expression gradually increased from day 5 to day 14, while expression levels of *Dec1* mRNA markedly decreased on days 3 and 7 after adipogenic induction. Infection with adenovirus expressing *Dec1* raised mRNA levels of several bone characteristic molecules such as osteopontin, PTH receptor, and alkaline phosphatase, even in the absence of the osteogenic induction medium, although it had little effect on *Runx2* expression or calcification. In the osteogenic induction medium, *Dec1* overexpression enhanced the expression of osteopontin and alkaline phosphatase and induced matrix calcification. Knockdown of *Dec1* with siRNA suppressed the expression of osteoblastic phenotype by the induced MSC. Using MSC cultures, we also confirmed that forced expression of *Dec1* suppressed adipogenic differentiation. These findings suggest that *Dec1* modulates osteogenic differentiation of MSC by inducing the expression of several, but not all, bone-related genes.

© 2006 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: *Dec1*; *Stra13*; *Bhlhb2*; *DEC2*; Mesenchymal stem cell; Osteogenesis; Adipogenesis

*Corresponding author. Tel.: +81 82 257 5629; fax: +81 82 257 5629.
E-mail address: tkawamo@hiroshima-u.ac.jp (T. Kawamoto).

Introduction

Basic helix–loop–helix transcription factor *Dec1* (*Stra13/BHLHB2*), which was previously identified as a differentially expressed transcript in chondrocytes (Shen et al., 1997), can bind to the CACGTG E-boxes and repress transcription from the target genes (Hama-guchi et al., 2004; Honma et al., 2002; Kawamoto et al., 2004; Li et al., 2003; Sato et al., 2004; St-Pierre et al., 2002; Zawel et al., 2002). Overexpression of *Dec1* enhanced chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells and rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) (Shen et al., 2002), but inhibited adipogenic differentiation of mouse 3T3-L1 cells (Yun et al., 2002); stable expression of *Dec2* in mouse C2C12 cells inhibited myogenic differentiation by interacting with *MyoD* (Azmi et al., 2004). *Dec1* also plays a part in circadian rhythm regulation by repressing *CLOCK/BMAL1*-induced promoters (Butler et al., 2004; Hama-guchi et al., 2004; Honma et al., 2002; Kawamoto et al., 2004; Li et al., 2004; Noshiro et al., 2004; Sato et al., 2004). During endochondral bone development in mouse tibia, *Dec1* mRNA expression was observed from E15.5 in post-mitotic hypertrophic chondrocytes, co-localizing with collagen X mRNA (Maclean and Kronenberg, 2004). At E15.5–E18.5, *Dec1* was also expressed in the primary spongiosa, where *Dec1* may be involved in primary bone formation.

Since *Dec1* is expressed in various tissues and induced by various growth factors or hypoxia (Boudjelal et al., 1997; Fujimoto et al., 2001; Miyazaki et al., 2002; Rossner et al., 1997; Shen et al., 1997, 2001), it may be involved in the control of differentiation in numerous tissues. Since MSC can give rise to osteoblasts, chondrocytes, myocytes, and adipocytes (Muraglia et al., 2000; Pittenger et al., 1999), these cells may be useful for analysis of lineage determination and the differentiation steps (Matsubara et al., 2004; Pittenger et al., 1999; Tsutsumi et al., 2001). Among various transcription factors involved in osteogenic differentiation, *Runx2* plays a central role in bone formation: In *Runx2* null mice, osteoblast differentiation was arrested in both the endochondral and intramembranous skeleton (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Mundlos et al., 1997; Otto et al., 1997). For adipogenic differentiation, the nuclear hormone receptor *PPAR γ* plays a crucial role in the function of many fat cell-specific genes (Rosen and Spiegelman, 2001). However, numerous other regulatory molecules are likely to be involved in the complex processes of osteogenic and adipogenic differentiation, stage-dependently. To clarify the roles of *Dec1* in differentiation of mesenchymal cells, we examined the effects of *Dec1* overexpression on osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow MSC: Forced expression of *Dec1* up-regulated bone-related gene expression and enhanced calcifica-

tion, and it suppressed adipogenic differentiation of MSC.

Materials and methods

Cell culture and adenovirus infection

Human MSC were purchased from BioWhittaker (Walkersville, MD) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. For osteogenic induction, MSC were plated at a density of 1×10^4 cells/cm² in 16-mm wells coated with type I collagen. For adipogenic induction, MSC were plated at a density of 2×10^4 cells/cm² in 16-mm wells.

Twenty-four hours after seeding the cells, infection of these cells with adenovirus expressing human *Dec1* (ad-*Dec1*) or adenovirus expressing *LacZ* (ad-*LacZ*) was performed at a multiplicity of infection (MOI) of 50 or 100 pfu/cell, as described previously (Shen et al., 2002). Adenovirus carrying the *LacZ* gene was generously supplied by Dr. Kohei Miyazono (The University of Tokyo) (Fujii et al., 1999). Six hours later, the culture medium was replaced with an induction medium suitable for osteogenic or adipogenic differentiation.

Osteogenic induction

Thirty hours after plating, MSC were transferred to the osteogenic induction medium (Os-medium), an α -minimal essential medium (α MEM) supplemented with 10% FBS, 0.1 μ M dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate, and 50 μ M ascorbic acid-2-phosphate (Pittenger et al., 1999). As a control, MSC were incubated in α MEM supplemented with 10% FBS alone (medium-A).

Adipogenic induction

For adipogenic differentiation, MSC were transferred to DMEM supplemented with 10% FBS, 0.1 μ M dexamethasone, 0.2 mM indomethacin, 10 μ g/ml insulin, and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (the adipogenic induction medium) (Pittenger et al., 1999). After 3 days, this medium was replaced with DMEM supplemented with 10% FBS and 10 μ g/ml insulin (the adipogenic maintenance medium), and the cells were cultured for 24 h in the new medium. Then, the induction/maintenance cycle for adipogenic induction was repeated.

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cultured cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and

Table 1. Sequence of TaqMan probes and primers used for quantitative real-time RT-PCR analysis

Dec1
TaqMan probe: 5'-CAAGAGTCCGAAGAACCCCCCAAAAA-3'
Forward primer: 5'-GAAAGGATCGGCGCAATTAA-3'
Reverse primer: 5'-CATCATCCGAAAGCTGCATC-3'
ALPase
TaqMan probe: 5'-CCCATGCTGAGTGACACAGACAAGAA-3'
Forward primer: 5'-CCGTGGCAACTCTATCTTTGG-3'
Reverse primer: 5'-GCCATACAGGATGGCAGTGA-3'
Osteopontin
TaqMan probe: 5'-CCTCCTAGGCATCACCTGTGCCATACC-3'
Forward primer: 5'-ATGAGAATTGCAGTGATTTGCTTTT-3'
Reverse primer: 5'-AGAACTTCCAGAATCAGCCTGTTT-3'
PPARγ
TaqMan probe: 5'-TCAGGGCTGCCAGTTTCGCTCC-3'
Forward primer: 5'-GGTGGCCATCCGCATCT-3'
Reverse primer: 5'-GCTTTTGGCATACTCTGTGATCTC-3'

subjected to real-time quantitative RT-PCR analysis using the ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) with TaqMan probes and primers shown in Table 1. TaqMan probe and primers for PTH receptor and *GAPDH* were obtained from Applied Biosystems. The values for mRNA levels, relative to internal control *GAPDH*, represent the mean \pm SEM for three wells. The experiments were repeated 2–4 times and similar results were obtained each time.

RNA interference

Twenty-four hours after MSC were seeded at a density of 5×10^3 cells/cm² in 12-well plates, the cells were transfected with Dec1 siRNA (DHARMACON, CO) or non-silencing control siRNA (Qiagen, CA) using Trans-IT TKO transfection reagent (Mirus, WI). After 48 h incubation, the culture medium was replaced with Os-medium for osteogenic induction.

ALPase staining

Cells were fixed with 3.5% formaldehyde and stained using ALPase staining kit (Muto pure chemical, Tokyo, Japan). The stained cells were rinsed with deionized water and dried overnight.

Alizarin red and von Kossa staining

Fixed cells were incubated with 1% Alizarin red-S (Sigma, St. Louis, MO) for 1 h at room temperature. Alternatively, fixed cells were exposed to sunlight for 30 min in the presence of 5% silver nitrate, and then

incubated with 5% sodium thiosulfate for 5 min (von Kossa staining). The stained cells were rinsed with deionized water and dried overnight.

Calcium content

After MSC were rinsed with PBS, calcium in the cell cultures was dissolved in 0.1 M HCl at 4 °C overnight. Calcium content of each sample was determined using a Calcium C kit (Wako pure chemical, Osaka, Japan).

Oil red-O staining

MSC fixed with 3.5% formaldehyde were incubated with 0.3% Oil red-O (Sigma) for 1 h at room temperature. The stained cells were rinsed with deionized water and dried overnight. Lipid drop areas stained with Oil red-O were measured using the NIH image program (RSB, NIMH/NIH, Bethesda, MD).

Results

Changes in *Dec1* mRNA levels during osteogenic differentiation of MSC

Osteogenic differentiation of human MSC was induced by Os-medium. After osteogenic induction, *Dec1* mRNA expression began to increase on day 5 and reached a peak on day 14 (Fig. 1A). In these cultures, mRNA levels of ALPase and PTH receptor started to increase on day 2, reaching a peak on day 14 (Fig. 1B and C); osteopontin mRNA level increased on days 14 and 21 (Fig. 1D).

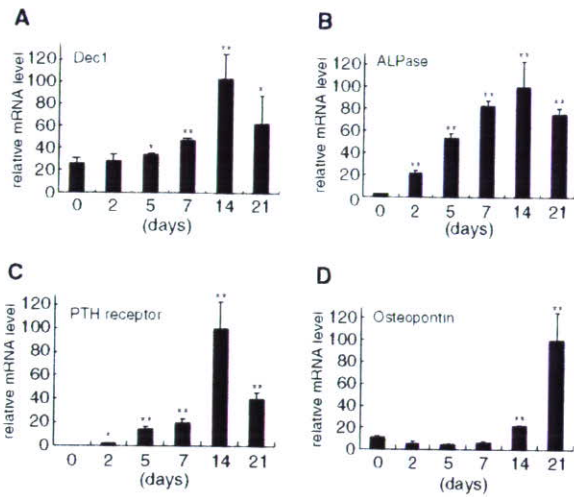


Fig. 1. Changes in mRNA levels of *Dec1*, ALPase, PTH receptor, and osteopontin during osteogenic differentiation of human MSC. Osteogenic differentiation was induced by Os-medium as described in Materials and methods. Total RNA was isolated from the cells on the indicated days after osteogenic induction, and subjected to real-time quantitative RT-PCR analysis. The values represent mRNA levels (mean \pm SEM) for *Dec1* (A), ALPase (B), PTH receptor (C), or osteopontin (D) relative to *GAPDH* mRNA levels. *P*-values were calculated by using the Student's *t*-test (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

Effect of forced expression of *Dec1* and *Dec1* siRNA on osteogenic differentiation of MSC

To test the effect of *Dec1* overexpression in the absence of Os-medium, MSC infected with *Dec1*-expressing adenovirus (ad-*Dec1*) were maintained in medium-A. Forced expression of *Dec1* elevated osteopontin mRNA levels at an MOI 25 or 50 (Fig. 2A) and the increase of osteopontin mRNA levels was significant from day 2 to day 14 compared with infection with LacZ-expressing adenovirus (ad-LacZ) (Fig. 2B). Expression of PTH receptor mRNA was also enhanced from day 5 to day 14, while *Runx2* expression was not significantly changed. In addition, the *Dec1* overexpression raised the activity and mRNA levels of ALPase (Fig. 2C). However, calcification was not induced by *Dec1* overexpression until day 28 (Fig. 2D).

In further studies, the effect of *Dec1* overexpression on bone-related gene expression in MSC cultured in Os-medium was examined. Infection of MSC with ad-*Dec1* up-regulated osteopontin mRNA levels from day 2 to day 14 in the presence of Os-medium (Fig. 3A). The *Dec1* overexpression enhanced the activity and mRNA expression of ALPase (Fig. 3B). The effect of *Dec1* overexpression on mRNA levels of osteopontin was much greater than that of Os-medium on day 7, and *Dec1* overexpression and Os-medium showed a synergistic or additive effect on day 7 or 14 (Fig. 3C).

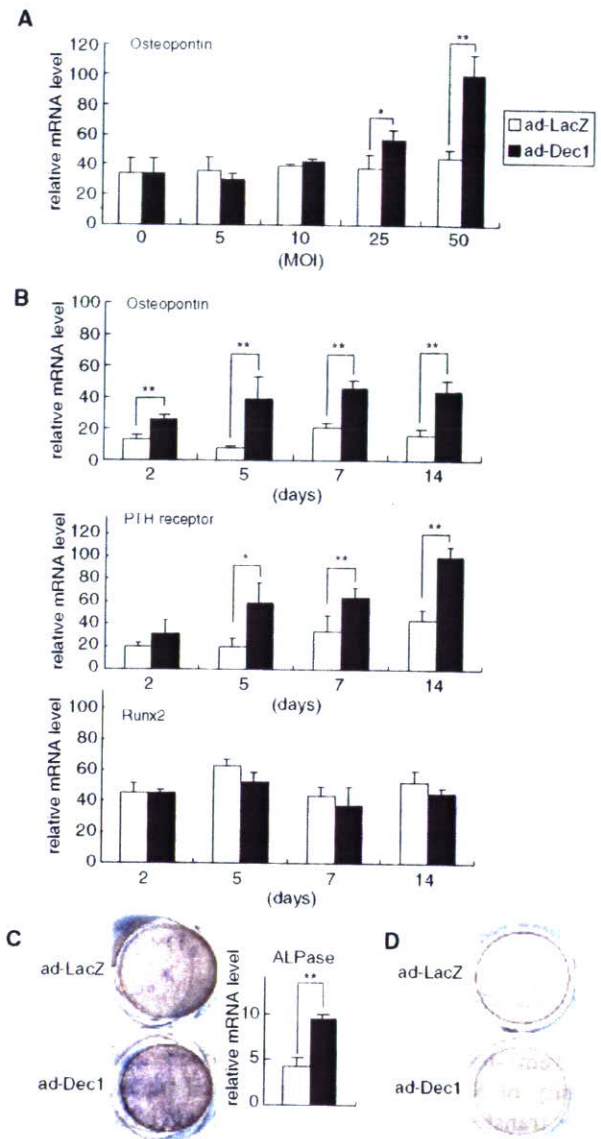


Fig. 2. Effect of *Dec1* overexpression on osteopontin, PTH receptor, and ALPase expression in MSC in medium-A in non-osteogenic status. (A) Six hours after MSC were infected with ad-*Dec1* at an MOI of 0, 5, 10, 25, or 50, the culture medium was replaced with medium-A. Expression levels (mean \pm SEM) of osteopontin mRNA were determined after a 2-day incubation. (B) MSC infected with ad-*Dec1* or ad-LacZ at an MOI of 50 were cultured in medium-A; mRNA levels (mean \pm SEM) for osteopontin, PTH receptor, and *Runx2* were measured on the indicated days. (C) ALPase activity on day 14 was demonstrated by staining the cells with ALPase staining kit. Expression levels of ALPase mRNA (mean \pm SEM) were also determined. (D) Matrix calcification on day 28 was examined using von Kossa staining. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (Student's *t*-test).

Furthermore, *Dec1* overexpression promoted calcification of MSC cultures in Os-medium: The calcium level in the cultures overexpressing *Dec1* on day 25 was 5