

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^{4), 5)}。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

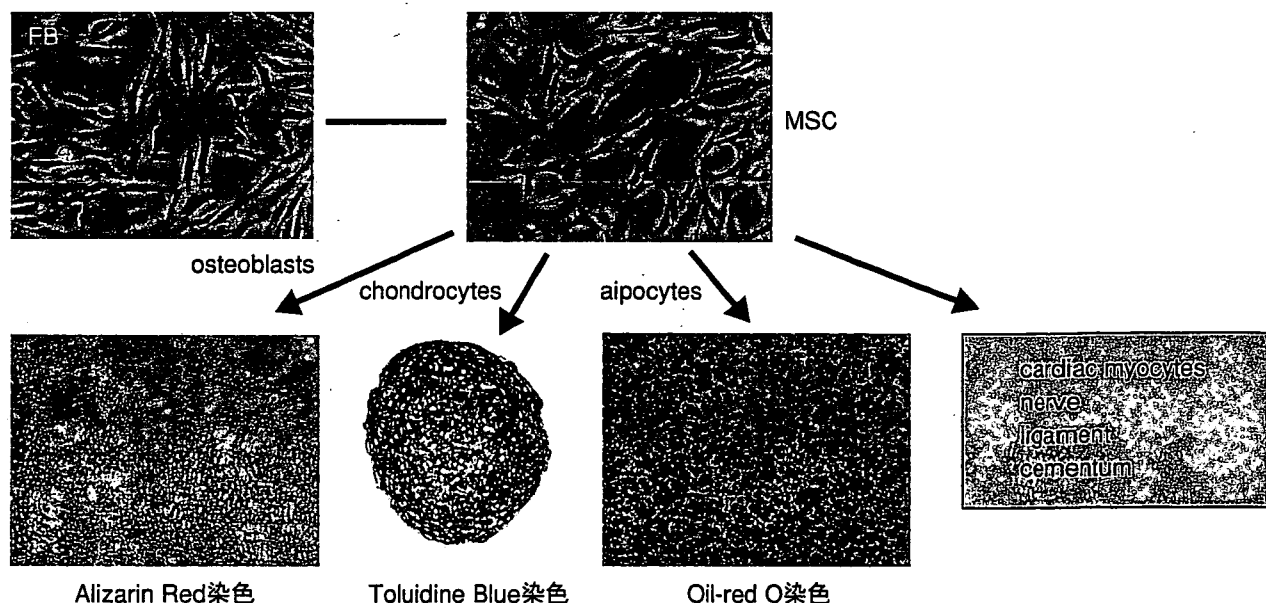
本的考え方」および「指針」において、「同一性の確認試験」や「細胞の純度試験」を求めている。

軟骨修復のための移植用細胞として、骨髓液中の培養皿に接着して増殖した細胞が用いられている^{6)~8)}。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)ともよばれる。しかし、培養皿接着細胞が均質な細胞かヘテロな細胞集団であるかはいまだに不明である。これまで、ある1つの論文は均質性を示唆しているが⁹⁾、多くの研究はMSCの不均質性を示唆している^{10), 11)}。

培養皿接着細胞には、MSC以外に、分化能力のない線維芽細胞様の細胞、骨/軟骨/脂肪への1方向だけの分化能をもつ前駆細胞などが存在する¹⁰⁾。また形態や増殖能の異なる2種類のMSCが存在する¹¹⁾。ただし生体の骨髓には幹細胞が存在しているが、培養すると前駆細胞へと分化するか、あるいは線維芽細胞へと脱分化する可能性があるので、「MSCの不均質性」は未完成の培養技術、分化技術の反映かもしれない。そこで著者らは、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ตอบสนอง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と形態的に区別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

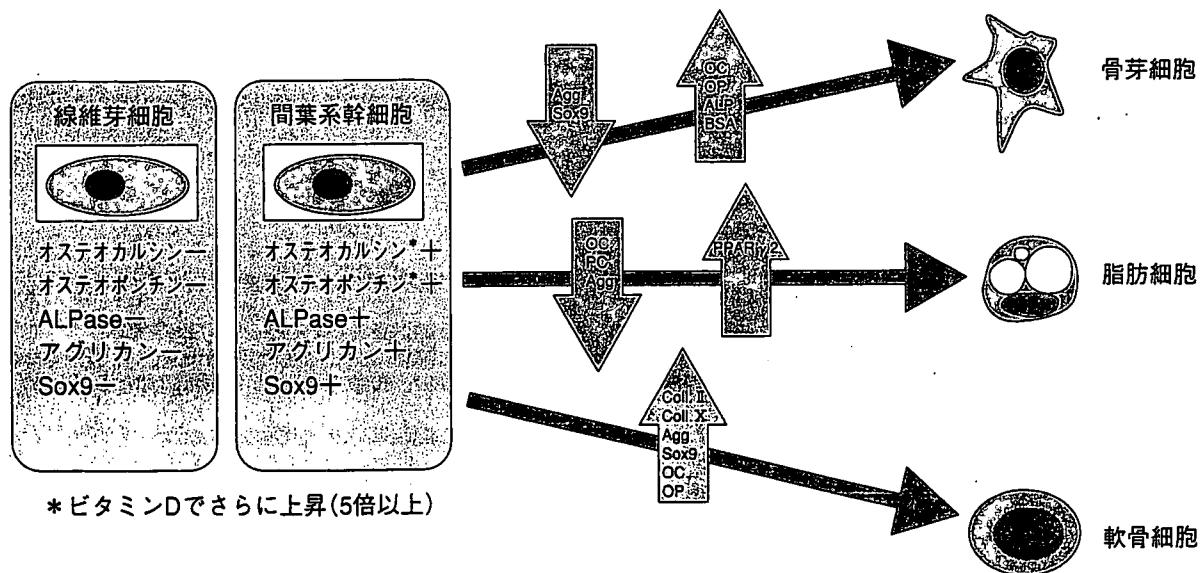
伝子発現パターン(後述)を検討した。その結果、いずれのクローン株も線維芽細胞とは異なる遺伝子発現パターンを示した。これらの結果も、骨髄液には「線維芽細胞」は存在しないことを示唆している。

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を(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見られるはずの、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- γ は、未分化なMSCです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、単一系列のみが亢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

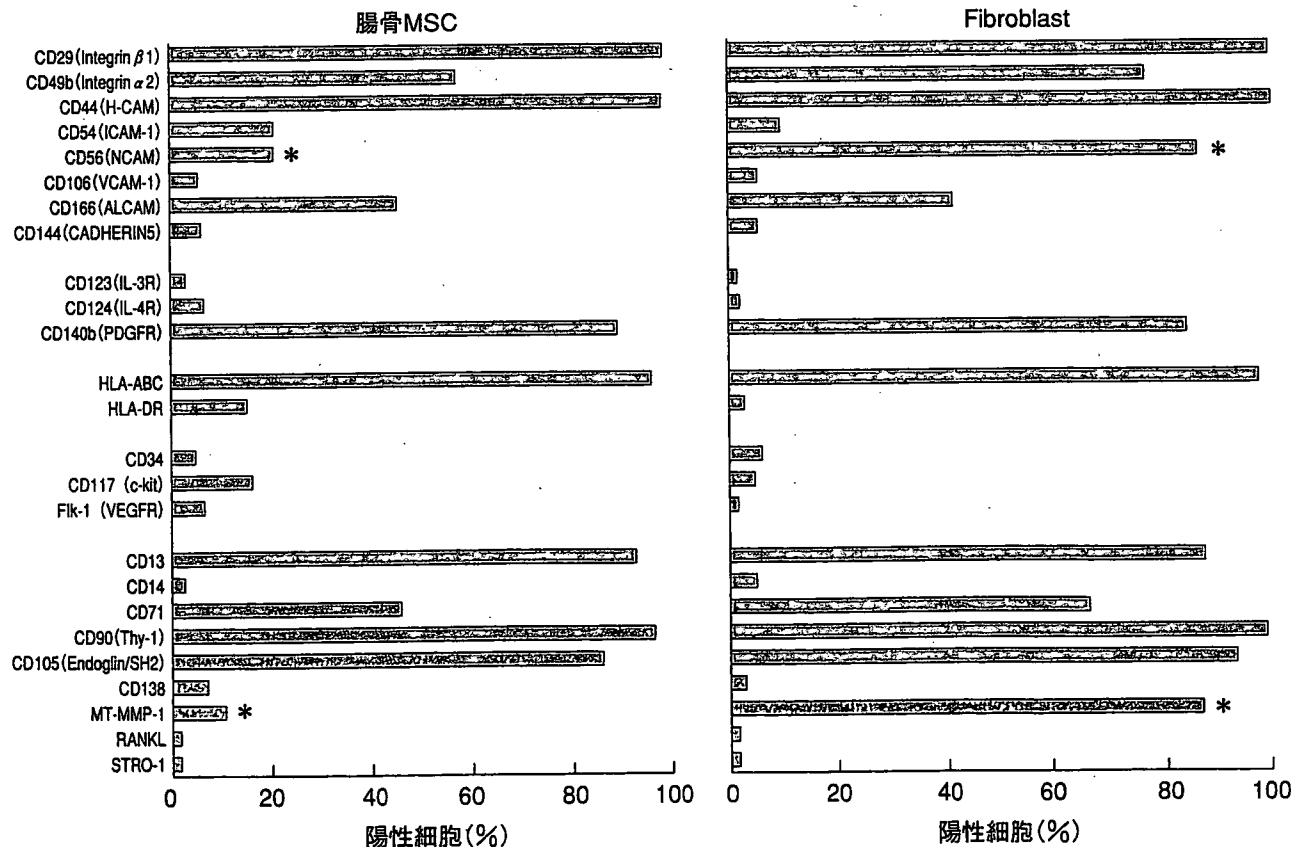
パターンを分析したところ、多数のMSCマーカー遺伝子(次項で詳述)の発現パターンは、クローン間で同一であり、線維芽細胞やその他の細胞でのパターンとは明らかに異なっていた。すなわち、著者らの開発した培養法では、均質なMSC(あるいは均質性が保証されたMSC: gMSC/ツーセル社の商標)が得られることが判明した。

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)¹²⁾。

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^{1), 12)}。

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- α	1561	1851	3582	22950	31004	7446	1022	582 \pm 402	2 \pm 2
MHC-DR- β	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, type XV, 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⁷⁾。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。

- 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^{1~3)} 十辻 紘一郎³⁾

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、歯周靱帯、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、脾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¹⁻⁵⁾。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です。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⁶⁾。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⁷⁾。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。

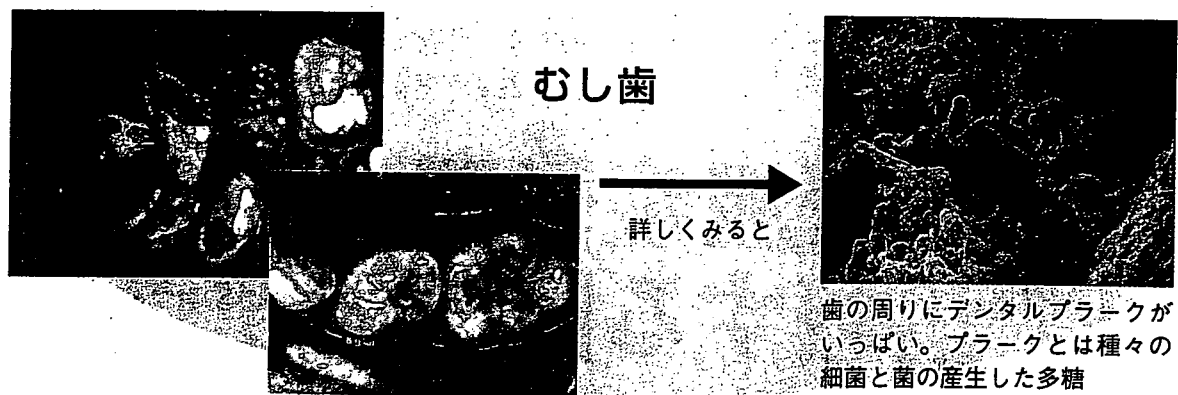
歯科での成長因子治療

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かと予想されます。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irikumi

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。

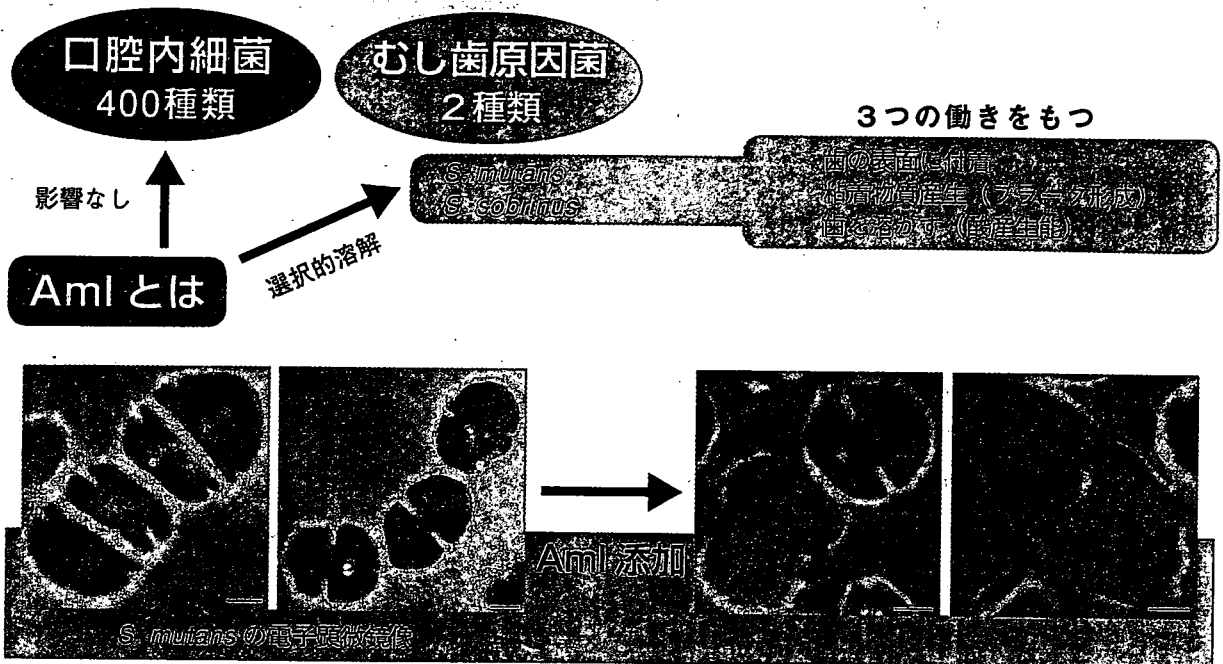
ツーセルは、前述の間葉系幹細胞を利用した歯周病(重症)の治療を病院型再生医療として実現したいと考えています。また、BDNFを用いた歯周病(軽症)の治療については栗原教授およびデンツプライ社との共同研究を進めています。この他、図1に示す新しいむし歯予防法は、広島大学の菅井基行教授らが開発を進めているもので、むし歯原因菌(*S. mutans*と*S. sobrinus*)を選択的に溶解するAmlを用いて幼児のむし歯を予防するものです。再生医療のほかにも、ツーセルは



むし歯

詳しくみると

歯の周りにデンタルプラークが
いっぱい。プラークとは種々の
細菌と菌の産生した多糖

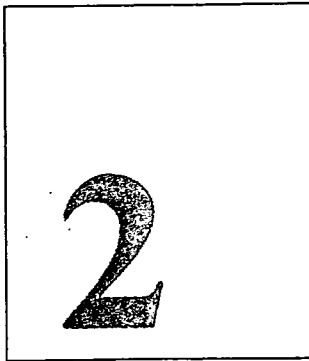


図① 新しいむし歯予防法。虫歯原因菌特異的溶菌酵素 (Aml) の臨床応用

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.



間葉系幹細胞の基礎

(2) 間葉系幹細胞の性質

加藤 幸夫* 久保 裕嗣** 清水 正和**
五十嵐 晃** 辻 紘一郎** 河本 健*
中島 歩**

要旨 ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSC) は、多分化能をもち低酸素に耐性である。このような MSC の特徴 “stemness” は、一群の遺伝子によって支持されているかもしれない。また MSC 特徴的遺伝子の発現は、MSC が存在する場所により部分的に変化すると思われる。顎骨由来の MSC は腸骨由来の MSC とはある程度異なる遺伝子発現パターンを示した。また脂肪、軟骨分化能の程度も異なっていた。そして MSC は腎臓の再生にも役立つかもしれない。

<Key point>

I. “stemness” 共通遺伝子は存在するか？

stemness

組織特異的分化
マーカー

幹細胞のもっともはっきりした特徴は、組織特異的分化マーカーが発現していないことである。しかしこれでは幹細胞を規定できない。

多分化能

self-renewal

非対称分裂

幹細胞は、多分化能を潜在的に維持して、self-renewal の能力をもつ。またある状況では非対称分裂をして、一方の娘細胞のみが分化細胞となる。幹細胞がすべて分化してしまえば、幹細胞が体内から枯渇するからである。これらのプロセス (stemness という言葉で表現されている) は、幹細胞では共通のメカニズムで制御されているかもしれない。またもしそうなら、すべての幹細胞で共通な stemness 遺伝子が存在するかもしれない。実際、2002 年に二つのグループが、胚性幹細胞 (ES 細胞)、造血幹細胞 (HSC)、神経幹細胞 (NSC) で共通して発現している遺伝子を stemness 遺伝子として報告した。しかし二つの報告で共通している stemness 遺伝子は数個しかなかった^{1), 2)}。一方、別の

Key words : ステムニス, マイクロアレー解析, 顎骨, 腸骨, 腎疾患

* 広島大学医歯薬学総合研究科口腔生化学 **同 分子内科学 (〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3)

** 株式会社ツーセル

microarray 解析

グループによって皮膚上皮の幹細胞の stemness 遺伝子も探求されたが、上記の幹細胞と共通して亢進している遺伝子の数は少数であった³⁾。これまでの研究で、“stemness” 遺伝子が同定できなかった理由は、純化した幹細胞集団を用いていなかったためかもしれない。あるいは microarray 解析に技術的な問題があったのかもしれない⁴⁾。

一方、われわれも microarray 解析によって、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSC) に選択的に高レベルに発現する遺伝子を同定したが (後述)、これらの MSC 特徴的遺伝子群と上記の幹細胞で発現が亢進している遺伝子との間で共通性は少なかった。したがって、すべての幹細胞に共通な stemness 遺伝子があるのではなく、各幹細胞はそれぞれ特有の stemness 遺伝子を有していると考えられる。たとえば ES 細胞では *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* が未分化維持に必須であるが、他の幹細胞では、これらに代わる遺伝子があるのではないだろうか。

II. MSC の多分化能および各種の骨由来の骨髄 MSC の性質の違い

骨髄で MSC は、多くが未分化なまま静的状態で維持される。しかし骨髄は出生後に発生、成熟するので、MSC はもともとは骨原基の周囲組織に存在したはずである。あるいは造血幹細胞のように遠い組織 (肝臓) から骨髄へ移動したかもしれない。また出生して骨髄が完成した後、骨髄 MSC の一部が、骨芽細胞、軟骨細胞あるいは脂肪細胞へと分化する。骨髄 MSC がどのようなシグナルにตอบสนองして、どのような機構で分化するのか、また増殖と分化のバランスについても未だ不明な点が多い。さらに MSC は造血支持能をもち⁵⁾、この能力と多分化能がどのように共存するのかも不明である。

造血支持能

一方で、すべての骨髄で MSC は共通であるかも不明である。顎骨由来の MSC は強力な骨分化能をもつものの、軟骨、脂肪分化能が低かった⁶⁾。さらに腸骨、大腿骨、脛骨、顎骨由来の骨髄 MSC の遺伝子プロファイルと比較したところ、大多数の MSC マーカーはこれらで共通していたものの、数個の遺伝子が顎骨 MSC とそれ以外の MSC (腸骨、大腿骨、脛骨由来) で有意に異なる発現パターンを示した⁷⁾ (五十嵐ら、投稿中)。顎骨 MSC は外胚葉の神経冠由来であるのに対して、腸骨、大腿骨、脛骨 MSC は中胚葉 (体節) 由来と考えられるので、起源の違いが性質の違いを規定しているのかもしれない。

遺伝子プロファイル

外胚葉

中胚葉

また骨膜、軟骨膜、滑膜、脂肪に存在する骨、軟骨分化能をもつ細胞と骨髄 MSC との関係も不明である。これらの MSC 様細胞は、由来組織の違いにより分化能の程度が異なる。たとえば滑膜由来 MSC は軟骨分化が顕著であり、脂肪由来 MSC は脂肪分化能が高いとされている。

滑膜由来 MSC

脂肪由来 MSC

一方、骨髄 MSC は、少なくとも試験管内では、筋芽細胞、神経様細胞、肝

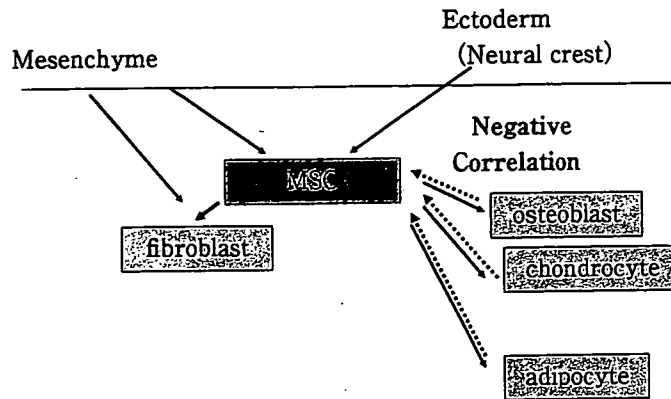


図 MSC system

MSC と線維芽細胞の発現プロファイルは類似しているが、MSC のみが分化スイッチをもっている。また MSC の遺伝子発現プロファイルは可逆的に変換しうる。つまり可塑性が大きい。

セメント細胞

臓様細胞へも分化した⁸⁾。また歯周組織欠損部へ移植すると、セメント細胞、歯根膜細胞へも分化した⁹⁾。このような予想外の細胞への MSC の分化は、分化転換 (transdifferentiation) かもしれないもののメカニズムとして興味深い。これらの疑問を追究するために、われわれは、ヒト骨髄 MSC の遺伝子発現プロファイルを検討した。

III. MSC の発現プロファイル

DNA microarray

MSC, 線維芽細胞, MSC 由来の骨芽細胞, 軟骨細胞, 脂肪細胞の全遺伝子 (約 54,000 プローブ) の発現プロファイルを DNA microarray を用いて解析すると、意外なことに MSC は線維芽細胞ともっともよく似ていた。つまり両者で弱いものの有意な正の相関があった。一方、MSC は骨芽細胞, 軟骨細胞, 脂肪細胞とは有意な負の相関があった (図)。つまり全体としていうと、MSC で発現が亢進している遺伝子は、分化すると低下して、MSC で抑制されていた遺伝子は、分化すると発現が亢進するものが多いことが示唆された。なお骨芽細胞と軟骨細胞はもっとも高い相関係数を示した。これはともに石灰化基質を大量に産生するからかもしれない。

相関係数

IV. MSC の発現プロファイルは系列決定の前の中立的な位置を維持している

全遺伝子の発現レベル

MSC の遺伝子発現パターンの特徴を捉えるために、MSC で上方、あるいは下方制御されている遺伝子を同定する方法がよくとられている。しかしわれわれはそれに加えて、MSC での全遺伝子の発現レベル (中間値を基準にした相対

- Bone Miner Res 20 : 399-409, 2005
- 7) Ishii M, Koike C, Igarashi A, et al : Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 332 : 297-303, 2005
 - 8) Ong SY, Dai H, Leong KW : Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *Biomaterials* 27 : 4087-4097, 2006
 - 9) Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, et al : Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* 77 : 1003-1007, 2006
 - 10) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145-1147, 1998
 - 11) Kale S, Karuhaloo A, Clark PR, et al : Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 112 : 42-49, 2003
 - 12) Togel F, Hu Z, Weiss K, et al : Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 289 : F31-F42, 2005
 - 13) Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, et al : Human mesenchymal stem cells in rodent whole embryo culture are reprogrammed to contribute kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 3296-3300, 2005
 - 14) Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al : Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440 : 1222-1226, 2006
 - 15) Miyazaki K, Kawamoto T, Kato Y, et al :

Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J Biol Chem* 277 : 47014-47021, 2002

- 16) 加藤幸夫, 加家壁正知, Pan Haiou, 他 : 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* 25 : 63-69, 2006

Summary

Characterization of bone marrow mesenchymal stem cells

Yukio Kato*, Hiroshi Kubo**, Masakazu Shimizu**, Akira Igarashi**, Koichiro Tsuji**, Takeshi Kawamoto*, Ayumu Nakashima*³

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) have multi-lineage differentiation potential and are resistant to hypoxia. MSC activity may be supported by "stemness" genes, whose expression is modulated by the *in vivo* location of MSC. Jaw-derived and ilium-derived MSC showed different gene expression profiles and different chondrogenic and adipogenic potentials. MSC may be useful for regenerative medicine to treat some renal diseases.

Key words : stemness, microarray analysis, jaw, ilium, renal diseases

*Department of Dental and Medical Biochemistry,
³Department of Molecular and internal medicine
 Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima
 University

**TWO CELLS, Co., Ltd.

Selection of Common Markers for Bone Marrow Stromal Cells from Various Bones Using Real-Time RT-PCR: Effects of Passage Number and Donor Age

AKIRA IGARASHI, M.S.,^{1,2} KAZUMI SEGOSHI, M.S.,^{1,2} YUHIRO SAKAI, M.S.,^{1,2}
HAIYOU PAN, Ph.D.,^{1,2} MASAMI KANAWA, Ph.D.,¹ YUKIHITO HIGASHI, Ph.D.,³
MASARU SUGIYAMA, Ph.D.,⁴ KOZO NAKAMURA, Ph.D.,⁵ HIDEKI KURIHARA, Ph.D.,⁶
SATORU YAMAGUCHI, M.D.,⁷ KOICHIRO TSUJI, Ph.D.,²
TAKESHI KAWAMOTO, Ph.D.,¹ and YUKIO KATO, Ph.D.^{1,2}

ABSTRACT

Bone marrow stromal cells (BMSCs) are valuable in tissue engineering and cell therapy, but the quality of the cells is critical for the efficacy of therapy. To test the quality and identity of transplantable cells, we identified the molecular markers that were expressed at higher levels in BMSCs than in fibroblasts. Using numerous BMSC lines from tibia, femur, ilium, and jaw, together with skin and gum fibroblasts, we compared the gene expression profiles of these cells using DNA microarrays and low-density array cards. The differentiation potential of tibia and femur BMSCs was similar to that of iliac BMSCs, and different from jaw BMSCs, but all BMSC lines had many common markers that were expressed at much higher levels in BMSCs than in fibroblasts; several BMSC markers showed discrete expression patterns between jaw and other BMSCs. The common markers are probably useful in routine tests, but their efficacy may depend upon the passage number or donor age. In our study the passage number markedly altered the expression levels of several markers, while donor age had little effect on them. Considering the effects of *in vivo* location of BMSCs and passage, magnitude of increase in expression levels, and interindividual differences, we identified several reliable markers—LIF, IGF1, PRG1, MGP, BMP4, CTGF, KCTD12, IGFBP7, TRIB2, and DYNC111—among many candidates. This marker set may be useful in a routine test for BMSCs in tissue engineering and cell therapy.

INTRODUCTION

BONE MARROW STROMAL CELLS (BMSCs) isolated from the ilium and some other bones have osteogenic, chondrogenic, and adipogenic potential,^{1–11} and transplantation

of BMSCs on various scaffolds, including collagen, calcium phosphate compounds, and poly (DL-lactic-co-glycolic acid), enhanced regeneration in bone and/or cartilage defects in both animal models and clinical studies.^{12–26} Usually the scaffolds can be chemically and physically defined, whereas

¹Department of Dental and Medical Biochemistry, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

²Two Cells Co. Ltd., Hiroshima, Japan.

³Department of Cardiovascular Physiology and Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

⁴Department of Oral Health Research, Faculty of Dentistry, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

⁵Department of Orthopedic Surgery, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

⁶Department of Periodontal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

⁷Department of General Surgical Science (Surgery I), Graduate School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Japan.

it is difficult to characterize the cells. *Ex vivo*-expanded BMSCs may show interindividual differences and may be contaminated by fibroblasts or other cells. To more precisely characterize BMSCs and control the quality of transplants, reliable molecular markers for BMSCs are required.

Using DNA microarrays, we recently identified four genes expressed at higher levels and eight genes expressed at lower levels in BMSCs than in fibroblasts.²⁷ However, four positive markers may be insufficient for characterization of BMSCs because of large interindividual differences. In fact, many candidate genes obtained in DNA microarray analyses did not show significant differential expression, when numerous BMSC and fibroblast lines were examined by RT-PCR.²⁷ It was difficult to determine the expression levels of many candidate genes quantitatively and simultaneously by conventional assay. Accordingly, in the present study, we utilized a TaqMan Low Density Array with 96 ready-made primer and probe sets, which can precisely distinguish interindividual differences from cell type-dependent differences among numerous BMSC and fibroblast samples. This allowed us to make a list of BMSC marker genes that were all consistently expressed at high levels in various BMSC lines in quantitative RT-PCR analysis.

Human BMSCs are usually isolated from the ilium, but alveolar/jaw BMSCs (A-BMSCs) may also be useful in cell therapy for jaw bone defects and periodontal diseases, and orthopedists may elect to use femur or tibia BMSCs (F-BMSCs or T-BMSCs, respectively) for their patients. Although we found that A-BMSCs had less chondrogenic and adipogenic potential than iliac BMSCs (I-BMSCs),¹¹ the differentiation potential of human F-BMSCs or T-BMSCs had not previously been compared with that of I-BMSCs or A-BMSCs. I-BMSCs, A-BMSCs, F-BMSCs, and T-BMSCs may have distinct differentiation potentials with distinct mRNA expression profiles, and these BMSCs may have common and *in vivo* location-dependent markers, which are expressed at higher levels in BMSCs than in fibroblasts. Furthermore, the expression of BMSC markers may be altered by donor age and passage number, and it is essential to understand the effects of interindividual differences, age, and passage number before application of BMSC markers to tissue engineering.

We showed here that the differentiation potentials and the gene expression profiles of human F-BMSCs and T-BMSCs were similar to those of I-BMSCs, but not A-BMSCs, perhaps because iliac and long bones, and the jaw are derived from the mesoderm and the ectoderm, respectively. In addition, we identified many common markers for I-BMSCs, F-BMSCs, T-BMSCs, and A-BMSCs by real-time RT-PCR with low-density array cards. We found that some markers were useful in clinical studies even when affected by interindividual differences, age, and passage number. We selected BMSC markers for optimal assays—considering the effects of *in vivo* location of BMSCs, interindividual differences, age, and passage number and the magnitude of increase in

expression levels—to determine a reliable list of BMSC markers. This list may be useful in increasing the efficacy of tissue engineering and cell-based therapy.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

BMSCs were obtained from various bones according to protocol approved by ethical authorities at Hiroshima University, or purchased from BioWhittaker (Walkersville, MD). For isolation of A-BMSCs, we selected 12 dental patients (age 19, 23, 24, 25, 25, 25, 43, 55, 57, 59, 63, and 63 years) whose bone marrow sites had been opened during jaw reconstitution surgery or other oral surgery for jaw distortion, jaw fracture, implant operation, tumor resection, or cyst resection; marrow aspirates were obtained using routine syringes and needles as described previously.¹¹ I-BMSC lines were obtained from four healthy donors (age 18, 18, 19, and 24 years), eight patients with vascular diseases (arteriosclerosis obliterans or Buerger's disease) (age 22, 25, 39, 53, 55, 59, 65, and 81 years), one patient with jaw deformation (age 64), and one patient with diabetes (age 61). Iliac bone marrow was aspirated using puncture needles and syringes. F-BMSC lines were obtained from three patients with malum coxae (age 67, 70, and 70 years) and three patients with injured crucial ligaments (age 17, 22, and 37 years) during surgery. We could not detect any correlation between the diseases and marker gene expression levels (data not shown). Marrow aspirates were immediately mixed with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 200 units/mL heparin. The cells were centrifuged at 500 g for 5 min and resuspended with DMEM without heparin. Bone marrow cells, including erythrocytes, were seeded at a density of 0.1 mL aspirate per 35 mm tissue culture dish (Corning, Nagog Park Acton, MA) and maintained in 2 mL DMEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/mL penicillin G (Sigma), and 100 µg/mL streptomycin (Sigma) (medium A) at 37°C in a 5% carbon dioxide incubator. Three days after seeding, floating cells were removed and the medium was replaced by fresh medium A. Thereafter, attached cells (plastic-adherent marrow cells) were fed with fresh medium A supplemented with 1 ng/mL fibroblast growth factor-2 (FGF-2) (Kaken Pharmaceutical, Tokyo, Japan), which was added every other day. Passages were performed when cells were approaching confluence. The cells were seeded at a density of 5×10^3 cells/cm² on 100 mm tissue culture dishes (Corning) and maintained in 10 mL medium A supplemented with 1 ng/mL FGF-2.⁹ To avoid any direct effect of FGF-2 on gene expression, FGF-2 was removed from the culture medium of BMSCs or fibroblasts 72 h before isolation of RNA.

Human skin fibroblasts from five healthy donors (age 29, 33, 36, 45, and 47 years) were purchased from Kurabo (Osaka, Japan), and gum fibroblasts were isolated from four healthy donors (age 17, 18, 26, and 73 years), as described previously.²⁸ Fibroblast cultures at passages 5–10 were used throughout this study.

Differentiation of BMSCs

Osteogenic, chondrogenic, and adipogenic conversions of BMSCs were determined according to procedures reported by Pittenger *et al.*¹ with some modifications in seeding cell density and duration of cultures. For osteogenic differentiation, cells were seeded at 4×10^4 cells/16 mm well (2.3×10^4 cells/cm²) and maintained for 28 days in DMEM supplemented with 10% FBS, 10 mM glycerophosphate (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan), 100 nM dexamethasone (Sigma), and 50 μ g/mL ascorbic acid-2-phosphate (Sigma) (osteogenic induction medium). For chondrogenic differentiation, cells were seeded at 2.5×10^5 cells/15 mL plastic centrifuge tube and maintained for 28 days in 0.5 mL of serum-free alpha minimum essential medium (α -MEM) (Sigma) supplemented with 1% insulin–transferrin–selenium plus (ITS-plus) (6.25 μ g/mL insulin, 6.25 μ g/mL transferrin, 6.25 μ g/mL selenite, 5.33 μ g/mL linolate, and 1.25 mg/mL bovine serum albumin) (BD Biosciences, San Jose, CA), 10 ng/mL transforming growth factor- β 3 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 100 nM dexamethasone, and 50 μ g/mL ascorbic acid-2-phosphate. The cultures were incubated in 0.5 mL of the medium until 3 days after seeding, and thereafter the cultures were fed with 1 mL of the medium every other day. For adipogenic differentiation, cells were seeded at 2×10^5 cells/35 mm well (2.3×10^4 cells/cm²) and grown to confluence in medium A. Adipogenic differentiation was induced by subjecting confluent monolayers to three rounds of adipogenic treatment. Each round consisted of incubation with DMEM (high glucose) (Sigma) containing 10% FBS, 0.2 mM indomethacin (Wako, Osaka, Japan), 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (Wako), and 10 μ g/mL insulin (Wako) (adipogenic induction medium) for 72–96 h, followed by incubation with DMEM (high glucose) containing 10% FBS and 10 μ g/mL insulin (maintenance medium) for another 72–96 h. Cultures were maintained for 28 days.

Calcium, glycosaminoglycan, and glycerol 3-phosphate dehydrogenase activity

Calcium levels were determined by the method of Gitelman.²⁹ Cartilage pellets were digested with 300 μ g/mL papain (Wako) in the presence of 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2 mM N-acetylcysteine, and 50 mM sodium/potassium phosphate buffer (pH 6.5) at 60°C for 1 h, and the glycosaminoglycan (GAG) content was determined using a sulfated GAG assay kit (Biocolor, Newtownabbey, Northern

Ireland).³⁰ Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity was determined using a GPDH activity assay kit (Hokudo, Sapporo, Japan).³¹

Microarray analysis

Total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), when the fifth to eighth passage cultures became confluent. Poly (A)⁺ RNA was purified using Micro poly (A) purist (Ambion, Austin, TX). DNA microarray analysis was performed with 0.5 μ g poly (A)⁺ RNA from A-BMSC ($n = 1$) and I-BMSC ($n = 1$) lines and skin ($n = 1$) and gum ($n = 1$) fibroblast lines using Kurabo Life Array analysis service (Incyte Genomics; Lot# KL01081 and Motorola; CodeLink-UniSet Human I). Incyte Genomics (UniGEM V2.0) uses Incyte DNA clones and two-color method. The expression level was deduced from the ratio of hybridization signal intensity (Cy5/Cy3) using Balance Coefficient and GEMTools 2.5 Software (Incyte Genomics, www.incyte.com). Motorola (CodeLink-UniSet Human I Bioarray) uses high-density oligonucleotide arrays and monocolour method. The hybridization signal on different chips was normalized using the median level and Code Link™ System Software Analysis Version 2.2.2. (www.amershambiosciences.com).

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using RNeasy minicolumns and reagents (Qiagen, Hilden, Germany), when the primary to 10th passage cultures became confluent. DNase I (Ambion) treatment was performed to remove genomic DNA from RNA samples according to the manufacturer's protocol. The first-strand cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using the ReverTra Ace- α (Toyobo, Osaka, Japan). Real-time quantitative PCR was performed using ABI Prism 7900 Sequence Detection System Instrument and Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) with a TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems). The TaqMan Low Density Array was designed for custom assay configuration with selected ready-made probe and primer sets. The mRNA level relative to that of β -actin was calculated. We normalized mRNA levels in various BMSCs against the values obtained with fibroblasts.

Enzyme-linked immunosorbent assay

BMSCs and fibroblasts were seeded in 100 mm tissue culture dishes at a density of 5×10^3 cells/cm² and maintained in 10 mL medium A supplemented with 1 ng/mL FGF-2 for 7 days. The cells were preincubated with DMEM/Ham's F-12 containing 10% FBS for 24 h. Thereafter, the cells were incubated with DMEM/Ham's F-12 containing 1% or 10% FBS for 24 h. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and pro-matrix metalloproteinase 1 (pro-MMP1) in

the medium containing 1% FBS and leukemia inhibitory factor (LIF) in the medium containing 10% FBS were determined using Quantikine Immunoassays (R&D Systems).

Quantitation of DNA

Quantitation of genomic DNA was determined using PicoGreen fluorescence assays (Invitrogen).

Statistical analysis

Data are represented by mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparison of the effects of various treatments was performed with Pearson and Student's *t*-tests. Values of *p* less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Osteogenic, chondrogenic, and adipogenic differentiations of BMSCs isolated from various bones

Osteogenic, chondrogenic, and adipogenic differentiations in F-BMSC, T-BMSC, I-BMSC, and A-BMSC lines were compared after incubation with the appropriate differentiation induction medium for 28 days. Calcium levels of all BMSC lines increased in the osteogenic condition (OS+) compared with those in medium A (OS-) (Fig. 1A). In chondrogenic or adipogenic conditions, I-BMSC, F-BMSC, and T-BMSC lines showed a marked increase in GAG contents or GPDH activities, respectively (Fig. 1B, C). However, A-BMSCs did not show any differentiation into chondrocytes or adipocytes under these culture conditions, as was expected from results of a previous study.¹¹ The osteogenic, chondrogenic, and adipogenic potentials of F-BMSCs and T-BMSCs were similar to that of I-BMSCs. In Figure 1, the chondrogenic and adipogenic potentials of A-BMSCs were undetectable, but some A-BMSC lines exhibited low levels of the chondrogenic and adipogenic potentials when cultured for an extended period.¹¹

Comparison of gene expression levels between BMSCs and fibroblasts

To identify BMSC marker genes, we compared gene expression profiles between A-BMSCs and skin fibroblasts, using DNA microarrays containing probes for 9,026 genes (Exp. 1), and between I-BMSCs and gum fibroblasts, using those containing probes for 9,962 genes (Exp. 2). The DNA microarrays used in Exp. 1 and 2 contained probes for 1,285 common genes. In these studies, 62 and 114 genes showed greater than twofold higher expression in A-BMSCs and I-BMSCs, respectively, than in fibroblasts: two genes were identified in both Exp. 1 and 2. To confirm their enhanced

expression in all BMSC lines, we used TaqMan Low Density Array-containing primers and probe sets for 35 and 62 (two overlap) genes, which had been identified in Exp. 1 and 2, respectively. Only 29 of 95 genes showed significantly higher expression levels in A-BMSC and/or I-BMSC lines than in fibroblast lines in the presence of large inter-individual differences (Table 1). In Table 1, we normalized mRNA levels in various BMSCs against the values obtained with fibroblasts.

We categorized these 29 genes into four groups (A-1, A-2, B, and C) (Table 1). Group A-1 genes (*n* = 13) showed significantly (*p* < 0.05) higher expression levels in both A-BMSCs and I-BMSCs than in fibroblasts. Group A-2 genes (*n* = 11) showed significantly (*p* < 0.05) higher expression levels in either A-BMSCs or I-BMSCs than in fibroblasts, and showed at least threefold higher expression levels in other BMSCs than in fibroblasts, although some of these levels were not statistically significant. Groups A-1 and A-2 genes were thus considered to be common markers for BMSCs.

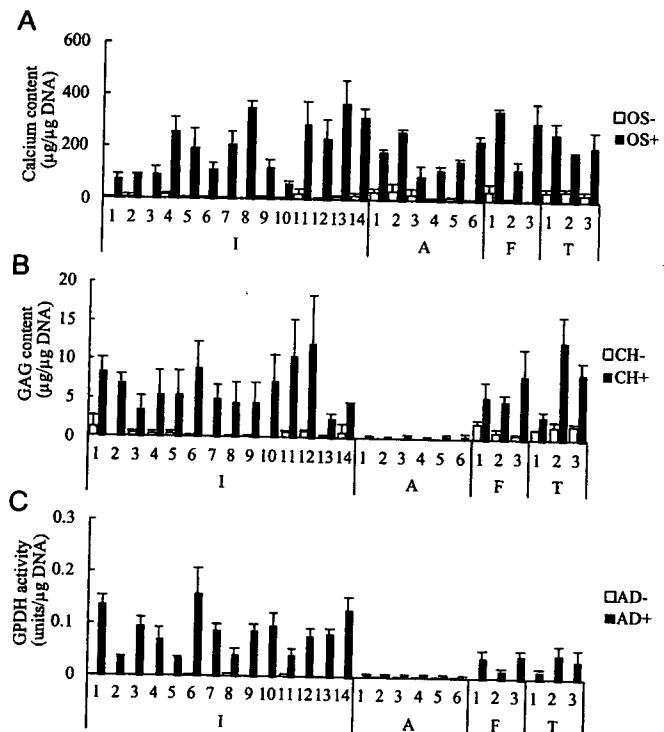


FIG. 1. The differentiation potential of I-BMSCs (I), A-BMSCs (A), F-BMSCs (F), and T-BMSCs (T). (A) Cultures of BMSCs obtained at passages 4–6 were maintained in medium A (OS-) or in the osteogenic medium (OS+). The calcium level was determined on day 28. (B) Pellet cultures were maintained in medium A (CH-) or in the chondrogenic medium (CH+). The GAG content was determined on day 28. (C) Cultures were maintained in medium A (AD-) or in the adipogenic medium (AD+). GPDH activity was determined on day 28. The values are mean \pm SEM for three cultures.

TABLE 1. COMMON AND *IN VIVO*-LOCATION DEPENDENT MARKERS FOR BMSC AND RELATIVE MRNA EXPRESSION LEVELS IN I-BMSC, A-BMSC AND FIBROBLASTS

Group	Gene symbol	Gene titles	Relative mRNA levels		
			I-BMSC	A-BMSC	Fibroblasts
A-1	<u>ADD3</u>	adducin 3 (gamma)	3 ± 1*	9 ± 1*	1 ± 1
	<u>BMP4</u>	bone morphogenetic protein 4	58 ± 19*	199 ± 54*	1 ± 1
	<u>CTGF</u>	connective tissue growth factor	15 ± 3*	13 ± 4*	1 ± 0
	<u>IGF1</u>	insulin-like growth factor 1	356 ± 124*	535 ± 138*	1 ± 1
	<u>IGFBP7</u>	insulin-like growth factor binding protein 7	21 ± 7*	22 ± 7*	1 ± 1
	<u>KCTD12</u>	potassium channel tetramerisation domain containing 12	14 ± 3*	15 ± 2*	1 ± 0
	<u>LAMA3</u>	laminin, alpha 3	14 ± 4*	17 ± 3*	1 ± 0
	<u>LIF</u>	leukemia inhibitory factor	41 ± 12*	22 ± 7*	1 ± 1
	<u>MGP</u>	matrix Gla protein	66 ± 25*	60 ± 19*	1 ± 1
	<u>PRG1</u>	proteoglycan 1, secretory granule	181 ± 66*	86 ± 29*	1 ± 0
	<u>SERPINI1</u> [#]	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1	28 ± 8*	79 ± 11*	1 ± 1
	<u>TRIB2</u>	tribbles homolog 2	8 ± 2*	10 ± 3*	1 ± 0
	<u>VEGF</u>	vascular endothelial growth factor	4 ± 1*	3 ± 1*	1 ± 0
	A-2	<u>ARHGDI3</u>	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	8 ± 3*	6 ± 3
<u>CD74</u> [#]		CD74 antigen	247 ± 87*	14 ± 5	1 ± 1
<u>DYNC1H1</u>		dynein, cytoplasmic, intermediate polypeptide 1	10 ± 2*	3 ± 1	1 ± 1
<u>HLADRA</u> [#]		major histocompatibility complex, class II, DR alpha	1455 ± 574*	45 ± 18	1 ± 0
<u>HLADRB</u> [#]		major histocompatibility complex, class II, DR beta	990 ± 353*	43 ± 22	1 ± 0
<u>TFPI2</u> [#]		tissue factor pathway inhibitor 2	7 ± 2*	13 ± 6	1 ± 1
<u>TGM2</u>		transglutaminase 2	46 ± 16*	7 ± 3	1 ± 0
<u>GMFG</u>		glia maturation factor, gamma	3 ± 2	4 ± 1*	1 ± 0
<u>IGFBP5</u>		insulin-like growth factor binding protein 5	5 ± 2	26 ± 5*	1 ± 0
<u>MCTP2</u>		multiple C2-domains with two transmembrane regions 2	3 ± 1	23 ± 6*	1 ± 0
<u>PLAU</u>		plasminogen activator, urokinase	4 ± 1	7 ± 1*	1 ± 0
B	<u>MCAM</u>	melanoma cell adhesion molecule	36 ± 2*	1 ± 0	1 ± 0
C	<u>CCND1</u>	cyclin D1	1 ± 1	3 ± 1*	1 ± 0
	<u>EDG2</u>	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	1 ± 0	4 ± 1*	1 ± 0
	<u>F2R</u>	coagulation factor II (thrombin) receptor	1 ± 0	12 ± 3*	1 ± 0
	<u>LEPR</u>	leptin receptor	3 ± 2	31 ± 9*	1 ± 0

RNA was isolated from BMSC cultures at passage 5-8. Relative mRNA levels were determined by real time quantitative RT-PCR, and were normalized in I-BMSC (n = 14) and A-BMSC (n = 6) against those obtained with 6 fibroblasts. Values are averages ± SEM for 6 ~ 14 cultures.

*Statistically significant *p < 0.05.

[#]Previously reported genes.¹²

Underlines: We selected these markers for optimal assays, considering the effects of *in vivo* location of BMSC and passage, magnitude of increase in expression levels and inter-individual differences (see Discussion).

Group B gene (n = 1) showed significantly higher expression levels in I-BMSCs than in fibroblasts, whereas the expression levels in A-BMSCs were similar to those in fibroblasts, so group B gene was considered to be a specific marker for I-BMSCs.

Group C genes (n = 4) showed significantly higher expression levels in A-BMSCs than in fibroblasts, whereas their expression levels in I-BMSCs were similar to those in fibroblasts, so group C genes were considered to be specific markers for A-BMSCs.

Expression of marker genes in F-BMSCs and T-BMSCs

Next, we examined expression levels of these markers in long-bone BMSCs (F-BMSCs and T-BMSCs). Figure 2 shows the mRNA levels of marker genes in F-BMSCs, T-BMSCs, I-BMSCs, and A-BMSCs in comparison with those in fibroblasts. The expression levels of group A-1 and A-2 genes in F-BMSCs and T-BMSCs were higher than those in fibroblasts, and many of these were comparable

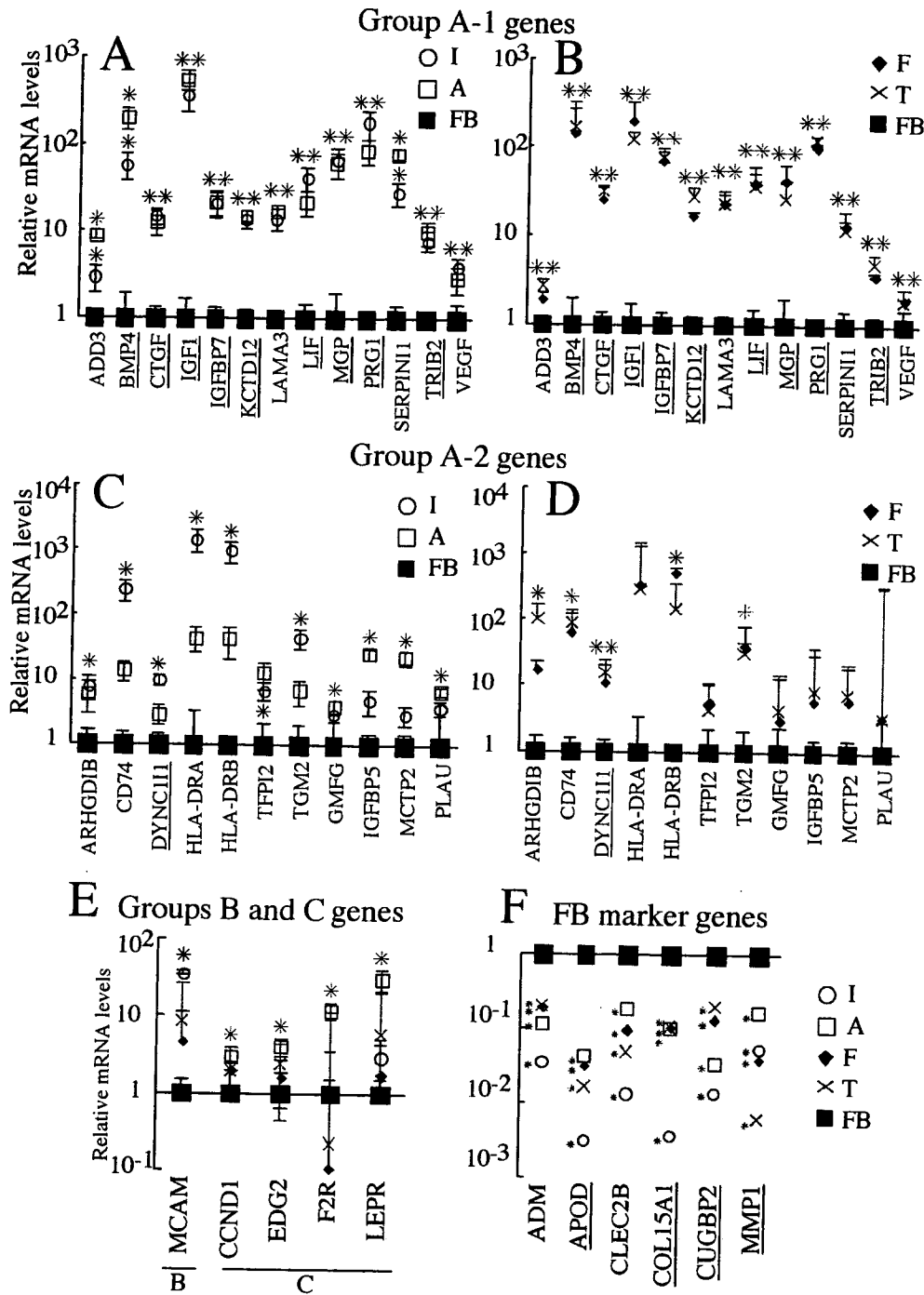


FIG. 2. The expression levels of the candidate marker genes in confluent cultures of I-BMSCs (I, $n = 14$), A-BMSCs (A, $n = 6$), F-BMSCs (F, $n = 3$), and T-BMSCs (T, $n = 3$) relative to those in fibroblasts (FB, $n = 6$) were determined by quantitative RT-PCR using low-density array cards. RNA was isolated from BMSC cultures at passages 5–8. Panels (A) and (C) show the mRNA levels of group A genes in I-BMSCs and A-BMSCs, and panels (B) and (D) show those in F-BMSCs and T-BMSCs. The expression levels of most marker genes were significantly different ($*p < 0.05$) from those in fibroblasts. The expression levels of group A-2 genes were higher (>3-fold) than those in fibroblasts (C, D). The expression levels of CD74, HLA-DRB and DYC111 in I-BMSCs and F-BMSCs were significantly different from those in fibroblasts (C, D). The expression levels of ARHGDI1, TGM2 and DYC111 in I-BMSCs and T-BMSCs were significantly different from those in fibroblasts (C, D). The expression levels of GMFG, IGFBP5, MCTP2 and PLAUR in A-BMSCs were significantly different from those in fibroblasts (C, D). The expression levels of MCAM in I-BMSCs was significantly different from those in fibroblasts (E). The expression levels of group C genes in A-BMSCs were significantly different from those in fibroblasts (C, D). The mRNA levels of groups B and C are shown in panel (E), and those of fibroblast markers are shown in panel (F). Underlined are the markers we had selected for optimal assays, considering the effects of *in vivo* location of BMSCs and passage number, magnitude of increase in expression levels, and interindividual differences (see “Discussion” section).