

## 原著

# 移植骨髄由来細胞の歯周組織への移動と細胞分化

村岡理奈<sup>1)</sup>、辻極秀次<sup>2)</sup>、中野敬介<sup>1)</sup>、片瀬直樹<sup>2)</sup>、玉村 亮<sup>2)</sup>、  
富田美穂子<sup>4)</sup>、岡藤範正<sup>3)</sup>、長塚 仁<sup>2)</sup>、川上敏行<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患病態解析学

<sup>2)</sup> 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 口腔病理病態学講座

<sup>3)</sup> 松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 臨床病態評価学

<sup>4)</sup> 松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 生体調節制御学

(受理：平成 23 年 11 月 20 日)

抄録：骨髄由来細胞の歯周組織への移動と同部構成細胞への分化について、GFPトランスジェニックマウスを用い検討した。GFP陽性の骨髄由来細胞の動態については蛍光免疫二重染色等を行い、歯周組織への細胞移動とその構成細胞への分化について追究した。その結果、マウス歯周組織には、GFP陽性細胞が多数移動していた。蛍光免疫二重染色等によって、少なくともGFP陽性細胞の一部は破骨細胞とマクロファージに分化していることが確認された。なお、血管周囲にGFP陽性細胞の集簇があった。以上の結果、歯周組織へは比較的短期間のうちに骨髄由来の細胞の移動があり、歯根膜構成細胞に分化している事がわかった。

## Transplanted Bone Marrow-derived Cell Migration into Periodontal Tissues and Cell Differentiation

Rina Muraoka<sup>1)</sup>, Hidetsugu Tsujigiwa<sup>2)</sup>, Keisuke Nakano<sup>1)</sup>, Naoki Katase<sup>2)</sup>, Ryo Tamamura<sup>2)</sup>,  
Mihoko Tomida<sup>4)</sup>, Norimasa Okafuji<sup>3)</sup>, Hitoshi Nagatsuka<sup>2)</sup> and Toshiyuki Kawakami<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Hard Tissue Pathology Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Nagano, Japan

<sup>2)</sup> Department of Oral Pathology and Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, nagano, Japan

<sup>3)</sup> Clinical Evaluation Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Nagano, Japan

<sup>4)</sup> Orofacial Neuroscience Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Nagano, Japan

Abstract: We examined the transplanted bone marrow-derived cell migration into periodontal tissues. Bone marrow cells from green fluorescent protein (GFP) transgenic mice were transplanted. The immunohistochemistry (IHC) revealed that GFP-positive cells were detected in the periodontal tissues. The GFP-positive cells histopathologically differentiated into some cell types. The fluorescence IHC and TRAP staining techniques demonstrated these cells were detected as osteoclasts and macrophages. Furthermore, GFP-positive cells gathered adjacent blood vessels. The data suggest that GFP-positive bone marrow-derived cell migrate into periodontal tissues and differentiate periodontal tissue component-cells.

Key words: Bone marrow-derived cells, Green fluorescent protein (GFP), Periodontal tissues, Osteoclasts, Macrophages, Fibroblasts

### 緒言

近年骨髄由来細胞の多分化能が明らかになり、さまざま

な臓器において骨髄由来細胞が積極的に関与する事が明らかにされ、骨髄由来細胞が多くの細胞種に分化することが報告されている。最近では臨床応用研究が既に始まっており、実際に心筋梗塞や脳梗塞等において細胞移植による各種病変の治療等が開始されている。

著者連絡先： 村岡理奈 〒399-0781 塩尻市広丘郷原1780 松本歯科大学大学院硬組織疾患病態解析学 Phone and Fax 0263-51-2035  
E-mail mura@po.mdu.ac.jp

歯科領域においては、骨髄由来細胞を用いる再生医療研究は骨組織の再建等極めて限られた領域での報告があるのみであり、今後の発展が見込まれる。我々はこれまでに骨髄由来細胞の多分化能に関する研究を行い、歯および歯周組織構成細胞などに移動・分化することを明らかにした<sup>1)</sup>。そこで今回、同じ実験系を用いて特に歯周組織に移動する細胞の細胞種を同定する事を試み、若干の興味ある知見を得たのでその結果を報告する。

### 材料および方法

実験には7週齢雌性C57BL/6マウス(チャールズリパー)および同系の7週齢雌性GFPトランスジェニックマウスC57BL/6 Tg(CAG-EGFP)(清水実験材料、京都)を使用した<sup>2,3)</sup>。

GFPマウス由来骨髄細胞の調製は、GFPトランスジェニック動物をエーテル麻酔下にて屠殺して大腿骨を摘出し、軟部組織を可及的に除いた後、骨髄細胞を採取した。採取した骨髄細胞は抗生剤を含むRPMI 1640培地で洗浄後、HBBSに置換、GFPマウスと同系の7週齢雌マウスに10 GrayのX線照射を行った後、尾静脈から $1 \times 10^7$ 個の骨髄細胞を移植した<sup>4,5)</sup>。骨髄移植の4週間後に、マウスから各種組織を採取して今回の組織学的解析を行った。

モデル動物の組織学的解析には、歯周組織構成細胞に分化した骨髄由来GFP陽性細胞の同定を行う為、HE染色、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)染色、免疫組織化学的(IHC)染色、蛍光免疫二重染色を行った。なお、マウスの上顎左側第一臼歯M1の遠心頰側根を観察部位とした。

本研究において使用されたすべての動物は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の実験動物ガイドラインに従い飼育、使用した。なお、本研究は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の動物実験委員会の審査、承認(OKU-2011237)のもと行った。

### 病理組織学的検討

マウス上顎臼歯部歯周組織を顎骨と一塊にして切り出した後、すみやかに4%パラホルムアルデヒド0.05Mリン酸緩衝固定液に浸漬させ、24時間固定を行い、脱灰液(10%EDTA solution)にて2週間脱灰を行った。パラフィンにて包埋し、当該歯根の歯根膜部について厚さ5 $\mu$ mの水平連続切片を作製した。その後、通法に従いHE染色ならびにTRAP染色を行った。

### GFPの免疫組織化学的検討

免疫染色に先立ち、キシレンにて脱パラフィン後、0.03%過酸化水素メタノール溶液で30分処理し内在性ペルオキシダーゼを失活させた。その後0.1%トリプシン溶液で37 $^{\circ}$ Cで15分処理を行った。抗GFP抗体は、抗ウサギポリクローナル抗体(MBL, 名古屋)を用い、一次抗体として抗GFP抗体は100倍に希釈し、4 $^{\circ}$ Cでovernightにて反応させた。30分間の抗ウサギ免疫グロブリン抗体(Dako, Glostrup,

Denmark)との反応後、TBSで洗浄した。洗浄後、室温で30分間ブロッキング後、DABで15分間反応させた。

### 蛍光免疫二重染色

蛍光二重染色には抗GFP抗体はヤギポリクローナル抗体を用い、抗F4/80抗体(AbD serotec, Oxford, UK)抗CD34抗体(Abcam, Cambridge, UK)を用いて、GFP-F4/80、GFP-CD34の組み合わせについて、各細胞における骨髄由来細胞の局在を確認するために行った。

GFP-F4/80では、脱パラフィン後にクエン酸緩衝液を用いて1分間マイクロウェーブで前処理、ブロッキングエース<sup>®</sup>を用いて室温で30分間ブロッキング後、一次抗体として、抗GFP抗体は100倍、抗F4/80抗体は10倍にCan Get Signal<sup>®</sup>(TOYOBO, 大阪)で希釈して4 $^{\circ}$ Cでovernightにて反応させた。二次抗体としてAlexa Fluor<sup>®</sup>568 Labeled Donkey Anti-Goat IgG Antibodies(Molecular Probes, 東京)およびAlexa Fluor<sup>®</sup>488 Labeled Donkey Anti-Rat IgG Antibodies<sup>®</sup>(Molecular Probes)をCan Get Signal<sup>®</sup>(TOYOBO)で200倍に希釈して室温で60分間反応させ、DAPI 1 $\mu$ g/mlを3分間反応させた。TBSで洗浄後にFluorescent Mounting Medium<sup>®</sup>(DAKO)で封入した。

GFP-CD34では、脱パラフィン後にクエン酸緩衝液を用いて1分間マイクロウェーブで前処理、10%ロバ正常血清を用いて室温で30分間ブロッキング後、一次抗体として、抗GFP抗体は100倍、抗CD34抗体は50倍にCan Get Signal<sup>®</sup>(TOYOBO)で希釈して4 $^{\circ}$ Cでovernightにて反応させた。二次抗体としてAlexa Fluor<sup>®</sup>568 Labeled Donkey Anti-Goat IgG Antibodies(Molecular Probes)およびAlexa Fluor<sup>®</sup>488 Labeled Donkey Anti-Rat IgG Antibodies(Molecular Probes)をCan Get Signal<sup>®</sup>(TOYOBO)で200倍に希釈して室温で60分間反応させ、DAPI 1 $\mu$ g/mlを3分間反応させた。TBSで洗浄後にFluorescent Mounting Medium<sup>®</sup>(DAKO)で封入した。

### 結果

骨髄移植4週間後、移植マウスの骨髄をIHCによって検索したところ、その全領域がGFP陽性細胞で満たされていた。

マウス歯周組織にはGFP陽性細胞が多数移動し、その細胞形態から以下のものがあった。歯槽骨表面の陥凹部の多核巨細胞、歯周組織内の不定形で比較的大きな細胞、歯周組織内の紡錘形の核を持った長紡錘形の細胞、同部の多角形細胞、血管外周の細胞、などである。

これらのGFP陽性細胞について、細胞種を同定する為に各種の二重染色を施し検討したところ、まずTRAP染色では、歯槽骨の表面に分布する多核巨細胞と単核の細胞にTRAP陽性を示す赤色反応が確認された(図1, A)。また、TRAPとGFPのIHC(DAB発色)の二重染色では、歯槽骨表面の陥凹部の多核巨細胞が両者に陽性、すなわちTRAP陽性の赤色反応を持つ細胞質に、GFP陽性を表すDABの褐色色素があった(図1, B)。

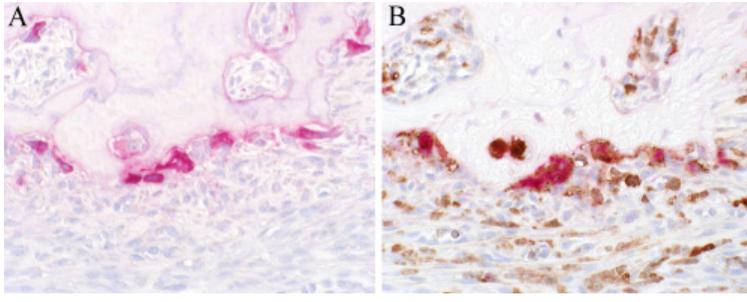


図1, A 歯槽骨表面の陥凹部に多核巨細胞があり、TRAP 陽性を示す (TRAP、× 200)。

図1, B 図1, Aの隣接切片において、多核巨細胞が、TRAP と GFP 両者に陽性を示す (TRAP + IHC、× 200)。

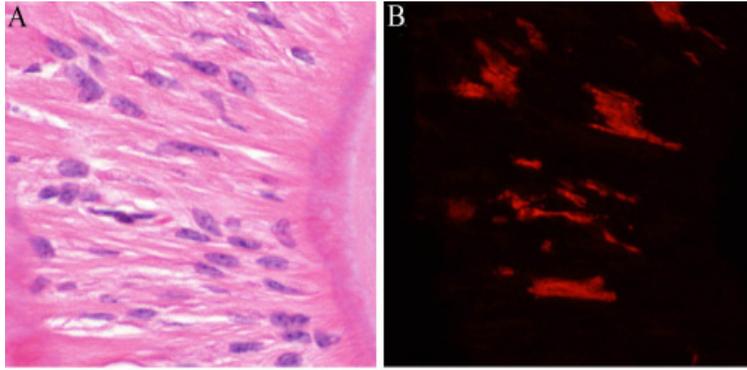


図2, A 歯根膜内には歯根膜線維の密な走向に沿うように紡錘形細胞が配置されている。比較的大型の核を持ち、外形が不整な細胞もまばらに存在している (HE、× 300)。

図2, B 歯根膜内に多数の赤色蛍光の GFP 陽性細胞が存在している。陽性細胞の多くは紡錘形であり、一部に多角形から複雑な細胞外形を示すものがある (IHC、GFP、× 300)。

図2, C 多角形や複雑な外形を有する細胞に陽性反応がある (IHC、F4/80、× 300)。

図2, D 一部の多角形や複雑な外形を有する細胞に GFP (赤色) と F4/80 (緑色) の二重陽性反応がある。紡錘形細胞の一部には GFP のみ陽性の細胞が存在している (IHC、GFP + F4/80、× 300)。

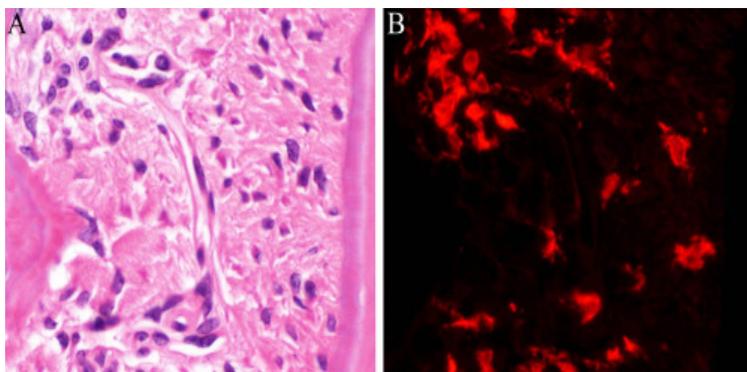
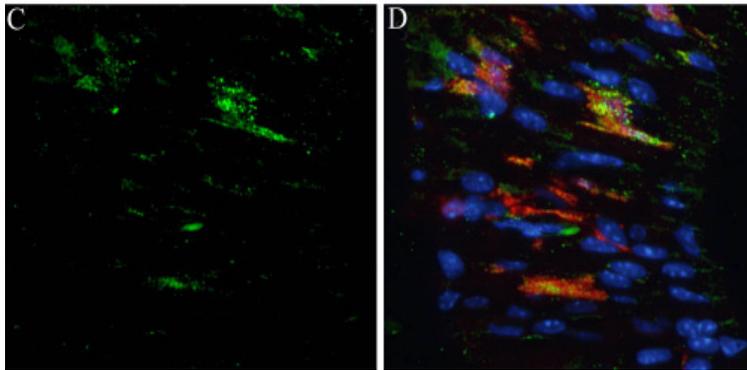
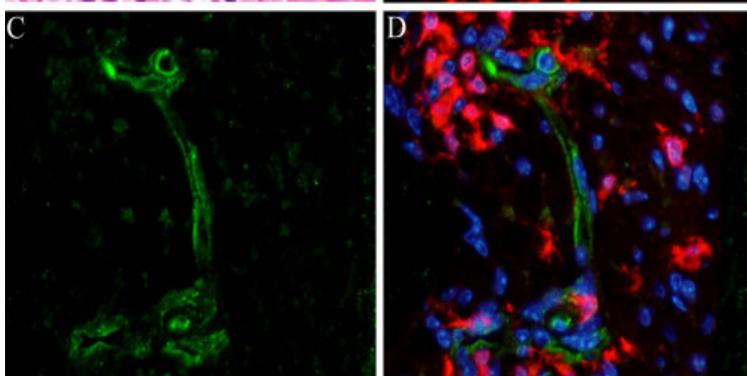


図3, A 歯根膜内に歯根膜線維の走向にそって紡錘形の歯根膜線維芽細胞と明瞭な小血管がある。血管内腔面には内皮細胞が、血管の外周の一部には周皮細胞が配置している (HE、× 300)。

図3, B 歯根膜内に多数の GFP 陽性細胞が存在している。赤色蛍光を発する陽性細胞は紡錘形や多角形を示し、一部の細胞は血管周囲を取り囲むように存在している (IHC、GFP、× 300)。

図3, C 血管腔を裏装するように血管内皮細胞に緑色蛍光の陽性反応がある (IHC、CD34、× 300)。

図3, D GFP (赤色蛍光) と CD34 (緑色蛍光) の二重陽性細胞はみられない (IHC、GFP + CD34、× 300)。



次いで、GFP-F4/80の組み合わせについて、HE染色で歯周組織内には歯根膜線維の密な走向をしている部位では、歯根膜線維の走向に沿うように紡錘形細胞が配置されていた。この長紡錘形細胞は、比較的大型の紡錘形核を持っていた。さらに、外形が不整な細胞もまばらに存在した。歯周組織の歯根膜を構成する主細胞と考えられる紡錘形の核を中央に持つ長紡錘形細胞と、一部に不定形ないし多角形から複雑な細胞外形を示す比較的大きな細胞があった(図2, A)。同部位には、赤色蛍光を発するGFP陽性所見(図2, B)があり、これらの外形を示す細胞に緑色蛍光のF4/80陽性反応が認められた(図2, C)。これを重ね合わせによって確認すると、複雑な細胞外形を示す比較的大きな細胞では両者の一致はみられなかったが、少なくとも不定形で比較的大きな細胞においては、赤色蛍光と緑色蛍光の一致する細胞が確認された(図2, D)。なお、核は、青色蛍光である。しかし、紡錘形細胞の一部にはGFPのみ陽性の細胞も存在しており、紡錘形の核を中央に持つ長紡錘形細胞での二重染色陽性は確認できなかった。

次に、GFP-CD34の組み合わせの蛍光二重染色について検討した。まず、HE染色において、歯根膜内に歯根膜線維の走向に沿う長紡錘形の細胞の中に、明瞭な小血管がみられる部位を観察したところ、血管内腔面には内皮細胞が、血管の外周の一部には周皮細胞が配置していた(図3, A)。同部位の歯根膜内には、多数のGFP陽性細胞が存在しており赤色蛍光を発するGFP陽性細胞は、紡錘形や多角形を示し、一部の細胞は血管周囲を取り囲むように並んでいた(図3, B)。血管腔を囲む血管内皮細胞に緑色蛍光のCD34陽性反応が認められた(図3, C)。これらの重ね合わせによる検討では、血管内皮細胞や血管周皮細胞部にはGFPとCD34の二重陽性細胞はみられなかった(図3, D)。しかし、血管周囲にはGFP陽性細胞の集簇している様子を観察される部もあった。

### 考察

骨髄由来細胞の多分化能に着目し、目的に沿った細胞に分化させる事を期待した臨床応用研究が既に始まっており<sup>6,7)</sup>、実際に心筋梗塞や脳梗塞等において、細胞移植による各種病変の治療等が開始されている。歯科口腔領域においては、ヒトの骨髄液を採取・培養した間葉系幹細胞を用いた骨の再生に関する治験が行われている<sup>8)</sup>。これは、口腔インプラント埋入に必要な厚さ・強度を有する顎骨の再生を目的としたものである。採取した患者の骨髄間葉系細胞を、培養・増殖させた後、移植することによって骨芽細胞に分化した細胞によって骨形成が為されると言う。しかし、骨髄由来細胞を用いる再生医療研究は、骨組織の再建等極めて限られた領域での報告があるのみであり、今後の発展が見込まれる分野である<sup>9-13)</sup>。よって、骨髄由来細胞の移動状況と細胞分化を追究することで、様々な口腔内組織の再生に繋がり、再生医療の進歩に寄与できるはずである。

GFPトランスジェニックマウスは、組織を構成する細胞

の全てがGFP蛋白を発現しており、移植した骨髄由来細胞がどのような細胞に分化しても、GFP蛋白を有する為、分化した細胞の追跡が可能である<sup>2,3)</sup>。Tsuji-giwaらは、この技術を用いてこれまでに骨髄由来細胞の多分化能に関する研究を行い、歯および歯周組織構成細胞などに移動・分化することを明らかにした<sup>1)</sup>。すなわち、移植骨髄由来GFP陽性細胞は、移植後1ヵ月と言う短期間の内に口腔領域に移動してきており、歯とその関連組織に分布するという事が明らかになっている。マウス切歯歯髄内の、樹状細胞様細胞、象牙芽細胞、歯肉上皮内のランゲルハンス細胞、歯周組織内の線維芽細胞、破骨細胞、血管などがGFP陽性を示したと記載している。

今回の実験でも、骨髄移植4週間後に移植マウスの骨髄を検索したところ、その全領域がGFP陽性細胞で満たされていた。この事は、GFPの骨髄移植が成功した証である。そこで、同移植マウスについて組織学的な検討をしたのである。その結果、Tsuji-giwaら<sup>1)</sup>の結果と同様に、マウスの歯周組織にはGFP陽性細胞が多数移動している事が改めて確認された。また、これらのGFP陽性細胞について、その細胞種を同定する為に各種の二重染色を施し検討することにした。まず、歯槽骨表面の陥凹部の多核巨細胞がTRAPとGFPの二重染色をしたところ、両者に陽性を示した。これより、この多核巨細胞は破骨細胞であることが言える。

歯根膜線維が密な走向をし、長紡錘形細胞が配置されている部位を観察したところ、歯根膜内に多数の赤色蛍光の多角形の細胞外形を示すGFP陽性細胞は、同時に緑色蛍光のF4/80陽性反応を呈したので、この細胞は、マクロファージであると同定された。さらに、長紡錘形細胞の一部にはGFPのみ陽性の細胞も存在していた。この事は、歯根膜線維芽細胞を特定する適切なマーカーが無いため断定は出来ないが、その形態学的な特徴から歯根膜線維芽細胞と考えても良いだろう。樹状細胞の細胞外形は、複雑な形状を示す細胞と考えられるが、今回の検討では特定のマーカーを用いての検討を行っていない為、その同定は出来ない。しかし、その場所と形状から、樹状細胞と推察される。

歯根膜内に歯根膜線維の走向にそって紡錘形の歯根膜線維芽細胞と、明瞭な小血管がみられる部位を観察したところ、多数のGFP陽性細胞が存在していた。赤色蛍光を発するGFP陽性細胞のうち、その一部は血管周囲を取り囲むように並んでいた。血管腔を裏装するように、血管内皮細胞に緑色蛍光のCD34陽性反応があった。しかし、GFPとCD34の二重陽性細胞は、血管に一致しては認められなかった。この所見から、Tsuji-giwaら<sup>1)</sup>が記載しているDAB陽性(GFP陽性)の血管に密接に関連していた細胞については、今回の詳細な二重染色結果によると、血管内皮細胞では陽性反応が確認されなかったため、Tsuji-giwaらの論文で血管陽性(Blood vessels were positive.)との記載は血管の周囲に集簇した未分化な細胞、ないしマクロファージであると考えられた。

以上の結果およびそれに基づく総合的な考察から、以下

の結論を得た。

GFP 陽性骨髄由来細胞が移動・細胞分化した細胞として、破骨細胞とマクロファージが同定された。

歯周組織内に移動・細胞分化する事が推定される細胞として、樹状細胞と歯根膜線維芽細胞がある。

今後は、GFP 移植骨髄由来細胞が口腔領域における各種組織に移動・分化するその全貌について、詳細な追究を行う予定である。

### 謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費 若手研究 (B) #23792456、基盤研究研究 (C) #2259230 および #23593075 の助成を受けたものである。

### 参考文献

1. Tsujigiwa H, Katase N, Sathi GA, Buery RR, Hirata Y, Kubota M, Nakano K, Kawakami T and Nagatsuka H. Transplanted bone marrow derived cells differentiated to tooth, bone and connective tissues in mice. *J. Hard Tissue Biol* 20: 147-152, 2011
2. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T and Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313-319, 1997
3. Ikawa M, Yamada S, Nakanishi T and Okabe M. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in mammals. *Curr Top Dev Biol* 44: 1-20, 1999
4. Wall DA, Hamberg SD, Reynolds DS, Burakoff SJ, Abbas AK and Ferrara JL. Immunodeficiency in graft-versus-host disease. I. Mechanism of immune suppression. *J Immunol* 140: 2970-2976, 1988
5. Zijlmans JM, Visser JW, Laterveer L, Kleiverda K, Heemskerker DP, Kluin PM, Willemze R and Fibbe WE. The early phase of engraftment after murine blood cell transplantation is mediated by hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 725-729, 1998
6. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA and McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779-1782, 2000
7. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal GB, Bodine DM, Leri A and Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705, 2001
8. Nakamura M, Udagawa N, Uematsu T, Shimodaira S, Tahara H and Wakitani S. Possibility of alveolar bone reproduction by human bone marrow mesenchymal cell transplantation. *The Bone* 23: 303-309, 2009
9. Tsujigiwa H, Nishizaki K, Teshima T, Takeda Y, Yoshinobu J, Takeuchi A, Orita Y, Sugata Y, Nagatsuka H and Nagai N. The engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the olfactory epithelium. *Brain Res* 1052: 10-15, 2005
10. Nishizaki K, Yoshinobu J, Tsujigiwa H, Orita Y and Yamada M. The early administration of granulocyte colony-stimulating factor increases the engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the olfactory epithelium damaged by methimazole. *Rhinology* 48: 228-232, 2010
11. Ueno M, Uchida K, Takaso M, Minehara H, Suto K, Takahira N, Steck R, Schuetz MA and Itoman M. Distribution of Bone Marrow-Derived Cells in the Fracture Callus during Plate Fixation in a Green Fluorescent Protein-Chimeric Mouse Model. *Exp Anim* 60: 455-462, 2011
12. Lee ES, Yu SH, Jang YJ, Hwang DY and Jeon CJ. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the developing mouse eye. *Acta Histochem Cytochem* 44: 213-221, 2011
13. Xue K, Zhu Y, Zhang Y, Chiang C, Zhou G and Liu K. Xenogeneic chondrocytes promote stable subcutaneous chondrogenesis of bone marrow-derived stromal cells. *Int J Mol Med*: DOI: 10.3892/ijmm.2011.830, 2011

