

## マウス緻密骨由来細胞から形成された自発的スフェロイドは 高い幹細胞性と分化能力を持つ

陳 凱

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座  
(主指導教員：各務 秀明 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文要旨

Spontaneously formed spheroids from mouse compact  
bone-derived cells retain highly potent stem cells with  
enhanced differentiation capability

KAI CHEN

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University  
(Chief Academic Advisor : Professor Hideaki Kagami)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

### 【目的】

スフェロイド培養は、通常の平面培養と比較して生理学的な環境に近く、幹細胞性の維持に優れているため、ティッシュエンジニアリングや細胞治療に有用であることが報告されている。皮質骨由来細胞（CBDCs）は間葉系幹細胞の潤沢な細胞源であるが、CBDCs由来のスフェロイドの性質についてはよく知られていない。そこで本研究では、マウスCBDCs由来の自発的スフェロイドを用いて、その性質について検討したので報告する。

### 【材料と方法】

マウス（C57BL/6J）の大腿骨および脛骨を摘出後、骨髓をフラッシュアウトして皮質骨を得た。細切後酵素処理を行い、CBDCsを採取した。はじめ通常の培養ディッシュを用いて平面培養を

行い、2～3継代目の細胞を以下の実験に使用した。細胞を特殊な接触角を持つ培養ディッシュへ播種することで、自発的スフェロイドを得た。ES細胞マーカー（SSEA1, Sox2, Oct4, Nanog）の発現を、免疫蛍光法および定量的PCR（qRT-PCR）にて検討した。同様に間葉系幹細胞マーカー（CD105, CD44, CD29, Sca-1, KLF4）の発現をqRT-PCRにて解析した。次にスフェロイド由来細胞を通常の培養ディッシュに播種し、骨および神経分化誘導を行った。骨分化マーカー（Osterix, BSP, DMP1）と神経分化マーカー（Nestin, MAP2, NGFR）の発現を解析し、平面培養細胞と比較した。

### 【結果】

CBDCs由来のスフェロイドは、ES細胞マーカーであるSSEA1, Sox2, Oct4, Nanog陽性で

あった。qRT-PCRによる解析では、平面培養された細胞と比較してFUT4 (SSEA1), Sox2, Nanogの遺伝子発現が有意に上昇していた。間葉系幹細胞マーカーの発現はスフェロイドと平面培養された細胞でほぼ同等であったが、Sca-1については有意にスフェロイドで高発現していた。分化誘導後、スフェロイド由来細胞は平面培養された細胞と比較して、高い骨分化マーカーおよび

神経分化マーカーの発現を認めた。

#### 【結語】

CBDCs由来の自発的スフェロイドは、平面培養細胞と比較して幹細胞マーカーを高発現し、優れた骨および神経分化能を示した。この結果から、スフェロイド細胞は平面培養細胞と比較して、より高い幹細胞性を持つことが示唆された。