

---

## MS3-1 ヒト多能性幹細胞由来軟骨内骨化組織の作製

---

○大庭 伸介

長大 生命医科 細胞生物

多能性幹細胞の分化システムは、器官発生機構の理解、疾患モデリング、治療用薬剤の同定、幹細胞を用いた治療法の開発に有用である。分化誘導剤の選定においては、器官発生を制御するシグナル経路への理解が必須となる。我々はヘッジホッグシグナルによる骨格系細胞の運命決定機構 (*Development*, 2008; *Dev Cell*, 2008; *J Biol Chem*, 2012; *J Biol Chem*, 2013) や Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が多能性幹細胞の多能性と分化を制御する際の遺伝子制御ネットワークを明らかにしてきた (*Stem Cells*, 2013)。これらの知見に基づき、マウス及びヒト多能性幹細胞から骨格系細胞を誘導するいくつかの手法を開発している (*Stem Cell Reports*, 2014; *Sci Adv*, 2017; *Regen Ther*, 2020)。一連の手法は、①多能性幹細胞の維持、②中胚葉・骨格系前駆細胞の誘導、③前駆細胞集団の骨格系細胞への分化、という3つのステップから構成される。①および②のステップでは、「組成が不明なものを用いない培養条件 (defined な培養条件)」において、発生学的に重要なシグナル経路を低分子化合物により調節している。このようにして誘導されたヒト多能性幹細胞由来前駆細胞を適切な条件下に置くことで、発生過程に類似した軟骨内骨化組織が形成されることを組織学的・分子生物学的手法により確認している。さらに最近では、シングルセル解析により、ヒト多能性幹細胞由来軟骨内骨化組織における細胞系譜や遺伝子制御ネットワークの一端を明らかにしつつある。一連の手法は、ヒト骨発生機構とその異常による疾患発症のメカニズムの理解や治療法開発への新たな研究プラットフォームとなることが期待される。

**【利益相反】** 筆者は利益相反がないことを宣言する。

---

## Generation of endochondral bone tissues using human pluripotent stem cells

---

○Ohba S

Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Pluripotent stem cell (PSC)-based differentiation systems are helpful for the understanding of organogenesis, disease modeling, identification of therapeutic drugs, and stem cell-based therapies. We need a deeper understanding of signaling pathways underlying organogenesis in order to choose suitable inducers for the systems. From this point of view, we studied Hedgehog signaling-mediated cell fate specification of skeletal cells and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-mediated gene regulatory networks underlying pluripotency and differentiation in PSCs. Based on these findings, we developed a couple of protocols for directing mouse and human PSCs toward skeletal cells. These protocols consist of the following three steps: (1) maintenance of PSCs, (2) induction of mesoderm and skeletal progenitors, and (3) differentiation of the progenitors into skeletal cells. In the first and second steps, developmentally crucial signaling pathways are modulated by small compounds under defined conditions. We have confirmed that the PSC-derived skeletal cells give rise to endochondral bone-like tissues under appropriate conditions. We are currently studying cell lineages and gene regulatory networks by taking advantage of single-cell analyses in the human PSC-derived endochondral bone-like tissues. Our approaches will lead to new platforms for the understanding of human ossification processes and skeletal diseases as well as the development of therapeutic strategies.

**Conflict of Interest:** The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

---

---

## MS3-2 ヒト臍帯由来間葉系幹細胞を用いた顎裂再建の可能性

---

○須田 直人, 豊田亜希子

明海大 歯 矯正

---

唇顎口蓋裂児の顎裂は、口腔の形態と機能の異常の原因となる。断裂した顎堤が残存すると、歯の萌出・位置の異常や歯列狭窄を伴う歯列不正、さらには矯正歯科治療に制約を生じる。そのため、早期の顎裂閉鎖により機能回復と形態改善を図ることが望ましい。

臍帯は、採取にあたりドナーへの身体的負担がなく、採取された細胞の増殖能が高いことからバイオリソースとして優れている。これまで臍帯では、臍帯血を利用して組織再生が行われてきたが、Wharton's Jelly を含む外層に間葉系幹細胞が存在することが報告された。そこで、我々はヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (hUCMSCs) に注目し、その骨組織形成能を検討した。

ヒト臍帯から酵素法により細胞を得た後、CD146 陽性細胞を磁気分離法により分離した (UC-MACS)。UC-MACS は間葉系幹細胞マーカーに陽性で、未分化維持関連遺伝子を発現し多分化能を有していた。ハイドロキシアパタイトとコラーゲンの複合体から成る担体に UC-MACS を播種し、ラット顎裂モデルへ移植した。マイクロ CT および組織染色により骨形成の評価を行ったところ、担体単独に比べて UC-MACS を加えた移植は顎裂間の骨架橋を増加させた。また骨架橋周囲にはオステオポンチン陽性の骨芽細胞様細胞が集積し、ヒト特異的抗体陽性の細胞も観察された。

hUCMSCs は免疫特権を持つことが知られている。以上の点から唇顎口蓋裂児の顎裂再建にあたり、hUCMSCs を用いることは効果的な再生医療技術と期待できる。

**【利益相反】** 著者は利益相反がないことを宣言する。

---

## Future perspective for regeneration of alveolar cleft using human umbilical cord derived mesenchymal stem cells

---

○Suda N, Toyota A

Div Orthod, Meikai Univ Sch Dent

---

Patients with cleft lip and palate have functional and esthetic problems. Alveolar cleft causes disorders in tooth eruption and occlusion, and the early correction is known as a desirable treatment protocol. Umbilical cord blood cells have been utilized in regenerative medicine. Recently, it is reported that mesenchymal stem cells are included in umbilical cords.

Thus, we took advantage using human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) to regenerate alveolar clefts. CD146-positive cells (UC-MACS) were enriched from the isolated umbilical cord derived cells by magnetic-activated cell sorting. UC-MACS were positive for mesenchymal stem cell markers and pluripotent. UC-MACS could induce bone bridge formation between the experimental alveolar cleft model when implanted with carriers including hydroxyapatite and collagen. Osteopontin-positive osteoblasts were seen around newly formed bone and the human derived cells were accumulated.

It is known that hUCMSCs are immune privileged. All these findings indicate that hUCMSCs have bone inducing potency and are reliable bioresource for alveolar bone regeneration.

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

---

---

### MS3-3 ヒト歯槽骨由来未分化骨芽細胞および3次元ポリ乳酸足場材を用いた新規骨再生医療技術の開発

---

○齋藤 正寛<sup>1</sup>, 半田 慶介<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東北大院歯 保存, <sup>2</sup>神歯大 歯 口腔生化

---

本格的な超高齢社会を迎えた世界においてあらゆる分野で造骨再生医療等製品が必要とされてきており、多くの製品が市場に出ている。これまで造骨再生医療には骨髄あるいは脂肪組織由来の間葉系幹細胞が用いられてきた。これらの多くは足場の間葉系幹細胞を定着させ骨芽細胞分化誘導を行い移植して造骨を期待する技術開発である。また間葉系細胞は免疫反応を調節する抗炎症効果による創傷治癒の促進効果があるため、移植手術における侵襲と骨欠損部位における抗炎症効果で骨再生を導くことも報告されている。このように間葉系幹細胞の有用性は示されているもの、この技術では長きに渡り待ち望まれている垂直方向の造骨、すなわち大規模な骨欠損における再生効果は限定的である。造骨には間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化誘導が必要であるが、それが不十分なことが示されており、効率的な分化誘導法、骨芽細胞密度をあげる手法の開発が望まれる。

研究代表者は顎骨から独自の酵素消化法にて骨再生医療に特化したヒト顎骨由来未分化骨芽細胞様細胞 (HAOB) の分離培養技術を世界に先駆けて確立してきた。HAOB はあらゆる年代の患者層から採取することが可能な造骨細胞であり、また産総研と共同で体内にて分解・代謝されるポリ乳酸を主成分とし、HAOB の増殖と分化に最適となるよう硬さ等を調製した生体吸収性移植材料 (3次元ポリ乳酸足場材) を開発してきた。水平性骨欠損を模倣した動物モデルを作製する目的で、マウスの上顎第一大臼歯を抜歯し、同部位の骨を切削して顎骨欠損モデルを作製し、マウス頭蓋冠より HAOB と同じ手法で未分化骨芽細胞 (MCOB) を分離培養し MCOB-3次元ポリ乳酸足場材の同種移植実験による骨再生能力を検証した。その結果、3次元ポリ乳酸足場材単独移植群と比較して MCOB-3次元ポリ乳酸足場材は顎骨欠損部位で良好な骨造性が確認され、MCOB を使用する優位性を証明出来た。

本シンポジウムでは未分化骨芽細胞様細胞-3次元ポリ乳酸足場材を用いた骨再生医療等製品の開発に関して議論する。

**【利益相反】** 著者は利益相反のない事を宣言します。

---

### Development of bone regenerative medicine technology using human alveolar bone derived immature osteoblast like cell and three-dimensional poly-lactic acid scaffold

---

○Saito M<sup>1</sup>, Handa K<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Divi Oper Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent, <sup>2</sup>Dept Oral Biochem, Kanagawa Dent Coll

---

Mesenchymal stem cells (MSCs) has an rapid healing of bone defect by bone forming ability and anti-inflammatory effect. Although effectiveness of MSCs have been shown, these cells could not be achieved regeneration of large bone defect. To overcome this problem, novel bone regeneration technology must be developed using cells possessing high bone forming ability and scaffold that can provide space for vertical bone formation.

To approach this problem, we have previously developed a graft material combining polylactic acid fiber that increase the strength of the scaffold material (3D PLLA) and alveolar bone derived immature osteoblast (HAOB) which has high bone regeneration ability for regeneration of large bone defect. Recently transplantation of mice calvaria derived immature osteoblast like cells (MCOB) which can isolate by identical protocol of HAOB mixed with 3D PLLA was able to regenerate mice alveolar bone defect model compared with those of 3D PLLA alone. In the present symposium, we are going to discuss HAOB-3D PLLA as a novel bone regeneration product for patient with large bone defect.

**Conflict of Interest:** Authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

---