

# 過剰歯髄由来間葉系細胞の特性

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

佐藤 桃子

(指導：白川 哲夫 教授，本田 雅規 准教授)

## 緒言

間葉系幹細胞 (MSCs) は自己複製能および多分化能を有し、近年では臨床応用に向けた様々な研究が行われている<sup>1)</sup>。歯髄は象牙質再生能を持つことが知られており、抜歯された歯から比較的容易に採取できることから、MSCs の細胞源として期待されている。歯髄由来の MSCs は、骨髄由来の MSCs<sup>2)</sup>と比較して、高いコロニー形成能、増殖能および多分化能を有することが報告されている<sup>3,4)</sup>。さらに、2003年に Miura ら<sup>4)</sup>は脱落乳歯歯髄に含まれる MSCs と永久歯の歯髄由来の MSCs とを比較し、乳歯に含まれる MSCs の方が高い細胞増殖能を示すことを明らかにした。

過剰歯とは通常の本数以上に存在する歯の総称であり、上顎および下顎のどちらにも出現し、複数認められることもあるが、1歯のみことが多い。過剰歯の乳歯列における出現頻度は 0.2-0.8%、永久歯列での出現頻度は 0.5-5.3%とされている<sup>5-9)</sup>。最も高頻度で出現する部位は上顎の正中部であり、その過剰歯を正中過剰歯と呼んでいる<sup>10-12)</sup>。正中過剰歯の出現頻度は 0.15-1.9%であり、女性よりも男性に高い頻度で現れる<sup>10,12,13)</sup>。過剰歯の発生原因に関しては不明な点が多いものの2つの発生機序が示されている<sup>14-16)</sup>。最も広く受け入れられている機序は、乳歯あるいは代生歯の歯堤の機能亢進により過剰に歯胚が形成されるというものである<sup>17,18)</sup>。もう一つの機序は、発生初期の乳歯もしくは永久

歯の歯胚が 2 分割されることでひとつは正常な歯になり，残りが過剰歯になるというものである<sup>19)</sup>。過剰歯は歯列不正の原因になることが多いため，抜歯することが第一選択となる。

近年，過剰歯の歯髄にも MSCs が存在することが報告され<sup>20,21)</sup>，MSCs の細胞源として有用と考えられるが，過剰歯の歯髄由来 MSCs の特性に関する報告はきわめて少ない。そこで本研究では，日本大学歯学部附属歯科病院小児歯科にて抜歯した上顎正中過剰歯の歯髄細胞を対象として，表面抗原，コロニー形成能，細胞増殖能，未分化マーカーの発現および分化能について解析することで過剰歯の歯髄に存在する MSCs の特性を検討したので報告する。

## 材料と方法

### 1. 細胞培養

本研究の実施にあたっては日本大学歯学部倫理委員会の承認を得た (No, AP10D014)。日本大学歯学部附属歯科病院小児歯科に来院しインフォームドコンセントの得られた患者より抜歯した上顎正中過剰歯 10 歯 (抜去時年齢: 5~8 歳) の歯髄から細胞を採取した。抜歯した歯は、全て歯根形成が完了していることを確認した。セメント-エナメル境部にディスクで 0.5-1.0 mm 程の深さの溝を入れた後、ノミを用いて歯を分割し、露出した歯髄をピンセットにより無菌的に採取した。単離後、外科用メスにより約 1 mm の大きさに細切した。細切した歯髄の 1 片を 35 mm 培養ディッシュ (TPP) に静置し、非働化した 20% ウシ胎児血清 (FBS, Nichirei Biocience Inc), 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Wako) を含む  $\alpha$ -MEM 培地 (Wako) を増殖培地とし、37°C, 5%CO<sub>2</sub> の環境下で組織培養を行い、歯髄片から細胞を外生させた。外生した細胞が培養ディッシュ内で 80%コンフルエント時に、0.05%トリプシン (Wako) を含む PBS (Wako) で細胞を培養ディッシュから分離し、100 mm 培養ディッシュ (TPP) にて継代培養した。本研究では第 2~4 継代目の細胞を用いた。また細胞形態は位相差顕微鏡 (Eclipse TS100, Nikon) を用いて観察した。

### 2. フローサイトメトリー

細胞の表面抗原型を解析するために、培養細胞を蛍光プローブで標識し、フローサイトメーター (BD FACS Aria, BD Bio-sciences) で蛍光標識された細胞の割合を調べた。100 mm 培養ディッシュに  $5 \times 10^3$  個の培養細胞を播種し 7 日間培養を行った。0.05% トリプシンを用いて細胞を剥離し、各抗体を添加 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) して 4°C で 25 分間静置した。使用した抗体は CD13 (PE), CD14 (FITC), CD34 (PE), CD44 (FITC), CD45 (FITC), CD73 (PE), CD90 (APC), CD146 (PE), CD271 (PE) であった (すべて BD Bio-sciences)。それぞれの抗体によって蛍光標識された細胞の割合をアイソタイプコントロールである IgG と比較し、FACS データ解析ソフト (FlowJo Digital Biology, Tomy Digital Biology) にて分析した。

### 3. コロニー形成能

MSCs の特性の一つであるコロニー形成能を検討するために、6 well プレート (TPP) に 100 個の培養細胞を播種した。9 日間培養を行ったのち 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で 15 分間固定後、PBS にて洗浄を行った。続いて 0.1% トリジンブルー染色液で 15 分間染色後、40 細胞以上に凝集した細胞群を 1 コロニーとし、コロニー数を位相差顕微鏡下で計測した。

### 4. 細胞増殖能

12 well プレート (TPP) に  $1.5 \times 10^3$  個/well の培養細胞を播種し、2, 4,

6, 8, 10 日目の細胞数を測定し, 細胞増殖能を検討した。培養細胞を PBS にて洗浄後, 0.05%トリプシンを用いて培養プレートから剥離し, 光学顕微鏡下において血球算定板で細胞数を計測した。

## 5. 細胞周期

細胞周期を解析するために, 細胞分裂期の細胞の割合を Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen) を用いて調べた。100 mm 培養ディッシュに  $5 \times 10^3$  個の培養細胞を播種し, 7 日間培養を行った。培養液中に 10 mM EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を加えて 1 時間後に細胞を固定し, Cell Cycle 488-red で 30 分間染色後, フローサイトメーターを用いて EdU で標識された細胞と DNA 含有量の相関を調べた。EdU で標識された細胞の割合をアイソタイプコントロールである IgG と比較し, FACS データ解析ソフトで分析した。

## 6. RT-PCR

c-Myc, Sox2, Nanog, Oct4, Klf4 および Rex1 の遺伝子発現を RT-PCR で解析した。培養細胞が 100 mm 培養ディッシュにおいて約 80%コンフルエントに到達後, NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) を用いて RNA を抽出後, ReverTra AceR qPCR RT Kit (Toyobo) により cDNA を合成した。PCR thermal cyclers (Takara) を用い, 第 1 表に示すプライマーを使用して PCR 反応後, 増幅した PCR 産物を 2%アガロースゲルにて電気泳動を行い, 遺伝子発現の有無

を確認した。

## 7. 分化能

過剰歯由来歯髄細胞の分化能を評価するために、骨芽細胞および脂肪細胞への分化誘導実験を行った。

### 1) 骨芽細胞への分化誘導と評価

12 well プレートに  $1.5 \times 10^3$  個/well の培養細胞を播種し、細胞が 80%コンフルエントになった時点 (0 日目) で増殖培地から骨芽細胞誘導培地に交換して 21 日間培養した。骨芽細胞誘導培地は  $\alpha$ -MEM 培地に 5%FBS, 10 mM デキサメタゾン (Sigma), 10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸 (Sigma), 50  $\mu$ g/ml L-アスコルビン酸 (Wako), 1 mM カルシトリオール (Wako), 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した。培地交換は 1 週間に 2 回行った。培養 1, 3, 7, 14, 21 日目に 10%中性ホルマリン緩衝液で固定し, Alkaline phosphatase (ALP) 活性を ALP 染色で, 石灰化 nodule 形成をアリザリン赤染色で評価した。カルシウム E テストキット (Wako) を用いて, 培養 21 日後の上清を除去後, 300  $\mu$ l の 0.5 M HCl を添加して石灰化物を溶解し, カルシウム沈着量を定量した。コントロールには増殖培地の細胞群を用い同様の実験を行った。得られたデータについて, Student's *t*-test による統計解析を有意水準 1%にて行った。

### 2) 脂肪細胞への分化誘導と評価

12 well プレートに  $1.5 \times 10^3$  個/ well の培養細胞を播種し、約 80%コンフルエントの時点 (0 日目) で増殖培地から脂肪細胞誘導培地に交換した。脂肪細胞誘導培地は、 $\alpha$ -MEM 培地に 5% FBS, 1  $\mu$ M デキサメタゾン, 0.2 mM インドメタシン (Sigma), 170 nM インスリン (Sigma), 0.5 mM イソブチルメチルキサンチン (Sigma), 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した。培地交換は 1 週間に 2 回行った。培養 46 日目に、オイルレッド O 染色で染色後、位相差顕微鏡下で脂肪滴の有無を観察した。



## 成績

### 1. 試料とした過剰歯の特徴

本研究で用いた過剰歯 10 歯中 9 歯が、上顎正中部に存在した逆生の埋伏過剰歯であり、1 歯が上顎乳歯列正中部に存在した順生歯であった。過剰歯の形態は円錐状が 6 歯、犬歯様が 4 歯であった。

### 2. 表面抗原のフローサイトメトリー解析

細胞の表面抗原の発現を解析した（第 2 表）。MSCs に共通のマーカーである CD13, CD44, CD73, CD90, および CD146 は高い発現を示した。一方で、MSCs に共通のマーカーの中で CD271, STRO-1 そして SSEA4 の発現は低かった。

### 3. コロニー形成能

コロニー形成が認められた培養 9 日目において、10 歯すべてでコロニー形成が認められた。最初に播種した 100 細胞から形成されたコロニーの比率は、46.6 ± 5.1%であった。

### 4. 細胞増殖能および細胞周期

培養細胞を播種後、2 日目から 4 および 6 日目にかけて細胞数はそれぞれ約 2 倍に増加し、6 日目から 8 日目にかけては約 5 倍の増加が認められた。10 日目から 12 日目にかけては細胞数の増加は認められなかった（第 1 図）。

細胞周期の解析から、DNA 合成期の S 期における細胞数の割合は 19.4%であり、細胞分裂期である G2/M 期における 12.0%と比較して高値を示した（第 3 表）。

## 5. RT-PCR

過剰歯由来歯髄細胞において、未分化マーカーである c-Myc, Sox2, Nanog, Oct4, Klf4, Rex1 の遺伝子発現が認められた（第 2 図）。

## 6. 分化能

骨芽細胞誘導培地および増殖培地を用いた実験から、21 日間の培養の過程で両培地とも ALP 活性は上昇した（第 3 図）。骨芽細胞誘導培地で培養した細胞群は、増殖培地で培養した細胞群と比較して、誘導開始から 3 日目において高い ALP 陽性反応が観察された。その後、14 および 21 日目になると 3 および 7 日目と比較して、ALP 陽性反応がより強くなった。

骨芽細胞誘導培地では、培養 21 日目にアリザリン赤陽性の石灰化 nodule が観察されたが、増殖培地では観察されなかった。骨芽細胞誘導培地で培養した細胞群は、Ca 沈着量がコントロール群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.01$ )（第 4 図）。

脂肪細胞誘導培地で培養した細胞では、培養 46 日目にオイルレッド O 陽性細胞が観察された（第 5 図）。しかし、陽性細胞数は 1 培養ディッシュあたり 1~2

個であった。

## 考察

過剰歯の歯髄に MSCs が存在していることを、2008年に Huang ら<sup>20)</sup>が初めて報告した。2011年には Lee ら<sup>21)</sup>が過剰歯歯髄由来の MSCs と乳歯歯髄由来の MSCs の特性を比較した結果を報告している。それらの研究で、過剰歯歯髄由来の MSCs はコロニー形成能ならびに細胞増殖能において乳歯歯髄由来の MSCs に劣るものの、フローサイトメトリーによる幹細胞マーカーの発現、細胞形態および多分化能は類似した特性があることが報告された。正中過剰歯は、小さい円錐形の歯冠部と短い単根管からなるものが多く、60~80%が埋伏歯である<sup>6,7,19,22,23)</sup>。今回の研究で用いた過剰歯は、10歯中6歯の歯冠が円錐状の形態を示し、残りの4歯が犬歯様の形態を示した。過剰歯の形態が通常の乳歯や永久歯と異なる場合には、歯髄内の MSCs の特性も異なることが推測されるが、正中過剰歯由来の MSCs の特性についての検討はされていない。そこで本研究では、これら正中過剰歯10歯を用いて、過剰歯の歯髄由来細胞の特性を検討した。

Huang ら<sup>20)</sup>の研究において、過剰歯の歯髄由来細胞はコロニー形成能、骨芽細胞および脂肪細胞への多分化能、および Nanog, Rex1 および Oct4 の遺伝子の発現が報告されている。そこで、本研究においても同様に、歯髄から外生した細胞を用いて、表面抗原、コロニー形成能、細胞増殖能、未分化マーカーの

発現および分化能について解析した。本研究でもすべての症例においてコロニー形成能が認められ、骨芽細胞誘導培地を用いて培養を行うと、ALP 染色及びアリザリン赤染色において陽性反応を示したことより、骨芽細胞あるいは象牙芽細胞への分化が誘導されたことが確認された。一方で、脂肪細胞へ分化誘導した場合、オイルレッド O 染色に陽性を示す細胞は、各培養ディッシュあたり 1～2 個しか認められなかった。過去の研究では、過剰歯の歯髄由来 MSCs を脂肪細胞に分化誘導すると、オイルレッド O 陽性細胞が多数観察されることが報告されている<sup>20,21)</sup>。本実験で用いた細胞群は脂肪細胞に分化する能力が低く、骨芽細胞もしくは象牙芽細胞への分化能力が高かったことから、本研究で用いた歯髄細胞は硬組織形成細胞としての性格を強く帯びていると示唆された。

永久歯および乳歯歯髄由来の MSCs では、Oct4、Sox2、Nanog および Rex1 等の未分化マーカーの遺伝子発現が認められている<sup>24-27)</sup>。今回の研究でも、これらすべての遺伝子の発現が認められた。さらに、フローサイトメトリーの解析を行ったところ、歯髄に特徴的な間葉系幹細胞のマーカーである CD146<sup>28-32)</sup> の発現が認められた。これらの結果は、MSCs の特性を有する細胞が過剰歯の歯髄に存在することを示している。

以上のことから、今回実験に用いた過剰歯 10 歯の歯髄組織から外生によって得た間葉系細胞群には、硬組織形成細胞に分化しうる MSCs が含まれ、*in vivo*

においては象牙芽細胞に分化すると示唆された。

## 結論

正中過剰歯 10 歯由来の歯髄細胞の特性を明らかにすることを目的に実験を行い、以下の結果および結論を得た。

1. 細胞表面抗原 CD13, CD44, CD73, CD90 および CD146 の発現は高かったが、CD271, STRO-1, SSEA4 の発現は低かった。
2. 10 歯全例でコロニー形成能と高い細胞増殖能が認められた。
3. c-Myc, Sox2, Nanog, Oct4, Klf4, Rex1 の遺伝子発現が認められた。
4. 骨芽細胞および脂肪細胞への分化能が認められた。

以上から、正中過剰歯歯髄由来の間葉系細胞群には、硬組織形成細胞に分化しうる MSCs が含まれると示唆された。

## 文献

- 1) Yang XF (2007) Immunology of stem cells and cancer stem cells. *Cell Mol Immunol* 4, 161-171.
- 2) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
- 3) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13625-13630.
- 4) Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5807-5812.
- 5) Brook AH (1975) Variables and criteria in prevalence studies of dental anomalies of number, form and size. *Community Dent Oral Epidemiol* 3, 288-293.
- 6) Fardi A, Kondylidou-Sidira A, Bachour Z, Parisi N, Tsirlis A (2011) Incidence of impacted and supernumerary teeth-a radiographic study in a North Greek population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16, e56-61.



- 7) Ferres-Padro E, Prats-Armengol J, Ferres-Amat E (2009) A descriptive study of 113 unerupted supernumerary teeth in 79 pediatric patients in Barcelona. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14, E146-152.
- 8) Leco Berrocal MI, Martin Morales JF, Martinez Gonzalez JM (2007) An observational study of the frequency of supernumerary teeth in a population of 2000 patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12, E134-138.
- 9) Rajab LD, Hamdan MA (2002) Supernumerary teeth: review of the literature and a survey of 152 cases. *Int J Paediatr Dent* 12, 244-254.
- 10) Hyun HK, Lee SJ, Lee SH, Hahn SH, Kim JW (2009) Clinical characteristics and complications associated with mesiodentes. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 2639-2643.
- 11) Alaejos C, Contreras MA, Buenechea R, Berini L, Gay C (2000) Mesiodens: a retrospective study of 44 patients. *Med Oral* 5, 81-88.
- 12) Fernandez MP, Valmaseda CE, Berini AL, Gay EC (2006) Retrospective study of 145 supernumerary teeth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11, E339-344.
- 13) Gallas MM, Garcia A (2000) Retention of permanent incisors by mesiodens: a family affair. *Br Dent J* 188, 63-64.

- 14) D'Souza RN, Klein OD (2007). Unraveling the molecular mechanisms that lead to supernumerary teeth in mice and men: current concepts and novel approaches. *Cells Tissues Organs* 186, 60-69.
- 15) Fleming PS, Xavier GM, DiBiase AT, Cobourne MT (2010) Revisiting the supernumerary: the epidemiological and molecular basis of extra teeth. *Br Dent J* 208, 25-30.
- 16) Cobourne MT, Sharpe PT (2010) Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula. *Semin Cell Dev Biol* 21, 314-324.
- 17) Solares R, Romero MI (2004) Supernumerary premolars: a literature review. *Pediatr Dent* 26, 450-458.
- 18) Rajab LD, Hamdan MA (2002) Supernumerary teeth: review of the literature and a survey of 152 cases. *Int J Paediatr Dent* 12, 244-254.
- 19) Garvey MT, Barry HJ, Blake M (1999) Supernumerary teeth--an overview of classification, diagnosis and management. *J Can Dent Assoc* 65, 612-616.
- 20) Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW (2008) Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J*

Oral Pathol Med 37, 571-574.

21) Lee S, An S, Kang TH, Kim KH, Chang NH, Kang S, Kwak CK, Park HS (2011) Comparison of mesenchymal-like stem/progenitor cells derived from supernumerary teeth with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Regen Med* 6, 689-699.

22) Stellzig A, Basdra EK, Komposch G (1997) Mesiodentes: incidence, morphology, etiology. *J Orofac Orthop* 58, 144-153.

23) 福本敏 (2011) 歯の異常. 小児歯科学. 第 4 版, 高木裕三, 田村康夫, 井上美津子, 白川哲夫編, 医歯薬出版株式会社, 東京, 67-68.

24) Miyoshi K, Tsuji D, Kudoh K, Satomura K, Muto T, Itoh K, Noma T (2010) Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa, *J Biosci Bioeng* 110, 345-350.

25) Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, Totey S, Bhonde RR, Abu Kasim NH (2010) Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod* 36, 1504-1515.

26) Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F (2012) Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media

containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum. PLoS One 7, e48945.

27) Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 25, 2739-2749.

28) Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, Fatica A, Negrini M, Peschle C, Valtieri M (2008) Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. Exp Hematol 36, 1035-1046.

29) Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992) Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone 13, 69-80.

30) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8, 315-317.

31) Bardin N, George F, Mutin M, Brisson C, Horschowski N, Frances V,

Lesaule G, Sampol J (1996) S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens* 48, 531-539.

32) Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Peault B (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301-313.

## 表および図

第1表 RT-PCR法で用いたプライマーおよび条件

Primers	Sequence	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Accession No.
c-Myc	F 5'- GCG TCC TGG GAA GGG AGA TCC GGA GC-3' R 5'- TTG AGG GGC ATC GTC GCG GGA GGC TG-3'	328	58	NM_002467
Sox2	F 5'-GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG-3' R 5'-TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG-3'	151	60	NM_003106
Nanog	F 5'-TTG GAA GCT GCT GGG GAA G-3' R 5'-GAT GGG AGG AGG GGA GAG GA -3'	193	60	NM_024865
Oct4	F 5'-GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG-3' R 5'-CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC-3'	144	61	NM_002701
Klf4	F 5'-ACG ATC GTG GCC CCG GAA AAG GAC C-3' F 5'- TGA TTG TAG TGC TTT CTG GCT GGG CTC C-3'	397	58	NM_004235
Rex1	F 5'-CAG ATC CTAAAC AGC TCG CAG AAT-3' R 5'-GGAAACCTCTCTCGCCTCTT-3'	306	57	AF450454
$\beta$ -actin	F 5'-TTC CAG CCT TCC TTC CTG G-3' R 5'- TTG CGC TCA GGA GGA GCAA-3'	224	60	NM_001101.3

F: Forward R: Reverse

第2表 表面抗原の陽性率

	CD13	CD14	CD34	CD44	CD45	CD73	CD90	CD146	CD271	STRO-1	SSEA4
%	93.6	0.29	0.09	99.2	0.34	96.1	96.7	95.5	0.86	0.19	0.97

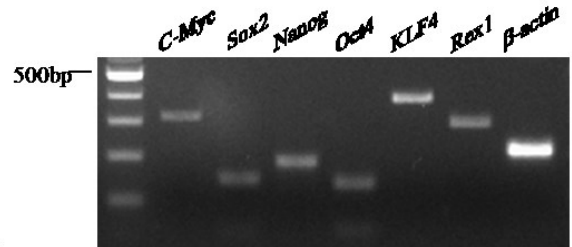
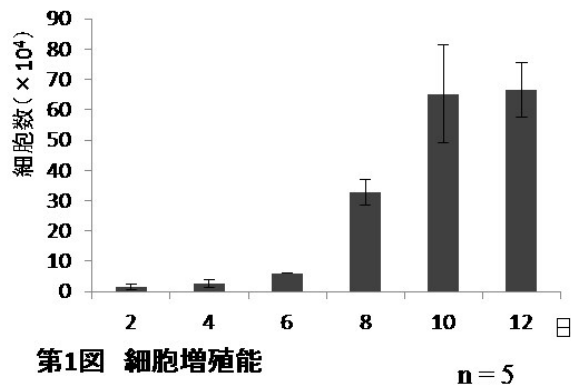
代表例1例を示す

第3表 EdUを用いた増殖能の評価

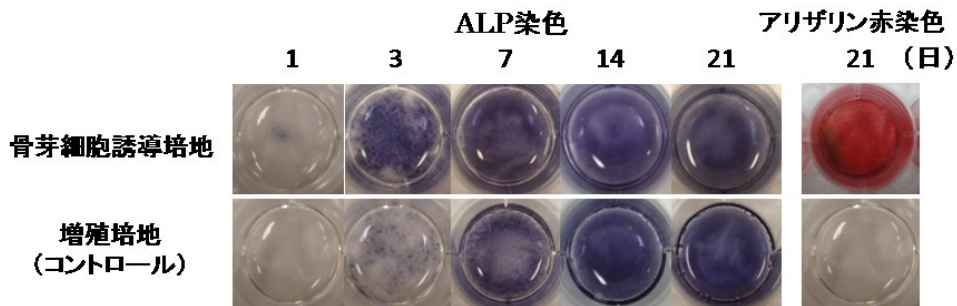
G0/1	59.9
S	19.4
G2/M	12.0

(%)

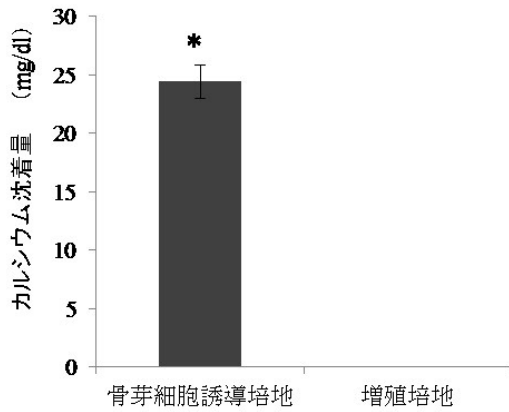
代表例1例を示す



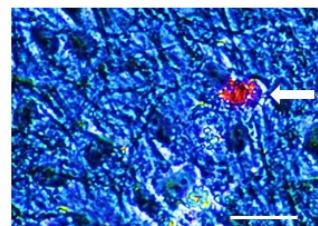
第2図 RT-PCR解析  
代表例1例を示す



第3図 骨芽細胞への分化誘導  
代表例1例を示す



第4図 カルシウム定量試験  
\*P < 0.01 (n = 6)



第5図 脂肪細胞への分化誘導  
矢印: オイルレッドO陽性細胞  
scale bar = 20 μm  
代表例1例を示す