

石灰化分化誘導培地を用いて作製したECM含有 β -TCPがラット骨髄間葉系幹細胞に与える影響

吉田賢二 岩崎和人 根本賢治 出口眞二
神奈川歯科大学大学院歯周組織再生学講座

Osteoinduction of β -tricalcium phosphate containing extracellular matrix.

Kenji YOSHIDA, Kazuto IWASAKI, Kenji NEMOTO, and Shinji DEGUCHI
Department of Periodontal regeneration, Kanagawa Dental University Graduate School

キーワード

β -TCP 細胞外マトリックス 歯槽骨骨膜由来細胞 骨髄間葉系幹細胞

ランニングタイトル

細胞外マトリックス含有 β -TCPの骨誘導能

Abstract

We assessed the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) in beta-tricalcium phosphate (β -TCP) blocks containing extracellular matrix (ECM) produced by human alveolar bone periosteal cells (HABPCs) in osteogenic differentiation medium. HABPCs were cultured in the blocks for 1 week (group 1) and 2 weeks (group 2). We then created β -TCP blocks containing ECM by drying both groups of cells. BMSCs were cultured in both groups' β -TCP blocks containing ECM for 2 weeks. In the control group, BMSCs were cultured in the β -TCP blocks alone for 2 weeks. A significantly higher number of HABPCs was observed in group 2 compared to group 1. HABPCs produced several bone matrix proteins, and these positive reactions in group 2 were significantly higher than in group 1. Both test groups

indicated a significantly higher number of BMSCs than the control group. BMSCs produced osteopontin and osteocalcin, and these positive reactions were significantly higher in both test groups compared to the control group. The numbers of osteocalcin-positive reactions were higher in group 2 than in group 1. The osteogenic differentiation of BMSCs in the group 2 β -TCP blocks containing ECM was significantly higher compared to the other BMSCs.

要 旨

我々は石灰化分化誘導培地を用いて培養したヒト歯槽骨骨膜由来細胞（HABPCs）が産生した細胞外マトリックスを含有した β リン酸三カルシウム（ β -TCP）が骨髄由来間葉系幹細胞（BMSCs）に与える影響について評価した。HABPCs は β -TCP 内にて 1 週間（Group 1）あるいは 2 週間（Group 2）培養された。Group 1 および Group 2 の β -TCP を乾燥させる事によって細胞外マトリックス含有 β -TCP を作製した。BMSCs を Group 1 および Group 2 の細胞外マトリックス含有 β -TCP 内にて 2 週間培養したものを実験群とし、 β -TCP 単体内にて BMSCs を 2 週間培養したものをコントロール群とした。HABPCs は Group 1 と比較して Group 2 にて有意に多く β -TCP 内に観られた。HABPCs は β -TCP 内にて様々な骨基質タンパクを産生しており、それらの陽性反応は Group 1 と比較して Group 2 にて有意に多く認められた。BMSCs は両実験群においてコントロール群と比較して有意に多く認められた。BMSCs は細胞外マトリックス含有 β -TCP 内にて Ki-67 やオステオポンチン（OP）やオステオカルシン（OC）を産生しており、その陽性反応は実験群においてコントロール群よりも有意に多く、特に OP と OC の陽性反応は Group 1 と比較して Group 2 で有意に多く認められた。これらのことから、Group 2 の細胞外マトリックス含有 β -TCP 内の BMSCs はその他の群よりも骨形成系細胞に分化している事が示唆された。

解説文

本研究は石灰化分化誘導培地を用いて培養したヒト歯槽骨骨膜由来細胞が産生した細胞外マトリックスを含有した β リン酸三カルシウムが骨髄由来間葉系幹細胞に与える影響について評価した。その結果、骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進させることが示唆されたのでここに報告する。

諸 言

歯周組織再生療法においてこれまで様々な研究が行われ、臨床に応用されてきた。Vacanti と Langer は再生医療の三要素として細胞、足場、シグナル分子を提唱した¹⁾。現在、細胞としては骨芽細胞や未分化間葉系幹細胞などが、足場としてはI型コラーゲン (Col-I) やβリン酸三カルシウム (β-TCP) などが、シグナル分子としては血小板由来成長因子や塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) などが挙げられ、単体または複数の組み合わせによって再生医療の研究に用いられている^{2,3)}。

自家骨移植は細胞、足場、シグナル分子という再生療法の三要素の全てを有しており、骨誘導能を持った歯周組織再生療法の gold standard とされている。しかしながら、その採取量には限界があり、また採取部位における術後疼痛、採取による術中時間の延長といった欠点が存在する⁴⁾。

細胞はその増殖や分化の過程において様々な細胞外マトリックスを産生する。特に骨芽細胞からは Col-I, 非コラーゲン性タンパク、プロテオグリカンなどが産生される。細胞外マトリックスは細胞に対し、足場として働くだけでなく、生存、増殖、形態変化、遊走や分化を調節する役割もある。Col-I は細胞基質の石灰化に働き⁵⁾、未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化において骨形成タンパク (BMP) や Runt-related transcription factor 2 (Runx2) は大きな役割を果たす^{6,7,8)}。

一方、未分化間葉系幹細胞は周囲環境や培養条件によって様々な細胞に分化することが知られている^{9,10)}。未分化間葉系細胞は骨髄、脂肪、軟骨などに存在しており、特に骨髄より採取した骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow stromal cells : BMSCs) を用いた様々な研究が行われている。Dexamethasone (Dex), β-glycerophosphate (β-GP) は未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へと分化させ、アルカリフォスファターゼ (ALP) やオステオカルシン (OC) の発現を促進させる働きがある¹¹⁾。Müller らはヒト間葉系幹細胞を石灰化分化誘導培地 (osteogenic differentiation medium : ODM) で培養したところ骨芽細胞へと分化したと報告し¹²⁾、また Ozono らはラット背部に b-FGF, 17β-estradiol と Dex を添加した培地内で培養した BMSCs を β-TCP と共に移植し、骨形成が観られたと報告している¹⁰⁾。

一方、患者の細胞を採取・培養し、その細胞を用いて再生療法を行う方法が研究されている。Okuda らはヒト歯槽骨骨膜を培養した培養骨膜シートを作製し、臨床において応用し¹³⁾、Ueno らは自家骨膜と自家骨髄移植において皮質骨と骨髄様組織の形成が起きたと報告している¹⁴⁾。

これまで我々は β-TCP 内で培養した HABPCs が細胞外マトリックスとして ALP や Runx2 などの骨芽細胞分化マーカーや、オステオポンチン (OP) や OC などの骨基質タンパクを産生し、それを乾燥させた細胞外マトリックス含有 β-TCP は BMSCs の骨形成系細胞への分化を促進することを明らかにしてきた¹⁵⁾。

今回、ODM を用いて β-TCP 内にてヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (human alveolar bone

periosteal cells : HABPCs) を培養し、それを乾燥させた細胞外マトリックス含有 β -TCP が BMSCs の骨形成系細胞への分化に与える影響について免疫組織化学的に評価した。

材料および方法

1. 細胞培養

本研究は、神奈川県立歯科大学附属病院に来院した歯周病患者を対象に行った。神奈川県立歯科大学倫理委員会の承認のもと（第 192 番）、インフォームドコンセントを得た上で、45 歳から 53 歳の 4 人の患者より歯周外科処置時に部分層弁にて歯肉剥離を行い、歯槽骨上にある組織を 3×3 mm 採取した。採取した組織を骨膜片とし、細分化した後、Cell culture slip (Thermanox Plastic : Nalge Nunc International, USA) にて骨膜片を押さえることにより、静置した状態を保ち培養した。その後、細分化した骨膜片から遊走してきた細胞を HABPCs の初代培養細胞とし、実験に供した。初代 HABPCs がコンフルエントに達した後、0.25% trypsin (ニッスイ, 東京) にて処理し、細胞密度を 1.8×10^4 cells/cm² に調整し、37°C, 5% CO₂ 下にて継代培養を行い使用した。細胞培養液は、 α -minimum essential medium (Gibco, USA) に 10% fetal calf serum (Thermo Trace, Australia), 0.25mM の L-ascorbic acid 2-phosphate (和光純薬, 大阪), 100units/mL penicillin (Gibco), 100 μ g/mL streptomycin (Gibco), 3.5mg/mL D-glucose (和光純薬) を添加したものを通常培地とし、2 日間毎に培地交換を行った。通常培地に 10nM の Dex (和光純薬), 10mM β -GP (和光純薬) を添加したものを ODM として使用した。

また、神奈川県立歯科大学動物実験指針に従い、7 週齢の Fisher 系雄ラット (F344, 日本クレア, 東京) をペントバルビタール・Na (ネンブタール, 大日本製薬, 大阪) の過剰投与により安楽死させ、大腿骨を摘出後、両端の大腿骨頸部で切除し、1mL の通常培地を注射筒で押し出し骨髄を採取した。その後、骨髄に対して 10mL の培養液で浮遊させ、細胞懸濁液を作製した。骨髄細胞は 100-mm culture dish に播種し、37°C, 5% CO₂ 下にてインキュベータ内で 3 日間培養した。培養した骨髄細胞に、4mL の培養液を 2 回加えた後、遊離細胞を除去し、付着細胞をさらに培養した。7 日間培養したものを初代 BMSCs とした。その後、細胞密度を 0.9×10^4 cells/cm² に調整し継代培養を行った。なお本研究はヘルシンキ宣言を遵守し行った。

2. β -TCP 内への HABPCs の播種

我々は $5 \times 5 \times 5$ mm の β -TCP (オスフェリオン, オリンパステルモバイオマテリアル, 東京) 内に Hasegawa らの方法¹⁰⁾を改変し HABPCs を播種した。つまり 5×10^5 cells/mL に調整した細胞懸濁液 1.5mL を満たした 5mL シリンジ (テルモシリンジ, テルモ, 東京) 内に β -TCP を入れ、内筒を引くことでシリンジ内部を陰圧にし、バイブレーターにて振動させることにより β -TCP 内の気泡を除去し、細胞を播種した。この処置を 4 回繰り返した。その後、 β -TCP をシリンジ内から取り出し、24-well culture dish に静置

し、上方より前述の細胞懸濁液を滴下し細胞播種を行い、37°C、5% CO₂下で培養を行った。ODM を用いて2日毎に培地を交換し、1週間および2週間の培養を行い、それぞれ Group 1, Group 2 の HABPCs/β-TCP とした (n=4)。

3. 細胞外マトリックス含有 β-TCP の作製

Group 1 および Group 2 の HABPCs/β-TCP を 37°C、5% CO₂下で3日間乾燥させることにより細胞を死滅させ、それぞれ Group 1, Group 2 の細胞外マトリックス含有 β-TCP とし、実験に使用した。

4. 細胞外マトリックス含有 β-TCP への BMSCs の播種

5×10⁵ cells/mL に調整した BMSCs の細胞懸濁液 1.5mL を満たしたシリンジ内に Group 1 および Group 2 の細胞外マトリックス含有 β-TCP を入れ、前述の通り細胞を播種した。その後、細胞外マトリックス含有 β-TCP をシリンジ内から取り出し、24-well culture dish に静置し、通常培地を用いて2日毎に培地を交換し、2週間培養を行ったものをそれぞれ Group 1 および Group 2 の BMSCs/β-TCP-ECM とした。培養終了後、通法に従い固定を行い組織学的検索および免疫組織学的検索を行った (n=4)。

また、β-TCP 内に BMSCs を播種し、通常培地にて2週間培養したものを Control として同様に組織学的、免疫組織学的検索を行った (n=4)。

5. 組織学的検索

HABPCs/β-TCP および BMSCs/β-TCP-ECM を 4% 中性緩衝パラホルムアルデヒド水溶液 (和光純薬) にて8時間固定し、その後パラフィン包埋を行いマイクロームにて厚さ 4~10 μm の切片を作製した。作製した切片をキシレン (和光純薬) および 100%, 95%, 90%, 80%, 70% エタノール (和光純薬) を用いて順次脱パラフィンを行い、HE 染色を行った。染色後、光学顕微鏡 (BX-53, オリンパス, 東京) にて HABPCs/β-TCP ではブロック中心部の小孔の観察を行い、BMSCs/β-TCP-ECM では表層の小孔の観察を行った。

6. 免疫組織学的検索

組織学的検索と同様に切片を作製し、脱パラフィン後に 10% 正常ヤギ血清 (normal goat serum : NGS) にてブロッキングを行った。一次抗体は、HABPCs/β-TCP には抗ヒト ALP マウスモノクローナル抗体 (1/10 : R&D Systems, USA), 抗ヒト Runx2 ラビットポリクローナル抗体 (1/50 : Abnova, USA) 抗ヒト Col-I マウスモノクローナル抗体 (1/50 : 第一ファインケミカル, 富山), 抗ヒト OP ラビットポリクローナル抗体 (1/1500 : CHEMICON INTERNATIONAL, USA), 抗ヒト OC ラビットポリクローナル抗体 (1/25 : Abd serotec, USA) を用い、BMSCs/β-TCP-ECM には抗ラット Ki-67 マウスモノクロー

ナル抗体 (1/50 : DakoCytomation, USA), 抗ラット OP ラビットポリクローナル抗体 (1/200 : BIOSS, USA), 抗ラット OC マウスモノクローナル抗体 (1/400 : Enzo Life Sciences, USA) を用い, 4°Cにて1晩反応させ, 二次抗体は Alexa fluor 488 マウス IgG および Alexa fluor 488 ラビット IgG (Dako Cytomation) を用いて, 室温にて1時間反応させた。観察は蛍光顕微鏡 (BH-2, オリンパス, 東京) を用い, 表層の小孔について行った。

7. 統計学的検索

HABPCs/ β -TCP における細胞数, ALP, Col-I, Runx2, OP, OC の陽性反応数および BMSCs/ β -TCP-ECM における細胞数, Ki-67, OP, OC の陽性反応数を平均化し, 市販の統計ソフト (Dr. SPSS II 11.0.1, SPSS, 東京) を用い HABPCs/ β -TCP については Levene test による等分散性の検定を行った後に, 分散が等しい場合には Student の t 検定を, 分散が等しくない場合には Aspin-Welch の t 検定を行い, BMSCs/ β -TCP-ECM については一元配置分散分析 (analysis of variance : ANOVA) の後に Sheffe 検定を行い, $p < 0.05$ のとき有意差ありとした。

結 果

1、組織学的所見

HABPCs/ β -TCP において, Group 1 は, 表層には多くの HABPCs の伸展が観られたが, 深部の小孔内では小孔壁表面にのみわずかに伸展していた。一方, Group 2 では, Group 1 に比較して深部の小孔内全体に HABPCs が有意に多く伸展していた (Table 1, Fig. 1A, B)。

BMSCs/ β -TCP-ECM において, Control と比較して Group 1 および Group 2 で有意に多くの細胞が β -TCP 表層の小孔内に伸展しており, また Group 1 と比較して Group 2 で有意に多かった (Table 2, Fig. 2A- C)。

2、免疫組織学的検索

HABPCs/ β -TCP では ALP, Col-I, Runx2, OP, OC の全ての陽性反応において Group 1 と比較して Group 2 にて有意に多く認められた (Table 1, Fig. 1C- L)。

BMSCs/ β -TCP-ECM では Ki-67 陽性反応は Group 1, Group 2 において Control と比較して有意に多く認められた。

OP および OC の陽性反応は Group 1, Group 2 において Control と比較して有意に多く認められ, また Group 2 では Group 1 と比較して有意に多く観られた (Table 2, Fig. 2D- L)。

考 察

今回、我々は細胞外マトリックスを含有した新しい移植材の開発を目的として、ODMを用いて作製した細胞外マトリックス含有 β -TCP が BMSCs に与える影響を検索し、BMSCs の骨芽細胞への分化を促進させることを示した。

骨表面を覆う結合組織である骨膜には骨芽細胞やその前駆細胞が存在している。骨膜は MSCs の細胞ソースとして、軟骨内骨化や骨折治癒において直接的に関与する¹⁷⁾。骨膜に含まれる前駆細胞は骨系、軟骨系、脂肪系への分化能力を持っている¹⁸⁾。軟骨治癒において、stromal cell-derived factor-1 の働きにより骨膜内の前駆細胞は胚様の状態に戻り、また MSCs の動員を行う¹⁹⁾。また、歯槽骨骨膜は歯根膜や骨組織に比較して、より比較的低侵襲で採取できる組織であるため、今回我々は歯槽骨骨膜組織から遊出した HABPCs を使用した。

現在、臨床において使用される人工骨としては HA や β -TCP が挙げられる。両者はともに生体親和性、骨伝導能を持つリン酸カルシウムの人工骨であるが、生体内において HA は移植後 10 年以上経過してもほとんど吸収されないのに対し、 β -TCP は経時的に吸収され、それに伴い骨のリモデリングが生じる^{20,21,22,23)}。そのため、今回我々は足場材として β -TCP を選択した。

Hasegawa らはシリンジを用いた方法が最も β -TCP 内部に効率的に細胞を播種できると報告し¹⁶⁾、我々はその方法を改変し使用した。HABPCs/ β -TCP の Group 1 では β -TCP 深部にわずかな細胞しか観られなかったのに対し、Group 2 では深部の小孔内に多くの細胞が認められた。このことから HABPCs が β -TCP 深部にまで十分伸展するには 2 週間程度の培養期間が必要であることが示された。

今回、ODM を用いて β -TCP 内部にて培養した HABPCs は細胞外マトリックスとして骨基質タンパクである Col-I, OP, OC や骨芽細胞の分化マーカーである ALP を産生し、その傾向は Group 1 と比較して Group 2 で有意に多く観られた。また、Runx2 の陽性反応も Group 1 と比較して Group 2 で有意に多く観られた。Runx2 は間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化の早期においては促進に働くが、分化の後期においては抑制に働き、また、Runx2 は Col-I, OP, 骨シアロタンパク, OC などの骨基質タンパク質の発現を調節している。^{24,25,26,27)}。我々は β -TCP 内にて HABPCs が産生した Runx2 が、BMSCs の骨芽細胞への分化を促進させ、OP, OC の産生を誘導したのではないかと考えている。

BMSCs/ β -TCP-ECM において β -TCP 内部に BMSCs が伸展しており、細胞増殖マーカーである Ki-67 の活性が観られたことから細胞外マトリックス含有 β -TCP は、BMSCs に対する細胞傷害性が低く、内部に BMSCs が侵入、伸展、増殖することが示された。

骨芽細胞はその分化段階によって様々な特異的遺伝子を発現する。すなわち前骨芽細胞においては Col-I と ALP を、未熟骨芽細胞においては OP と骨シアロタンパクを、そして成熟骨芽細胞では OC の発現が観られる^{9,28,29,30)}。よって、我々は OP, OC の発現を観察することにより、BMSCs の骨芽細胞への分化程度を観察することができると考えた。今回、細胞外マトリックス含有 β -TCP 内部において BMSCs の産生した OP およ

び OC の陽性反応が観られたことから、BMSCs が未成熟骨芽細胞や成熟骨芽細胞に分化していると考えられた。

細胞外マトリックスは間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を誘導する。また、BMSCs は多分化能を有している。それゆえ我々は細胞外マトリックス含有 β -TCP の骨伝導能を評価する為に BMSCs をブロック内に播種した。今回、Control と比較して Group 1 と Group 2 の方が OP, OC の陽性反応が有意に多く観られ、また Group 1 と比較して Group 2 において有意に多く認められた。これらのことから、ODM を用いて培養した HABPCs 由来の細胞外マトリックスが BMSCs の骨芽細胞への分化を促進させることが示唆され、BMSCs の分化は細胞外マトリックスが多く産生されている Group 2 でより著明であった。

結論として、 β -TCP 内にて ODM を用いて培養した HABPCs は骨基質に含まれる細胞外マトリックスを産生し、それを乾燥させた細胞外マトリックス含有 β -TCP は BMSCs の骨芽細胞への分化を促進させることが示唆された。

今後、免疫不全動物を用いた *in vivo* の研究において、細胞外マトリックス含有 β -TCP がどのような影響を及ぼすのかを検討する必要があると考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、材料提供をいただいたオリンパス社に深く感謝いたします。

本論文の要旨は神奈川歯科大学学会第 142 回例会（2013 年 10 月 10 日）において発表した。

参考文献

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* **260**: 920- 926, 1993.
2. Wikesjö UM, Sorensen RG, Kinoshita A, Jian Li X, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human bone morphogenetic protein-12 (rhBMP-12) on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol* **31**: 662- 670, 2004.
3. Lee JS, Wikesjö UM, Jung UW, Choi SH, Pippig S, Siedler M, *et al.* Periodontal wound healing/regeneration following implantation of recombinant human growth/differentiation factor-5 in a beta-tricalcium phosphate carrier into one-wall intrabony defects in dogs. *J Clin Periodontol* **37**: 382- 389, 2010.
4. Haberstroh K, Ritter K, Kuschnierz J, Bormann KH, Kaps C, Carvalho C, *et al.* Bone repair by cell-seeded 3D-bioploted composite scaffolds made of collagen treated tricalciumphosphate or tricalciumphosphate-chitosan-collagen hydrogel or PLGA in ovine critical-sized calvarial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **93**: 520- 530, 2010.

5. Pham MT, Reuther H, Maitz MF. Native extracellular matrix coating on Ti surfaces. *J Biomed Mater Res A* **66**: 310- 316, 2003.
6. Ong JL, Bess EG, Bessho K. Osteoblast progenitor cell responses to characterized titanium surfaces in the presence of bone morphogenetic protein-atelopeptide type I collagen in vitro. *J Oral implantol* **25**: 95- 100, 1999.
7. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* **23**: 4315- 4329, 2004.
8. Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem* **95**: 445- 453, 2005.
9. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* **48**: 913- 927, 1999.
10. Ozono S, Fujita T, Matsuo M, Todoki K, Ohtomo T, Negishi H, *et al.* Co-treatment with basic fibroblast growth factor and 17beta-estradiol in the presence of dexamethasone accelerates bone formation by rat bone marrow stromal cell culture. *J Jpn Prosthodont Soc* **52**: 366- 374, 2008.
11. Igarashi M, Kamiya N, Hasegawa M, Kasuya T, Takahashi T, Takagi M. Inductive effects of dexamethasone on the gene expression of Cbfa1, Osterix and bone matrix proteins during differentiation of cultured primary rat osteoblasts. *J Mol Histo* **35**: 3- 10, 2004.
12. Müller P, Bulnheim U, Diener A, Lüthen F, Teller M, Klinkenberg ED, *et al.* Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* **12**: 281- 91, 2008.
13. Okuda K, Yamamiya K, Kawase T, Mizuno H, Ueda M, Yoshie H. Treatment of human infrabony periodontal defects by grafting human cultured periosteum sheets combined with platelet-rich plasma and porous hydroxyapatite granules: case series. *J Int Acad Periodontol* **11**: 206–213, 2009.
14. Ueno T, Honda K, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Shirasu N, Sawaki M, *et al.* Histological comparison of bone induced from autogenously grafted periosteum with bone induced from autogenously grafted bone marrow in the rat calvarial defect model. *Acta Histochem* **110**: 217-223, 2008.
15. Iwasaki K, Munemasa N, Tago K, Nemoto K, Tsujigami H, Sugaya A, *et al.* The influence of beta-tricalcium phosphate blocks containing extracellular matrix on the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *J Periodontol* **84**: 1484- 1492, 2013.
16. Hasegawa T, Miwa M, Sakai Y, Niikura T, Lee SY, Oe K, *et al.* Efficient cell-seeding into scaffolds improves bone formation. *J Dent Res* **89**: 854- 859, 2010.
17. Caron MM, Emans PJ, Surtel DA, Cremers A, Voncken JW, Welting TJ, *et al.* Activation

- of NF- κ B/p65 facilitates early chondrogenic differentiation during endochondral ossification. *PLoS One* **7**: e33467, 2012.
18. Choi YS, Noh SE, Lim SM, Lee CW, Kim CS, Im MW, *et al.* Multipotency and growth characteristic of periosteum-derived progenitor cells for chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Biotechnol Lett* **30**: 593- 601, 2008.
 19. Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, *et al.* Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum* **60**: 813-823, 2009.
 20. Yamamoto T, Onga T, Marui T, Mizuno K. Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumours. Clinical results. *J Bone Joint Surg Br* **82**: 1117- 1120, 2000.
 21. Saito M, Shimizu H, Beppu M, Takagi M. The role of beta-tricalcium phosphate in vascularized periosteum. *J Orthop Sci* **5**: 275- 282, 2000.
 22. Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T. Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* **23**: 4493- 4502, 2002.
 23. Matsumine A, Myoui A, Kusuzaki K, Araki N, Seto M, Yoshikawa H, *et al.* Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Br* **86**: 719- 725, 2004.
 24. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerker W, *et al.* Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol* **145**: 3889- 3897, 1990.
 25. Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* **8**: 727- 738, 2005.
 26. Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* **132**: 49- 60, 2005.
 27. Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev Dyn* **236**: 1876- 1890, 2007.
 28. Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE. Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol* **166**: 220- 234, 1994.
 29. Lekic P, Sodek J, McCulloch CA. Relationship of cellular proliferation to expression of

osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res* **285**: 491- 500, 1996.

30. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* **39**: 169- 179, 1995.

Figure 1

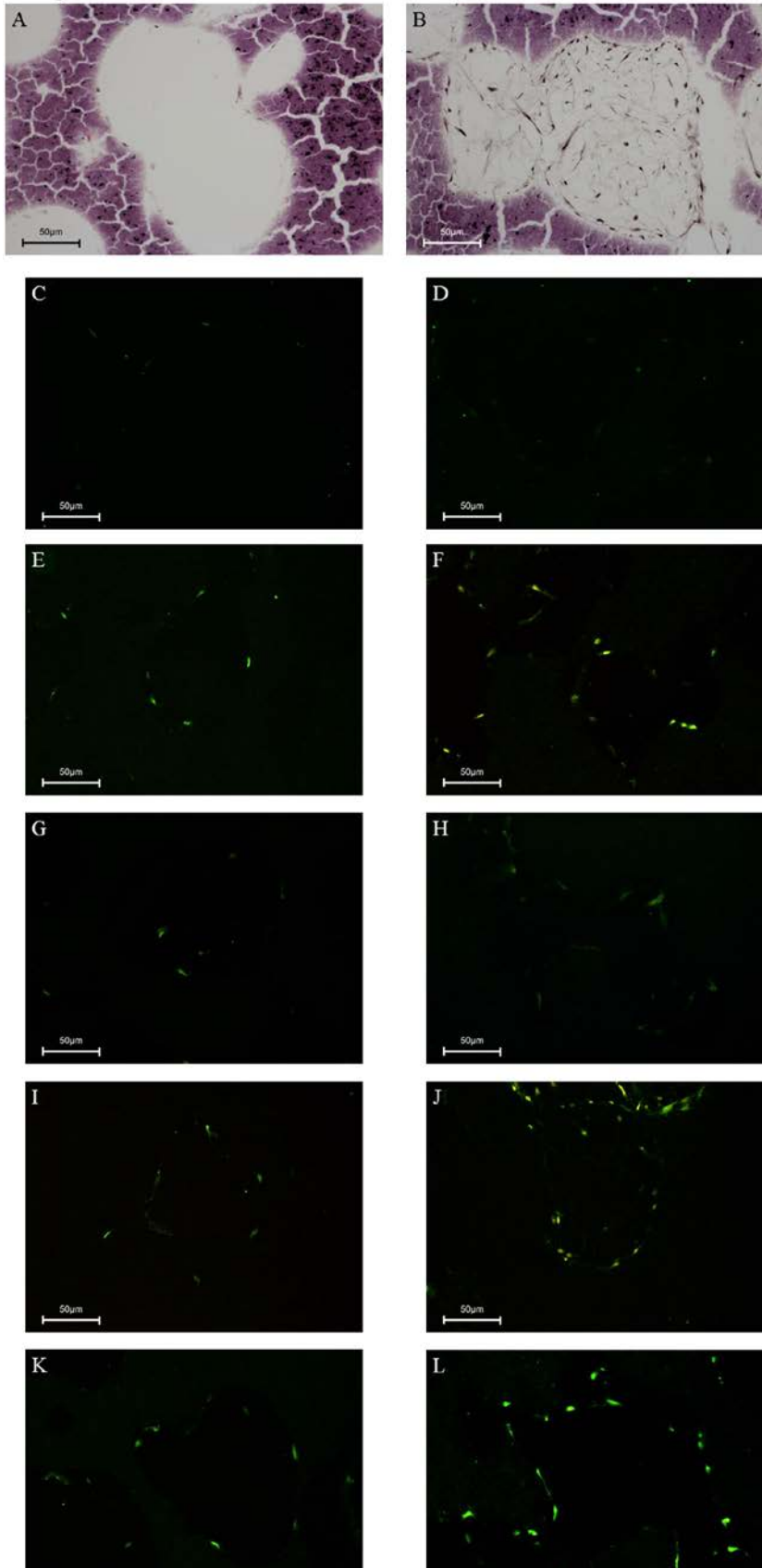


Figure 2

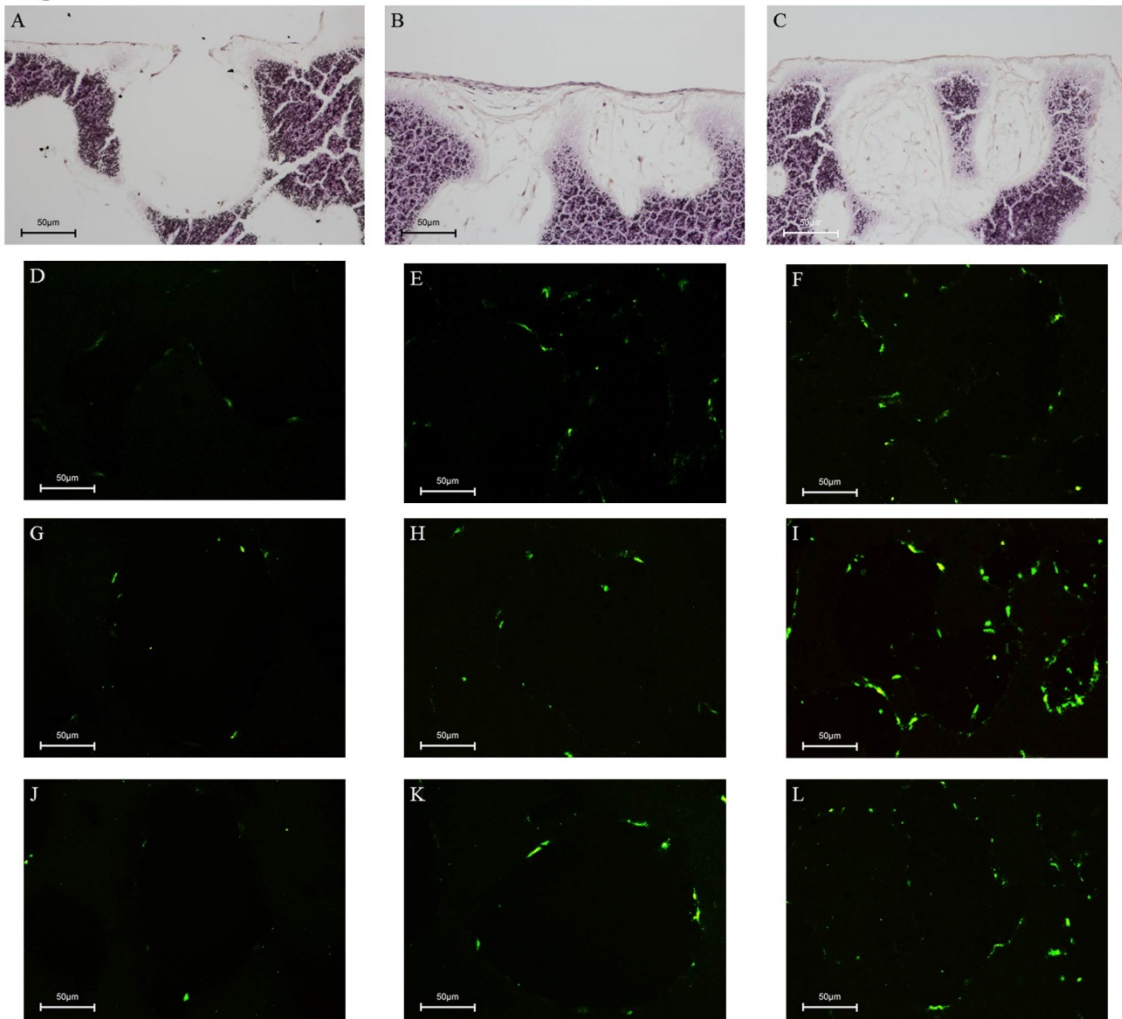


Figure legends

Figure 1. H&E stain images of the HABPCs/ β -TCP blocks from group 1 (A) and group 2 (B). Significantly higher numbers of cells extended into the pores at the core of group 2. Immunohistochemical staining showing the expression of ALP (C), Col-I (E), Runx2 (G), OP (I), and OC (K) in group 1 and ALP (D), Col-I (F), Runx2 (H), OP (J), and OC (L) in group 2 of the HABPCs/ β -TCP blocks. In group 2, all of the positive reactions were significantly higher compared to group 1. (A–L: original magnification $\times 200$, scale bar = 50 μm)

Figure 2. H&E stain images of the BMSCs/ β -TCP-ECM blocks from the control group (A), group 1 (B), and group 2 (C). Significantly higher numbers of cells extended into the core in the group 1 and group 2 blocks compared to the control group. Immunohistochemical staining showing the expression of Ki-67 (D), OP (G), and OC (J) in the control group, Ki-67 (E), OP (H), and OC (K) in group 1, and Ki-67 (F), OP (I), and OC (L) in group 2 of the BMSCs/ β -TCP-ECM blocks. In group 1, a significantly higher number of positive reactions of Ki-67 showed in the pores compared to the control group. In both group 1 and group 2, a significantly higher number of OP-positive reactions were observed in the pores compared to the control group. In group 1, a significantly higher number of positive reactions of OC showed in the pores compared to the control group. In group 2, a significantly higher number of OC-positive reactions were seen in the pores compared to group 1 and the control group. (A–L: original magnification $\times 200$, scale bar = 50 μm).

Table 1. HABPCs/ β -TCP blocks analysis

	Group 1	Group 2
Number of cells	23.3 \pm 5.1	112.5 \pm 41.8* [§]
ALP	11.4 \pm 0.9	23.1 \pm 4.2 ^{†§}
Col-I	14.7 \pm 2.5	27.4 \pm 3.5 ^{†‡}
Runx2	18.8 \pm 4.2	31.7 \pm 1.7 ^{†‡}
OP	26.6 \pm 3.2	41.4 \pm 4.9 ^{†‡}
OC	13.6 \pm 1.7	26.9 \pm 2.4 ^{†‡}

Results are mean \pm SD.

* $p < 0.05$ compared to the Group 1.

† $p < 0.01$ compared to the Group 1.

‡ Student t -test.

§ Aspin-Welch t -test.

Table 2. BMSCs/ β -TCP-ECM blocks analysis

	Control	Group 1	Group 2
Number of cells	30.3 \pm 7.0	77.0 \pm 16.8 ^{††}	101.1 \pm 6.4 ^{‡†}
Ki-67	11.8 \pm 2.3	23.4 \pm 3.7 ^{††}	25.1 \pm 2.9 ^{††}
OP	9.4 \pm 2.4	23.0 \pm 4.7 ^{††}	46.0 \pm 4.0 ^{§†}
OC	9.7 \pm 1.3	22.4 \pm 2.8 ^{*†}	42.7 \pm 7.3 ^{§†}

Results are mean \pm SD.

* $p < 0.05$ compared to the Control.

† $p < 0.01$ compared to the Control.

‡ $p < 0.05$ compared to the Group 1.

§ $p < 0.01$ compared to the Group 1.

|| ANOVA and Sheffe method.