

20030387

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

組織工学技術を用いた骨・軟骨の効果的再生による臨床研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 上田・実

平成16(2004)年4月

目 次

I. 総括研究報告書	
組織工学技術を用いた骨・軟骨の効果的効率的再生による臨床研究	-----1
上田 実	
II. 分担研究報告	
1. 歯周組織再建のための基礎研究および臨床応用	-----12
各務 秀明	
2. 未分化間葉系細胞を用いた骨再生の臨床研究	-----16
山田 陽一	
3. 超音波刺激による軟骨分化誘導促進に関する研究	-----20
鳥居 修平	
4. 細胞の大量培養システムの確立に関する研究	-----22
小林 猛之	
5. 骨組織マトリックスの作成に関する研究	-----25
高井 治	
6. 糖鎖結合型材料に関する研究	-----31
小林 一清	
7. 軟骨再生における至適材料評価に関する研究	-----33
木全 弘治	
8. マトリックスの改良および開発に関する研究	-----35
春日 敏宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----38

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨の効果的効率的再生による臨床研究

主任研究者 上田 実 名古屋大学大学院医学研究科頭頸部・感覚器外科学講座 教授

研究要旨

組織工学的手法は、生きた細胞を用いて移植組織が作製できる極めて優れた方法として世界的に注目されている。本研究は、骨、軟骨組織の再生に着目し、これら組織工学の手法を用いた骨系統疾患患者の治療方法を確立しようとするものである。本研究の特徴は、基礎的研究から臨床応用まで一貫して検討することにある。今年度は、主に骨延長部への注入型人工骨の応用や、新たな骨、軟骨再生用マトリックスの開発につながる研究などを進めている。また、培養骨膜による骨再生を大型動物疾患モデルにて行い効果を確認した後、臨床応用を開始した。軟骨再生については、関節軟骨再生の動物実験と新たな担体に関する基礎的検討を行い、臨床応用のための技術的課題の克服を目指した。本研究における骨再生の対象患者は、種々の要因にて生じた骨欠損患者で骨移植を必要とするものや、人工関節などの代替物置換を必要としているものである。また軟骨組織再生では、関節軟骨の障害に起因する膝または股関節症患者や、耳介、鼻翼欠損などの審美的問題を有するものが対象となる。本研究が完遂した際には、これらの症例に対し極めて有効な治療方法を提供できるとともに、患者一人あたりの手術回数の減少および治療期間の短縮が見込まれ、医療経済的にも有利となる。

分担研究者

各務 秀明 名古屋大学医学部組織工学講座
助教授

山田 陽一 名古屋大学医学部附属病院遺伝
子・再生医療センター 助手

鳥居修平 名古屋大学医学部形成外科 教授

小林 猛之 名古屋大学大学院工学研究科生
物機能工学専攻生物プロセス工学講座 助
教授

高井 治 名古屋大学理工科学総合研究セン
ター 教授

小林一清 名古屋大学大学院工学研究科生
物機能工学専攻生体材料工学講座 教授

木全弘治 愛知医科大学分子医科学研究所
教授

春日敏宏 名古屋工業大学工学部材料工学科
ハイブリッド機能機構学講座 助教授

A. 研究目的

国民が高度な医療を享受してゆくためには、組織工学（ティッシュエンジニアリング）を基礎としたヒト組織の再生技術とそのための基盤的技術を早急に確立させ、再生医療用製品生産に関わる産業の発展を促進させることが必要不可欠である。本研究開発では、骨、および軟骨を対象として細胞を生体中にある状態と同様に組織化し、組織・臓器の持つ高次な機能を再現するための技術を確立する。また、新たな担体の開発や再生した細胞組織の輸送、関連する各種生理活性物質の利用など、広範な分野での新規産業の創出に資することを目的としている。具体的には、近年注目されているティッシュエンジニアリング技術を用い、自家あるいは同種の骨移植にかわりうる、新しい人工骨

あるいは軟骨材料を開発し臨床応用に至る道筋を拓くことが本研究課題の主眼である。以下、本研究の具体的目標として、骨、軟骨組織に分けて述べる。

骨：本プロジェクトでは、完全生体吸収性の材料による骨、軟骨再生と、細胞の採取から移植まで、低侵襲で患者に負担をかけない再生医療の開発を目的としている。また、骨欠損部に成形することなく使用できる注入型人工骨や、培養骨膜を用いた骨再生治療の開発により、今後は個々の患者の状態や欠損の大きさ、形状に適した治療法が選択可能となることを目指している。いち早く臨床応用を行うことで患者への貢献をし、quality of life (QOL) の向上に帰依することを目的とする。今回、すでに臨床応用されている未分化間葉系幹細胞を用いた骨再生については、その基盤となる基礎的研究にも重点を置くこととし、培養骨膜については臨床応用を開始するなかで、治療方法の開発および最適化を検討していく。

軟骨：新たな関節軟骨用担体の開発により、骨膜による関節面の被覆を必要としない軟骨再生治療を確立する。これにより治療侵襲を軽減できるのみでなく、長期予後の改善にもつながる可能性がある。さらに骨・軟骨複合組織の再生は、より重篤な関節の傷害にも応用可能と考えられ、運動機能の傷害を持つ高齢者に新たな治療法を提供することが期待される。この目的のために、移植された細胞の軟骨、骨への分化を制御するための基礎的検討も合わせて行う。

B. 研究方法

骨再生に関する研究

注入型培養骨の特徴を、組織学的検討に加えて人工歯根（インプラント）との結合率、骨占有率などにおいても検討を行った。また、これ

まで行ってきた臨床症例について、臨床的評価に加えて、レントゲンの（CTなどを用いて）評価を行った。一方、培養骨膜は、そのシート状の構造のため、上記の流動型マトリックスによる骨再生が得られにくい歯周病（歯槽膿漏）患者の歯槽骨欠損への応用が可能である。本研究期間では、骨のみでなく歯根膜など歯周組織の再生についても検討を行うこととした。また、培養骨膜シートの凍結保存法や運搬法等を検討することで、臨床における実用性を高める研究も行うこととした。さらに、これまでの研究成果を生かして臨床応用を加速させていくことに重点をおく。

軟骨再生に関する研究

MSC から軟骨細胞への分化誘導法は確立しており、臨床の場で使用しやすい再生法の開発を本研究期間の課題とする。予備実験から、関節軟骨部の欠損に繊維状コラーゲンと PLA の特殊な不織布を担体として埋入することで、従来行われてきた骨膜等で関節面を被覆する方法と同等の関節面保護、癒着防止の効果が得られる可能性を見いだした。

今年度には、基礎的検討として軟骨組織再生を制御する方法についての検討を行った。特に、移植された細胞の分化に関する検討を開始するとともに、軟骨再生のための新たな担体の検討を行った。具体的には PGA, PLA に糖鎖 + BMP や FGF などの細胞増殖因子を付加したものである。これらのマトリックスに軟骨細胞を混ぜヌードマウスの背部皮下に移植を行い、2 週、4 週後の組織をアリューサンプル染色、基質アグリカン量を中心とした軟骨マーカーを指標にそれぞれのマトリックスを評価した。

（倫理面への配慮）

本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、組織採取を行う場合、手術時に余剰とな

ったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。また、動物実験については名古屋大学動物実験指針に基づき、学内動物実験委員会にて承認された内容を遵守して行った。

C. 研究結果

骨：注入型培養骨の骨再生能力を欠損のみ、自家骨、PRPのみと比較検討した。その結果、再生された骨占有率は、移植後8週目においては、 $18.3\pm 4.84\%$ (欠損のみ)、 $29.2\pm 5.47\%$ (PRP)、 $61.4\pm 3.38\%$ (自家骨)、and $67.3\pm 2.06\%$ (注入型培養骨)であった。また、インプラントとの骨結合率については $26.4\pm 9.5\%$ (欠損のみ)、 $44.2\pm 10.8\%$ (PRP)、 $49.9\pm 8.2\%$ (自家骨)、 $58.6\pm 9.7\%$ (注入型培養骨)であった。さらに、組織学的にも注入型培養骨は十分な層板構造を持った成熟した骨再生が確認された。以上の結果をもとに、臨床応用を行った。インプラントとの応用例(8例)、骨延長部への応用例(5例)、歯周病への応用例(1例)が適応され、現在経過は良好である。

一方、培養した骨膜細胞のシートを用いて、歯周疾患による骨吸収を治療する研究も行ってきた。少量の骨膜細胞を培養すると50~100umの厚みを有するシート状を呈し、これが高い骨形成能を有することにわれわれは注目した。この培養骨膜シートは骨形成能を有する膜であり、人工材料を含まず、細胞と細胞外マトリックスのみより構成される極めて生体親和性の高い移植材料である。現在までにイヌへの移植実験で、歯槽骨のみならず従来の歯周病治療法では困難とされていた、セメント質を含む歯周組織の再生が得られることを確認した。この結果を基に本年第2例目の臨床応用を行

った。また、本研究により、この培養骨膜シートが歯周病の有効な治療手段の一つとなりうる事が示唆された。

軟骨：PCL, PLAなどの様々な担体を用いて *in vivo* での軟骨再生の最適条件の比較検討を行った。また、糖鎖を担体マトリックスに付加することで、BMPやFGFなどの細胞増殖因子の活性発現部位を任意に調節可能で効率よく利用でき、同時により生体親和性の高い担体の開発を行った。実際、ウシ膝関節軟骨から得た細胞は、PCL+PLAのコポリマー培養基質とBMPの添加により高い軟骨分化能をかなりの細胞分裂後も再獲得できることを明らかにした。従って、コポリマーの糖鎖結合部分の整形により、任意の形を持った軟骨が得られる可能性が出てきた。また、この担体への増殖因子の添加により、移植された細胞の分化をコントロールする可能性が示唆された。その他、超音波刺激による間葉系幹細胞からの効率的培養法の確立に成功した。

D. 考察

近年組織工学的技術を用いた製品開発が世界的に行われているが、本研究分野の製品は未だ開発途中であり、完成品と言われるような製品は創出されていないのが現状である。今後、1000万人ともいわれる重症骨系統疾患が対象となることを考慮すると、本研究の成果は新たな骨再生治療の創出につながると期待しており、ひいては世界的な製品市場の開拓も見込まれる。

注入型人工骨については、今後は症例を増やすことで、適応の拡大を目指すとともに長期予後について検討をおこなうことで、治療法としての確立が期待される。また、培養骨膜を用いた骨再生治療についても、臨床応用を開始することで、有用性を検証することが可能となるであろう。

軟骨の再生については、確立された MSC からの至適培養条件と、新たな担体との組み合わせで、新規の軟骨再生法の創出を目指している。これまでの実験条件をもとに *in vivo* での軟骨再生法を確立した後、動物モデルを用いて関節部の軟骨欠損の治療を行い、臨床応用につなげることで成果の活用につなげたい。

E. 結論

本研究課題では、自家あるいは同種の移植に代わりうる、新たな骨、軟骨の再生医療の実用化について研究成果が得られた。幹細胞を応用したトランスレーショナルリサーチは良好な結果を得ており、今後も臨床例を積み重ねることにより、治療の確実性を高めることを目指したい。一方、臨床経験から新たに見いだされた課題については基礎的検討を行い、治療を一般化するための基礎データを集積することが必要である。今後は臨床応用と基礎的検討を平行して行うことにより、本研究の目的である組織工学の手法を用いた骨系統疾患患者の治療方法の確立につなげたい。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

論文発表

M.Ueda Clinical Case Reports of Injectable Tissue-engineered Bone Applied for Alveolar Augmentation with Simultaneous Implant Placement. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry 2004(in press)

臍帯血からの間葉系幹細胞の分離と再生医療への応用

山田陽一、上田実

細胞 36(2),2004

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., and Ueda M., A comparison of osteogenesis-related gene expression of mesenchymal stem cells during the osteoblastic differentiation induced Type-I collagen and/or fibronectin, Int J Oral-Med Sci, 1, 139-146, 2003.

Yamada, Y., Ueda M, Naiki T and Nagasaka, T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. Clin Oral Impl Res, in press (2004).

Yamada, Y., Itano, N, Hata, K., Ueda, M., and Kimata,K. Differential Regulation by IL-1 α and EGF of Expression of Three Different Hyaluronan Synthases in Oral Mucosal Epithelial Cells and Fibroblasts and Dermal Fibroblasts: Quantitative Analysis using Real Time RT-PCR, J Invest Dermatol, in press.

Yamada, Y., Ueda M, Hibi H and Nagasaka, T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet -rich plasma-from basic research to clinical case study. Cell transplantation, in press.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K., and Nagasaka, T. Autogenous injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) Tissue-engineered bone regeneration- Tissue engineering. in press.

Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R., and Okazaki, Y. A clinical report of injectable tissue-engineered bone applied for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry in press.

(分担研究者)

(各務 秀明)

A Novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum-a preliminary study in canine mandible- Mizuno H, Hata K-I, Kogami, H, Wada K, Bonassar LJ and Ueda M. Tissue Engineering 投稿中

Miyata Y, Okada K, Fujimoto A, Hata K, Kagami H, Tomita Y, Ueda M:

The effect of the long-term cultivation on telomere length and morphology of cultured epidermis, Journal of Dermatological Science, in press (2004)

Oda Y, Kagami H, Ueda M Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. J Oral Maxillofac Surg

62:73-80, 2004

Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y and Miyamoto H. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. Gerodontology 20:29- 32, 2003

(山田 陽一)

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., and Ueda M., A comparison of osteogenesis-related gene expression of mesenchymal stem cells during the osteoblastic differentiation induced Type-I collagen and/or fibronectin, Int J Oral-Med Sci, 1, 148-155, 2003.

Yamada, Y., Ueda M, Naiki T and Nagasaka, T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. Clin Oral Impl Res, in press (2004).

Yamada, Y., Itano, N, Hata, K., Ueda, M., and Kimata, K. Differential Regulation by IL-1 β and EGF of Expression of Three Different Hyaluronan Synthases in Oral Mucosal Epithelial Cells and Fibroblasts and Dermal Fibroblasts: Quantitative

Analysis using Real Time RT-PCR, J Invest Dermatol, in press.

Yamada, Y., Ueda M, Hibi H and Nagasaka, T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet -rich plasma-from basic research to clinical case study. Cell transplantation, in press.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K., and Nagasaka, T. Autogenous injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) – Tissue-engineered bone regeneration- Tissue engineering. in press.

Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R., and Okazaki, Y. A clinical report of injectable tissue-engineered bone applied for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry in press.

(鳥居 修平)

K. Ebisawa, K. Hata, K. Okada, K. Kimata, M. Ueda, S. Torii, H. Watanabe. Ultrasound enhances TGF β -mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. Tissue Eng 2004;in press.

Ikuo Hyodo, Bin Nakayama, Mitsuru Takahashi, Kzuihiro Toriyama, Yuzuru

Kamei and Shuhei Torii: The gastrocnemius with soleus bi-muscle flap.

British Journal of Plastic Surgery, 57: 77-82, 2004.

Hasegawa Yukiharu, Sakano Shinji, Iwase Toshiki, Iwasada Seiki, Torii

Shuhei, Iwata Hisashi : Pedicle bone grafting versus transutrochanteric

rotational osteotomy for avascular necrosis of the femoral head. J Bone

Joint Surg 84-B(2): 191-198, 2003 .

(小林裕猛)

Ito A, Takizawa Y, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T: Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of co-cultured hepatocytes and endothelial cells, *Tissue Eng*, in press (2004)

Ito A, Hayashida M, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T: Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force, *Tissue Eng*, in press (2004)

Ito A, Hibino E, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T: A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles, *Biochem Eng J*, in press (2004)

Kato N, Kobayashi T, and Honda H. : Screening of stress enhancer based on analysis of gene expression profiles: hyperthermia-induced tumor necrosis by an MMP-3 inhibitor, *Cancer Science*, 94 (7), 644-649 (2003)

Ito A, Takizawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K, Ueda M, Kuno N, Itakura A and Kobayashi T: Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering, *J Biosci Bioeng*, 95(6), 589-593(2003)

Ito A, Mase A, Takizawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K, Ueda M and Kobayashi T: Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering, *J Biosci Bioeng*, 95(2), 196-199(2003)

(高井 治)

K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, Hydroxyapatite Coating on Titanium by Thermal Substrate Method in Aqueous Solution, *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 59, No.2 (2002) 390-397

K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai,

Effects of Ion Concentration and pH on Hydroxyapatite Deposition from Aqueous Solution onto Titanium by the Thermal Substrate Method, *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 61, No. 3 (2002) 354-359
M. Okido, K. Nishikawa, K. Kuroda, R. Ichino, Z.W. Zhao and O. Takai, Evaluation of the Hydroxyapatite Film Coating on Titanium Cathode by QCM, *Mater. Trans.* Vol. 43, No. 12 (2002) 3010-3014

K. Kuroda, Y. Miyashita, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, Preparation of Calcium Phosphate Coatings on Titanium Using the Thermal Substrate Method and Their in vitro Evaluation, *Mater. Trans.* Vol. 43, No. 12 (2002) 3015-3019

M. Okido, K. Kuroda, M. Ishikawa, R. Ichino and O. Takai, Hydroxyapatite Coating on Titanium by Means of Thermal Substrate Method in Aqueous Solutions, *Solid State Ionics*, Vol. 151 (2002) 47-52

J.M. Gomez-Vega, K. Teshima, A. Hozumi, H. Sugimura and O. Takai, Mesoporous Silica Thin Films Produced by Calcination in Oxygen Plasma, *Surface and Coatings Technology*, Vol. 169 (2003) 583-586

(小林 一清)

Miura Y, Ikeda T, Kobayashi K: Chemoenzymatically synthesized glycoconjugate polymers, *Biomacromolecules*, 4, 410-415 (2003).

Miura Y, Ikeda T, Wada N, Sato H, Kobayashi K: Chemoenzymatic Synthesis of Glycoconjugate Polymers: Greening Synthesis of Biomaterials. *Green Chemistry*, 5, 610-614 (2003).

Miura Y, Ikeda T, Wada N, Kobayashi K: Yoshiko Miura, Chemoenzymatic Synthesis of a Multivalent Aminoglycoside, *Macromol. Biosci.*, 3, 662-667 (2003).

(木全 弘治)

M. Honda, N. Morikawa, K. Hata, T. Yada, S.

- Morita, M. Ueda, K. Kimata. Rat costochondral cell characteristics on poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* 2003;24: 3511- 3519.
- P. Jemth, E. Smeds, A-T. Do, H. Habuchi, K. Kimata, U. Lindahl, M. Kusche- Gullberg. Oligosaccharide library-based assessment of heparan sulfate 6-O- sulfotransferase substrate specificity. *J Biol Chem* 2003;278:24371-24376.
- A. Irie, H. Habuchi, K. Kimata, Y. Sanai. Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308:858-65.
- T. Kozaki, Y. Matsui, J. Gu, R. Nishiuchi, N. Sugiura, K. Kimata, K. Ozono, H. Yoshikawa, K. Sekiguchi. Recombinant expression and characterization of a novel fibronectin isoform expressed in cartilaginous tissues. *J Biol Chem* 2003;278:50546-50553.
- H. Watanabe, K. Matsumoto, K. Kimata. The proteoglycan aggregate: Structure and function. *Connective Tissue* 2003; 35:201-205.
- K. Nogami, H. Suzuki, H. Habuchi, N. Ishiguro, H. Iwata, K. Kimata. Distinctive expression patterns of heparan sulfate O-sulfotransferases and regional differences in heparan sulfate structure in chick limb buds. *J Biol Chem* 2004;279:8219-8229.
- S. Ashikari-Hada, H. Habuchi, Y. Kariya, N. Itoh, A. H. Reddi, K. Kimata. Characterization of Growth Factor- binding Structures in Heparin/Heparan Sulfate Using an Octasaccharide Library. *J Biol Chem* 2004;279:12346-54.
- Y. Yamada, N. Itano, K. Hata, M. Ueda, K. Kimata. Differential regulation by IL-1β and EGF of expression of three different hyaluronan synthases in oral mucosal epithelial cells and fibroblasts and dermal fibroblasts: Quantitative analysis using real time RT-PCR. *J Invest Dermatol* 2004:in press.
- K. Ebisawa, K. Hata, K. Okada, K. Kimata, M. Ueda, S. Torii, H. Watanabe. Ultrasound enhances TGFβ-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2004:in press.
- (春日 敏宏)
- H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, and Y. Ota: Preparation of Calcium Carbonate Composites and Their Apatite-Forming Ability in Simulated Body Fluid, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, in press.
- H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, H. Kagami, K. Hata, and M. Ueda: Preparation of Bonelike Apatite Composite Sponge, *Key Engng. Mater.*, 254-256, 497-500 (2004).
- H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Vaterite / Poly(lactic acid) Composite Biomaterials, *Arch. Biocer. Res.*, 3, 110-113 (2003).
- H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami: Preparation of Calcium Carbonate / Poly(lactic acid) Composite (CCPC) Hollow Spheres, *Key Engng. Mater.*, 254-256, 533-536 (2004).
- Hirotaka Maeda, Toshihiro Kasuga, and Masayuki Nogami: Apatite formation on titania-vaterite powders in simulated body fluid, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 24, 2125-2130 (2004).
2. 学会発表
- 16th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. May 14-20, 2003, Athens, Greece.
- Regeneration of alveolar bone by cultured periosteum.
- Mizuno H., Hata K-I., Wada K., Kogami, H., SOJO K., Ueda M.
- 82nd General session and exhibition of the IADR March 10-13, 2004, Hawaii, USA.
- A novel approach to regenerating periodontal tissue by cultured periosteum. Mizuno H., Hata

K-I., Wada K., Kogami, H., Ueda M..

各務秀明, 本田雅規, 安藤由典, 上田実
歯および歯胚由来細胞を用いた再生医療とその可能性

シンポジウムー7ー1

歯, 歯周組織, 顎骨の再生に向けて

第3回日本再生医療学会総会 2004.3.23-25
千葉 幕張メッセ

Ueda, M., Yamada, Y., Ito, K., and Okazaki, Y.
Tissue engineered bone using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. Academy of osseointegration 18th annual meeting, Boston, 2003. 2.27-3.1

山田陽一, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田 実. 注入型培養骨を用いた骨再生医療. 第2回日本再生医療学会大会. 神戸, 2003.3.10-12

高橋 誠, 山田陽一, 小沢亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 岡崎恭宏, 上田 実. 培養歯髄幹細胞による象牙質形成能の比較検討 (in vitro). 第2回日本再生医療学会大会. 神戸, 2003.3.10-12

古市保志, 山田陽一, 山本松男, 松山孝司, 尾畑俊和, 金城守明, 中村利明, 吉元剛彦, 上田 実, 和泉雄一. 間葉系幹細胞および高血小板血漿を用いた歯周組織再生療法の組織学的評価. 第46回日本歯周病学会春季学術大会. 東京, 2003.4.24-26

山田陽一, 古市保志, 畠賢一郎, 各務秀明, 岡崎恭宏, 伊藤憲治, 和泉雄一, 上田 実. 未分化間葉系幹細胞, 多血小板血漿を応用した注入型による歯周組織再生療法-GTR 法との比較. 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9.

高橋 誠, 山田陽一, 小沢亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 岡崎恭宏, 上田 実. 培養歯髄幹細胞による象牙質形成能の比較検討 (in vitro). 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9

日比英晴, 大隅 省, 惣城一美, 伊藤優子,

坂井謙介, 猿山 大, 水野裕和, 大久保肇, 服部 宇, 伊藤憲治, 山田陽一, 畠賢一郎, 重富俊雄, 藤内 祝, 上田 実, 澤木佳弘, 水谷英樹. 外科矯正手術と仮骨延長術-仮骨延長術にみられる問題とその対策-. 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9.

大屋盛道, 山田陽一, 和田圭祐, 畑中隆志, 夫才成, 渡辺和代, 伊藤憲治, 小澤亮太郎, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田 実. 間葉系幹細胞とPRP 複合体を用いた上顎洞底挙上術への骨造成法. 第33回日本口腔インプラント会総会. 名古屋, 2003.7.18-20

日比英晴, 山田陽一, 小澤亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 高橋 誠, 岩槻慎二, 上田 実. 血管柄付き遊離移植された肩甲骨中のインプラント周囲組織. 第33回日本口腔インプラント会総会. 名古屋, 2003.7.18-20

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Ozawa, R., Hibi, H., Kagami H, and Baba, S. Injectable tissue-engineered bone regeneration for osseointegrated dental implants: clinical and basic approach. European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., Baba, S., Hata, K-I, and Ueda, M. Injectable bone regeneration with mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11

山田陽一, 日比英晴, 小澤亮太郎, 伊藤憲治, 大屋盛道, 高橋 誠, 木下一彦, 長坂徹郎, 各務秀明, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 馬場俊輔, 上田 実. 注入型培養骨による骨再生医療ー基礎研究から臨床応用に関するトランスレーショナルリサーチー, 第48回日本口腔外科学会総会. 富山, 2003.10.23-24.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Hibi, H., and Baba, S. Translational research as for injectable tissue-engineered bone regeneration: from basic research to clinical approach. The 6th Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network (A-IMBN) 2003, Tokyo, Japan, 2003. 11.12-13

Hibi, H., Kinoshita, K., Hishida, S., Nishiguchi, H., Yamada, Y., and Ueda. New internal and multidirectional distractor for the treatment of mandibular segmental defect. 7th European craniofacial congress, Italy, 2003.11.19-22

Yamada, Y., Fujimoto, A., Ozawa, R., Ito, K., and Ueda, M. Cluster analysis and gene expression profile between mesenchymal stem cells (MSCs) and Dentin pulp stem cells (DPSCs). International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13

Ito, K., Yamada, Y., Baba, H., Hibi, H., Ozawa, R., Takahashi, M., Ohya, M., Sojo, K., Kinoshita, K., and Ueda, M. Mechanical properties of tissue-engineered bone using MSCs and PRP. International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13

山田陽一, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田 実. 注入型培養骨を用いた骨再生医療. 第2回日本再生医療学会大会. 神戸, 2003.3.10-12

高橋 誠, 山田陽一, 小沢亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 岡崎恭宏, 上田 実. 培養歯髄幹細胞による象牙質形成能の比較検討 (in vitro). 第2回日本再生医療学会大会. 神戸, 2003.3.10-12

古市保志, 山田陽一, 山本松男, 松山孝司, 尾畑俊和, 金城守明, 中村利明, 吉元剛彦, 上田 実, 和泉雄一. 間葉系幹細胞および高血小板血

漿を用いた歯周組織再生療法の組織学的評価. 第46回日本歯周病学会春季学術大会. 東京, 2003.4.24-26

山田陽一, 古市保志, 畠賢一郎, 各務秀明, 岡崎恭宏, 伊藤憲治, 和泉雄一, 上田 実. 未分化間葉系幹細胞, 多血小板血漿を応用した注入型による歯周組織再生療法-GTR 法との比較-. 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9.

高橋 誠, 山田陽一, 小沢亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 岡崎恭宏, 上田 実. 培養歯髄幹細胞による象牙質形成能の比較検討 (in vitro). 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9

日比英晴, 大隅 省, 惣城一美, 伊藤優子, 坂井謙介, 狛山 大, 水野裕和, 大久保肇, 服部宇, 伊藤憲治, 山田陽一, 畠賢一郎, 重富俊雄, 藤内 祝, 上田 実, 澤木佳弘, 水谷英樹. 外科矯正手術と仮骨延長術-仮骨延長術にみられる問題とその対策-. 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9.

大屋盛道, 山田陽一, 和田圭祐, 畑中隆志, 夫才成, 渡辺和代, 伊藤憲治, 小澤亮太郎, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田 実. 間葉系幹細胞とPRP 複合体を用いた上顎洞底挙上術への骨造成法. 第33回日本口腔インプラント会総会. 名古屋, 2003.7.18-20

日比英晴, 山田陽一, 小澤亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 高橋 誠, 岩槻慎二, 上田 実. 血管柄付き遊離移植された肩甲骨中のインプラント周囲組織. 第33回日本口腔インプラント会総会. 名古屋, 2003.7.18-20

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Ozawa, R., Hibi, H., Kagami H, and Baba, S. Injectable tissue-engineered bone regeneration for osseointegrated dental implants: clinical and basic approach. European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., Baba, S.,

Hata, K-I, and Ueda, M. Injectable bone regeneration with mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11

山田陽一, 日比英晴, 小澤亮太郎, 伊藤憲治, 大屋盛道, 高橋 誠, 木下一彦, 長坂徹郎, 各務秀明, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 馬場俊輔, 上田実. 注入型培養骨による骨再生医療-基礎研究から臨床応用に関するトランスレーションリサーチ-, 第48回日本口腔外科学会総会. 富山, 2003.10.23-24.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Hibi, H., and Baba, S. Translational research as for injectable tissue-engineered bone regeneration: from basic research to clinical approach. The 6th Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network (A-IMBN) 2003, Tokyo, Japan, 2003. 11.12-13

Hibi, H., Kinoshita, K., Hishida, S., Nishiguchi, H., Yamada, Y., and Ueda. New internal and multidirectional distractor for the treatment of mandibular segmental defect. 7th European craniofacial congress, Italy, 2003.11.19-22

Yamada, Y., Fujimoto, A., Ozawa, R., Ito, K., and Ueda, M. Cluster analysis and gene expression profile between mesenchymal stem cells (MSCs) and Dentin pulp stem cells (DPSCs). International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13

Ito, K., Yamada, Y., Baba, H., Hibi, H., Ozawa, R., Takahashi, M., Ohya, M., Sojo, K., Kinoshita, K., and Ueda, M. Mechanical properties of tissue-engineered bone using MSCs and PRP. International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR),

Honolulu, America, 2004. 3.10-13

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

7. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

特許出願

・ 特願 2002-64235

特許申請中

・ 「組織または器官再生用材料」

「骨又は歯周組織形成用の組成物」

特願 2003-046060 号

「細胞培養方法」

特願 2003-78964 号

「医用材料」

特願 2003-73808 号

「細胞培養方法及び細胞シート」

特願 2003-136336 号

「細胞培養方法及び培養組織」

European Patent Application EP 1252904A3

Date of Filing 24.04.2002

Precursors for active materials, active materials using such precursors, and method for producing said active materials

Inventors: Sugimura Hiroyuki, Takai Osamu, Gomez-Vega, Jose Manuel

Applicant: Nagoya University

Priority 25.04.2001 JP201128093

(1) 生体用材料

出願番号 特願 2002-111346

出願日 平成14年3月10日

発明者 三浦佳子、上坊史子、小林一清

出願人 小林一清

公開番号 特開 2003-260125

公開日 平成15年9月16日

(2) 酵素触媒による生分解性糖鎖高分子の製造法

出願番号 特願 2002-62899

出願日 平成14年3月8日

発明者 三浦佳子、池田高康、小林一清

出願人 小林一清
公開番号 特開 2003-261621
公開日 平成 15 年 9 月 19 日

2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

歯周組織再建のための基礎研究および臨床応用

分担研究者 各務 秀明 名古屋大学医学部組織工学講座 助教授

研究要旨

われわれは、重度歯周疾患に対する治療法の開発を中心に、新たな骨再生のための手段として培養骨膜による骨再生研究を行っている。これまでの結果から、ヒト、イヌおよびウシの骨膜より作成した培養骨膜シートは、nativeな骨膜と同様の形態学的、生化学的性状を示し、高い骨形成能を持つことを報告してきた。また、*in vivo*においてはイヌ歯周組織に形成された欠損に対し、3ヶ月で歯槽骨および歯周組織の再生が認められる。本研究期間中は、基礎的検討として非脱灰標本を用いて歯周組織の再生についての検討を行った。また、臨床症例として、口唇口蓋裂の術後に起こった口腔鼻腔漏孔の閉鎖術および歯周疾患への応用を開始し、その経過について検討を行った。

A. 研究目的

骨膜組織片を適当な条件下において培養すると膜状の構造物を形成することが知られている。一方骨が新生する際には、骨髄中の骨芽細胞のみでなく、骨膜からも骨形成が起こることが知られている。これまでの骨再生研究は、主として骨髄中に存在する骨芽細胞あるいは幹細胞由来の骨芽細胞をターゲットとした研究が行われており、骨膜由来の細胞を用いた骨の再生については十分検討されてこなかった。

一方歯科において歯周疾患（歯槽膿漏）は重要な課題であり、中、高齢者において歯牙を失う主たる原因となっている。しかしながら、重度の歯周疾患に対して、失われた歯周組織を再生する効果的な方法はないのが現状である。近年軽度あるいは中程度の歯周組織を再生する方法として、ゴアテックスなどの人工物の膜を利用する方法が行われている（GTR法）。これは歯周組織の欠損部に膜を置くことで、上皮の侵入

を抑制し、骨の自発的な再生を期待する治療法である。しかしながら、膜の除去が必要であることや、人工物であるために感染などの問題を起こすことも少なくない。また、当然のことながら膜自体に骨形成能はない。

われわれのプロジェクトでは、この培養骨膜を用いて、歯槽骨を中心とした骨再生研究を行い、その有用性を報告してきた。これまでの研究で歯槽骨の再生については明らかになっているが、脱灰標本やX線を用いた解析では、歯と歯槽骨を連結している歯根膜をはじめとした歯周組織の再生については十分明らかではなかった。本研究期間では、まず基礎的検討として、培養骨膜によって再生された歯根膜組織について非脱灰標本を用いて解析した。一方、本治療法についてはすでに名古屋大学医学部の倫理委員会にて承認を受けている。これまでの臨床応用とその経過についても検討を行った。

B. 研究方法

ヒト、イヌ、ウシそれぞれの骨膜組織片より培養骨膜（CP）を作製した（図1）。完成したCPのアルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシン、オステオポンチン、オステオネクチンなどの各種分化マーカーを指標として、CPの骨形成能を評価した。

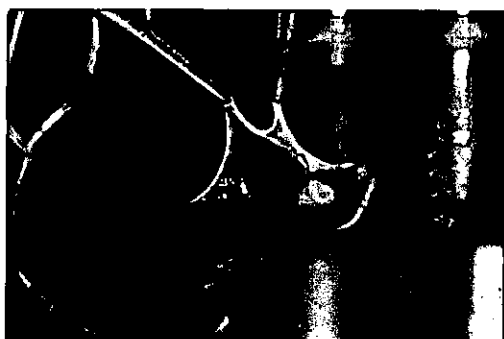


図1 培養骨膜

次にイヌを用いて、歯槽骨の再生実験を行った。まず、歯周病による歯槽骨欠損に見立てた骨欠損を下顎臼歯部に作製し、内部に血漿中のplatelet rich plasma (PRP)を充填したのち、ここにCPを従来のGTR法による歯槽骨欠損に準じて膜状のまま移植した。コントロールとしては、PRPのみを移植した群と、PRPおよび従来GTR法に用いられてきたコラーゲン膜を用いた。約3ヶ月の後、標本採取を行い、軟エックス線、マイクロCTによる評価を行った。特に今回は非脱灰切片を作製し、歯根膜を中心とした歯周組織の再生を評価した。

臨床症例については、第1例目では口唇口蓋裂術後に生じた顎裂部の骨欠損を対象とした。また、2例目については歯周疾患を対象とした。それぞれ名古屋大学医学部の倫理委員会にて承認を得た治療プロトコールに基づいて治療を開始し、経過観察を

行った。

（倫理面への配慮）

ヒトの組織採取を行う場合、手術時に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。

C. 研究結果

組織標本および免疫組織化学染色により、CPは性状の骨膜に近い性質を有していることが明らかになった。さらに酵素活性やウエスタンブロッティングによる発現タンパクの解析から、培養骨膜は正常骨膜を超える骨形成能を持つ可能性が示唆された。イヌ歯周組織欠損に対する実験からは約3ヶ月にてCP移植群では歯槽骨の再生が認められた（図2）。

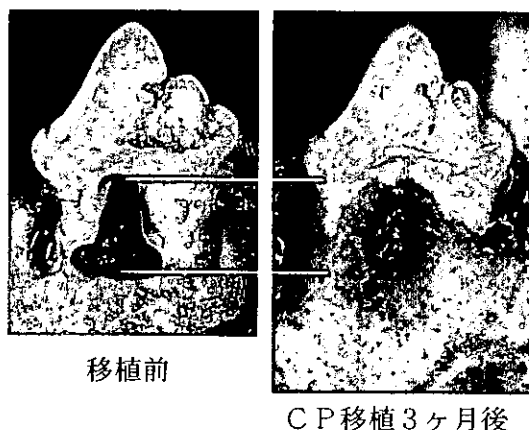


図2 培養骨膜による歯周組織の再生

再生骨は、根分岐部のみではなく、側面の露出した根の表面まで完全に被覆していた。また、マイクロCTでは歯根と歯槽骨間には一層の軟組織が介在していることが

明らかであったが、非脱灰組織標本により、再生骨と根表面の間には歯周靭帯様の構造の再生が確認できる箇所も存在した。分岐部では、歯槽骨と新生セメント質との間にシャープな線維が入り込んでおり、骨と歯根とは一定の間隔に保たれていた。これは正常の歯根と歯周組織との関係とほぼ同様であった。



図3 非脱灰標本による評価

臨床応用の経過では、顎裂部の骨欠損に対しては十分な骨再生を認めなかった。これは、欠損部に挿入された β -TCPに対する感染か、あるいは移植された骨膜への栄養供給の問題の可能性が考えられた。歯周組織への症例については、移植後早期に粘膜縫合部のし開が見られた。したがって、早期の歯槽骨再生は認められなかったが、現在長期の経過観察中であり、骨再生の評価も今後行っていく予定である。

D. 考察

培養骨膜(CP)は、これまで用いられてきた間葉系幹細胞と同様に、高い骨形成能を有することが明らかになった。また、歯周組織に応用した場合には、骨形成能を持った生体吸収性GTR膜としての利用が可能と考えられる。しかしながら、臨床的には術式や適応症に検討が必要と考えられ、今後症例を増やしてデータの蓄積を行うことが必要と考えている。

E. 結論

培養骨膜(CP)は骨形成能を有する膜であり、人工材料を含まず、細胞と細胞外マトリックスのみより構成される極めて生体親和性の高い移植材料である。また、本研究により、このCPが歯周病の有効な治療手段の一つとなりうることが示唆された。一方、臨床応用については開始されたばかりであるが、骨再生を可能にする手術手技については今後の検討が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していません。

G. 研究発表

1. 論文発表

A Novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum—a preliminary study in canine mandible- Mizuno H, Hata K-I, Kogami, H, Wada K, Bonassar LJ and Ueda M. Tissue Engineering 投稿中

Miyata Y, Okada K, Fujimoto A, Hata K, Kagami H, Tomita Y, Ueda M:

The effect of the long-term cultivation on telomere length and morphology of cultured epidermis, Journal of Dermatological Science, in press (2004)

Oda Y, Kagami H, Ueda M Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. J Oral Maxillofac Surg 62:73-80, 2004

Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y and Miyamoto H. High correlation between the bacterial species in

denture plaque and pharyngeal microflora.
Gerodontology 20:29- 32, 2003

2. 学会発表

16th International Conference on Oral and
Maxillofacial Surgery. May 14-20, 2003,
Athens, Greece.

Regeneration of alveolar bone by cultured
periosteum.

Mizuno H., Hata K-I., Wada K., Kogami, H.,
SOjo K., Ueda M.

82nd General session and exhibition of the
IADR March 10-13, 2004, Hawaii, USA.

A novel approach to regenerating periodontal
tissue by cultured periosteum. Mizuno H., Hata
K-I., Wada K., Kogami, H., Ueda M..

各務秀明

組織工学的手法を用いた歯の再生

ミニシンポジウム

第57回日本口腔科学会総会 2003.5.7-8
福岡

各務秀明、上田実

各科外科手術の最前線1

臨床応用の進む歯科の再生医療

要望演題

第28回日本外科系連合会学術集会
2003.6.20-21 東京 都市センターホテル

各務秀明, 本田雅規, 安藤由典, 上田実

歯および歯胚由来細胞を用いた再生医療と
その可能性

シンポジウムー7ー1

歯, 歯周組織, 顎骨の再生に向けて

第3回日本再生医療学会総会
2004.3.23-25 千葉 幕張メッセ

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を
含む。)

総括研究報告書に記す

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

未分化間葉系細胞を用いた骨再生の臨床研究

分担研究者 山田 陽一、名古屋大学医学部附属病院遺伝子再生医療センター 助手

研究要旨

再生医療は生きた細胞、生理活性物質、マトリックスを用いて組織を再生する、移植医療に変わりうる新しい概念の組織再生療法のひとつである。本研究では、中でも骨組織再生に着目し、再生医療的手法を用いた骨系統疾患患者の治療方法を確立しようとするものである。今回生きた細胞として、多分化能を持ち合わせた未分化間葉系幹細胞（MSCs）を、生理活性物質、マトリックスとして多血小板血漿（PRP）を用いて、低侵襲で形態付与性を持ち合わせた注入型培養骨による骨再生を試みる。まず、基礎研究において、犬下顎骨に作製した骨欠損に移植した上記マトリックスおよび現在、臨床的に行われている自家骨と比較検討することにより、骨再生能力を検討した。さらなる培養骨の特徴を検討することに加えて、この結果を受けて倫理委員会にて承認されている培養骨の臨床応用を押し進め、患者への貢献をいち早く行っていき、さらに基礎研究、臨床研究を関係付けることによるトランスレーショナルリサーチを進めていくものとする。

A. 研究目的

現在、骨再生は人工材料、自家骨などを用いて行われているが、前者は吸収期間、異物反応などの問題を抱えており、後者も、正常組織に侵襲を新たに加えなければならないことに加えて、採取量にも制限がある。そこで、今回低侵襲による、形態付与性を持ち合わせた注入型培養骨による骨再生を試みる。また、いち早く臨床応用を行うことで患者への貢献をし、quality of life (QOL) の向上に寄与することを目的とする。

さらに、今回その臨床経験とすでに未分化間葉系幹細胞を用いた骨再生に成功している技術を応用する中で、基礎研究に根ざした、さらなる治療方法の開発および臨床症例を重ねていく中で、最適化を検討していきたい。このことが達成されれば歯科界に関する貢献は画期的で計り知れないもの

がある。

B. 研究方法

注入型培養骨の特徴を組織学的検討に加えて、人工歯根（インプラント）との結合率、骨占有率などにおいても検討を加えた上で、臨床応用を行い、臨床症例を重ねることで、患者負担の少ない再生医療を進めるものとする。各症例においては、臨床的評価に加えて、レントゲンの（CTなどを用いて）臨床評価、組織学的検討を行う。

（倫理面への配慮）

組織採取、臨床応用を行う場合、名古屋大学倫理委員会にて承認された申請内容に従い、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護の

ためドナー情報は秘密にて行うこととした。

C. 研究結果

注入型培養骨の骨再生能力を欠損のみ、自家骨、PRPのみと比較検討した。その結果、再生された骨占有率は、移植後8週目においては、 $18.3 \pm 4.84\%$ (欠損のみ), $29.2 \pm 5.47\%$ (PRP), $61.4 \pm 3.38\%$ (自家骨), そして $67.3 \pm 2.06\%$ (注入型培養骨)であった。また、インプラントとの骨結合率については $26.4 \pm 9.5\%$ (欠損のみ), $44.2 \pm 10.8\%$ (PRP), $49.9 \pm 8.2\%$ (自家骨), and $58.6 \pm 9.7\%$ (注入型培養骨)であった。さらに、組織学的にも注入型培養骨は十分な層板構造を持った成熟した骨再生が確認された。以上の結果をもとに、臨床応用を行った。インプラントとの応用例 (8例)、骨延長部への応用例 (5例)、歯周病への応用例 (1例)が適応され、現在経過は良好である。

D. 考察

幹細胞を応用したトランスレーショナルリサーチは良好な結果を得ており、今後も臨床例を積み重ねることにより、よりよい臨床研究、貢献を続けていくと同時に、経過観察を行っていくものとするのが重要であると思われる。

E. 結論

基礎研究に根ざした、MSCsとPRPを用いた骨再生療法は、臨床応用においても、現在14例すべて経過良好であった。今後臨床症例の拡充と同時に、臨床経過を検討していくこととする。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な

影響を及ぼす事項は発生しておりません。

G. 研究発表

1. 論文発表

小澤亮太郎, 山田陽一, 日比野祥敬, 長坂徹郎, 夫才成, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田 実.

間葉系幹細胞, フィブリンのりおよび生体吸収性足場を用いた注入法による骨再生に関する実験的研究, 日本口腔外科学会誌, 2003, VOL49, NOS, 317-322.

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., and Ueda M., A comparison of osteogenesis-related gene expression of mesenchymal stem cells during the osteoblastic differentiation induced Type-I collagen and/or fibronectin, Int J Oral-Med Sci, 1, 148-155, 2003.

Yamada, Y., Ueda M, Naiki T and Nagasaka, T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. Clin Oral Impl Res, in press (2004).

Yamada, Y., Itano, N, Hata, K., Ueda, M., and Kimata, K. Differential Regulation by IL-1 α and EGF of Expression of Three Different Hyaluronan Synthases in Oral Mucosal Epithelial Cells and Fibroblasts and Dermal Fibroblasts: Quantitative Analysis using Real Time RT-PCR, J Invest Dermatol, in press.

Yamada, Y., Ueda M, Hibi H and Nagasaka, T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma-from basic research to clinical case study. Cell transplantation, in press.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi,

M., Hata, K., and Nagasaka, T. Autogenous injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) - Tissue-engineered bone regeneration- Tissue engineering. in press.

Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R., and Okazaki, Y. A clinical report of injectable tissue-engineered bone applied for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry in press.

2. 学会発表

Ueda, M., Yamada, Y., Ito, K., and Okazaki, Y. Tissue engineered bone using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. Academy of osseointegration 18th annual meeting, Boston, 2003. 2.27-3.1

山田陽一, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田 実. 注入型培養骨を用いた骨再生医療. 第2回日本再生医療学会大会. 神戸, 2003.3.10-12

高橋 誠, 山田陽一, 小沢亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 岡崎恭宏, 上田 実. 培養歯髄幹細胞による象牙質形成能の比較検討 (in vitro). 第2回日本再生医療学会大会. 神戸, 2003.3.10-12

古市保志, 山田陽一, 山本松男, 松山孝司, 尾畑俊和, 金城守明, 中村利明, 吉元剛彦, 上田 実, 和泉雄一. 間葉系幹細胞および高血小板血漿を用いた歯周組織再生療法の組織学的評価. 第46回日本歯周病学会春季学術大会. 東京, 2003.4.24-26

山田陽一, 古市保志, 畠賢一郎, 各務秀明, 岡崎恭宏, 伊藤憲治, 和泉雄一, 上田 実. 未分化間葉系幹細胞、多血小板血漿を応用した注入型による歯周組織再生療法

-GTR 法との比較-. 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9.

高橋 誠, 山田陽一, 小沢亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 岡崎恭宏, 上田 実. 培養歯髄幹細胞による象牙質形成能の比較検討 (in vitro). 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9

日比英晴, 大隅 省, 惣城一美, 伊藤優子, 坂井謙介, 獺山 大, 水野裕和, 大久保肇, 服部 宇, 伊藤憲治, 山田陽一, 畠賢一郎, 重富俊雄, 藤内 祝, 上田 実, 澤木佳弘, 水谷英樹. 外科矯正手術と仮骨延長術-仮骨延長術にみられる問題とその対策-. 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9.

大屋盛道, 山田陽一, 和田圭祐, 畑中隆志, 夫才成, 渡辺和代, 伊藤憲治, 小澤亮太郎, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田 実. 間葉系幹細胞と PRP 複合体を用いた上顎洞底挙上術への骨造成法. 第33回日本口腔インプラント会総会. 名古屋, 2003.7.18-20

日比英晴, 山田陽一, 小澤亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 高橋 誠, 岩槻慎二, 上田 実. 血管柄付き遊離移植された肩甲骨中のインプラント周囲組織. 第33回日本口腔インプラント会総会. 名古屋, 2003.7.18-20

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Ozawa, R., Hibi, H., Kagami H, and Baba, S. Injectable tissue-engineered bone regeneration for osseointegrated dental implants: clinical and basic approach. European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., Baba, S., Hata, K-I, and Ueda, M. Injectable bone regeneration with mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold.