

分担研究者 戸口田淳也
京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野・教授

A. 研究目的

MSC の多分化能は多くの実験結果から明らかではあるが、MSC を用いた組織再生治療を Evidence Based Medicine として確立するためには、その増殖・分化能の基本的現象を分子レベルで把握する必要がある。このような背景のもと、まず不死化 MSC を樹立し、それを用いて分化能に関する解析を行った。更に腸骨より骨移植を受ける患者より、骨髓液を採取し、初代培養系を確立し、MSC の増殖能・分化能を解析した。更に MSC を用いた難治性骨病態の治療法の開発を目的として、家兎を用いた骨幹部凍結処理骨モデルの作成、及び犬を用いたキーンベック病モデルを作成し、MSC を用いた治療法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 不死化 MSC 及び骨肉腫細胞を用いた分化制御の解析

1-1. 不死化を用いた分化制御の解析

1-1-1. 不死化 MSC の樹立

テロメラーゼ逆転写酵素 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 及びヒトパピローマウイルス E6 及び E7 遺伝子を MSC に導入し MSC の不死化を試みた

1-1-2. クローン化不死化 MSC の分化能の解析

不死化 MSC のクローニングを行い 100 個のクローンを樹立し、各クローンの分化能の解析を行った。

1-1-3. クローン化不死化 MSC を用いた分化関連因子の単離

不死化 MSC より単離したクローンのうち、骨、軟骨、脂肪に分化できるクローン (以下 AOC クローン) と骨、脂肪にのみ分化できるクローン (以下 AO クローン) を用いて、軟骨分化決定因子の単離を試みた。それぞれのクローンを 2 系統より、平板培養による定常状態での RNA、微小塊培養法による三次元培養下での RNA、及び更に TGF β 等の軟骨分化誘導刺激を加えた状態での RNA を抽出し、Affymetrix 社製のオリゴマイクロアレイシステムを用いて遺伝子発現プロファイルを比較した。

1-2. 骨肉腫細胞を用いた分化制御の解析

1-2-1. 骨肉腫細胞における軟骨関連遺伝子の発現

骨肉腫腫瘍組織及び培養細胞株における軟骨関連遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した。

1-2-2. コンドロモデュリン (Chondromodulin-I, ChM-I) 遺伝子の骨肉腫における発現

骨肉腫腫瘍組織及び培養細胞株における ChM-I 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法、ノザンプロット法及びウエスタンプロット法により解析した

1-2-3. ChM-I 遺伝子発現におけるメチル化の関与

5-アザシチジン処理による ChM-I 遺伝子発現誘導を試みた。ChM-I 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を Bisulfite 処理によるメチル化特異的塩基配列解析により解析した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、メチル化による発現制御を解析した。

1-2-4. ChM-I 遺伝子発現におけるアセチル化の関与

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による ChM-I 遺伝子発現誘導を試みた。ChM-I 遺伝子発現調節領域に結合するヒストンのアセチル化状態を Chromatin Immunoprecipitation 法により解析した。

2. 初代培養 MSC を用いた解析

2-1. 初代培養 MSC の増殖・分化能

京都大学医学部附属病院において、腸骨より骨移植を受ける患者より骨髓液を採取し、MSC を単離し、増殖及び分化能を解析した。分化能に関しては骨、軟骨及び脂肪への分化能を培養初期とその後定期的に、分化誘導培地での遺伝子発現及び組織化学染色等で解析した。増殖は 3T3 様の継代で継続した。

2-2. クロマチンリモデリング因子の分化能への関与

1-1 の研究により、MSC の分化誘導刺激に伴い、発現が低下する遺伝子として単離されたクロマチンリモデリング因子に関して初代培養 MSC を用いて解析した。培養開始後、経時的な遺伝子発現の変化を観察し、細胞周期調節遺伝子など増殖関連遺伝子あるいは各系統の分化形質関連遺伝子の発現との相関性を解析した。機能的解析としては、siRNA を用いた発現抑制系及び発現ベクターを用いた強制発現系を用いて、MSC の分化能への影響を解析した。

2-3. 細胞表面マーカーの同定

CD 抗原、増殖因子受容体などの細胞表面マーカーに関して、骨、軟骨、脂肪に分化できる不死化 MSC クローンと他のクローン及び初代培養 MSC における発現を比較し、不死化 MSC で発現している表面マーカーの検索を行った。方法は、RT-PCR 法、FACS 及び当研究所岩田研究室で開発された抗体アレイを用いた。

3. 無腐性骨壊死の動物モデルの作成と治療実験

3-1. 家兎大腿骨骨幹部処理骨モデルの作成

腫瘍性疾患の治療を想定し、家兎大腿骨中央骨幹部を切除、液体窒素により凍結処理を行い、壊死骨を作成したのち、キュルシュナー鋼線により元の位置に固定。経時的に X 線撮影を行い、6 週間後に屠殺、組織学的評価を行った。

3-2. イヌ腸骨よりの MSC の採取、増殖及び標識

イヌ腸骨より骨髓液を採取、ヒト MSC の場合と同様な操作を経て、単層培養を開始。初代あるいは継代 2 代目の時点で、 β ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだレンチウィルスベクターを感染させ細胞を標識した。その後は選択用の薬剤添加の状態、3T3 様の継代により増殖させた。

3-3. イヌ月状舟状骨を用いたキーンベック病モデルの作成と治療実験

イヌ月状舟状骨を手背部より展開し開窓、約 80% を搔爬したのち液体窒素による凍結処理を行い、壊死骨モデルを作成した。培養増殖させたイヌ MSC を有孔人工骨基質 (b-TCP 製剤) に吸着させたものを、作成した壊死骨へ充填したのち、橈骨遠位端より血管柄付骨片を挙上し、開窓部を被覆した。術後は外固定を施行せず、自由に運動させた。定期的に X 線及び MRI 検査を施行し、術後 4 週の時点で、犠死させ、マイクロ CT による評価の後、組織学的評価を行った。

C. 研究結果

1. 不死化 MSC 及び骨肉腫細胞を用いた分化制御の解析

1-1. 不死化を用いた分化制御の解析

1-1-1. 不死化 MSC の樹立

hTERT のみでは MSC は不死化せず、E6/E7 遺伝子導入により旺盛な増殖能をもつ不死化 MSC を樹立することに成功した。不死化 MSC は骨、軟骨及び脂肪への分化能を維持してい

た。

1-1-2. 不死化 MSC クローンの樹立と分化能の解析

100 個のクローンを樹立し、各クローンの分化能の解析を行ったところ、骨・軟骨・脂肪の三方向へ分化する能力を維持しているクローンはわずかに 2 クローンであり、二方向への分化能をもつもの、あるいは一方向への分化能のみを有するものがあり、分化能において多様な集団であることを示す結果が得られた。

1-1-3. 不死化 MSC クローンを用いた分化関連因子の単離

コントロールでは 4 系統の細胞間で著しい相違は認められなかった。一方三次元培養のみの状態を比較すると AOC、AO の 2 系統は同等の遺伝子発現変化を示し、両者は明らかな相違を示し、更に軟骨分化誘導刺激によりその差は顕著となった。最終的に軟骨分化誘導刺激後に 2 群間で明確な相違を示した遺伝子群を約 30 種類同定した。これらのうちの既知の遺伝子のいくつかについて通常の RT-PCR 法により、発現パターンがマイクロアレイによる解析結果と一致することを確認した。

1-2. 骨肉腫細胞を用いた分化制御の解析

1-2-1. 肉腫細胞における軟骨関連遺伝子の発現

軟骨形成型骨肉腫では骨関連遺伝子に加えて軟骨関連遺伝子も正常軟骨と同程度に認められた。また骨形成型骨肉腫でも部分的に軟骨関連遺伝子の発現が認められ、特に SOX9 遺伝子の発現は全ての骨肉腫において認められた。

1-2-2. ChM-I 遺伝子の骨肉腫における発現

軟骨形成型骨肉腫のみに発現が認められ、培養骨肉腫細胞でも軟骨形成型骨肉腫より樹立されたものでは高い発現が RNA 及び蛋白レベルで確認できた。

1-2-3. ChM-I 遺伝子発現におけるメチル化の関与

5-アザシチジン処理により ChM-I 発現陽性となる細胞株が検出された。メチル化特異的塩基配列解析により ChM-I 遺伝子のプロモーター領域の Sp3 結合部位のメチル化と発現の有無が相関していることが判明した。

1-2-4. ChM-I 遺伝子発現におけるアセチル化の関与

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤により未分化骨肉腫細胞株で ChM-I 遺伝子発現調節領域に結合するヒストンのアセチル化及び

ChM-I 遺伝子の発現誘導が認められた。一方より分化段階の進んだ骨肉腫細胞株ではヒストンアセチル化及び発現誘導は認められなかった。以上より ChM-I 遺伝子の発現制御にはシスエレメント結合転写因子に加えて、DNA のメチル化、ヒストンのメチル化及びアセチル化のエピゲノム因子が関与していることが明らかになり、骨肉腫細胞の分化段階に応じてこれらの因子が発現を可逆的あるいは非可逆的に制御している機構が存在している可能性を示す結果が得られた。

2. 初代培養 MSC を用いた解析

2-1. 初代培養 MSC の増殖・分化能

12 例の試料提供者腸骨骨髓より MSC を単離、増殖させた。うち 8 例は既に増殖が停止し、停止までの時間は 48 日～196 日で平均 121 日であった。増殖中 4 例のうち 3 例は培養開始後 60 日以内と短期間であるが、他の 1 例は 280 日を経過してもまだ旺盛な増殖能を示している。この細胞は 24 才、女性より樹立されたものであり継代 3 代目の時点で骨、軟骨、脂肪への分化能が確認され、継代 24 代目の時点でも同様な分化能が確認された。

2-2. クロマチンリモデリング因子の分化能への関与解析

単離されたクロマチンリモデリング因子に関して、各初代培養 MSC での継代毎の遺伝子発現をみると、特定の方向への分化を誘導しない場合、その発現レベルはほぼ一定に保たれていた。一方、分化誘導後、特に軟骨分化誘導後に発現レベルが著しく低下した。詳細な解析により、この遺伝子にはこれまで報告されていないスプライシングバリエーションが存在することが判明した。siRNA を用いた発現抑制を試みたが、作成した複数の siRNA の中で最も有効であったものでも蛋白レベルで 25% 程度の抑制であったため、抑制による影響に関しては結論が得られていない。一方、強制発現系に関しては、一過性の強発現により MSC の分化関連遺伝子の発現が低下することが観察された。以上の解析よりこのクロマチンリモデリング因子は MSC を未分化な状態に維持しておく上で、重要な役割を果たしていることが想定された。

2-3. 細胞表面マーカーの同定

不死化した MSC クローンは、これまで報告されている細胞表面マーカーである CD44、105、106、156 のいずれも陽性であった。一群のファミリーを形成する細胞表面マーカーの解析過程で、そのうちの一つのみが不死化 MSC

において非常に強く発現しており、他の遺伝子が発現していないことを見出した。一方初代培養 MSC ではファミリーの他の遺伝子の発現も検出された。初代培養 MSC が異なる発現パターンを示すヘテロな細胞の集合である可能性を考慮すると、この細胞表面マーカーの MSC に対する親和性が伺われる。興味深い点は、1-1 項で述べた長期培養が可能となった細胞では、このマーカーのみが陽性であった。

3. MSC を用いた壊死骨再建

3-1. 大腿骨骨幹部処理骨モデルの作成

対照群が術後 2 週より仮骨形成を認め、6 週では全周性の骨癒合を認めたのに対し、液体窒素処理群では仮骨形成は乏しく、6 週でも周囲の仮骨で連絡性はあるものの、骨切断端は偽関節の状態であった。また処理骨皮質内には骨細胞が認められずいわゆる“empty lacunae”の状態であった。以上より、このモデルは処理骨再利用に対する MSC の応用モデルとして妥当であると考えられた。

3-2. イヌ腸骨よりの MSC の採取、増殖及びレトロウィスルによる標識

骨髓液より採取、培養した MSC は、ヒトの場合と同様に骨、軟骨及び脂肪へ分化誘導することが可能であった。またヒトと同様に、比較的初期に p16 遺伝子の発現が亢進し、増殖速度が低下したが、約 5ml の骨髓液から培養を開始し、4 週間後に 1×10^7 の細胞を得ることができた。初代培養細胞におけるレンチウィスルベクター pLenti6/V5-GW/lacZ による標識の効率は約 50% とほぼ満足できるものであった。

3-3. イヌ月状舟状骨を用いたキーンベック病モデルの作成と治療実験

実験群を三群に分けた。開窓後、海綿骨搔爬及び液体窒素処理のみを行った例を C 群、液体窒素処理後、予め皮下組織から樹立した線維芽細胞を β -TCP とともに、搔爬部に充填し、その上を血管柄付き骨片で被覆したものを F 群、そして線維芽細胞の代わりに MSC を用いたものを M 群とした。C 群は術後 2 週間で既に X 線所見上、圧潰が認められ 4 週で摘出した時点では、搔爬部に骨再生は全く認められず、完全に圧潰した状態であり、それに伴い遠位手根列の亜脱臼及び橈骨関節面での変形性関節症変化が認められた。F 群では画像上 C 群に比べて軽度であるが、やはり徐々に圧潰が進行し、切除標本でも明確な変形が認められた。一方 M 群では画像上、形態は維持されており、切除標本のサイズ、重量

ともに F 群を上回っていた。内部の骨再生像をマイクロ CT で観察すると、F 群と M 群の間には明確な差が認められ、F 群では繊維組織と思われる壊死部が多く残存しているのに対し、M 群ではほぼ全域にわたる骨梁の再構築が認められ、壊死骨再生の所見が得られた。

D. 考察

1. 不死化 MSC 及び骨肉腫細胞を用いた分化制御の解析

現行の方法によって単離されたヒト MSC の分化能が多様であることは、組織再生を計る上で考慮すべき点である。異なる分化能をもつクローンを用いた比較解析により、分化能と関連した因子の同定が期待できる。また分化方向決定機構にエピゲノム因子が関与している事実は、SOX9 等のマスター遺伝子の発現のみでは説明しがたい現象の理解とともに、クロマチン修飾機構による分化制御という新しい展開につながる成果であると考えられる。

2. 初代培養 MSC を用いた解析

MSC の単離法に関しては未だに理論に基づいた方法が確立されていない。初代 MSC は明らかにヘテロな集団であり、その中には長期にわたり培養可能な細胞が含まれていることが判明した。この細胞が真の MSC であるかについては、今後更に解析が必要であるが、他の細胞系との比較による細胞表面マーカーの同定などに有用な試料となることが期待される。多分化能維持機構についても多くは不明のままである。現在解析しているクロマチンリモデリング因子は、ES 細胞の多分化能の維持にも関与していることが報告されており、広く幹細胞の分化能維持機構に関与している因子である可能性があり、非常に興味深い因子であると考えている。今後は誘導可能な発現系を構築するなどして、解析を進めたい。

3. MSC を用いた壊死骨再建

イヌ月状舟状骨を用いたキーンバック病モデルの作成及び治療実験は、臨床病態及び現行の治療法に非常に近いモデルであり、かつ術後の安静が不可能な大型動物を用いたモデルである。このような実験モデルにおいて MSC を用いた治療により、変形が生ずることなく完全に骨再生が得られたことは、臨床応用に向けて大きな成果と考える。これらのデータをもとに、MSC を用いた壊死骨再生治療を京都大学に申請する予定である。

E. 結論

MSC を用いた組織再生の基礎的データを得るために、不死化 MSC を樹立し、その多分化能の解析を行い、MSC が分化能に関して多様な細胞の集団であることを明らかにした。また骨軟骨の分化決定機構にエピゲノム因子が関与していることが判明し、クロマチン修飾機構の改変による分化誘導が期待できる結果が得られた。初代培養 MSC は生物学的にヘテロな集団であり、その中には多分化能及び増殖能を携えた真の MSC が存在している可能性があり、その細胞表面マーカーの候補を同定できた。そして MSC を用いた壊死骨再生治療は、イヌのモデルにおいて顕著な有効性を示し、ヒト病態への応用が期待される。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Okamoto, T., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamata, T., Hosaka, T., Nishijo, K., Nakamura, T., Kiyono, T., Toguchida, J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295:354-61, 2002.
- 2) Nakamata, T., Aoyama, T., Okamoto, T., Hosaka, T., Nishijo, K., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. In vitro demonstration of cell-to-cell interaction in growth plate cartilage using chondrocytes established from p53^{-/-} mice. *J. Bone Miner. Res.*, 18:97-107, 2003.
- 3) Ushio, K., Oka, M., Hyon, S. H., Yura, S., Toguchida, J., Nakamura, T. Partial hemiarthroplasty for the treatment of osteonecrosis of the femoral head. An experimental study in the dog. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85: 922-30, 2003.
- 4) 戸口田淳也、岡本健、青山朋樹、間葉系幹細胞の分化制御機構：骨・軟骨の再生を目指して *細胞工学* 22 : 548-551、2003.
- 5) 岡本健、戸口田淳也、中村孝志：骨・軟骨を対象とした再生医療。 *日本臨床* 61 : 432-438、2003.
- 6) Aoyama, T., Okamoto, T., Nagayama, S., Nishijo, K., Ishibe, T., Yasura, K., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. Methylation in the core-promoter region of the chondromodulin-I gene determines the cell-specific expression by regulating

the binding of transcriptional activator, Sp3. *J. Biol. Chem.*, 279: 28789-97, 2004.

- 7) Aoyama, T., Bojian Liang, B., Okamoto, T., Matsusaki, T., Nishijo, K., Ishibe, T., Yasura, K., Nagayama, S., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.*, in press
- 8) 戸口田淳也、青山朋樹：臨床応用をめざした間葉系幹細胞の基礎と治療実験。医学のあゆみ 209：937-941、2004.

学会発表

- 1) 戸口田淳也：骨軟骨再生デバイスとしての間葉系幹細胞の増殖・分化制御。医工学フォーラム (2002. 2. 16 京都)
- 2) 戸口田淳也：京都における再生医学研究の現場からー組織工学と細胞の不死化・癌化。日本バイオマテリアル学会・シンポジウム (2002. 2. 28 京都)
- 3) 岡本健、仲俣岳晴、青山朋樹、西庄功一、保坂泰介、中山富貴、坪山直生、中村孝志、戸口田淳也、清野透：不死化ヒト骨髄間葉系幹細胞株の樹立と多分化能の解析。第 15 回日本軟骨代謝学会 (2002. 3. 8 前橋)
- 4) 青山朋樹、仲俣岳晴、岡本健、保坂泰介、西庄功一、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也：p53-/-マウス由来軟骨細胞株を用いた成長軟骨における細胞間相互作用の再現。第 15 回日本軟骨代謝学会 (2002. 3. 8 前橋)
- 5) 岡本健、仲俣岳晴、青山朋樹、西庄功一、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也、清野透：不死化ヒト骨髄間葉系幹細胞株の樹立と多分化能の解析。第 1 回日本再生医療学会総会 (2002. 4. 18 京都)
- 6) 岡本健、仲俣岳晴、青山朋樹、西庄功一、中山富貴、中村孝志、清野透、戸口田淳也：不死化ヒト骨髄間葉系幹細胞株の樹立と多分化能の解析。第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2002. 10. 12 青森)
- 7) 戸口田淳也：間葉系組織の再生医療ー科学と錬金術のはざまー。浜松整形外科医学会・教育研修講演 (2002. 11. 6 浜松)
- 8) 岡本健、青山朋樹、西庄功一、安良興、石部達也、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也、清野透：不死化ヒト骨髄間葉系幹細胞株の樹立と多分化能の解析。第 25 回日本分子生物学会年会 (2002. 12. 13 横浜)
- 9) 青山朋樹、岡本健、松崎尚志、西庄功一、石部達也、安良興、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也。p53-/-マウス由来関節軟骨細胞株を用いたプロスタグランジン E2 の関節軟骨に対する作用の解析。第 16 回日本軟骨代謝学会 (2003. 3. 7 岡山)
- 10) 岡本健、青山朋樹、西庄功一、安良興、石部達也、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也、清野透。不死化ヒト間葉系幹細胞株を用いた多分化能の研究。第 16 回日本軟骨代謝学会 (2003. 3. 8 岡山)
- 11) 青山朋樹、岡本健、西庄功一、青山朋樹、石部達也、安良興、中山富貴、坪山直生、中村孝志、戸口田淳也。骨肉腫におけるコンドロモデュリン-I 遺伝子発現のエピジェネティック制御機構。第 36 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、(2003. 7. 11 神戸)
- 12) 戸口田淳也。間葉系幹細胞の増殖分化制御機構。第 25 回骨・カルシウム代謝研究会 (2003. 9. 19 京都)
- 13) 戸口田淳也。間葉系腫瘍と組織再生の接点。第 253 回 MOC (2003. 9. 22 福岡)
- 14) 青山朋樹、岡本健、西庄功一、石部達也、安良興、柴田弘太郎、嶋靖子、長山聡、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也。骨肉腫におけるコンドロモデュリン-I 遺伝子発現のエピジェネティック制御機構。第 62 回日本癌学会総会 (2003. 9. 27 名古屋)
- 15) 戸口田淳也。患肢温存治療へ向けた再生医学の展望。第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2003. 10. 17 北九州)
- 16) 青山朋樹、岡本健、松崎尚志、西庄功一、石部達也、安良興、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 p53-/-由来関節軟骨細胞株を用いたプロスタグランジン E2 の関節軟骨に対する作用の解析。第 18 回日本整形外

科学会基礎学術集会 (2003. 10. 17 北九州)

- 17) 柴田弘太郎, 岡本健, 青山朋樹, 安良興, 中村孝志, 戸口田淳也. p16 遺伝子不活化による間葉系幹細胞の不死化. 第 24 回日本炎症・再生学会 (2003. 11. 26, 京都)
- 18) 青山朋樹, 岡本健, 西庄功一, 石部達也, 安良興, 柴田弘太郎, 嶋靖子, 中山富貴, 中村孝志, 長山聡, 戸口田淳也. 骨肉腫におけるコンドロモデリン-I 遺伝子発現のエピジェネティック制御機構. 第 26 回日本分子生物学会年会 (2003. 12. 10 神戸)
- 19) 神戸任鮮英, 加藤元新規 HAC ベクター系の構築: 間葉系幹細胞の遺伝子再生医療への応用を目指した基礎的検討. 第 26 回日本分子生物学会年会 (2003. 12. 11 神戸)
- 20) 戸口田淳也: 生活習慣病と再生医療: 骨軟骨疾患を対象として. 近畿保健所長会連絡協議会 (2004. 2. 13 京都)
- 21) 戸口田淳也: 運動器再生医療のための間葉系幹細胞の基礎. 第 48 回日本リウマチ学会 (2004. 4. 15 岡山)
- 22) 戸口田淳也: 間葉系幹細胞に対する期待と疑問. 第 9 回広島整形外科先端医学セミナー (2004. 6. 23 広島)
- 23) 嶋靖子, 岡本健, 石部達也, 青山朋樹, 西庄功一, 安良興, 嶋靖子, 柴田弘太郎, 中山富貴, 中村孝志, 清野透, 戸口田淳也: 骨髄間葉系幹細胞の癌化機構の解析. 第 37 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2004. 7. 15 東京)
- 24) 嶋靖子, 岡本健, 青山朋樹, 西庄功一, 石部達也, 柴田弘太郎, 中山富貴, 中村孝志: 骨髄間葉系幹細胞の癌化機構の解析. 第 63 回日本癌学会総会 (2004. 9. 29 福岡)
- 25) 青山朋樹, 梁伯堅, 松崎尚志, 安良興, 中村孝志, 戸口田淳也: PGF2 は EP2 レセプターを介して関節軟骨の増殖を促進する. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2004. 10. 21 東京)
- 26) 嶋靖子, 岡本健, 石部達也, 中村孝志, 清野透, 戸口田淳也: 間葉系幹細胞の

癌化機構の解析. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2004. 10. 22 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究者 牛田 多加志

東京大学大学院医学系研究科 教授

A. 研究目的

関節軟骨細胞の形質を維持しながら関節用軟骨組織を生体外で再構築するためのシート状の 3 次元培養担体を開発し, その 3 次元培養担体を基に関節軟骨組織エレメントを構築することを目的とする。また, 均一な粒径のセラミックビーズと細胞および細胞が産生する細胞外マトリックスからなる細胞ビーズシートを作製, シート間に血管誘導層を介在させ積層することで, 3 次元培養骨を構築することを目的とする。

B. 研究方法

PLGA ニットメッシュを用いて, type I コラーゲンからなるマイクロスポンジをフリーズドライ法により形成させた。ウシ関節軟骨由来細胞をサスペンションにして, 上記の 3 次元培養担体に播種した。再構築させた組織の切片を H&E 染色, safranin-O/fast green 染色, toluidine blue 染色を行い, マトリックス産生を評価した。また, type II コラーゲン抗体を用いた免疫染色を行った。一方, type IA2 コラーゲン, type IIA コラーゲン, アグレカンの遺伝子発現を Northern blotting により検証した。一方, リン酸カルシウムとポリビニルアルコールのスラリーを液体窒素上に滴下することにより, 多孔質・球状のリン酸カルシウムビーズが形成させた。細胞はヒトより採取した骨髄からの接着性の細胞のみを 2×10^5 回継代培養した骨髄間質細胞を用いた。粒径 $300 \mu\text{m}$ の β -TCP ビー

ズを一層敷き詰めた容器に細胞を播種・培養することで、シート状の組織（細胞ビーズシート）が形成されるかを検討した。シートを骨芽細胞分化培地中で培養することで、骨への分化を誘導した。ビーズシートを6枚積層、シート間には type I atelo-collagen を介在させた厚さ 10mm の立方形状培養骨を免疫不全マウスに皮下移植、8 週間後に摘出し形状の比較を行った。

C. & D. 結果と考察

再生組織切片の組織化学的解析から、培養軟骨細胞は PLGA メッシュにコラーゲンマイクロスポンジをハイブリッドした 3 次元培養担体に均一に播種され、関節軟骨特有のマトリックスが産生されていることが示された。培養と共に、type I コラーゲンの発現が低下し、一方で type II コラーゲンの発現が増加した。そして aggrecan の発現も培養とともに増加した。これは、いったん脱分化の傾向をもつ軟骨細胞が関節軟骨細胞としての形質を取り戻し再分化したことを示している。一方、骨形成実験において、良好なシート形成が認められた。細胞を播種し、3 日間の培養の後、骨芽細胞分化培地中で 2 週間培養すると、鉗子にて把持が可能な程度の強度を持った細胞ビーズシートが作製された。ゲル単独およびゲル中に細胞とビーズを懸濁・封入したサンプルでは移植後 8 週の観察で初期形状が維持できなかったのに対し、ビーズシートの積層にて作製したものでは立方形状が保持されていた。血流量の定量的な解析に至っていないが、組織学的に中心部まで移植ヒト細胞の壊死を伴わない均一な存在が確認され、辺縁部中心ではあるがビーズ周囲にヒト細胞由来の骨新生が確認された。

E. 結論

PLGA メッシュにコラーゲンマイクロスポンジをハイブリッドした 3 次元培養担体に軟骨細胞を播種し、培養することにより軟骨細胞の形質が維持され、また軟骨組織様のシート組織が再構築された。また、新しいコ

ンセプトの培養骨エレメントとしてセラミックビーズと細胞からなる細胞ビーズシートの開発を行い、移植実験からビーズ周囲の骨形成と中心部まで均一な細胞分布が得られていることが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness, Guoping Chen, Takashi Sato, Takashi Ushida, Rei Hirochika, Yoshio Shirasaki, Naoyuki Ochiai, Tetsuya Tateishi, J Biomed Mater Res 67A: 1170-1180, 2003
- 2) Bone tissue engineering based on bead-cell sheets composed of calcium phosphate beads and bone marrow cells, Katsuko S. Furukawa, Shunsuke Miyauchi, Daisuke Suzuki, Yoshikazu Umezumi, Tsuneo Shinjo, Takashi Ushida, Miki Eguchi, Tetsuya Tateishi, Materials Science and Engineering C 24:437-440 2004
- 3) Novel bone graft model using bead-cell sheets composed of tricalcium phosphate beads and bone marrows, Materials Science and Engineering C 24: 875-879 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

生体用担体及び細胞培養方法（特開 2004-267562）

分担研究者 渡辺 研

国立長寿医療センター研究所

運動器疾患研究部 骨機能再建研究室長

A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞の細胞寿命の延長に際して、高効率の遺伝子導入法を検討する事に

より、少量の幹細胞を効果的に増幅させる方法について検討を行う。

B. 研究方法

遺伝子の細胞への導入効率は、Green Fluorescent Protein (GFP) 発現ベクター pMx-GFP を用いることにより、導入細胞を蛍光により同定し算出した。遺伝子導入は、ecotropic, amphotropic, ならびに pantropic (lentivirus 系) のパッケージング細胞に transfection し、非増殖型レトロウイルスを産生させ、間葉系細胞株もしくは初代骨髄間葉系細胞に対して、培養上清に加える事により感染させ、培地交換の後、24 時間後に蛍光観察をした。Msx2 の N 末端側にタンパク質導入配列 (TAT) を付したものを pGEX-6P1 ベクターに挿入し、大腸菌において、GST タンパクと TAT-Msx2 の融合タンパク質として産生させた。同様に点変異体 (T147A) 型 Msx2 も PCR 法を用いて作製し、GST-TAT 融合タンパク質として調製した。グルタチオンセファロースにより精製を行った後、GST タンパク部分を除去するため、Precision プロテアーゼにより 4℃にて反応させ、Msx2 もしくは TAT-Msx2 タンパク質を得た。たんぱく質は SDS-PAGE 法により、純度・濃度を検定した。細胞への導入については、間接蛍光抗体法ならびにウエスタンブロッティング法により検討を行った。脂肪細胞分化は、脂肪細胞株 (3T3-L1) を用い、分化誘導は 15% FCS および MDI (0.5 mM methylisobutylxanthine, 1 mM dexamethasone, 1 mg/mL insulin) を含む phenol red-free aMEM で培養することにより行った。脂肪細胞分化は脂肪滴を Oil-Red O で染色することにより評価した。筋細胞分化は、筋芽細胞株 (C2C12) を用い、通常の 15%FCS を 2% horse serum へ変えることにより細胞融合・筋管形成の誘導を行った。

(倫理面への配慮)

当該分担研究課題では、ヒトゲノム・遺伝子解析を対象としておらず、また、材料採取等に伴う動物実験は、国立長寿医療センター動物実験施設指針等に則り、材料、モデルともに、動物愛護上の配慮をしたうえで行った。

C. 研究結果

間葉系細胞株 (筋芽細胞 C2C12、骨髄由来ストローマ細胞 ST-2、間葉系細胞 C3H10T1/2、前脂肪細胞 3T3-L1、軟骨細胞 ATDC-5、前骨芽細胞 MC3T3-E1、骨芽細胞 KUSA-A1) ならびに初代培養骨髄ストローマ細胞をに対して、EcoPack293、PT67、GP2-293/VSV-G の各パッケージング細胞により作製したウイルスをポリブレン存在下で感染させ、蛍光による遺伝子導入効率を検討したところ、どの細胞においても、GP2-293/VSV-G 細胞により作製した Pantropic ウイルスが高効率の遺伝子導入が観察された。また、Msx2 と Estrogen Receptor (ER) のリガンド結合領域の融合タンパクを発現するレトロウイルスベクターを作製し、骨芽細胞株 KUSA-A1 に感染させ、ER アゴニスト (タモキシフェン) により Msx2 活性を誘導する系を構築した。Msx2ER を発現させた細胞株では、骨芽細胞のマーカーであるアルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性がタモキシフェンにより消失した。Drosophila Antennapedia などのホメオボックスたんぱく質は、内在性にたんぱく質導入配列 (PTD) を有し、細胞膜を透過して細胞内外へ移行することができる事が知られている。このことから、ホメオボックスを有す Msx2 は、たんぱく質がそのまま細胞内へ導入することが考えられたので、大腸菌で合成させ、培地に添加して導入を試みたが、数パーセントの細胞にしか導入されなかったため、塩基性の TAT ペプチドを N 末端側に添加した TAT-Msx2 を合成し、293 細胞を対象に PTD を試みた。その結果、培地に添加後、2 時間後にはすでに 70% の細胞が陽性となった。COS7 細胞でも同様に高 PTD 効率が観察された。間葉系細胞である骨芽細胞株 KUSA-A1、筋芽細胞株 C2C12、前脂肪細胞株 3T3-L1 においても、導入効率はやや下がるものの、有意 (50%~) に TAT-Msx2 が導入された。脱分化誘導活性について、KUSA-A1 細胞の ALP 活性抑制活性を調べたところ、10 倍量の大腸菌粗抽出液では観察されない抑制活性が TAT-Msx2 導入後、3 日で確認された。3T3-L1 細胞の MDI 添加による脂肪細胞分化系において、分化培

地 (MDI 含有培地) へ転換後 1 日後より、最終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ の TAT-Msx2 もしくは GST bacterial lysate を添加して培養を続けたところ、無添加、GST 群では Oil Red 染色脂肪滴が顕著に蓄積したのに対し、TAT-Msx2 群では脂肪分化が顕著に抑制されていた。しかしながら、分化し、細胞質に大量に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞の脱分化は誘導されなかった。一方、C2C12 細胞の筋分化系では、細胞融合ならびに筋管形成し、最終分化した筋細胞へ TAT-Msx2 を添加したところ、筋管の形態変化ならびに一部単核細胞の増加といった Msx2 遺伝子導入による脱分化誘導と一致した現象が見られた。Msx2 には頭蓋形態形成異常を伴う先天疾患で検出されている機能異常型点変異体が知られている。その中には DNA 結合能の低下した T147A 型についても検討を行ったところ、野生型 Msx2 同様に脂肪細胞分化抑制能があることがわかった。

D. 考察

レンチウイルス系ベクターは、標的細胞膜に特異的なウイルス受容体を必要としないため、ウイルス力価を上げる事により高効率の遺伝子導入が達成されたと考えられ、ヒト由来細胞でも効果的である可能性が示された。先天疾患や癌、難治疾患に対する遺伝子治療が進められているが、実際、発癌などの遺伝子治療独特の副作用の問題が顕在化してきている。本研究では、幹細胞の増幅を目的としていることから、遺伝子による恒常的活性化は問題点も抱えているのが現実である。そこで、タンパク質導入という持続性の点で遺伝子治療に劣るものの、安全性という点で評価できる方法を取り入れ、その導入法について検討を行った。本年度の研究では、ホメオボックスタンパクという比較的高次構造が単純である分子の導入に成功したが、SS 結合や金属酵素など高次構造が複雑なタンパクの導入に関しては更なる検討が必要であると考えられた。一方、遺伝子導入法により強制発現させた Msx2 同様に PT 法により導入した Msx2 も機能することが示された。この PT による Msx2 導入細胞を *in vivo* での分化試験成績は得られなかったが、目的でもある *ex vivo* での効果としては一定の成果が得ら

れたものと考えられる。また、T147A 型 Msx2 でも同様の効果が得られたことにより、分化抑制機能には DNA 結合能はあまり寄与しないことが示された。これは遺伝子導入により得られた知見と一致している。野生型 Msx2 の強制発現系では骨芽細胞分化促進能もあるが、T147A 型 Msx2 ではその機能が消失しており、骨芽細胞分化には DNA 結合が必要であることが示唆される。今後、機能亢進型変異 (P148H) 一骨芽細胞分化誘導型を用いて有効的に骨芽細胞分化を他の系譜の細胞 (脂肪細胞など) より誘導を試みる予定である。また、T147A 型 Msx2 は骨芽細胞以外の細胞系譜 (軟骨細胞など) への分化誘導の際は、有効である可能性がある。

E. 結論

生体では抗原性等の問題も考えられるが、DNA 導入に代わる機能分子導入発現法として、PT 法もその候補として有効である可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- K. Watanabe & A. Hishiyama. "Mouse models of senile osteoporosis." *Mol. Aspects Med.* (2005) *in press*.
- Sasaki, L. Hinck, & K. Watanabe. "RumMAGE-D the members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins." *J. Recept. Signal. Transduct.* (2005) *in press*
- Hishiyama & K. Watanabe. "Progeroid syndrome as a model for impaired bone formation in senile osteoporosis" *J. Bone Miner. Metab.* (2004) **22**:399-403.
- M.E. Williams, P. Strickland, K. Watanabe, & L. Hinck "UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE." *J. Biol. Chem.* (2003) **278**:17483-17490.
- T. Matsuda, H. Suzuki, I. Oishi, S. Kani, Y. Kuroda, T. Komori, A. Sasaki, K. Watanabe, & Y. Minami "The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the MAGE-family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution." *J. Biol. Chem.* (2003) **278**:29057-29064.
- M. Watanuki, A. Sakai, T. Sakata, H. Tsurukami, M. Miwa, Y. Uchida, K. Watanabe, K. Ikeda, & T. Nakamura. "Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading." *J Bone Miner Res* (2002)

17:1015-1025

Sasaki, Y. Masuda, K. Iwai, K. Ikeda, & K. Watanabe. "A RING finger protein Praja 1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1." *J. Biol Chem.* (2002) 277:22541-22546

学会発表

- 1) 菱谷彰徳、伊東昌子、池田恭治、渡辺 研
- 2) Ataxia Telangiectasia Mutated (Atm) ノックアウトマウスにおける骨形成の低下をともなう骨量減少 日本骨代謝学会第20回年会 岡山 平成14年 7月25日～27日
A. Hishiyama, M. Ito, K. Ikeda, K. Watanabe
- 3) Decreased bone formation in ataxia telangiectasia mutated (ATM) knockout mice. The 24th Annual Meeting of the American Society for Bone &

Mineral Research. September 20-24, 2002, San Antonio, Texas, USA.

- 4) Shinotsuka C, Hishiyama A, Mizuno K, Aburatani H, Ikeda K, Watanabe K. Induction of multipotent stem cells through dedifferentiation of mesenchymal cells by Msx2 protein transduction. The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. October 1-5, Seattle, Washington, USA.

分担研究者 久保田 直樹
中外製薬株式会社製品育成研究部 課長

A. 研究目的

ヒトの骨粗鬆症のモデルとして汎用される、動物モデルを用い、ビタミン D あるいはその誘導体が骨髄細胞分化に及ぼす影響を検討した。また、ビタミン D 受容体欠損細胞株を用い、ビタミン D の骨髄細胞分化に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1-1. 卵巣摘除ラットの作成とビタミン D 誘導体投与による骨髄細胞の変化

雌性ラット(Wistar-imamichi、動物繁殖研究所)を10ヶ月令にて入手し、体重を指標としてコンピュータを用いた層別連続的無作為法により、各実験群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように1群7の8群に配分した。投与開始2週間前に、エーテル麻酔下で背部皮膚を切開し、両側卵巣を摘出した(偽手術群は切開のみ)。水は給水器にて自由摂取とし、飼料もCE-2(日本クレア社製、ガンマ線滅菌済み)をステンレス製給餌器に入れ自由に摂取させた。

両側の卵巣摘除後14日から12週間、1週間に5日(月～金曜日)、1日1回、8:00～12:00の間に、ディスポーザブル注射筒およびラット用ゾンデを用いて、投与液を強制経口投与した。ビタミン D 誘導体の ALF [1α -hydroxyvitamin D_3]あるいは ED-71 [2β -(3-hydroxypropoxy)- 1α , 25-dihydroxyvitamin D_3] はそれぞれ MCT (medium chain triglyceride、日清製油) 溶液とした。投与用量はそれぞれ 1 mL/kg で、ALF は 0.1, 0.2, 0.4 mg/kg, ED-71 は 0.05, 0.1, 0.2 mg/kg となるように、各個体の投与液量は投与日に最も近い体重を用いて算出した。最終投与の翌日に剖検を行い、骨標本、血清および尿を採取した。

腰椎 L2-L4 の平均骨密度は、二重 X 線骨塩定量装置 (DCS-600; アロカ社製) にて測定した。骨吸収マーカーの尿中デオキシピリジノリン排泄量は、絶食下で採取した 24 時間蓄積尿をオステオリンクス(住友)によって測定した。血清オステオカルシンは rat osteocalcin ELISA kit (アマシャム; RPNJ 404) にて測定した。脛骨近位部の脱灰病理標本作製し hematoxylin and eosin (HE) 染色にて骨髄脂肪と骨梁構造を検討した。

1-2. ビタミン D 受容体欠損細胞株を用いた、ビタミン D の骨髄細胞分化に及ぼす

影響の検討

ビタミン D は骨粗鬆症のほか、皮膚炎、慢性腎不全、骨軟化症などの治療薬として使われる。いろいろな細胞に作用して強力な分化誘導作用を示す。また、リンパ球系細胞の増殖・分化への影響を与え、免疫機能を調整している。これらの働きは細胞核内に存在するビタミン D 受容体と結合することによって起こると考えられているが、解明されていない点も多い。

条件的不死化細胞は、トランスジェニックマウスとビタミン D 受容体の遺伝子を欠損したノックアウトマウスを交配させ、SV40T 抗原遺伝子を持った同受容体欠損マウスを得られたもので、対照として、抗原遺伝子と受容体を併せ持つマウスを用い、常法に従って細胞株が樹立された。なお、SV40 と呼ばれるウイルスのガン抗原遺伝子を持つトランスジェニックマウスは、すべての組織や臓器の細胞が不死化する可能性がある。さらに、本研究のように、温度感受性の SV40T 抗原を発現したトランスジェニックマウスを用いると、不死化細胞は培養温度を調節することにより分化形質も制御可能となることから、極めてユニークで有用な実験ツールである。また、増殖性ととも分化形質の維持された、いろいろな分化段階の細胞の株化が可能である。

実際、両マウスの細胞株とも 33°C で増殖し、39°C では増殖を停止したので、抗原遺伝子が細胞増殖を制御していることが確認できた。

両細胞株を分化の状態にさせるため、培養容器の培養面をほぼすべて覆った後 39°C に培養温度を移行させて、受容体がない細胞株とある細胞株の脂肪細胞への分化能を調べた。さらに、受容体を介したビタミン D の脂肪細胞分化への影響を調べるために、培養温度を 39°C に移行すると同時に、活性型ビタミン D を添加した。いずれも、脂肪細胞数を計測するために、オイルレッド O 染色法で赤色に染まった脂肪細胞を顕微鏡下で計数した。

(倫理面への配慮)

ラットを実験動物として本研究に使用するにあたり中外製薬株式会社動物実験指針を遵守して実施した。

全ての実験の研究内容は、組換え DNA 安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

C. 研究結果

1-1. 卵巣摘除ラットの作成とビタミン D 誘導体投与による骨髄細胞の変化

卵巣を摘出したラットにおいては、閉経後の骨粗鬆症患者に見られる変化と同様に、骨吸収と骨形成のいずれもが亢進した結果、骨量が減少していることが観察された。このとき、2 種類のビタミン D 誘導体はいずれも骨吸収を抑制し、骨形成を維持あるいは促進して、その結果として骨量の減少抑制効果を示すことが明らかとなった。

また、脛骨近位部の病理組織標本を注意深く観察すると、卵巣を摘出してプラセボを投与した動物群に比して ALF を投与した群では、骨梁が太く密になったことに加え、骨髄の脂肪細胞の減少が観察された。以上のことから、ビタミン D は骨代謝関連細胞のみならず、骨髄細胞中の脂肪細胞の数に影響を及ぼした可能性が考えられた。

1-2. ビタミン D 受容体欠損細胞株を用いた、ビタミン D の骨髄細胞分化に及ぼす影響の検討

脂肪細胞へ分化した細胞数は、ビタミン D 受容体がある細胞株では $1854 \pm 287 \text{ cell/cm}^2$ であったのに対し、ビタミン D 受容体がない細胞株では $7740 \pm 27 \text{ cell/cm}^2$ と明らかに増加していた。さらに、ビタミン D 受容体を介したビタミン D の脂肪細胞分化への影響を調べるために、培養温度を 39°C に移行すると同時に、活性型ビタミン D を添加したところ、ビタミン D 受容体がある細胞株では脂肪細胞へ分化した細胞数が $806 \pm 170 \text{ cell/cm}^2$ と著しく減少したが、ビタミン D 受容体がない細胞株

では $6934 \pm 1737 \text{ cell/cm}^2$ とほとんど影響を受けなかった。

以上の結果から、ビタミン D はその受容体を介して脂肪細胞の分化を抑制していると考えられた。

D. 考察

本年度、我々は、間葉系細胞にビタミン D を作用させることによって脂肪細胞分化が抑制されること、さらに、その作用はビタミン D 受容体を介する可能性を明らかにすることが出来た。骨欠損部における骨形成については、担体に細胞を染み込ませて足場を形成することが重要であると報告してきたが、今回、骨粗鬆症治療薬として広く用いられているビタミン D に再生骨を形成させる上で有利な細胞種構成を提供できる可能性を認めたことは、興味深い。

今後、他の成長因子や担体および添加物などの検討を継続していくことで、骨石灰化を確実にするための条件の最適化が可能であると考ええる。

E. 結論

ビタミン D は破骨細胞や骨芽細胞に作用するばかりではなく、間葉系細胞に作用して脂肪細胞への分化を抑制し、骨量を増加させたことから、骨の形成においては、間葉系細胞の足場とともにビタミン D のような外来因子が重要な役割をする可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 研究成果に関する一欄表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
梅澤明弘	第3章 再生医療のキーテクノロジー 技術編5		細胞分離・幹細胞工学、「図解再生医療工学」	(株)工業調査会	東京	2004	
梅澤明弘	6 再生医療とエピジネティクス エピジネティクス	佐々木裕之		シュプリンガー・フェアラーク東京	東京	2004	229-234
梅澤明弘	7 章再生治療モデル、「ヒト疾患モデルー難病の病態解明と診断・治療への応用」	秦 順一	間葉系幹細胞を用いた細胞治療	文光堂	東京	2004	
梅澤明弘	間葉系幹細胞		生活習慣と遺伝子疾患	メディカルレビュー社	東京	2002	255-257
梅澤明弘	細胞不死化・臓器再生・置換から寿命延命の可能性をさぐる		老化研究が分かる	羊土社	東京	2002	4章-3 114-120 2002

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Kuroda, M., Oikawa, K., Yoshida, K., Takeuchi, A., Tekeuchi, M., Usui, M., Umezawa, A., and Mukai, K.	Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL.	Cancer letter	in press		2005
Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X-K., Umezawa, A., and Kiyono, T. Correspondence to AU.	Immortalization of human fetal cells: The life span of umbilical-cord-blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway.	Mol. Biol. Cell,	16	1491-1499	2005
Tschiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Umezawa, A. Correspondence to AU.	Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet.	Cell Tissue Res,	316	141-153,	2004
Sakurai, K., Iizuka, S., Shen, J-S., Meng, X-L., Mori, T., Umezawa, A., Ohashi, T., and Eto, Y.	Brain transplantation of genetically modified bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice.	Gene Therapy,	11 (19)	1475-1481	2004
Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K.	Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression.	Cancer Res,	64	3545-3549	2004
Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and Umezawa, A. Correspondence to AU.	Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?	J Gene Med,	6(8)	833-845	2004

Higuchi, A., Hamamura, A., Shindo, Y., Kitamura, H., Yoon, B-O., Mori, T., Uyama, T., and Umezawa, A.	Photon-modulated changes of cell attachments on poly(spiropyran-co-methylmethacrylate) membranes,	Biomacromolecules	5(5)	1770-1774	2004
Kato, Y., Imabayashi, H., Mori, M., Tani, T., Taniguchi, M., Umezawa, A., and Tsunoda, Y.	Developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal: Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells.	Biol Reprod,	70	415-418,	2004
Sharov, A. A., Piao, Y., Matoba, R., Dudekula, D. B., Qian, Y., VanBuren, V., Falco, G., Martin, P. R., Stagg, C. A., Bassey, U. C., Wang, Y., Carter, M. G., Hamatani, T., Aiba, K., Akutsu, H., Sharova, L., Tanaka, T. S., Kimber, W. L., Yoshikawa, T., Jaradat, S. A., Pantano, S., Nagaraja, R., Boheler, K. R., Taub, D., Hodes, R. J., Longo, D. L., Schlessinger, D., Keller, J., Klotz, E., Kelsoe, G., Umezawa, A., Vescovi, A. L., Rossant, J., Kunath, T., Hogan, B. L. M., Curci, A., D'Urso, M., Kelso, J., Hide, W., and Ko, M. S. H.	Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos,	PLoS Biology,	1 (3)	410-419,	2003
Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., Kiyono, T., Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Hata, J., Toyama, Y., and Umezawa, A. Correspondence to AU.	Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis.	Exp Cell Res,	288	35-50,	2003
Gojo, S., Gojo, N., Takeda, Y., Mori, T., Abe, H., Kyo, S., Hata, J., and Umezawa, A. Correspondence to AU.	In vivo Cardiovasculogenesis by Direct Injection of Isolated Adult Mesenchymal Stem Cells.	Exp Cell Res,	288	51-59,	2003
Gojo S, Umezawa A.	Plasticity of mesenchymal stem cells--regenerative medicine for diseased hearts.	Hum Cell.	16(1)	23-30,	2003.
Allan, E. H., Ho, P.W., Umezawa, A., Hata, J., Makishima, F., Gillespie, M. T., Martin, T. J.	Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line.	J Cell Biochem.,	90(1)	158-169,	2003.
Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, Yamaguchi A, Umezawa A, Takagi M, Katsube K, Suda H.	Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by notch signaling.	Exp Cell Res,	290 (2)	370-80,	2003
Matsushita, K., Okita, H., Suzuki, A., Shimoda, K., Fukuma, M., Yamada, T., Urano, F., Honda, T., Sano, M., Iwanaga, S., Ogawa, S., Hata, J., and Umezawa, A. Correspondence to AU.	Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene.	Mol Cell Endocr,	203 (1-2)	105-116,	2003

Yoneda S, Itoh D, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S.	The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect.	J Periodontal Res.	38(3)	333-342,	2003.
Fukuma, M., Okita, H., Hata, J., and Umezawa, A. Correspondence to AU.	Up-regulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma.	Oncogene	22(1)	1-9,	2003
Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H., Ueno, K., Ohkawa, H., Mori, T., Toyama, Y., Hata, J-i., and Umezawa, A. Correspondence to AU.	The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic- co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge.	J. Cell. Physiol.	194	45-53,	2003
Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, Hata J	Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor.	Pathology international	53(4)	214-220,	2003
Shibata, R., Umezawa, A., Takehara, K., Aoki, D., Nozawa, S., Hata, J.	Primary carcinosarcoma of the vagina,	Pathol Int.,	53(2)	106-110,	2003
Itoh D, Yoneda S, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, and Kasugai S.	Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) in vitro.	J Biomed Mater Res.	62(2)	292-298,	2002.
Shibata, R., Hashiguchi, A., Sakamoto, J., Yamada, T., Umezawa, A., and Hata, J.	Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (Wt1) mutation and the histological findings in Wilms tumor (WT),	J Med Genet.	39 (12)	E83,	2002
Suzuki, S., Tanaka, K., Nogawa, S., Umezawa, A., Hata, J., and Fukuuchi, Y.	Expression of interleukin-6 in cerebral neurons and ovarian cancer tissue in Trousseau syndrome.	Clin Neuropathol.	21 (5)	232-235,	2002
Ogawa, S., Matsumura, S., Yoshikawa, T., Satoh, T., Kumagai, H., Mitamura, H., Iwanaga, S., and Umezawa, A.	A case of dilated cardiomyopathy with end-stage heart failure treated by prolonged continuous hemodiafiltration.	Keio J Med.	51 (3)	165-177,	2002
Yabe, H., Fukuma, M., Urano, F., Yoshida, K., Toyama, Y., Hata, J., and Umezawa, A. Correspondence to AU.	Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing's sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo, (Tables are corrected in BBRC, 295: 573-574, 2002)	Biochem. Biophys. Res. Commun.,	293	61-71,	2002
Itoh D, Yoneda S, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S.	Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) in vitro.	J Biomed Mater Res.	62(2)	292-8,	2002
Hakuno, D., Fukuda, D., Makino, S., Konishi, F., Tomita, Y., Manabe, T., Suzuki, Y., Umezawa, A. and Ogawa, S.	Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors.	Circulation,	105	380-386,	2002
Ohyama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J., Umezawa, A. and Nishikawa, T.	Immunologic and histopathologic characterization of active disease model mouse for pemphigus vulgaris.	J Invest Dermatol,	118	199-204,	2002

梅澤明弘	ヒト幹細胞を用いた再生医療	昭和学会誌	64 (1)		2004
梅澤明弘、竹田征治	骨髄間質細胞の可塑性	実験医学	22 (1)	12-16	2004
梅澤明弘、五條理志	間葉系幹細胞の基礎と臨床	Molecular Medicine	40 (12)		2004
梅澤明弘	骨芽細胞から神経細胞への分化	再生医療	3(1)	61-68	2004
梅澤明弘	書評「絵で分かる 血液のはたらき」	医学のあゆみ	209 (2)	115	2004
梅澤明弘	第1部必要な基礎知識 9 遺伝子変異	病理と臨床臨 時増刊号	22	47-53	2004
梅澤明弘、槌谷宏平、牛田 多加志、陳国平	骨再生・形状システムの構築—生分解性 ハイブリッドシートを用いて。	医学のあゆみ	209 (12)	964- 967	2004
梅澤明弘	骨をつくる—細胞移植の基盤研究とバイ オマテリアルによる臨床応用	医学のあゆみ	209 (12)	929	2004
梅澤明弘、槌谷宏平、牛田 多加志、陳国平	再生医療の現状と化学工学への期待	化学工学	68 (8)	414- 417	2004
梅澤明弘、竹田征二	単離間葉系幹細胞心筋細胞への分化	生体の科学	55 (4)	329- 333	2004
梅澤明弘	骨髄間葉系幹細胞を用いた再生医療	顕微鏡	39 (2)	84-87	2004
梅澤明弘	精子形成に関わるエピジネティクス	Hormone frontier in genecology	11 (3)	231- 234	2004
梅澤明弘	骨髄間葉細胞の現状と展望	治療学	38 (10)	1056- 1060	2004
小室一成、山下潤、桜田一 洋、梅澤明弘	「座談会」細胞移植 細胞移植の現状と 課題—基礎から臨床へ—	治療学	38 (10)	1133- 1143	2004
竹田征治、梅澤明弘	筋ジストロフィーに対する再生医療	医学のあゆみ	204 (3)	179- 182	2003
森泰昌、今林秀明、梅澤明 弘	再生医学と幹細胞—成体幹細胞	日本医学会雑 誌	129 (3)	307- 312	2003
槌谷宏平、松野丈夫、梅澤 明弘	間葉系幹細胞	医学会新聞	2523		2003
橋口明典、坂本亨宇、梅澤 明弘	体性幹細胞(組織幹細胞)の分裂、増殖、 分化誘導	日本臨床	61 (3)	390- 395	2003
伊澤良兼、梅澤明弘	骨髄間質細胞	再生医学 臨時 増刊号	40	144- 151	2003

梅澤明弘	骨折の再生医療に研究者人生をかけます	日経バイオビジネス	4	111	2003
梅澤明弘	間葉系幹細胞と生殖医療—生物学的特性からみた治療戦略を意識して—	医学のあゆみ	204 (13)	943- 948	2003
梅澤明弘	エピジェネティックの臨床応用—幹細胞と臓器再生	現代医療 別冊	30 (5)	1081- 1087	2003
梅澤明弘	骨髄由来の多能性細胞—骨髄間質による骨・軟骨形成	実験医学	21 (8)	1062- 1068	2003
梅澤明弘	再生医療—病理解剖ならびに病理検体から学ぶこと—	病理と臨床	21 (7)	725- 731	2003
梅澤明弘	再生医療の展望1.細胞移植による再生医療	日本内科学会雑誌	92 (9)	1758- 1762	2003
梅澤明弘	再生医療の基礎 神経幹細胞の供給源 骨髄・骨髄細胞	Clinical Neuroscience 別冊	21 (10)	1127- 1130.	2003
梅澤明弘・五條理志	間葉系細胞の基礎と臨床応用	Molecular Medicine	40 (12)	1432- 1440.	2003
梅澤明弘	再生医療	城西放射線・医療同窓会報	26号		2003
竹田征治、梅澤明弘	多能性幹細胞としての間葉系幹細胞研究	分子呼吸器病	7(4)	378- 380	2003
梅澤明弘	第一章「幹細胞の増殖・分化機構とその制御」3) 骨髄由来の多能性細胞1.骨髄間質による骨・軟骨形成	実験医学増刊	21 (8)	94-100	2003
梅澤明弘	組織幹細胞と生殖細胞の再生医学-再生医学シリーズ	慶應義塾大学医学部新聞	1月		2003
梅澤 明弘	発生・細胞分化過程におけるクロマチン構造と遺伝子発現	実験医学「細胞分化機構とエピジェネティクスの解明」	20・15	2206- 2211	2002
梅澤 明弘	骨芽細胞から神経への転換	最新医学別刷	57・7	1640- 1647	2002
梅澤 明弘	間葉系幹細胞	再生医学再生医療現代化学増刊	41	16-23	2002
梅澤 明弘	間葉系幹細胞による臓器再生-その表面マーカーに着目する	化学と生物	40・6	362- 369	2002
梅澤 明弘	再生医療	小児科臨床	55・5	844- 846	2002
梅澤 明弘	幹細胞とエピジェネティクス	Molecular Medicine 別刷	39・7	816- 822	2002
桜田 一洋	間葉系幹細胞と再生医学	わかる実験医学シリーズ「再生医学がわかる」		84-92	2002
梅澤 明弘	間葉系幹細胞をもちいた再生医療研究	分子細胞治療	1・1	31-37	2002

梅澤 明弘	間葉系幹細胞	ゲノム医学	2・1	87-94	2002
梅澤 明弘	組織幹細胞と生殖細胞の再生医学	ドクターズ マガジン	33	40-41	2002
梅澤 明弘	間葉系幹細胞	医学のあゆみ	200・ 13	1127- 1228	2002
梅澤 明弘	間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)による 造血再生	血液・腫瘍科	44・2	126- 136	2002
梅澤 明弘	間葉系幹細胞による臓器再生	化学と生物	40・6	362- 369	2002
五條 理志	間葉系幹細胞の分化制御機構	炎症と免疫	10・1	13-18	2002
五條 理志	多能性体性幹細胞としての間葉系幹細胞	最新医学	57・1	38-46	2002
浦野 文彦	Ewing 肉腫と PNET	病理と臨床 14 (臨時増刊号)		188- 192	2002

Ⅲ研究成果に関する一欄表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kudoh, A.	Reactivation of lytic replication from Epstein-Barr virus latently infected B-cells occurs with high S-phase CDK activity while inhibiting cellular DNA replication.	J. Virol.	77	851-861	2003
Fujita, M.	Establishment of latrunculin-A-resistance in HeLa cells by expression of R183A D184A mutant b-actin.	Oncogene,	22	627-631	2003
Bruemmer, D,	Atorvastatin inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular muscle cells.	Europ. J. Pharmacol	462	15-23	2003
Nagata KI,	Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in mammary HMEC cells depends on interactions with microtubules.	J. Biol. Chem	278	18538-43	2003
Bruemmer D,	Rapamycin inhibits E2F-dependent expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.,	303	251-258	2003
Bruemmer D,	Peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells.	Mol. Endocrinol	17	1005-18	2003
Bruemmer D,	Expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells is ERK/MAPK dependent.	Exp Cell Res	290	28-37	2003
Kyo S,	Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics.	Am J Pathol.	163	2259-69	2003
清野 透	ヒトパピローマウイルス	新世紀の感染症学 日本臨床社	下巻	562-567	2003
Kitamura, S.,	Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells Cultured on Alumina Ceramics	Artificial Organs	Vol.28 No.1	72-82	2004
Kotobuki, N.,	Cultured Autologous Human Cells for Hard Tissue Regeneration: Preparation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow	Artificial Organs	Vol.28 No.1	33-39	2004
Shimaoka, H.,	Recombinant growth/differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation of marrow mesenchymal cells in porous hydroxyapatite ceramics	Journal of Biomedical Materials Research	Vol.68A Issue 1	168-176	2004
Higashiyama, S.,	Transplantation of Hepatocytes Cultured on Hydroxyapatite into Nagase Analbuminemia Rats	Journal of Bioscience and Bioengineering	Vol.96 No.1	83-85	2003
Ikeuchi, M.,	Osteogenic differentiation of cultured rat and human bone marrow cells on the surface of zinc-releasing calcium phosphate ceramics	Journal of Biomedical Materials Research	Vol.67A Issue 4	1115-1122	2003
Uchimura, E.,	<i>In-Situ</i> Visualization and Quantification of Mineralization of Cultured Osteogenic Cells	Calcified Tissue International			2003, issued online
Nakamata, T.,	In vitro demonstration of cell-to-cell interaction in growth plate cartilage using chondrocytes established from p53 ^{-/-} mice.	J. Bone Miner. Res.	18	97-107	2003
Ushio, K.,	Partial hemiarthroplasty for the treatment of osteonecrosis of the femoral head. An experimental study in the dog.	J. Bone Joint Surg. Br.	85	922-30	2003