

(図5) 培養工程管理での仮定

#### D. 考察

細胞培養と細胞調製工程は、どちらも人間の調製感覚が重要であるため、多くの場合これらの自動化は困難であると考えられている。しかし、本研究では工程管理という面においても、プロトコルのレベル分けという考え方を導入することで、かなりの柔軟性をもって個体差による影響に対応できるシステムを作れることが示唆されるものであった。

#### E. 結論

本研究からは、「培養の効率化」という課題に対して、情報処理技術が大きく貢献できることが示された。情報処理技術の導入は、これまで人の感や経験に頼り切っていた再生医療の細胞調製という工程の自動化を大いに進めることが考えられ、再生医療の実用化には非常に大きな影響を持つと考えられる。しかしながら、研究の最終目的である培養条件の予測のためにはまだ臨床データの数が満たないためにモデル化にたどり着けておらず、今後はデータの蓄積をまってさらなる情報処理解析による培養効率化を目指す必要がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tomokatu Hongo, Mariko Kajikawa, Seiichi Ishida, Shogo Ozawa, Yoichi Ishikawa, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Three-dimensional high density culture of HepG2 cells in a 5-ml radial-flow bioreactor for construction of artificial liver, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99 (3), 237-244 (2005)

Ryuji Kato, Hideo Nakano, Hiroyuki Konishi, Katsuya Kato, Yuichi Koga, Tsuneo Yamane, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Novel strategy for protein exploration High-throughput screening assisted with fuzzy neural network, *Journal of*

*Molecular Biology*, 351, 683-692 (2005)

Hiro Takahashi and Hiroyuki Honda : A new reliable cancer diagnosis method using boosted fuzzy classifier with SWEEP operator method, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 38, 763-773 (2005)

Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda Chiaki Kobayashi, Hiroko Terasaki, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi: Construction and delivery of tissue-engineering human retinal pigment epithelial cell sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force, *Tissue Engineering*, 11 (3/4), 489-496 (2005)

Akira Ito, Kousuke Ino, Masao Hayashida, Takeshi Kobayashi, Hiroshi Matsumura, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Hiroyuki Honda : A novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force, *Tissue Engineering*, 11 (9/10), 1553-1561 (2005)

Akira Ito, Eri Hibino, Kazunori Shimizu, Takeshi Kobayashi, Yoichi Yamada, Hideharu Hibi and Minoru Ueda and Hiroyuki Honda, Magnetic force-based mesenchymal stem cell expansion using antibody-conjugated magnetoliposomes, *Journal of Biomedical, Materials Research: Part B-Applied Biomaterials*, 75 (2), 320-327 (2005)

#### 2. 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

・細胞培養管理ソフトウェア  
(発明登録済→特許出願予定)

##### 2. 実用新案登録 なし

##### 3. その他 なし

間葉系幹細胞の分化に関する分子生物学的、細胞生物学的評価  
—軟骨再生における至適材料評価に関する研究—

分担研究者 木全 弘治 愛知医科大学分子医科学研究所 教授

研究要旨

再生医療の実用化のためには、培養細胞の分化を制御する技術の開発が重要である。間葉系幹細胞を用いた骨、軟骨の再生はすでに臨床応用されているが、実用化のためには、培養細胞の分化が安定して行われる必要がある。これには、細胞の分化を制御し、常に一定の細胞の性質が得られる仕組みを構築する必要がある。本年度は、組織工学的手法を用いた注入型軟骨作製および3次元培養におけるマトリックスの至適材料の検討を目的に、本年度はBMPなどの誘導で軟骨細胞へ分化するN1511細胞の細胞外マトリックスの解析により、軟骨再生のキーとなる細胞増殖因子が有効に作用し、かつその後の細胞分化に有利なグリコサミノグリカン鎖結合マトリックススキャフォールドとしてコンドロイチン硫酸の有効性を確認した。

A. 研究目的

再生医療におけるティッシュエンジニアリング組織の中で、軟骨は比較的臨床応用されやすく、また移植軟骨組織を必要とする患者の数も多い。しかしながら、軟骨細胞は脱分化をきたしやすく、実用化のためには細胞の分化を制御し、安定した細胞を供給することが重要な課題である。本研究では、軟骨移植の臨床応用に向けてより効率的な軟骨細胞への分化に関わるマトリックスの検討を実際の臨床応用を視野に入れて検討を行った。

B. 研究方法

N1511細胞は実光らによってp53ノックアウトマウス肋軟骨より確立された不死化細胞株で、通常は線維芽細胞様であるがBMPまたはdexamethasoneとPTHの添加により軟骨細胞へと分化する。従ってこの分化に伴う細胞外マトリックスの分子変化は、組織工学的手法を用いた再生軟骨作製に関わるマトリックスの研究に重要な示唆を当て得てくれるものと考え、その詳細な検討を行った。他の軟骨細胞分化能力を持つ培養細胞株を用いた研究により既にヘパラン硫酸プロテオグリカンの重要性は明らかにされていると言ってよい。従って今回はマトリックスプロテオグリカンの約2/3を占めるヒアルロン酸結合性のPG-M/versicanのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの関与に焦点を当てた。研究方法は、アグリカン、II型コラーゲン、IX型コラーゲンなどの軟骨分化マーカー分子のreal timePCRによる発現量測定により、またアルシアンブルー染色法および特異抗体を用いた蛍光抗体染色法によるアグリカンの合成及び細胞外マトリックスへの分布蓄積の検討により、軟骨分化への関与の程度を定量化した。まず、1) PG-M/versicanの合成、マトリックス蓄積の重要性を、PG-M/versicanコア蛋白質のアンチセンスmRNA発現による発現合成抑制に

おける軟骨分化への影響から確認した。ついで、PG-M/versicanに結合しているコンドロイチン硫酸鎖部分の軟骨分化における重要性を、2) コンドロイチナーゼの培地添加によるコンドロイチン硫酸鎖の特異的分解による分化抑制の活性の上記の方法による測定結果から、さらに3)  $\beta$ -キシロシドの培地添加によるPG-M/versican結合コンドロイチン硫酸鎖量の低下による軟骨分化への影響を同様に比較検討し、明らかにした。

（倫理面への配慮）

本研究では、患者由来のヒト細胞を利用することが無いため、倫理的問題は生じないことが明かであった。

C. 研究結果

BMPまたはdexamethasoneとPTHの添加により軟骨細胞へと分化する時、また軟骨分化には高細胞密度が必要であるが、これらの軟骨誘導条件では、かならず大型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるPG-M/versicanの合成とマトリックスへの蓄積を伴うことを、つまり必須であることを、方法1)を用いて初めて明らかにした。ついでPG-M/versicanの軟骨分化における重要性はその結合グリコサミノグリカンであるコンドロイチン硫酸鎖部分であることを、まず発現する4種類のスプライズドフォームをもつPG-M/versicanの中、結合コンドロイチン硫酸鎖本数の高い潜在能力を持つものが発現されていることから予測し、方法2)により結合コンドロイチン硫酸鎖部分を特異的に消化分解すると軟骨分化程度の低下を招くこと、また方法3)によりコンドロイチン硫酸鎖の人工的合成イニシエターになり、従って本来のプロテオグリカン結合コンドロイチン硫酸鎖の結合量を抑制する $\beta$ -キシロシドを培地に添加することにより、軟骨分化への抑制が観察されたことから、上記の予測、つまり結合コンドロイチン硫酸鎖部分が軟骨分化に

必須であることを証明した。さらに他の細胞外マトリックス分子の分布への影響の検討から、コンドロイチン硫酸鎖を持つPG-M/versicanはヒアルロン酸、フィブロネクチンなどのマトリックス分子と結合し複合体を形成して軟骨分化に有利に作用することも明らかにした。

#### D. 考察

実際の軟骨へと分化する間充織において数種のヘパラン硫酸プロテオグリカンと主にヒアルロン酸結合性のPG-M/versicanより成るコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを含む細胞外マトリックスの合成が盛んである。それぞれが軟骨分化の方向に有利に作用していると思われるが、前者はそのヘパラン硫酸鎖部分が軟骨誘導増殖因子であるFGFやBMPと結合しその作用に直接に関与、または活性を促進しているとの証拠が得られつつある。後者はヒアルロン酸リッチマトリックスを構成し細胞形態や運動に作用して分化を制御していると思われる。今回の研究で初めてコンドロイチン硫酸鎖が重要であることが分かったと言ってよい。

#### E. 結論

軟骨分化におけるコンドロイチン硫酸鎖の重要性が今回の研究で決定的になった。従って組織工学的手法による注入型軟骨作製を視野に入れた軟骨再生の3次元培養におけるマトリックスの至適材料として、コンドロイチン硫酸鎖結合マトリックススキャフォールドの有効性の確認が不可欠であるとの結論を得た。昨年度明らかにしたヘパラン硫酸鎖結合マトリックススキャフォールドの細胞増殖因子作用における重要性に加えて、この点から系を改善して、より良好な組織をつくるよう検討する必要があると思われる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

N. Kamiya, H. Watanabe, H. Habuchi, H. Takagi, T. Shinomura, K. Shimizu, K. Kimata. Versican/PG-M Regulates Chondrogenesis as an Extracellular Matrix Molecule Crucial for Mesenchymal Condensation. *J Biol Chem* 2006;281:2390-400.

Y. Inoue, M. Yoneda, J. Zhao, O. Miyaishi, A. Ohno-Jinno, T. Kataoka, Z. Isogai, K. Kimata, M. Iwaki, M. Zako. Molecular cloning and characterization of chick spacrecan. *J Biol Chem* 2006.

・澤井崇博, 板野直樹, 木全弘治. マウス初代軟骨細胞におけるbone morphogenetic protein-2のヒア

ルロン酸合成酵素発現制御. 愛知医科大学医学会雑誌 2005;33:1-6.

##### 2. 学会発表

・渡邊裕規, 塩生真史, 木全弘治, 木村友厚, 渡辺秀人. Splicing factor 3bはBMPR-IAに結合し骨軟骨分化を抑制する. 第19回日本軟骨代謝学会. 横浜, 2006. 3. 4.

坂井顕一郎, 木全弘治, 佐藤隆, 後藤雅式, 成松久, 四宮謙一, 渡辺秀人. 軟骨におけるコンドロイチン硫酸合成酵素群の解析. 第19回日本軟骨代謝学会. 横浜, 2006. 3. 4.

##### 3. 著書

蛭沢克己, 木全弘治, 渡辺秀人. プロテオグリカン. ティッシュエンジニアリング2005. 日本医学館, 2005:25-30. (日本組織工学会編集)

卓麗聖, 木全弘治. 第1編 糖鎖を科学する 第1章 糖鎖のしくみ 第3節プロテオグリカン 1 ヒアルロン酸の構造と機能. 糖鎖科学の新展開. NTS, 2005:40-47.

渡辺秀人, 木全弘治. 3. 糖鎖遺伝子研究 1. 糖転移酵素 1.17 コンドロイチン硫酸合成関連遺伝子群. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:172-174.

板野直樹, 木全弘治. 3. 糖鎖遺伝子研究 1 糖転移酵素 1.19 ヒアルロン酸合成酵素. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:176-177.

木全弘治. 4. 糖鎖機能解析 7 再生医療・移植 7.1 組織再生におけるプロテオグリカン. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:303-309.

羽渕弘子, 木全弘治. 4. 糖鎖機能解析 9 発生・分化・形態形成 9.6 形態形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:339-432.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |

自動培養装置の開発・LOH解析による培養細胞のがん化検出システムの開発

分担研究者 鈴木 力 日立メディコ技術研究所 主任技師

研究要旨

再生医療の実用化のためには、熟練した人の技術に依存している現在の作業工程を自動化することは、培養コストの削減と安全性向上の両観点から非常に重要であると考えられる。このため、本研究では、接着依存性細胞であるヒト線維芽細胞をモデル細胞として用い、培養プロセスを自動化する培養装置の開発と評価を行った。結果として、本研究で開発された自動培養装置を用いたヒト線維芽細胞培養では、3週間以上の無人操作と正常な培養細胞 ( $3.0 \times 10^7$  cells) が可能であることが確認された。また、通常煩雑な作業を経て行う組織片からの初代培養も、組織の処理条件と培養装置の稼働を最適化することにより、非常に有効な細胞回収数 ( $1.82 \sim 2.3 \times 10^7$  cells) を得ることが確認された。これらの結果は、今後の培養工程の更なるコスト削減と安全性向上の可能性を強く示唆するものである。

A. 研究目的

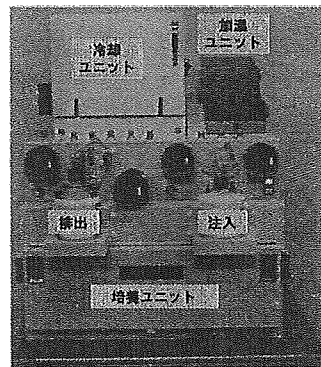
再生医療に用いる細胞の多くは、手作業による細胞培養を必要としている。この作業は熟練を要し、扱う器材も多岐に渡るため、ヒューマンエラー、コンタミネーションのリスクが高い。また培養条件の均一化と品質の再現性向上も重要なファクターであり、医療品と同等以上の安全性を確保する仕組みが必要である。さらに、現在の再生医療の多くは研究フェーズにあるが、産業化を進めるに当たっては、コストの問題も配慮する必要がある。すなわち、培養作業に伴う工数と、その人的・物的管理費用、高潔な施設の建設ならびに管理には莫大な費用がかかることが予想されており、新しい医療技術の普及を阻害する要因になり得ると考えられる。このように、安全性の確保とコスト低減の両立を図る必要があり、現状では大きな課題がある。

我々は、心筋、骨・軟骨、神経などの再生、白血病治療に用いる造血幹細胞の移植補助などに使われる間葉系幹細胞に着目し、前記安全性やコストの課題を克服する解の一つとして、細胞培養の自動化装置を開発してきた。開発を始めるに際しては、医薬品製造などに係るレギュレーションを精査し、また一般病院の臨床医師、大学研究者などのアドバイスを参考に、従前の細胞培養プロトコルを尊重しながらも、安全性をバリデートできない外気の侵入を阻止し、マイクロコンピュータで全自動制御するシステムを開発することにした。このシステムは、培養プロトコルをプログラマブル化することにより、多目的に使用可能となっており、再生医学の研究が加速できるものと期待している。これをベースに将来の産業化に向けた大きなコンセプトを提示したいと考えている。

ここでは、上記自動培養システムを用いてヒト組織からの培養を試み、培養条件の検討、培養細胞の性能評価を行った結果について述べる。

B. 研究方法

開発した自動培養装置（図1）を用いてPCからの操作で、ヒト細胞を用いた培養基本工程（播種・継代・培養・回収）の実働性を確認した。



（図1）開発自動培養装置外装（初号機）

細胞（Cambrex社正常ヒト線維芽細胞）、培地（Gibco社DMEM培地）、トリプシン（Gibco社）、PBS（Gibco社）を無菌的に装置内部にセットした送液チューブを通じて送液し、直径30cm特製培養皿にて培養を行った。継代、培地交換、回収の全ての工程は、プログラミングした工程として自動的に装置が行い、培養中の細胞の状態の映像は30分置きに画像化して保存した。一定期間の培養の後、装置で培養した細胞はPCからのプログラム操作によって培養皿から回収し、回収した細胞液をクリーンベンチにて操作後、細胞計測装置を用いて細胞数・生存率などを測定した。培養中の画像を定期的に保存することで、細胞の育成状況をモニタリングし、回収のタイミング・操作の条件を微調整しながら培養を繰り返した。

（倫理面への配慮）

本研究で用いたヒト細胞は、治療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

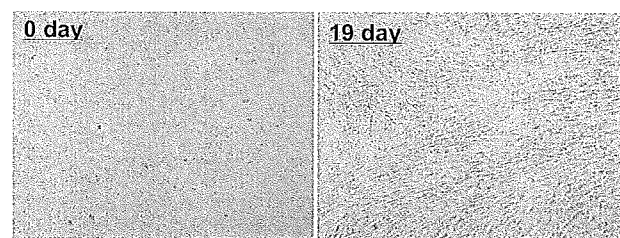
で十分に説明し同意を得、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。

### C. 研究結果

図1の自動培養装置を用いた購入ヒト正常細胞の培養では、19日間の継代培養(自動培地交換3日間隔)を経て、1培養皿から $3.0 \times 10^7$  cellsを得ることができた。この細胞数は、例えば皮膚修復に用いる場合を想定すると、約1.5回分の数であるため、正常ヒト線維芽細胞を全自動で十分に培養できることを確認した(表1)。さらに、この培養における細胞の形態は画像から正常であり、回収細胞の生存率が90.7%と非常に高いことが明らかとなった(図2)。

(表1) 正常ヒト線維芽細胞の自動培養装置を用いた培養(19日) 結果

Cell Type	Normal human fibroblast (Adult oriented) (Cambrex)
Medium	D-MEM (Sigma) + 10% FBS + 2% Antibiotic Antimicotic
Frequency of medium change	Every 3 days
Cell culture period	19 days
Seeding cell number	$1.0 \times 10^6$ cells
Collected cell number	$3.1 \times 10^7$ cells
Collected cell viability	90.7%

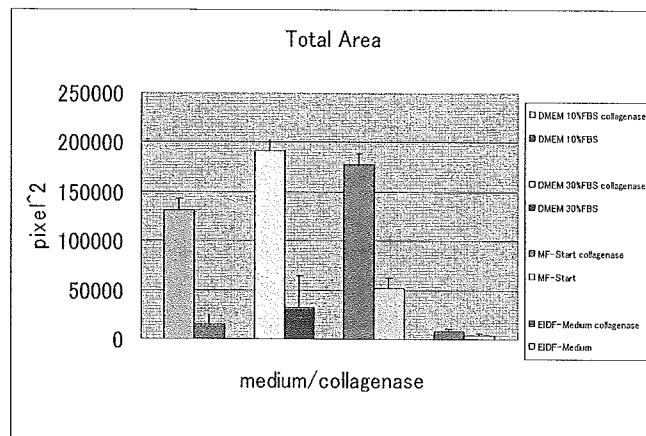


(図2) 自動培養装置を用いた細胞培養中の細胞モニタリング画像

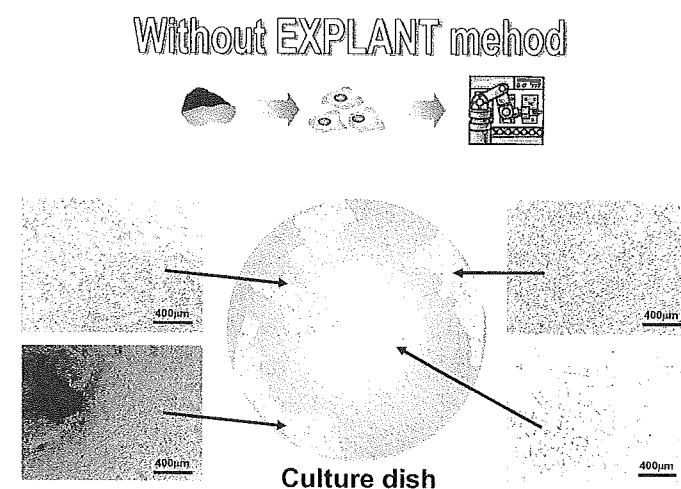
通常の再生医療における細胞培養では、組織片から細胞を、初代培養を経て得る工程があり、これは熟練と経験を要する工程である。自動培養装置を用いた培養も、このような現実的な課題を克服する必要があったため、次ぎにこのような組織片からの初代培養を試みた。この際、得られた組織片を酵素処理する条件の最適化を行い、手作業で初代培養の効率を確認した(図3)。

最適化した酵素処理を施した組織片を図1の培養装置にPCを介した操作で投入して培養した結果、図4のような偏りを持った増殖ではあったが、 $1.82 \sim 2.3 \times 10^7$  cellsを2例のヒト線維芽細胞を歯肉片より回収できることを確認した。回収された初代培養細胞は、88%という生存率であり形態的にも、通常の手培養と同じような細胞を

得られていた。



(図3) マウス組織上皮の酵素処理条件検討。酵素処理によって初代培養の効率が飛躍的にあがることが確認された。



(図4) 培養皿(自動培養装置)における初代培養細胞の増殖図

### D. 考察

我々の開発した自動培養装置は、当初間葉系幹細胞のみの培養を想定していたが、再生医療の産業化の際に現実性の高い「既に分化した細胞」であるヒト線維芽細胞を用いた場合でも、安定に自動培養が行えることが確認された。購入細胞及び、同意を得たヒト正常細胞は、どれも自動培養装置を用いて、十分な細胞を得ることができた。これは、線維芽細胞だけでなく、同様な接着依存性細胞には幅広く応用できる可能性が示唆された。さらに、自動化が難しいと考えられた初代培養を、酵素処理を通じて簡易化できたため、現実的な細胞取得現場における有効性が期待されるものであった。しかし、現段階の初号機は、そのオペレーションがまだ複雑であり、さらなる回収細胞数増加とシステムとしての簡便性を追求することが必要であることが、次の課題として考えられた。また、装置を用いて培養した細胞の品質をLOH解析によって評価し、がん化の検出手法の開発と、通常の培養と比較した安全性を検討することが次年度の課題である。

## E. 結論

本研究を通じて、再生医療の実用化を推進するための安全性向上のための自動培養装置の初期検討を行うことができた。結果、本研究で開発された自動培養装置は接着依存性の細胞を十分な細胞数まで自動培養でき、人的作業を大幅に削減できることが確認された。今後は、L0H解析や、人の手作業と自動培養における培養との細胞の品質や、細胞評価方法を詳細に比較し、より安全な培養装置の改良を行うことが求められる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

R. Kato, K. Okada, T. Suzuki, Y. Komori, H. Tachikui, D. Iejima, H. Kagami, M. Ueda: Development of Fully-Automated Cell Culture System Adopted to Adhesive Cells for Clinical Usage, 8<sup>th</sup> Tissue Engineering Society International (TESI), Shanghai, China, October, 2005.

加藤竜司、岡田邦彦、各務秀明、上田実  
再生医療実用化に向けた線維芽細胞自動培養装置の開発, 再生医療学会, 東京, 2006年3月

加藤竜司、岡田邦彦、各務秀明、上田実  
再生医療の産業化を目指した細胞自動培養装置の開発, 化学工学会, 東京, 2005年9月

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
特願2006-008521 自動培養装置  
出願準備中 自動培養装置
2. 実用新案登録 なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### <主任研究者>

(上田 実)

M. Ueda, Y. Yamada, R. Ozawa, Y. Okazaki : Clinical Case Reports of Injectable Tissue-engineered Bone Applied for Alveolar Augmentation with Simultaneous Implant Placement, *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 25 (2), 129-137, 2005

H. Maeda, T. Kasuga, M. Noagami, M. Ueda : Preparation of bonelike apatite composite for tissue engineering scaffold, *Science and technology of Advanced Materials* 3, 48-53, 2005

K. Ito, Y. Yamada, T. Nagasaka, S. Baba, M. Ueda Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: A comparison among autogeneous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings, 15, 64-72, 2005

K. Hamamura, Keiko. Furukawa, T. Hayashi, T. Hattori, J. Nakano, H. Nakashima, T. Okada, H. Mizutani, H. Hattori, M. Ueda, T. Urano, K. O. Lloyd, Koichi Furukawa : Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells, *PNAS*, 102 (31), 11041-11046, 2005

K. Hamamura, K. Tanahashi, K. Furukawa, T. Hattori, H. Hattori, H. Mizutani, M. Ueda, T. Urano, K. Furukawa : G M1 expression in H-ras-transformed NIH3T3 results in the suppression of cell proliferation inducing the partial transfer of activated H-ras from non-raft to raft fraction, *International Journal of Oncology*, 26, 897-904, 2005

H. MJ, Sumita Y, Ueda M : Histological and Immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis, *Arch Hitol Cytol* 68 (2), 89-101, 2005

M. Murata, M. Momose, K. Okuda, Y. Ninagawa, M. Ueda, H. Yoshie : Immunohistochemical Localization of Cytokeratin 19, Involucrin and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Cultured Human Gingival Epithelial Sheets, *International of the International Academy of Periodontology*, 7/4, 129-134, 2005

A. Ito, K. Ino, M. Hayashida, T. Kobayashi, H. Matsunuma, H. Kagami, M. Ueda, H. Honda: Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force : *Tissue Engineering*, 11, 2005

A. Ito, E. Hibino, C. Kobayashi, H. Terasaki, H. Kagami, M. Ueda, T. Kobayashi, H. Honda: Construction and Delivery of Tissue-Engineered Human Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets, Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force, *Tissue Engineering*, 11, 489-496, 2005

上田実:再生医療は歯科をどう変えるか- 第8回「再生医療とアンチエイジング」. *日本歯科評論* 2:97-100, 2005

上田実:再生医療は歯科をどう変えるか- 第9回「再生医療と特許法」. *日本歯科評論* 3:85-88, 2005

上田実:人体再生はどこまで可能になったか. *Medical Science Digest* 31:13-15, 2005

上田実:ティッシュエンジニアリングと産業化. *日本医学館* 181-187, 2005

上田実:再生医療は歯科をどう変えるか- 第10回「再生医療の臨床応用に向けて」. *日本歯科評論* 4:101-104, 2005

上田実:求められる歯科医療2. Dental Tribune Japan Edition 2:24, 2005

上田実:21世紀の歯科医療. 歯界展望特別号 58-62, 2005

上田実:実用化に向かう歯と歯槽骨の再生医療. 中・四国矯正歯科学会雑誌 17:1-7, 2005

上田実:総括. 日本再生医療学会雑誌 11:17, 2005

<分担研究者>

(各務 秀明)

Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 21: 141-147, 2006.

Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials.* 27: 3238-3248, 2006.

Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Shear stress facilitates tissue-engineered odontogenesis. *Bone.* 2006 in press

Honda MJ, Ohara T, Sumita Y, Ogaeri T, Kagami H, Ueda M. Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J Oral Maxillofac Surg.* 64: 283-289, 2006.

Ohno K, Hattori T, Kagami H, and Ueda M. Effects of Preceding Sialadenitis on Development of Autoimmunity against Salivary Gland. *Oral Diseases* in press.

Mase J, Mizuno H, Okada K, Sakai K, Mizuno D, Usami K, Kagami H, Ueda M. Cryopreservation of cultured periosteum: effect of different cryoprotectants and pre-incubation protocols on cell viability and osteogenic potential. *Cryobiology* in press.

Matsunuma H, Kagami H, Narita Y, Hata K-I, Ono Y, Ohshima S, and Ueda M. The potential of bone marrow-derived mononuclear cells for enhancing angiogenesis in ureteral acellular matrix. *Tissue Engineering* in press.

Tatebe M, Nakamura R, Kagami H, Okada K, Ueda M. Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytototherapy* 7, 520-530, 2005.

Ito A, Ino K, Hayashida M, Kobayashi T, Matsunuma H, Kagami H, Ueda M, Honda H. Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng.* 11, 1553-61, 2005.

Kobayashi C, Kagami H, Kito K, Ishikawa K, Ebisawa K, Ueda M, Terasaki H. Selective and Efficient Culturing of Retinal Pigment Epithelial Cells Using a Feeder Layer. *Cytototherapy* 7, 427-37, 2005.

Michael A Hale, Kagami H, Ling Shi, Holland Andrew M, Elsasser Hans-Peter, PhD; Hammer Robert E, Raymond J. MacDonald. The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas. *Dev Biol.* 286, 225-37, 2005.

Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engin



eered odontogenesis. Arch Histol Cytol 68, 89-101, 2005.

Ito A, Hibino E, Kobayashi C, Terasaki H, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T, Honda H. Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanoparticles and magnetic force. Tissue Eng. 11, 489-96, 2005.

Kito K, Kagami H, Kobayashi C, Ueda M, Terasaki H. Effects of cryopreservation on histology and viability of cultured corneal epithelial cell sheets in rabbit. Cornea 24, 735-41, 2005.

Seko K, Kagami H, Senga K, Ozeki K, Mizutani H, Ueda M. Effects of Ovariectomy and estrogen replacement on rat oral mucosa. Maturitas 50, 44-51, 2005.

山田陽一、各務秀明、上田 実 幹細胞を応用した歯周組織再生 「再生歯科のテクニックとサイエンス—歯周・審美・インプラント—」 第1編 歯周組織・再生 吉江弘正/宮本泰和編 クインテッセンス出版株式会社、2005

各務秀明 唾液による健康づくり—明日からの臨床に取り組む— Part 3 唾液のはたらき 1 2. 唾液腺の再生医療は可能か? 日本歯科評論 増刊2005 株式会社ヒョーロンパブリシャーズ 201-208, 2005

各務秀明, 杉戸孝行, 上田実 増殖因子および培養細胞を用いた唾液腺の再生 口科誌 54 (2) : 211-215, 2005

本田雅規, 小原孝之, 住田吉慶, 各務秀明, 魚返拓利, 上田実 歯の再生—イヌ下顎骨への歯胚細胞移植 「再生医療」 4 (1) : 85-89, 2005

各務秀明, 渡辺真紀, 外村明子, 安藤由典, 本田雅規, 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 「再生医療」 4 (1) : 79-83, 2005

(紀ノ岡正博)

Norihiko Hata, Yuka Agatahama, Masahiro Kino-oka, and Masahito Taya: "Relations between Individual Cellular Motions and Proliferative Potentials in Successive Cultures of Human Keratinocytes", Cytotechnology, Vol. 47, No. 1-3, pp. 127 - 131 (2005)

紀ノ岡正博、田谷正仁: "移植を前提とした組織培養工程における細胞評価"、医工学治療、Vol. 17, No. 4, pp. 203-206 (2005)

(本多裕之)

Tomokatu Hongo, Mariko Kajikawa, Seiichi Ishida, Shogo Ozawa, Yoichi Ishikawa, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Three-dimensional high density culture of HepG2 cells in a 5-ml radial-flow bioreactor for construction of artificial liver, Journal of Bioscience and Bioengineering, 99 (3), 237-244 (2005)

Ryuji Kato, Hideo Nakano, Hiroyuki Konishi, Katsuya Kato, Yuichi Koga, Tsuneo Yamane, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda : Novel strategy for protein exploration High-throughput screening assisted with fuzzy neural network, Journal of Molecular Biology, 351, 683-692 (2005)

Hiro Takahashi and Hiroyuki Honda : A new reliable cancer diagnosis method using boosted fuzzy classifier with SWEEP operator method, Journal of Chemical Engineering of Japan, 38, 763-773 (2005)

Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda Chiaki Kobayashi, Hiroko Terasaki, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi: Construction and delivery of tissue-engineering human retinal pigment epithelial cell sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force, Tissue Engineering, 11 (3/4), 489-496 (2005)

Akira Ito, Kousuke Ino, Masao Hayashida, Takeshi Kobayashi, Hiroshi Matsumura, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Hiroyuki Honda : A novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force, *Tissue Engineering*, 11 (9/10), 1553-1561 (2005)

Akira Ito, Eri Hibino, Kazunori Shimizu, Takeshi Kobayashi, Yoichi Yamada, Hideharu Hibi and Minoru Ueda and Hiroyuki Honda, Magnetic force-based mesenchymal stem cell expansion using antibody-conjugated magnetoliposomes, *Journal of Biomedical, Materials Research: Part B-Applied Biomaterials*, 75 (2), 320-327 (2005)

#### (木全弘治)

N. Kamiya, H. Watanabe, H. Habuchi, H. Takagi, T. Shinomura, K. Shimizu, K. Kimata. Versican/PG-M Regulates Chondrogenesis as an Extracellular Matrix Molecule Crucial for Mesenchymal Condensation. *J Biol Chem* 2006;281:2390-400.

Y. Inoue, M. Yoneda, J. Zhao, O. Miyaishi, A. Ohno-Jinno, T. Kataoka, Z. Isogai, K. Kimata, M. Iwaki, M. Zako. Molecular cloning and characterization of chick sparcrcan. *J Biol Chem* 2006.

澤井崇博, 板野直樹, 木全弘治. マウス初代軟骨細胞におけるbone morphogenetic protein-2のヒアルロン酸合成酵素発現制御. *愛知医科大学医学会雑誌* 2005;33:1-6.

蛭沢克己, 木全弘治, 渡辺秀人. プロテオグリカン. *ティッシュエンジニアリング2005*. 日本医学館, 2005:25-30. (日本組織工学会編集)

卓麗聖, 木全弘治. 第1編 糖鎖を科学する 第1章 糖鎖のしくみ 第3節プロテオグリカン 1 ヒアルロン酸の構造と機能 糖鎖科学の新展開. *NTS*, 2005:40-47.

渡辺秀人, 木全弘治. 3. 糖鎖遺伝子研究 1. 糖転移酵素 1.17 コンドロイチン硫酸合成関連遺伝子群. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:172-174.

板野直樹, 木全弘治. 3. 糖鎖遺伝子研究 1 糖転移酵素 1.19 ヒアルロン酸合成酵素. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:176-177.

木全弘治. 4. 糖鎖機能解析 7 再生医療・移植 7.1 組織再生におけるプロテオグリカン. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:303-309.

羽瀧弘子, 木全弘治. 4. 糖鎖機能解析 9 発生・分化・形態形成 9.6 形態形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:339-432.

#### 特許出願

- ・特願2005-000740 腱または靭帯組織再生器具, 上田 実
- ・特願2005-045417 ヒト歯髄細胞の分化誘導法及び象牙質再生用組成物, 株式会社日立メディコ/名古屋大学, 上田実, 各務秀明
- ・PCT/JP2005/013679 特願2004-215556 間葉系幹細胞から象牙芽細胞への分化誘導方法, 上田実, 各務秀明, 安藤由典, 家島大輔
- ・特願2005-306471 組織形成用複合材料およびその製造方法, 上田実, 各務秀明, 岡田邦彦, 水野裕和, 宇佐見一公
- ・特願2005-298161 移植材料及び骨質改善剤, 上田実, 各務秀明, 山田陽一, 岡田邦彦, 上嶋伸知, 八島明弘, 高後友之
- ・特願2005-102404 細胞の増殖又は分化方法
- ・特願2005-203999 細胞の蓄種方法
- ・特願2005-222886 ヒト歯胚細胞の判別及び選択方法

- ・特願2005-045417 象牙質再生用組成物の製造方法, 株式会社日立メディコ/名古屋大学, 安藤由典, 外村明子, 各務秀明, 上田実
- ・特願2005-102404 培養上清を用いた細胞培養技術, 株式会社日立メディコ/名古屋大学, 家島大輔, 小原孝之, 安藤由典, 外村明子, 各務秀明, 上田実
- ・特願2005-48527 象牙質の再生方法及びこれに用いる移植物, 上田実/日本特殊陶業/日立メディコ, 小原孝之, 安藤由典, 外村明子, 各務秀明, 上田実
- ・特願2005-143443 骨組織形成用細胞の調整方法、及び骨組織形成用細胞の利用, 名古屋大学/オステオジェネシス株式会社, 上田実, 山田陽一, 島伸行
- ・特願2005-190374 皮膚組織改善剤, 名古屋大学, 蛭沢克己, 上田実, 各務秀明, 岡田邦彦, 加藤竜司, マズリガム・アブドゥル
- ・特願2006-000075 移植のための組織組成物, 東京大学, 上田実
- ・特願2006-008521 自動培養装置
- ・出願準備中 自動培養装置