

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

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と  
臨床応用  
平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 中村 耕三

平成18（2006）年 3月

# 目 次

I. 総括研究報告	
皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用 -----	1
中村耕三	
II. 分担研究報告 -----	6
1. 骨欠損大動物モデルの作製とその有用性・妥当性に関する検討 -----	6
中村耕三	
2. 骨欠損大動物モデルの作製とその長期自然経過に関する検討 -----	13
高戸毅	
3. 皮膚の多能性幹細胞の単離・培養と性状解析-----	18
大河内仁志	
4. 皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨再生法の開発と臨床応用に関する研究-----	22
片岡一則	
5. 骨軟骨細胞増殖・分化に関わる担体の開発 -----	30
岡野光夫	
6. 軟骨欠損大動物モデルの作製とその長期自然経過に関する検討 -----	42
川口浩	
7. 骨・軟骨分化増殖シグナルの最適化と皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換 -----	49
鄭雄一	
8. 骨・軟骨分化増殖シグナルの最適化と皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換 -----	52
星和人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	55
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	57

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用

主任研究者 中村耕三 東京大学大学院医学系研究科・整形外科教授

研究要旨

本研究は、量的限界のある骨髄間葉系幹細胞を細胞源とした従来の骨・軟骨誘導法に代わり、骨・軟骨分化に必要な十分なシグナル伝達系を確定し、採取が容易で増殖能も高い皮膚線維芽細胞に骨・軟骨分化を誘導し、これを移植することで、新しい骨・軟骨再生治療法を確立することを目的としている。さらに、遺伝子導入における安全性を高めるためナノミセルテクノロジーを用いた人工ウイルスの開発を行い、担体による異物反応や狂牛病などの交差感染を防ぐため細胞シート工学を応用した担体なしの移植片作製法も確立する計画である。平成17年度は本年度の研究課題である、

- 皮膚からの再生用細胞採取・培養法の開発と改良
- 骨・軟骨分化に必要なシグナルの最適化と皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換
- 人工ウイルスによる遺伝子導入法の開発と改良
- 形質転換した皮膚線維芽細胞による細胞シートの作製法の開発
- 骨・軟骨欠損大動物モデル（イヌ）の作製と基礎データ収集

を全て達成した。

分担研究者氏名・所属施設名および職名

高戸 毅  
東京大学大学院医学系研究科口腔外科・教授

大河内 仁士  
国立国際医療センター研究所細胞組織再生医学研究部再生医学・部長

片岡 一則  
東京大学大学院工学系研究科ナノ工学・教授

岡野 光夫  
東京女子医科大学先端生命医科学研究所生体材料工学・教授・所長

川口 浩  
東京大学大学院医学系研究科整形外科・助教授

鄭 雄一  
東京大学大学院医学系研究科骨再生医療・助教授

星 和人  
東京大学大学院医学系研究科軟骨再生医療・助教授

A. 研究目的

高齢化社会の到来とともに、骨・軟骨の加齢性疾患は社会経済的に大きな問題となっている。例えば、骨粗鬆症による骨折は高齢者寝たきりの原因第二位であり、歯周病による顎骨萎縮では65歳以上の30%以上が無歯顎となり、関節軟骨の老化疾患である変形性関節症は人口の10%近くが罹患し、多くの高齢者のQOLを著しく損なっている。また老化とともに悪性腫瘍は増加するが、頭頸部腫瘍切除後の、顎・顔面・口腔機能の低下も患者のQOLを著しく低下させている。

これらに対処すべく、組織工学的手法による骨・軟骨組織の再建や、自家及び他家骨・軟骨移植、また近年は骨髄間葉系幹細胞を用いた骨・軟骨再生法等が試みられているが、いずれも問題を解決するには至っていない。特に骨髄間葉系幹細胞から骨・軟骨細胞を誘導する手法は、最近の再生医学の発展とともに大いに期待されて研究されてきたが、分化能を保持して十分量の細胞を得ることは困難で、臨床で十分満足できるような質と量を兼ね備えた骨・軟骨産生法は未だ実現していない。

本研究は、量的限界のある骨髄間葉系幹細胞を細胞源とした従来の骨・軟骨誘導法に代わり、骨・軟骨分化に必要な十分なシグナル伝達系を確定し、採取が容易で増殖能も高い皮膚線維芽細胞に骨・軟骨分化を誘導し、これを移植することで、新しい骨・軟骨再生治療法を確立することを目的としている。さ

らに、遺伝子導入における安全性を高めるためナノミセルテクノロジーを用いた人工ウイルスの開発を行い、担体による異物反応や狂牛病などの交差感染を防ぐため細胞シート工学を応用した担体なしの移植片作製法も確立する計画である。

## B. 研究方法

### 皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

術前に承諾の得られた摘出皮膚 (n=3, 50-75歳) およびマウス(CD57BL/6J)の皮膚を用いた。Dispase処理により、表皮と真皮を分離した後、それぞれHanks Balanced Solution (HBSS)で洗い、0.1%トリプシン溶液にて37°C60分静置した。trypsin neutralizing solution (TNS)でトリプシンを中和した。細胞はフィルターで濾過し、遠心にて回収した。PBSにて細胞浮遊液とし、hoechst33342を5ug/mlとなるように加え、適度に攪拌しながら37°C60分おいた。UVレーザーを照射しFACS解析を行った。Verapamil添加群と非添加群を比較した。SP細胞群と非SP細胞群に分けて細胞を分取し、遺伝子発現並びに表面マーカーの解析を行った。色素排出能に関係する膜のトランスポーターの1種であるBcrp1に対する抗体を用いて皮膚におけるSP細胞の局在を検討した。セルソーターによりSP細胞を分取し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで37度5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養して増殖能を検討した。

### 「倫理面への配慮」

研究に用いたヒト皮膚は術前に同意を得た手術標本の一部を使用した。実験にはマウスを用いたが、当研究所の実験動物委員会の規則に従い、動物愛護上の配慮をもって実験を行った。

### 骨・軟骨分化に十分なシグナルの最適化

骨分化に関してはBMP・IRS・Wnt・Hh・Runx2シグナルの全組合せから、軟骨分化に関してはBMP・IRS・Wnt・TGF- $\beta$ ・Soxシグナルの全組合せから、骨軟骨分化を特異的に検出する細胞センサーを用いて効率的に分化を誘導する組合せをスクリーニングした。

### 皮膚線維芽細胞の骨・軟骨形質転換

最適化されたシグナルをアデノウィルスベクターにより皮膚線維芽細胞に導入し、分化マーカーの発現の検討・染色等による基質産生の検討を通じて、その骨軟骨形質転換を検証した。

### 骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす因子群の相互

### 作用の解析

BMP2/6ダブルノックアウトマウスの解析・PTHの骨同化作用におけるIRS-1の関与に関する解析・WntシグナルとSox9の軟骨分化における役割のin vitro解析を行った。

### 軟骨増殖に十分な液性因子の最適化

市販されている12種の液性因子 (FGF-2, IGF-I, インスリン, BMP2, PTH, 成長ホルモン, デキサメサゾン, 活性型ビタミンD3, トリヨードサイロニン, IL-1 受容体アンタゴニスト, 17 $\beta$ -エストラジオール, テストステロン) から軟骨細胞を効率的に増殖させる組合せの最適化を行った。

### 人工ウイルスによる遺伝子導入法の開発

1) ポリカチオンの合成とポリプレックスの調製  
アミノリシス法によるブロック共重合体合成を行った。ポリアスパラギン酸(P[Asp])側鎖にジエチレントリアミン(DET)を導入したP[Asp(DET)]ポリマーとポリエチレングリコール(PEG)とのブロック共重合体(PEG-DET)を合成した(PEG分子量12000, ポリアミノ酸重合度98)。ナノミセル型キャリアはトリスバッファー中でDNAとポリマー溶液を混合することによって調製した。

### 2) 初代培養株細胞への遺伝子導入

マウス皮膚組織より皮膚線維芽細胞を採取し、6穴プレートに播種、培養し、ナノミセル型キャリアによる遺伝子導入を行った。同様に新生マウス頭蓋骨由来の未分化骨芽細胞に対する遺伝子導入も行った。導入遺伝子はホタル発光ルシフェラーゼおよび蛍光タンパクであるYFPを用い、それぞれルミノメーター、蛍光顕微鏡にて遺伝子発現を評価した。また、遺伝子導入条件における細胞への毒性を評価するため、生細胞数の計測をMTTアッセイにより行った。

### 3) ナノミセル型キャリアの細胞内挙動観察

DNAを2種の波長の異なる蛍光分子で標識することにより、DNAがナノミセルに内包されると、2分子間の蛍光エネルギー移動により波長が変化する。一方DNAがキャリア外に放出されるとこのエネルギー移動は解消されるため、その変化を観察することにより、細胞内でのキャリア挙動、DNA放出をレーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。

### 4) 遺伝子発現の持続性評価

遺伝子発現の状態をより詳細に確認するため、その発現をmRNAレベルで評価した。ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、細胞からmRNAを抽出、ルシフェラーゼ遺伝子mRNAの発現を定量PCR法にて評価した。

### 骨形質転換線維芽細胞シートの作製

8週齢雄C57BL/6Nマウス背部皮膚より採取・分離し

た線維芽細胞にアデノウイルスにてcaALK6+Runx2を導入した。導入後、線維芽細胞をアテロコラーゲン膜上にて培養し骨形質転換を誘導した。石灰化を確認後直径5 mmにカットし、移植片とした。

#### マウス頭蓋部骨欠損モデルの作製

8週齢雄C57BL/6Nマウスの頭頂骨に直径4 mmの円形全層骨欠損を作製し、上述の細胞シートを移植した。術後2週・4週・6週で骨欠損部のX線撮影を行ったのち、屠殺して組織切片を作製しH-E染色にて骨形成の評価を行った。

#### 骨欠損大動物モデル(イヌ)の作製

11ヶ月齢-2歳10ヶ月(平均1歳10ヶ月)の健常ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15mmの骨欠損を作製した。術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で骨欠損部のCT撮影を行った。

#### 軟骨欠損大動物モデル(イヌ)の作製

11ヶ月齢-2歳10ヶ月(平均1歳10ヶ月)の健常ビーグル犬の膝関節軟骨にドリルで円形の穴を全層または半層に穿ち、その時間経過を追った。術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で軟骨欠損部のCT撮影を行った。

#### 骨欠損大動物モデル(イヌ)への3次元積層法にて作製した $\alpha$ -TCP人工骨の移植

11ヶ月齢-2歳10ヶ月(平均1歳10ヶ月)の健常ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15mmの骨欠損を作製した。骨欠損部のCTデータをもとに、骨欠損部の形状に成形された $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨を作製した。作製にはインクジェットプリンターを用いた3次元積層法を用いた。対照には市販のハイドロキシアパタイトブロック(HAブロック)を切削加工したものをを用いた。 $\alpha$ -TCP人工骨とHAブロックを骨欠損部に移植し、術直後及び術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で一般健康状態・血液検査・骨欠損部のCT撮影を行った。また24週時に頭蓋骨を採取し人工骨の組織学的検討を行った。

#### 「倫理面への配慮」

研究に用いたヒト皮膚および脂肪組織は術前に同意を得た手術標本の一部を使用した。動物実験においては各研究機関の実験動物委員会の規則に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して十分な倫理的および動物愛護上の配慮のもとに実験を行った。

## C. 研究結果

まずマウス皮膚を用いて条件検討を行った。表皮に色素排出能の高い細胞群が存在し、verapamil投与により排出能が抑制されたことからSP細胞の存在を確認した。新生児マウスでは5-10%SP細胞が見られたのに対して、生後1ヶ月から0.1%程度に激減していた。6ヶ月や24ヶ月のマウスでも検討したが、0.1%以下の割合であった。

真皮の細胞において検討したところSP細胞の割合は0.1%以下であった。毛の毛乳頭細胞のみを選択的に集めて検討したところ、SP細胞の割合は3%と上昇した。

表皮におけるSP細胞をソーティングして、表面マーカーの検索をしたところ、 $\beta$ 1インテグリンや $\alpha$ 6インテグリンが強く発現していたが、バルジ領域の細胞のマーカーとされているCD34は発現していなかった。

色素排出能に関係する膜のトランスポーターの1種であるBcrp1の発現はSP細胞においてRNAレベルでも蛋白レベルでも非SP細胞より亢進していた。Bcrp1に対する抗体を用いて皮膚におけるSP細胞の局在を検討したところ、SP細胞は表皮基底層に多く存在し、一部バルジ領域にも存在が確認された。真皮の細胞はほとんど検出できなかった。

SP細胞をセルソーターにより分取し、培養を試みたところ、コロニーの大きさは大きい傾向が見られたが、コロニー形成率において非SP細胞と増殖能に有意な差は見られなかった。

ヒトの皮膚においてもSP細胞の検討を行ったが表皮においてSP細胞の割合は0.01-0.1%程度と非常に少なかった。

骨分化の最適化シグナルはBMP+Runx2であり、軟骨分化の最適化シグナルはSox5/6/9であった。皮膚線維芽細胞において、遺伝子導入によりこれらのシグナルを活性化させることで骨形質転換・軟骨形質転換が誘導された。

さらに、骨・軟骨の分化・増殖に影響を及ぼす因子群の相互作用の解析を行ったところBMP2/6は共に骨分化に大きく関与すること、WntシグナルはSox9依存性に軟骨分化を促進すること、PTHの骨同化作用にIRSが関与することが明らかとなった。

また、FGF-2とインスリン・IGF-Iの組合せが軟骨再生に有効な軟骨増殖因子の組合せであることが明らかとなった。

1) 初代培養株細胞への遺伝子導入  
PEG-DET/DNAナノミセル型キャリアにより、皮膚線維芽細胞においてほとんど毒性を示すことなく遺伝子発現が確認された。ルシフェラーゼ遺伝子による評価で、ポリマーのカチオン電荷対DNAの電荷比を80(N/P=80)にて調製したナノミセルにおいて最も

優れた遺伝子発現が得られることが確認され、YFP 遺伝子発現の蛍光顕微鏡による観察では、導入後6日目で約20%の細胞に遺伝子発現を認めた。

また、未分化骨芽細胞に対してはさらに良好な遺伝子導入が可能であり、導入後3日目で約50%の細胞に遺伝子発現が観察された。

何れの細胞においても細胞は形態的に遺伝子導入を行っていないコントロール細胞とくらべほとんど影響は見られず、MTTアッセイによる生細胞数計測にても、コントロールとの有意差を認めなかった。代表的な遺伝子導入用カチオンポリマーであるポリエチレンジミンでは、強い毒性が生じており、対照的な結果となった。

## 2) ナノミセル型遺伝子キャリアによる皮膚線

フルオレセインおよびCy3のふたつの蛍光子で標識したDNAをナノミセル型キャリアに内包し、24時間後にレーザー共焦点顕微鏡にて観察した。図3の左は蛍光画像、右はその二つの分子の蛍光強度比(F/Cy3)をプロットしたものであり、黒い部分が蛍光エネルギー移動の起こっている部分すなわちDNAがキャリアに内包された状態、白い部分がDNAが細胞質内に放出されている状態を示す。PEG-DET/DNAナ

伝子導入で、24時間後明らかに細胞質内でのDNAの効率よい放出が観察され、本キャリアにより効率よいDNAの細胞内デリバリーが達成されていることが確認された。これは同様の効率的細胞内遺伝子デリバリーが可能で、ポリエチレンジミンの結果と相関するものであり、本キャリアによっても、細胞内に取り込まれた後、効率よいエンドソーム脱出の起こっていることが示唆された。

## 3) 遺伝子発現のと持続性評価

ナノミセル型キャリアでは非常に低毒性で細胞へ遺伝子導入することが可能のため、キャリア共存下で長時間培養することが可能となる。その結果として、非常に長期間にわたる遺伝子発現が観察される。この発現が実際に核内転写レベルで起こっていることを確認するため、細胞からmRNAを抽出、遺伝子発現を定量PCR法で評価したところ、ナノミセル型キャリアでは、むしろ1日目より3、5日目にかけてmRNAの発現が増加する傾向が観察された。一般的な脂質由来の市販遺伝子導入試薬であるFugene6では、mRNAレベルの発現としては、1日目で非常に高い発現が見られるものの、以後急激に減少し、全く異なった発現のパターンとなっていることが明らかとなった。ナノミセル型キャリアでは、核内転写レベルにおいても遺伝子発現が持続することにより、長期にわたる高い遺伝子発現の得られることが確認された。

アテロコラーゲンフィルム上に、骨形質転換させた皮膚線維芽細胞シートを作製することに成功した。皮膚線維芽細胞を含む間葉系の細胞は、これまで細

胞シートに用いられてきた上皮系あるいは筋肉の細胞と異なり、基質を多く産生しその中に埋入しているため、従来のコーティングでは剥離が困難であることが判明した。対処方として、薄いアテロコラーゲンフィルムを底に敷くことで、細胞シートを一塊として取り出すことができた。さらにこの細胞シートをマウス頭蓋部骨欠損モデルに移植したところ、術後4週で、骨再生が認められた。再生骨の長期経過については現在経過観察中である。

イヌ頭蓋部骨欠損モデルにおいては、放射線学的には、6ヶ月経過しても治癒につながる明らかな骨形成は認められなかった。また、イヌ軟骨欠損モデルでは、放射線学的には、6ヶ月経過しても明らかな治癒は認められなかった。これらのモデルは現在経過観察中である。

イヌ頭蓋部骨欠損モデルに対して、3次元積層法にて作製した $\alpha$ -TCPテラーメード人工骨を移植しその安全性と有効性を検証したところ、術中合併症はなく、術後の健康状態・血液検査値に関しても大きな異常は認められなかった。CT撮影の結果、 $\alpha$ -TCP人工骨内孔の狭小化と周囲骨との架橋形成が認められ骨再生を誘導していることが示唆された。組織学的検索から、 $\alpha$ -TCP人工骨内孔と周囲に骨様組織が誘導されていることが確認された。さらに $\alpha$ -TCP人工骨内部に骨髓腔の形成が認められた。

## D. 考察

マウス皮膚においてSP細胞は生下時に非常に多いが、急速に減少することが示唆された。ヒト成人の皮膚にSP細胞は少ないこともマウスの結果と合わせれば矛盾はしない。また骨髓中のSP細胞の割合も0.1%程度とされているので、組織中の割合は比較的一定なのかもしれない。表皮のSP細胞の表面マーカー解析によればこれまで報告されたケラチノサイトの幹細胞マーカーを多く発現していたが、CD34に関しては発現していなかった。またBcrp1の抗体を用いた局在の検討においても、基底層に多く存在し、幹細胞が存在しているバルジ領域が必ずしも陽性ではなかった。幹細胞の性質として有毒物質を排出する能力は重要と考えられるが、バリアー機能も重要な皮膚においては基底層に存在する意義は十分にあると考えられる。

また毛乳頭細胞においてSP細胞の割合が高い傾向が見られたので、真皮の幹細胞の存在場所として毛乳頭部も候補として考えられる。実際毛乳頭細胞は神経堤由来の細胞であることが示唆されており、毛乳頭細胞が多能性をもつという報告も散見されている。ただ毛乳頭細胞に特異的なマーカーがこれまでに存在していないので、SP細胞が多能性を持つか否かは大変興味深いところであ

る。

S P細胞の培養法についてはまだ改善の余地が多いと思われるが、セルソーターによるダメージも無視できず、今後の検討課題である。

分化・増殖シグナルに関しては、本研究で最適化された増殖・分化に有効な因子を使用することで、皮膚線維芽細胞からの効率的な骨軟骨分化誘導系を確立できる可能性が示唆された。さらに継続して分化・増殖シグナルに関する検討を続ける必要があると考えられる。

本研究では実際の治療に用いることが可能な人工遺伝子ベクターを開発を目的とする。そのための要件として、高い遺伝子導入効率とともに、ほとんど細胞毒性を示さないことが不可欠となる。特に生体由来の初代培養株細胞は、市販遺伝子導入試薬を用いる際にも細胞毒性の影響を受けやすいことが知られており、毒性の少なさは重要なポイントとなる。今回評価を行った

今回評価を行ったPEG-DET/DANナノミセル型キャリアは、ほとんど細胞への毒性を示すことなく、良好な遺伝子導入を実現しており、臨床応用を視野に入れたキャリアとして非常に有望なシステムといえる。また、長期間にわたる核内転写の持続という特徴も併せ持つことが明らかとなった。これは例えば細胞分化誘導を行う目的に治療用遺伝子を機能させる際には、非常に重要なポイントとなりうることである。さらにポリマーの構造、鎖長と最適化することにより、生体組織内での遺伝子発現を時間的、空間的にコントロールすることの出来るインテリジェント化遺伝子デリバリーシステムへの展開が期待される。

線維芽細胞シートによる骨再生実験は、3次元担体を用いない細胞シートの骨再生能を確認する予備実験であるため、アテロコラーゲン膜を支持体として用いた。今後は温度感受性培養皿を用いて、担体を用いない方法を開発する予定である。さらに本法によって誘導された再生骨の長期経過についても詳細に観察しなければならない。

イヌ骨欠損モデルは6ヶ月という期間内であれば、骨再生実験の際の臨界骨欠損モデルとして使用可能であると考えられた。しかしながら昨年度の小動物モデルの場合と同様に、モデルによっては完全な不可逆性欠損でないことがあるので、観察期間やコントロールに注意する必要がある。また、軟骨欠損モデルにおいても同様の注意が必要であると考えられた。

イヌ骨欠損モデルにおいて、 $\alpha$ -TCPテーラーモード人工骨の安全性と有効性が示唆されたが、自家骨への置換は完全ではなかった。安全性と併せて、さらに長期にわたる経過の観察が必要であると考えられる。

## ・ 結論

皮膚から色素排出能の高いS P細胞を単離・培養することができた。今後S P細胞の多能性についても検討を加えていきたい。

新たな骨・軟骨分化制御因子を同定し、またそれらの因子の詳細な作用を明らかにした。

新合成、最適化したブロック共重合体を用いたナノミセル型遺伝子キャリアにより、皮膚線維芽細胞を含めた初代培養株細胞への低毒性かつ効率よい遺伝子導入が確認された。

骨形質転換させた皮膚線維芽細胞から作製した細胞シートが骨再生を誘導することをマウス頭蓋部骨欠損モデル用いて明らかにした。

イヌ骨・軟骨欠損モデルの長期の自然経過を明らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。さらにイヌ骨欠損モデルにおいて、3次元積層法にて作製した $\alpha$ -TCPテーラーモード人工骨の安全性と有効性が確認され、基礎データを収集した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

分担研究報告書参照

## H. 知的財産権の出願・登録状況

分担研究報告書参照

厚生労働省科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

骨欠損大動物モデルの作成とその有用性・妥当性に関する検討

分担研究者 中村耕三（東京大学大学院医学系研究科・整形外科 教授）

研究要旨

骨欠損大動物モデル（イヌ）に、3次元積層法にて作成した $\alpha$ -TCP人工骨を移植しその安全性と有効性を検証した。

A. 研究目的

テーラーメイド医療の実現は骨軟骨再生においても大きなテーマである。組織欠損部に適合した外部形態と内部構造を有する人工臓器あるいは組織再生を誘導するインプラントを用いることは再生組織量と再生組織の質の向上につながると考えられる。そこで、昨年度得られた小動物の基礎データをもとに、今年度は臨床応用を視野に入れた大動物（イヌ）骨欠損モデル使用し、欠損部に適合した人工骨の基礎データの収集を試みた。分担研究者の高戸とともにイヌに骨欠損モデルに対して、3次元積層法にて作製した $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨を移植しその安全性と有効性を検証した。

B. 研究方法

11ヶ月齢—2歳10ヶ月（平均1歳10ヶ月）の健常ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15mmの骨欠損を作製した。骨欠損部のCTデータをもとに、骨欠損部の形状に成形された $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨を作製した。作製にはインクジェットプリンターを用いた3次元積層法を用いた。対照には市販のハイドロキシアパタイトブロック（HAブロック）を切削加工したものをを用いた。 $\alpha$ -TCP人工骨とHAブロックを骨欠損部に移植し、術直後及び術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で一般健康状態・血液検査・骨欠損部のCT撮影を行った。また24週時に頭蓋骨を採取し人工骨の組織学的検討を行った。

C. 研究結果

術中合併症はなく、術後の健康状態・血液検査値に関しても大きな異常は認められなかった。CT撮影の結果、 $\alpha$ -TCP人工骨内孔の狭小化と周囲骨との架橋形成が認められ骨再生を誘導していることが示唆された。組織学的検索から、 $\alpha$ -TCP人工骨内孔と周囲

に骨様組織が誘導されていることが確認された。さらに $\alpha$ -TCP人工骨内部に骨髓腔の形成が認められた。

D. 考察

大動物骨欠損モデルにおいて、 $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨の安全性と有効性が示唆されたが、自家骨への置換は完全ではなかった。安全性と併せて、さらに長期にわたる経過の観察が必要であると考えられる。

E. 結論

大動物臨界骨欠損モデルにおいて、3次元積層法にて作製した $\alpha$ -TCPテーラーメイド人工骨の安全性と有効性が確認され、基礎データを収集した。

F. 健康危険情報

主任研究者が一括して報告。

G. 研究発表

【論文発表】

1. Yamaguchi M, Ogata N, Shinoda Y, Akune T, Kamekura S, Terauchi Y, Kadowaki T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Insulin receptor substrate-1 is required for bone anabolic function of parathyroid hormone in mice. *Endocrinology* 146: 2620-2628, 2005.
2. Kawaguchi H, Akune T, Yamaguchi M, Ohba S, Ogata N, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, and Nakamura K: Distinct effects of PPAR $\gamma$  insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab* 23: 275-279, 2005.
3. Yano F, Kugimiya F, Ohba S, Ikeda T, Chikuda H, Ogasawara T, Ogata N, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI: The canonical Wnt signaling pathway promotes

chondrocyte differentiation in a Sox9dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 1300-1308, 2005

4. Moro T, Ogasawara T, Chikuda H, Ikeda T, Ogata N, Maruyama Z, Komori T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Okayama H, and Kawaguchi H: Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol* 204: 927-933, 2005.
  5. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung UI, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, and Kawaguchi H: Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 632-641, 2005.
  6. Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K, Ikegawa S, and Chung UI: Distinct roles of SOX5, SOX6 and SOX9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab* 23: 337-340, 2005.
  7. Kugimiya F, Kawaguchi H, Kamekura S, Chikuda H, Ohba S, Yano F, Ogata N, Katagiri T, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, and Chung UI: Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP)2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem* 280: 35704-35712, 2005.
  8. Kugimiya F, Yano F, Ohba S, Igawa K, Nakamura K, Kawaguchi H, and Chung UI: Mechanism of osteogenic induction by FK506 via BMP/Smad pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 872-879, 2005..
  9. Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, and Hoshi K: Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant* 14: 683-693, 2005.
  10. Katagiri M, Ogasawara T, Hoshi K, Chikazu D, Kimoto A, Noguchi M, Sasamata M, Harada S, Akama H, Tazaki H, Chung UI, Takato T, Nakamura K, and Kawaguchi H: Suppression of adjuvant-induced arthritic bone destruction by cyclooxygenase-2 selective agents with and without inhibitory potency against carbonic anhydrase II. *J Bone Miner Res* 21: 219-227, 2006.
2. 学会発表  
【国内学会】
1. 星和人、劉光耀、小笠原徹、高橋嗣明、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩：軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の組み合わせの最適化と相互作用機序の検討。第18回日本軟骨代謝学会。2005。3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪)。
  2. 龜倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、鄭雄一、小守壽文、中村耕三、川口浩：Runx2による関節軟骨細胞の病的肥大化が変形性関節症の発症に重要である—新規OA誘発モデルを用いたRunx2ヘテロ欠損マウスの解析—。第18回日本軟骨代謝学会。2005。3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪)。
  3. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、小笠原徹、池田敏之、緒方直史、高戸毅、中村耕三、川口浩、鄭雄一：古典的Wntシグナルは軟骨細胞への分化と肥大化を促進的に制御している。第18回日本軟骨代謝学会。2005。3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪)。
  4. 釘宮典孝、筑田博隆、池田敏之、中村耕三、鄭雄一、川口浩：cGKIIはSox9の核内移行を抑制することにより軟骨細胞の肥大分化における分子スイッチとして働く。第18回日本軟骨代謝学会。2005。3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪)。
  5. 瀬戸宏明、龜倉暁、三浦俊樹、山本愛一郎、筑田博隆、緒方徹、平岡久忠、織田弘美、中村耕三、黒沢尚、鄭雄一、川口浩、田中栄：滑膜線維芽細胞での軟骨特異的遺伝子発現におけるSmad pathwayとp38 pathwayの役割について。第18回日本軟骨代謝学会。2005。3.18-19 (大阪千里ライフサイエンスセンター、大阪)。
  6. 中村耕三：変形性関節症の病態と治療。第49回日本リウマチ学会総会・学術集会。2005。4.17 (パシフィコ横浜、神奈川)。
  7. 釘宮典孝、筑田博隆、中村耕三、鄭雄一、川口浩：cGKIIはSox9の核内移行を抑制することによって軟骨細胞の肥大分化への分子スイッチとして働く。第49回日本リウマチ学会総会・学術集会。2005。4.17-20 (パシフィコ横浜、神奈川)。
  8. 龜倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、鄭雄一、小守壽文、中村耕三、川口浩：Runx2による関節軟骨細胞の病的肥大化が変形性関節症(OA)発症の引き金となる。第49回日本リウマチ学会総会・学術集会。2005。4.17-20 (パシフィコ横浜、神奈川)。
  9. 茂呂徹、高取吉雄、中村耕三、川口浩：関節摺動面のMPCポリマー処理は人工股関節の弛みを抑制する—耐摩耗性と生体適合性に優れた新規人工股関節の開発—。第49回日本リウマチ学会総会・学術集会。2005。4.17-20 (パシフィコ横浜、神奈川)。
  10. 山田高嗣、河野博隆、龜倉暁、腰塚裕、中村耕

- 三、加藤茂明、川口浩：軟骨特異的遺伝子 Cystatin 10 は軟骨細胞の石灰化を介して変形性関節症・異所性石灰化に関与している。第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会。2005. 4. 17-20 (パシフィコ横浜、神奈川)。
11. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、高玉博朗、山脇昇、中村耕三、川口浩：シンポジウム「バイオトライボロジーの最前線」MPC ポリマーのナノ表面処理による長寿命型人工股関節の開発 - 耐摩耗性と生体適合性の検討 -。第 44 回生体医工学会大会 (日本エム・イー学会)。2005. 4. 25-27 (つくば、栃木)。
  12. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、高玉博朗、山脇昇、中村耕三、川口浩：生体適合性高分子材料・MPC による関節摺動面のナノ表面処理は人工股関節の弛みを抑制する - 長寿命型人工股関節の開発 -。第 78 回日本整形外科学会学術集会。2005. 5. 12-15 (パシフィコ横浜、神奈川)。
  13. 竹下克志、星地亜都司、河村直洋、東川晶郎、村上元昭、川口浩、中村耕三：Neck Disability Index の有用性。第 78 回日本整形外科学会学術集会。2005. 5. 12-15 (パシフィコ横浜、神奈川)。
  14. 河野博隆、佐藤隆史、山田高嗣、松本高広、中村耕三、川口浩、加藤茂明：男性ホルモンの骨量維持作用 - 男性ホルモン受容体遺伝子欠損マウスの解析 -。第 78 回日本整形外科学会学術集会。2005. 5. 12-15 (パシフィコ横浜、神奈川)。
  15. 星地亜都司、竹下克志、松平浩、川口浩、東川晶郎、緒方直史、村上元昭、中村耕三：頸部脊髄症の神経学的高位診断 - MRI からみた検証 -。第 34 回日本脊椎脊髄病学会学術集会。2005. 6. 10-11 (仙台国際センター、仙台)。
  16. 星地亜都司、竹下克志、阿久根徹、川口浩、東川晶郎、中村耕三：コンピューターナビゲーションシステムを使用した頸椎部砂時計腫の手術療法。第 34 回日本脊椎脊髄病学会学術集会。2005. 6. 10-11 (仙台国際センター、仙台)。
  17. 中村耕三：変形性関節症の病態と治療。アロカ株式会社内における教育講演。2005. 7. 21 (アロカ株式会社・東京)
  18. 川口浩、河村直洋、阿久根徹、緒方直史、星和人、鄭雄一、窪田直人、山内敏正、寺内康夫、門脇孝、中村耕三：Insulin/IGF-I・IRS・Akt シグナルによる骨リモデリング調節 (ミニシンポジウム「骨リモデリングの分子メカニズム」)。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
  19. 川口浩、篠田裕介、山口雅之、阿久根徹、大庭伸介、緒方直史、鄭雄一、窪田直人、山内敏正、寺内康夫、門脇孝、中村耕三：脂質代謝調節分子による骨代謝制御 (ミニシンポジウム「メタボリックシンドロームと骨」)。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
  20. 川口浩、神宮司誠也、泉敏弘、福永仁夫、松下隆、中村孝志、水野耕作、中村利孝、中村耕三：リコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子-2 (rhFGF-2) の骨形成促進作用 - 骨切り症例における前向き多施設臨床試験 - (優秀演題賞受賞)。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
  21. 河村直洋、釘宮典孝、大庭伸介、緒方直史、山口雅之、福田明、鈴木亮、戸邊一之、門脇孝、中村耕三、鄭雄一、川口浩：Akt1 による生体内骨代謝調節作用とそのメカニズム (優秀演題賞受賞)。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
  22. 大庭伸介、池田敏之、釘宮典孝、矢野文子、藤田隆司、小守壽文、小笠原徹、星和人、中村耕三、高戸毅、川口浩、鄭雄一：Runx2 シグナルと BMP シグナルは協調的に Cbfb を制御することによって骨芽細胞分化の最小かつ十分なシグナルユニットとして機能する (優秀演題賞受賞)。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
  23. 丸山善治郎、豊澤悟、古市達哉、金谷直子、藤田隆司、中村耕三、川口浩、小守壽文：Osterix の骨芽細胞における過剰発現は、骨芽細胞の増殖を促進、成熟を抑制し、著明な骨減少を引き起こす (優秀演題賞受賞)。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
  24. 齊藤琢、池田敏之、中村耕三、川口浩、鄭雄一：S100A1、S100B は SOX9/SOX5/SOX6 (SOX trio) の標的分子として軟骨細胞の肥大化・石灰化を抑制する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
  25. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、池田敏之、緒方直史、小笠原徹、高戸毅、中村耕三、川口浩、鄭雄一：新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体は Sox9 と独立して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
  26. 丸山善治郎、酒井暁子、金谷直子、中村耕三、川口浩、小守壽文：細胞周期調節分子 Cdk6 と cyclin D1 の軟骨における過剰発現は、軟骨細胞分化を抑制するとともに p53 経路を介してアポトーシスを誘導する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
  27. 山川聖史、亀倉暁、村上誠、工藤一郎、植松智、

- 審良 静男、中村耕三、川口浩：膜型プロスタグランジン E2 酵素-1 (mPGES-1)の骨折治癒および変形性関節症への関与。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
28. 篠田裕介、山口雅之、緒方直史、阿久根徹、窪田直人、山内敏正、寺内康夫、門脇孝、竹内靖博、福本誠二、星和人、鄭雄一、中村耕三、川口浩：Adiponectin の autocrine/paracrine および endocrine 作用による骨代謝調節機構。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
29. 吉村典子、木下裕文、岡敬之、川口浩、中村耕三：女性における脊椎椎体骨折発生率の関与：山村コホート 10 年間の追跡。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
30. 小笠原徹、筑田博隆、大庭伸介、近津大地、片桐未佳、矢野文子、中村耕三、鄭雄一、星和人、岡山博人、高戸毅、川口浩：細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の Runx2 機能スイッチングによる骨芽細胞分化制御。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
31. 星和人、劉光耀、小笠原徹、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩：甲状腺ホルモン (T3) は、BMP-2 および insulin と協調し、脱分化型軟骨細胞の理想的な再分化を実現する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
32. 河野慎次郎、星和人、川口浩、中村耕三、田中栄：Mitogen activated kinase (MAP キナーゼ) Pathway は MLO-A5 および骨芽細胞の石灰化を抑制する。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
33. 片桐未佳、小笠原徹、近津大地、木本愛之、野口正宏、笹又理央、原田俊一、田崎初江、鄭雄一、星和人、高戸毅、中村耕三、川口浩：Carbonic anhydrase II 抑制活性の有無による COX-2 阻害剤の炎症性骨破壊抑制効果。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
34. Lee S, Chung UI, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Rhee Y, Lim SK: Experimental Parathyroid Hormone Gene Therapy using Phi C31 Litegrase (Asia Travel Award 受賞)。第 23 回日本骨代謝学会。2005. 7. 21-23 (大阪国際会議場、大阪)。
35. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、鄭雄一、高玉博朗、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口浩：生体適合性ポリマーのナノ表面処理による高潤滑インターフェイスは人工関節の弛みを抑制する。第 8 回日本組織工学会。2005. 9. 1-2 (東京)
36. 中村耕三：骨系統疾患の診断と治療：京都運動器疾患フォーラム。2005. 9. 12 (京都)
37. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Takadama H, Nakamura K, Kawaguchi H: Nano-grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner surface for preventing aseptic loosening of the artificial hip joint. 18th Annual Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty (ISTA). 2005. 9. 30-10. 1 (京都国際会議場)。
38. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Takadama H, Nakamura K, Kawaguchi H: Nano-grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner for preventing aseptic loosening of the artificial hip joint. 18th Annual Symposium of International Society for Technology in Arthroplasty. 2005. 9. 27-10. 2 (京都国際会議場、京都)。
39. 中村耕三：変形性関節症の病態と治療：KCOA 関節症研修会。2005. 10. 6 (東京)
40. 川口浩、神宮司誠也、松下隆、中村耕三：リコンビナントヒト線維芽細胞増殖因子-2 (rhFGF-2)の骨形成促進作用 -骨切り症例における前向き多施設臨床試験-。第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会。2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
41. 篠田裕介、山口雅之、緒方直史、阿久根徹、中村耕三、川口浩：Adiponectin の autocrine/paracrine および endocrine 作用による骨代謝調節 (優秀ポスター受賞)。第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会。2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
42. 小笠原徹、星和人、筑田博隆、中村耕三、高戸毅、川口浩：細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の Runx2 機能スイッチングによる骨芽細胞分化制御。第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会。2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
43. 丸山善治郎、金谷直子、前野考史、中村耕三、川口浩、小守壽文：Osterix の骨芽細胞における過剰発現は、骨芽細胞の増殖を促進、成熟を抑制し、著明な骨減少を引き起こす。第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会。2005. 10. 20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
44. 高石官成、Jeanine D' Armiento、小崎直人、川口浩、中村耕三、戸山芳昭：MMP-13 遺伝子欠損マウスでは、骨芽細胞を介した破骨細胞の機能不全により骨量の増加を示す。第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会。2005. 10. 20-

- 21 (三重県営サンアリーナ、三重).
45. 小崎直人、高石官成、亀倉暁、川口浩、中村耕三、戸山芳昭：MMP-13は骨折治癒過程における軟骨性仮骨吸収に必要なである。第20回日本整形外科学会基礎学術集会。2005.10.20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
  46. 山川聖史、亀倉暁、村上誠、中村耕三、川口浩：膜型プロスタグランジンE2合成酵素-1 (mPGES-1)の骨折治癒および変形性関節症への関与。第20回日本整形外科学会基礎学術集会。2005.10.20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
  47. 河村直洋、釘宮典孝、門脇孝、中村耕三、鄭雄一、川口浩：Akt1による生体内での骨代謝調節作用とそのメカニズム。第20回日本整形外科学会基礎学術集会。2005.10.20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
  48. 齊藤琢、川口浩、池田敏之、中村耕三、鄭雄一：S100A1、S100BはSOX9/SOX5/SOX6 (SOX trio)の標的分子であり、軟骨細胞に作用してその肥大化・石灰化を抑制する。第20回日本整形外科学会基礎学術集会。2005.10.20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
  49. 星和人、山岡尚世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩：インプラント型再生軟骨を作製するための足場素材システムの開発。第20回日本整形外科学会基礎学術集会。2005.10.20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
  50. 位高啓史、大庭伸介、鄭雄一、川口浩、中村耕三、片岡一則：再生医療応用に向けた高分子ミセル型遺伝子ナノキャリア。第20回日本整形外科学会基礎学術集会。2005.10.20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
  51. 丸山善治郎、酒井暁子、金谷直子、中村耕三、川口浩、小守壽文：細胞周期調節分子Cdk6とcyclin D1の軟骨における過剰発現は、軟骨細胞分化を抑制するとともにp53経路を介してアポトーシスを誘導する。第20回日本整形外科学会基礎学術集会。2005.10.20-21 (三重県営サンアリーナ、三重)。
  52. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、高玉博朗、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口浩：生体適合性リン脂質ポリマーのナノ表面制御による長寿命型人工股関節の開発。第32回日本股関節学会学術集会。2005.11.6-8 (新潟)。
  53. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、高玉博朗、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口浩：ポリマーナノグラフト型人工股関節の生体適合機能。第27回日本バイオマテリアル学会大会。2005.11.28-29 (京都)。
  54. 石山典幸、茂呂徹、大江隆史、石原一彦、金野智浩、木村美都奈、三浦俊樹、中村耕三、川口浩：生体内解離性リン脂質ポリマーハイドロゲルの癒着防止効果。第27回日本バイオマテリアル学会大会。2005.11.28-29 (京都)。
  55. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、高玉博朗、松下富春、山脇昇、中村耕三、川口浩：シンポジウム「日本発の人工臓器：基盤技術の創出と開発の現況」生体適合性ポリマーのナノ表面処理による長寿命型人工股関節の開発。第43回日本人工臓器学会大会。2005.11.30-12.2 (東京)。
  56. 中村耕三：変形性関節症の予防治療へのとりくみ：リウマチ財団賛助会講演。2005.12.13 (東京)。
  57. 山川聖史、亀倉暁、亀井大輔、竹越唯衣、村上誠、工藤一郎、植松智、審良静男、中村耕三、川口浩：膜型プロスタグランジンE2酵素-1 (mPGES-1)の骨・軟骨疾患への関与。第10回プロスタノイド研究会。2005.12.17 (東京医科大学特別講堂、東京)。
  58. 山川聖史、亀倉暁、村上誠、工藤一郎、植松智、審良静男、中村耕三、川口浩：膜型プロスタグランジンE2合成酵素-1 (mPGES-1)の骨折治癒および変形性関節症への関与。第19回日本軟骨代謝学会。2006.3.3-4 (はまぎんホールヴィアマール、横浜)。
  59. 齊藤琢、池田敏之、鄭雄一、中村耕三、川口浩：S100A1、S100BはSOX9/SOX5/SOX6 (SOX trio)の標的分子であり、軟骨細胞に作用してその肥大化・石灰化を抑制する。第19回日本軟骨代謝学会。2006.3.3-4 (はまぎんホールヴィアマール、横浜)。
  60. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、池田敏之、緒方直史、小笠原徹、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一：新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体はSox9と独立に作用して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する。第19回日本軟骨代謝学会。2006.3.3-4 (はまぎんホールヴィアマール、横浜)。
  61. 筑田博隆、釘宮典孝、星和人、池田敏之、小笠原徹、河野博隆、亀倉暁、土田温子、横井伯英、中村耕三、米田嘉重郎、鄭雄一、川口浩：低身長ラットKMIの原因遺伝子cGMP-dependent protein kinase II (cGKII)はSox9の核内移行を抑制し、軟骨細胞の肥大分化への分子スイッチとして働く。第19回日本軟骨代謝学会。2006.3.3-4 (はまぎんホールヴィアマール、横浜)。
- 【海外学会】
- ① Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Takadama H, Nakamura K, Kawaguchi H: New biocompatible and wear-resistant articulating surface of artificial joints for preventing

- aseptic loosening. 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). 2005.2.20-23 (Washington D.C., USA)
- ② Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Nakamura K, Kawaguchi H: Biocompatible polymer grafting inhibits loosening of artificial joint based on macrophage activation. 72nd Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2005.2.23-27 (Washington D.C., USA).
- ③ Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Fukushima S, Yamasaki Y, Oba S, Chung UI, Kawaguchi H, Nakamura K, Kataoka K: Intelligent nanocarrier of plasmid DNA for bone regeneration. 51th annual meeting of the Orthopaedic Research Society. 2005. 3. 5-8 (New Orleans, Louisiana, USA).
- ④ Ishihara K, Moro T, Takatori Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Konno T: Biomimetic surface on polyethylene liner for obtaining excellent lubrication. 19th European Conference on Biomaterials. 2005.9.11-15 (Sorrento, Italy).
- ⑤ Kawamura N, Kugimiya F, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Akt1 in osteoblasts and osteoclasts contributes to the maintenance of bone mass and turnover (Young Investigator Award). 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
- ⑥ Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H: S100A1 and S100B, transcriptional target molecules of SOX5, SOX6 and SOX9 (the SOX trio), inhibit hypertrophic differentiation and calcification of chondrocytes (Young Investigator Award). 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
- ⑦ Yamakawa K, Kamekura S, Murakami M, Kudo I, Uematsu S, Akira S, Nakamura K, Kawaguchi H: Contribution of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) in fracture healing and osteoarthritis. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
- ⑧ Ogasawara T, Chikuda H, Ohba S, Chikazu D, Katagiri M, Yano F, Nakamura K, Chung U, Hoshi K, Takato T, Okayama H, Kawaguchi H: Functional switching of Runx2 by Cdk6 and Cdk4 in regulation of osteoblast differentiation. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
- ⑨ Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Fukumoto S, Hoshi K, Chung U, Nakamura K, Kawaguchi H: Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
- ⑩ Hoshi K, Liu G, Ogasawara T, Asawa Y, Chung U, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H: Thyroid hormone (T3) realizes ideal redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes in cooperation with BMP-2 and insulin. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).
- ⑪ Yoshimura N, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Cooper C: Comparing risk factors for hip and knee osteoarthritis in Japan and Britain. 27th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2005. 9.23-27 (Nashville, Tennessee, USA).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
内容：組織癒着・関節拘縮防止材  
番号：特願2005-243984

骨欠損大動物モデルの作成とその長期自然経過に関する検討

分担研究者 高戸毅（東京大学大学院医学系研究科・口腔外科 教授）

研究要旨

骨欠損大動物モデル（イヌ）の作製と長期自然経過を明らかにした。

A. 研究目的

臨床的に有用な再生医療を開発するためには、使用する動物モデルが妥当に使われているかの検証が重要である。従来げっし類が骨軟骨欠損モデルによく使われているが、彼らの再生能力は旺盛であり、ともすれば自然治癒を観察している可能性があった。そこで、昨年度はマウス・ラットの臨界骨・軟骨欠損モデルの長期の自然経過を明らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。これら小動物の基礎データをもとに、今年度は臨床応用を視野に入れた大動物（イヌ）臨界骨・軟骨欠損モデルの確立を目指した。分担研究者の川口とともにイヌに骨・軟骨欠損モデルを作製し、その自然経過を追うことで実験を行う場合の至適条件を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

11ヶ月齢—2歳10ヶ月（平均1歳10ヶ月）の健康ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15mmの骨欠損を作製した。術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で骨欠損部のCT撮影を行った。

C. 研究結果

イヌ頭蓋部骨欠損モデルにおいては、放射線学的には、6ヶ月経過しても治癒につながる明らかな骨形成は認められなかった。  
このモデルは現在経過観察中である。

D. 考察

6ヶ月という期間内であれば、骨再生実験の際の臨界骨欠損モデルとして使用可能であると考えられた。しかしながら昨年度の小動物モデルの場合と同様に、モデルによっては完全な不可逆性欠損でないことがあるので、観察期間やコントロールに注意する必要がある。

E. 結論

臨界骨欠損大動物モデル（イヌ）の自然経過を追い、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。

F. 健康危険情報

主任研究者が一括して報告。

G. 研究発表

1. 論文発表

Abe M., Ohira M., Kaneda A., Yagi Y., Yamamoto S., Kitano Y., Takato T., Nakagawara A., and Ushijima T.: CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65(3): 828-34, 2005.

Fujihara Y., Koyama H., Nshiyama N., Eguchi T., Takato T.: Gene Transfer of bFGF to recipient bed improves survival of ischemic skin flap. *British Journal of Plastic Surgery* 58: 511-517, 2005.

Yano F., Kugimiya F., Ohba S., Ikeda T., Chikuda H., Ogasawara T., Ogata N., Takato T., Nakamura K., Kawaguchi H., and Chung UI.; The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 333(4): 1300-1308, 2005.

Yamaoka K., Yamaoka H., Nakajima Y., Hoshi k., Takato T., Sakurai H., Shimamura H., and Ishibashi H.: Coloring and Blocking of In-line Filters when Total Prenteral Nutrition Solutions Are Supplemented with Vitamins and Trace Elements. *医療薬学*(Japanese Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences)31(8):

620-624, 2005.

Iida H., Jo T., Iwasawa K., Morita T., Hikiji H., Takato T., Toyo-Oka T., Nagai R., and Nakajima T.: Molecular and pharmacological characteristics of transient voltage-dependent K(+) currents in cultured human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Br J Pharmacology* 146(1): 49-59, 2005.

Chikazu D., Ohba S., Ogasawara T., Saijyo H., Mori Y., Tomizuka K., Kawaguchi H., Yonehara Y., Susami T., and Takato T.: Combination of platelet-rich plasma and cyclooxygenase-2 inhibitor potently stimulates bone marrow stromal cell proliferation in vitro. *Asian. J. Oral and Maxillofacial Surgery* 17: 95-101, 2005.

西條英人、井川和代、鄭雄一、米原啓之、高戸毅: 三次元積層造形による立体モデルを用いた手術シミュレーションシステム. *日本形成外科学会誌* 25(11): 746-751, 2005.

Takahashi T., Ogasawara T., Kishimoto J., Liu G., Asato H., Nakatsuka T., Nakamura K., Kawaguchi H., Chung U., Takato T., Hoshi K.: Synergistic Effects of FGF-2 with Insulin or IGF-I on the Proliferation of Human Auricular Chondrocytes. *Cell Transplant* 14: 683-693, 2005.

Katagiri M., Ogasawara T., Hoshi K., Chikazu D., Kimoto A., Noguchi M., Sasamata M., Harada S., Akama H., Tazaki H., Chung UI., Takato T., Nakamura K., and Kawaguchi H.: Suppression of Adjuvant-Induced Arthritic Bone Destruction by Cyclooxygenase-2 Selective Agents with and without Inhibitory Potency against Carbonic Anhydrase II. *J Bone Miner Res.* 21(2): 219-227, 2006.

Yamaoka H., Asato H., Ogasawara T., Nishizawa S., Takahashi T., Nakatsuka T., Koshima I., Nakamura K., Kawaguchi H., Chung UI., Takato T., and Hoshi K.: Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials *J Biomed Mater Res* (in press)

## 2. 学会発表

矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一: 新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体は Sox9 と独立に作用して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する. 第 4 回日本再生医療学会総会, 2005 年 3 月 1 日、大阪.

大庭伸介、池田敏之、緒方直史、Lichtler Alex、小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一: 骨形成のための最小十分シグナルの同定と幹細胞を用いない新規骨再生法の開発. 第 4 回日本再生医療学会総会、2005 年 3 月 2 日、大阪.

西條英人、井川和代、米原啓之、森良之、須佐美隆史、高戸毅: 三次元積層造形による立体モデルを用いた手術シミュレーションシステム. 第 48 回日本形成外科学会総会・学術集会、2005 年 4 月 15 日、東京.

近津大地、富塚 健、西條英人、小泉敏之、古敷谷昇、森 良之、米原啓之、須佐美隆史、高戸毅: マウスを用いたインプラント体周囲の骨反応における COX-2 の役割. 第 59 回日本口腔科学会総会、2005 年 4 月 21-22 日、徳島.

西條英人、井川和代、近津大地、末永英之、森 良之、米原啓之、須佐美隆史、高戸毅: 三次元積層造形による立体モデルを用いた手術シミュレーションシステム. 第 59 回日本口腔科学会総会、2005 年 4 月 21-22 日、徳島.

引地尚子、安部貴大、古敷谷昇、島 誠一、小泉敏之、西條英人、近津大地、森 良之、富塚 健、米原啓之、須佐美隆史、高戸毅: 一酸化窒素による骨形成促進および抑制機構の解明と遺伝子治療への試み. 第 59 回日本口腔科学会総会、2005 年 4 月 21-22 日、徳島.

渡邊宏伊、酒井直彦、中野香代子、瀬崎晃一郎、山崎安晴、須佐美隆史、内沼栄樹、徳永勝士、高戸毅: 日本人口唇口蓋裂患者におけるホメオボックス遺伝子の解析. 第 29 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2005 年 5 月 25 日、東京.

大庭伸介、池田敏之、釘宮典孝、矢野文子、藤田隆司、小守壽文、小笠原徹、星和人、中村耕三、高戸毅、川口浩、鄭雄一: Runx2 シグナルと BMP シグナルは協調的に Cbfb を制御することによって骨芽細

胞分化の最小かつ十分なシグナルユニットとして機能する。第 23 回日本骨代謝学会学術集会、2005 年 7 月 21 日、大阪。

矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、池田敏之、小笠原徹、高戸毅、中村耕三、川口浩、鄭雄一：新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体は Sox9 と独立に作用して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する。第 23 回日本骨代謝学会学術集会、2005 年 7 月 21 日、大阪。

小笠原徹、筑田博隆、大庭伸介、近津大地、片桐未佳、矢野文子、中村耕三、鄭雄一、星和人、岡山博人、高戸毅、川口浩：細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の Runx2 機能スイッチングによる骨芽細胞分化制御。第 23 回日本骨代謝学会学術集会、2005 年 7 月 21 日-23 日、大阪。

片桐未佳、小笠原徹、近津大地、木本愛之、野口正宏、笹又理央、原田俊一、田崎初江、鄭雄一、星和人、高戸毅、中村耕三、川口浩：Carbonic anhydrase II 抑制活性の有無による COX-2 阻害剤の炎症性骨破壊抑制効果、第 23 回日本骨代謝学会学術集会、2005 年 7 月 21 日-23 日、大阪。

星和人、劉光耀、小笠原徹、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口浩：甲状腺ホルモン(T3)は、BMP-2 および insulin と協調し、脱分化型軟骨細胞の理想的な再分化を実現する。第 23 回日本骨代謝学会学術集会、2005 年 7 月 21 日-23 日、大阪。

引地 尚子、高戸毅：PAF は骨芽細胞を介さずオートクライン的に破骨細胞に作用し、骨粗鬆症を悪化させる。東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学大講座（口腔外科学）第 23 回日本骨代謝学会、2005 年 7 月 21-23 日、大阪。

小笠原徹、高橋嗣明、浅輪幸世、山岡尚世、田中庸子、西澤悟、劉光耀、須佐美隆史、依田哲也、高戸毅、星和人：ヒト耳介由来軟骨細胞培養における TGF- $\beta$  添加の影響について。第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1 日-2 日、東京。  
山岡尚世、小笠原徹、朝戸裕貴、西澤悟、鄭雄一、高戸毅、川口浩、中村耕三、中塚貴志、星和人：軟骨再生医療に用いる足場素材ハイドロゲルの検討。第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1 日-2 日、東京。

小笠原徹、大庭伸介、近津大地、末永英之、矢野文子、中村耕三、鄭雄一、川口浩、星和人、高戸毅：細胞周期調節因子による Runx2 機能制御機構の解明と骨再生医療への応用可能性。第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1 日-2 日、東京。

星和人、劉光耀、小笠原徹、高橋嗣明、浅輪幸世、鄭雄一、中村耕三、川口浩、高戸毅：軟骨再生医療に用いる軟骨細胞再分化誘導法の検討と作用機序の解明。第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1 日-2 日、東京。

浅輪幸世、小笠原徹、中塚貴志、鄭雄一、高戸毅、星和人：ヒト鼻中隔および耳介由来軟骨細胞の細胞特性の比較検討。第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1 日-2 日、東京。

高橋嗣明、小笠原徹、西澤悟、中塚貴志、鄭雄一、川口浩、中村耕三、内沼栄樹、高戸毅、星和人：ヒト軟骨細胞の増殖培養法の検討と液性因子の最適化。第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1 日-2 日、東京。

近津大地、大庭伸介、小笠原徹、川口 浩、米原啓之、須佐美隆史、高戸毅：COX-2 選択的阻害剤は PRP の bone marrow stromal cell 増殖効果を促進する。第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1-2 日。

大庭伸介、池田敏之、矢野文子、Lichtler Alex、小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一：骨形成シグナルの最適化と幹細胞を用いない新規骨再生法の開発。第 8 回日本組織工学会 2005 年 9 月 1 日、東京。

矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、池田敏之、緒方直史、小笠原徹、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一：新規軟骨誘導化合物チエノインダゾール誘導体は Sox9 と独立に作用して軟骨分化を促進し肥大化を抑制する。第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1 日、東京。

井川和代、杉森理、望月学、佐々木伸雄、山澤建二、安斎正博、清水康太郎、鈴木茂樹、大庭伸介、高戸毅、鄭雄一：Ink-jet 式を用いた人工骨の造形、第 8 回日本組織工学会、2005 年 9 月 1-2 日、東京。

末永英之、古川克子、星和人、小笠原徹、牛田多加志、立石哲也、高戸毅：旋回培養を利用した分化促

進と組織工学への応用. 第 8 回日本組織工学会  
2005 年 9 月 1 日、東京.

藤原久子、堤雅弘、楠岡修、高戸毅、中釜齊、杉村  
隆、益谷美都子: Parp-1 欠損マウスの肝臓に認め  
られたアゾキシメタン誘発異所性骨形成の経時的解  
析. 第 8 回日本組織工学会 2005 年 9 月 1-2 日、  
東京.

山田陽子、太田正人、種村健太郎、近藤隆、江藤一  
洋、西條英人、藤原久子、米原啓之、高戸毅: 味蕾  
の細胞動態と分化マーカーによる味蕾幹細胞の検討.  
第 8 回日本組織工学会 2005 年 9 月 1-2 日、東京.

山中克之、松原全宏、坂井将典、清水正和、坂井裕  
大、瀬越和美、五十嵐晃、中村大吉、高戸毅、中村  
耕三、辻紘一郎、加藤幸夫: 培養骨シート(間葉系  
幹細胞)による腸骨再生. 第 8 回日本組織工学会  
2005 年 9 月 1-2 日、東京.

吉橋久男、原真依子、瀬越和美、坂井将典、五十嵐  
晃、松原全宏、山縣敏彦、中村耕三、高戸毅、加藤  
幸夫、辻紘一郎: 幹細胞自動培養装置の開発と得ら  
れた hMSC の品質評価. 第 8 回日本組織工学会  
2005 年 9 月 1-2 日、東京.

大庭誠、赤木大輔、西山伸宏、宮田哲郎、高戸毅、  
片岡一則、小山博之: 血管疾患の遺伝子治療を目指  
した非ウイルス型遺伝子デリバリーシステムの開発、  
第 8 回日本組織工学会 2005 年 9 月 1-2 日、東京.

永吉実紀子、小山博之、高戸毅、小林尚俊、大塚英  
典、田口哲志、五十嵐聡、田中順三: 再生臓器の血  
管化. 第 8 回日本組織工学会 2005 年 9 月 1-2 日、  
東京.

河瀬陽子、徳原真、高戸毅、水野博司、浜崎辰夫、  
大河内仁志: ニューロスフェア法を用いたヒト脂肪  
組織からの神経細胞誘導の検討. 第 8 回日本組織  
工学会 2005 年 9 月 1-2 日、東京.

小笠原徹、星和人、筑田博隆、中村耕三、高戸  
毅、川口浩: 細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の  
Runx2 機能スイッチングによる骨芽細胞分化制御  
(会議録). 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集  
会、2005 年 10 月 20 日-21 日、三重.

小笠原徹、筑田博隆、大庭伸介、高戸毅、星和  
人: 細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の Runx2 機能制

御による骨芽細胞分化調節機構(会議録). 第 28 回  
日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 7 日-10 日、  
福岡.

Susami T., Asahito T., Morita S., Negoro T.,  
Kochi S., Ohtsuka S., Kitai N., Mohri T., Ono  
K., Tachimura T., Terao E., Ogihara Y., Takato  
T., Takagi R., Hanada K.: Assessmet of dental  
arch relationships in patients with unilateral  
cleft lip and palate in six Japanese hospitals.  
10th International Congress on Cleft Palate  
and Related Craniofacial Anomolies.  
September 5<sup>th</sup>, 2005, Durban, South Africa.

Ogasawara T., Chikuda H., Ohba S., Chikazu D.,  
Katagiri M., Yano F., Nakamura K., Ung-il  
Chung, Hoshi K., Takato T., Okayama H.,  
Kawaguchi H.: Functional Switching of Runx2 by  
Cdk6 and Cdk4 in Regulation of Osteoblast  
Differentiation. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the  
ASBMR, September 23-27, 2005, USA.

Ohba S., Ikeda T., Kugimiya F., Yano F.,  
Fujita T., Komori T., Ogasawara T., Nakamura  
K., Takato T., Kawaguchi H., Chung U.:  
Involvement of Cbfb in the Cooperative Action  
of BMP and Runx2 Signalings on Osteogenic  
Differentiation. 27th Annual Meeting of the  
American Society for Bone and Mineral Research,  
Sep.24, 2005, Nashville, Tennessee, USA.

Yano F., Ohba S., Kugimiya F., Ikeda T., Ogata  
N., Ogasawara T., Takato T., Nakamura K.,  
Kawaguchi H., Chung U.: A New Thienindazole  
Derivative Promotes Chondrogenic  
Differentiation in a Sox-9-Independent Manner  
without Inducing Hypertrophy. 27th Annual  
Meeting of the American Society for Bone and  
Mineral Research, Sep.25, 2005, Nashville,  
Tennessee, USA.

Hoshi K., Liu G., Ogasawara T., Asawa Y.,  
Chung U, Takato T., Nakamura K., and Kawaguchi  
H.: Thyroid Hormone (T3) Realizes Ideal  
Redifferentiation of Dedifferentiated  
Chondrocytes in Cooperation with BMP-2 and  
Insulin. Twenty-Seventh Annual Meeting of the  
American Society for Bone and Mineral Research,  
September 23-27, 2005, Nashville, Tennessee,

USA.

Hikiji H., Ishii S., Shindou H., Takato T.,  
and Shimizu T.: Prevention of Osteoporosis in  
Ovariectomized Mice Deficient in Platelet-  
activating Factor Receptor (PAF) The  
Autocrine/Paracrine Action of PAF on

Osteoclasts not via Osteoblasts. The 27<sup>th</sup>  
Annual Meeting of American Society of Bone  
Mineral Research, September, 23, 24, 2005,  
Nashville, Tennessee, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

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）  
分担研究報告書

皮膚の多能性幹細胞の単離・培養と性状解析

分担研究者 大河内仁志 国立国際医療センター  
細胞組織再生医学研究部 部長

研究要旨 ヒトおよびマウスの皮膚からS P細胞を分離し、性状解析と培養法の検討を行った。ヘキスト色素を用いて色素排出能の高い細胞（S P細胞: Side Population cell）が皮膚に存在することを確認した。

A. 研究目的

皮膚からS P細胞の存在を検討し、分離ならびに培養法を検討する。またS P細胞の性状解析と存在部位を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

皮膚からS P細胞の分離・培養

術前に承諾の得られた摘出皮膚（n=3, 50-75歳）およびマウス（CD57BL/6J）の皮膚を用いた。Dispase 処理により、表皮と真皮を分離した後、それぞれ Hanks Balanced Solution (HBSS) で洗い、0.1%トリプシン溶液にて 37°C60 分静置した。trypsin neutralizing solution (TNS) でトリプシンを中和した。細胞はフィルターで濾過し、遠心にて回収した。PBSにて細胞浮遊液とし、hoechst33342 を 5ug/ml となるように加え、適度に攪拌しながら 37°C60 分おいた。UVレーザーを照射し FACS 解析を行った。Verapamil 添加群と非添加群を比較した。S P細胞群と非S P細胞群に分けて細胞を分取し、遺伝子発現並びに表面マーカーの解析を行った。色素排出能に関係する膜のトランスポーターの1種である Bcrp1 に対する抗体を用いて皮膚におけるS P細胞の局在を検討した。セルソーターによりS P細胞を分取し、CO<sub>2</sub>インキ

ュベーターで37度5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養して増殖能を検討した。

「倫理面への配慮」

研究に用いたヒト皮膚は術前に同意を得た手術標本の一部を使用した。実験にはマウスを用いたが、当研究所の実験動物委員会の規則に従い、動物愛護上の配慮をもって実験を行った。

C. 研究結果

まずマウス皮膚を用いて条件検討を行った。表皮に色素排出能の高い細胞群が存在し、verapamil 投与により排出能が抑制されたことからS P細胞の存在を確認した。新生児マウスでは5-10% S P細胞が見られたのに対して、生後1ヶ月から0.1%程度に激減していた。6ヶ月や24ヶ月のマウスでも検討したが、0.1%以下の割合であった。

真皮の細胞において検討したところS P細胞の割合は0.1%以下であった。毛の毛乳頭細胞のみを選択的に集めて検討したところ、S P細胞の割合は3%と上昇した。

表皮におけるS P細胞をソーティングして、表面マーカーの検索をしたところ、β1インテグリンやα6インテグリンが強く発現していたが、バルジ領域の細胞のマーカーとされているCD34は発現していなかった。

色素排出能に関係する膜のトランスポーターの1種である Bcrp1 の発現はS P細胞においてRNAレベルでも蛋白レベルでも非S P細胞より亢進していた。Bcrp1 に対する抗体を用いて皮膚におけるS P細胞の局在を検討した