

準静的評価を実施するためのハードの確認を行ったところ、汎用性の高い位相差顕微鏡でかつ、培養初期24h後に画像取得することで適用可能であることが確認された。また、形態変化評価においても既製品の画像解析ソフト（本試験では、WinRoof、三谷商事を使用）にて細胞輪郭をフリーハンドで描き、円形度を算出することで評価可能であることが確かめられた。なお、本評価機能を備えた、自由配布可能なソフトを作成することで、汎用性を可能とした。

2) 準静的評価法

ヒト上皮細胞の数回の継代培養において、準静的評価を行い、累積分裂回数に対する細胞形態（円形度）の変化を観察したところ、累積回数の増加に伴い、伸展可能な細胞が減少し、その結果円形度が上昇した。さらに細胞増殖速度の減少と細胞形態変化相関づけることができた。

3) D-グルコース提示面の特性解明

抗体を用いたブロッキング法により細胞接着ならびに形態変化のメカニズム解明を目指した。特に、GLUTを介する細胞形態のメカニズムを証明するために、0、100%D-glucose提示培養面を用いインスリンを含むまたは含まない培養条件で培養した細胞のGLUTの観察を行った。ここで細胞は、不活化処理を施したヒト乳腺上皮細胞を使用することで、実験の安定化を図った。

細胞接着はインスリンの有無とは関係なくほとんど差が確認されず、D-グルコースの提示密度に伴う大きな変化は確認されなかった。また、細胞表面に存在するGLUTをanti-GLUT抗体を用いブロックした細胞の細胞接着にもほとんど差が確認されなかった。これは、乳腺上皮細胞の場合、細胞接着にintegrinが関与していると考えられた。

様々な濃度(0、50、100%)のD-グルコースを結合させた面上で培養した細胞は様々な形態を示すことが確認され、さらに、培地中のインスリンの有無やブロッキングの有無によって、伸展された細胞の形態から丸く維持された細胞形態まで円形度が変化することがわかった。以上より、D-グルコース提示面上の細胞は、接着としては、インテグリンを介した機構、形態変化は、GLUTを介した機構であることが解明された。また、形態変化の程度は、細胞側のGLUT量と培養面上のD-グルコース提示量との量的バランスにより変化する“Receptor saturation model”に従うことがわかった。

D. 考察

培養細胞の特性評価を行ううえで、準静的評価手法の構築は、汎用性、オペレータの省力化などの観点から重要となる。その際、細胞を固定する技術は、インテグリンを介した細胞接着機構が多く報告されているが、接着斑形成を伴うために、細胞内のシグナリング変化を引き起こされ細胞特性が変化することが予想されている。そこで、シグナリング変化を引き起こさないようなイナートな固定が必要となる。よって、細胞固定法としては、

培養面に固定された脂質等を積極的に細胞膜中に挿入し、細胞固定を行う方法、細胞表面に存在するレセプターを標的とした物質を培養表面に固定化し、アフィニティー吸着により固定する方法、培養面に固定されたトランスポートチャンネルを標的とした物質を細胞に取り込ませトランスポーターに補足させることで細胞を固定する方法が挙げられる。被検体細胞の再利用を必須とする培養工程での細胞評価では、適度な細胞固定と細胞構成物質での固定が不可欠となり、トランスポートチャンネルを標的にしたシステムが有望視される。

表面にリガンドの1つとしてD-グルコースを提示した面は、本来の細胞特性を利用した形で、細胞構成物質以外の第3物質の導入を伴う、従来の強制的な固定物質の導入固定法（強制細胞固定）とは異なり、細胞の負担が低減される。また、細胞表面のレセプターをターゲットとした細胞固定（親和的吸着による固定）場合に比べ、より強固な細胞固定が可能と考えられ、細胞固定培養面として有用である。

本研究で示したように、培養中の細胞運動の推進力は細胞骨格形成に起因し、累積分裂回数の増加（細胞寿命）と伴に骨格形成能力が低下し、その結果、円形度変化が見られなくなったものと考えている。

E. 結論

以上、グルコース提示型デンドリマー培養面を用いることにより骨格形成を伴う細胞運動をエンドポイント観察することが可能となった。また、評価後に細胞を回収し、細胞を再利用することができることから、培養組織生産工程において、骨格形成能を評価できる有効なツールとなるものと考えられた。今後は、より汎用性をめざし、準静的評価手法により他の細胞特性について評価を試みる。

F. 研究発表

1. 論文発表

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: “Response of Human Epithelial Cells on Culture Surfaces with Varied Roughnesses Prepared by Immobilizing Dendrimers with/without D-Glucose Display”, J. Biosci. Bioeng., Vol. 103, No. 2, pp. 192 -199 (2007).

2. 学会発表

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: “Design for EGF Stimulation on D-glucose-displayed surface”, Regenerate World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, (Oral presentation; Kim), Pittsburgh (April. 25-27, 2006).

紀ノ岡正博, 金 美海, 川瀬雅也, 田谷正仁: グルコース提示型培養面を用いたEFG刺激伝達面の設計,

第9回日本細胞工学会, 京都 (2006.9)

金 美海, 紀ノ岡正博, 川瀬雅也, 八木清仁, 田谷正仁: グルコース提示型培養面における細胞伸展機構の解明, 第58回日本生物工学会大会, 大阪 (2006.9)

紀ノ岡正博, 金 美海, 川瀬雅也, 八木清仁, 田谷正仁: グルコース提示を介したEGF刺激伝達面上における上皮シート形成, 第58回日本生物工学会大会, 大阪 (2006.9)

G. 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
3. その他 なし

情報処理理論を用いた細胞培養の効率化

分担研究者 本多裕之

名古屋大学大学院工学系研究科 バイオテクノロジー講座 生物プロセス工学グループ 教授

研究要旨

本研究では、再生医療実用化のため、細胞培養という人間の感に頼った作業工程を効率化するための情報処理技術の確立を行った。現在、再生医療に用いられる細胞は、作業者の感や経験に依存した調製工程で作製されており、通常の工業的大量生産製品に比べて非常に非効率でありコストが高い。このような問題は、現在の再生医療の産業化における最大の課題であり、より安全かつ安定な細胞調製を行うためには、これらの作業工程における情報処理理論の導入が必要不可欠であると考えられる。本年度の本研究では、培養工程を効率化と品質管理の両方の視点から、知識情報処理技術であるFuzzy Neural Networkを画像処理データに適応したモデル化を行い、その有用性を検証した。H17～H18年度までに得られた臨床サンプルを用いた生データからモデル構築を行い、細胞調整工程の効率化を支援する自動培養装置の制御プログラムとしての機能性を詳細に検討した。本研究から、大量の画像データから有益な画像的指標を抽出するための新画像解析フィルターアルゴリズムと、Fuzzy Neural Networkを用いた生産性予測モデルを得ることができた。また、昨年度から取り組んでいるCPC内作業のコンピュータ管理（人的コントロール）のためのソフトウェアのGUIを更新し、さらに使いやすいCPC管理ソフトウェアとしてGMPへの対応も視野に入れた新しい管理システムのプラットフォームを確立した。

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療を実用化するために必要である「効率的な培養」を可能にするため、これまで工業的な生産管理に応用されてきている情報処理を用いた支援技術を、医療の臨床現場に密着した形で開発することである。

近年、再生医療の対象患者はますます増加しており、その適応範囲は致死的な疾患から日常的な疾患まで拡大されつつある。しかし、この新しい医療を享受出来る患者の数は僅かではない。これは治療技術の確立以外に、セルプロセッシングの技術が成熟していないことが一因と考えられる。再生医療のための細胞調製という工程はテーラーメイドであり、通常の工業的大量生産のストラテジーを応用することは難しい。これは現在、多くの企業が再生医療に興味を示しているにも関わらず実用化が進まない原因の一つでもある。このため、再生医療の治療用細胞の安定供給と安全性維持のための技術の開発は、より多くの医療施設で、多くの患者に現在の技術を提供するために必須である。

現在、多くの再生医療研究は治療法開発を目的としており、実用化や産業化に必要な、生産プロセスの効率化に関する基礎研究は少ない。動物細胞の大量培養の研究は、これまでの工学的な物質生産の観点からは多く行われて来たが、細胞そのものを医療用に用いる観点での細胞供給システムの開発は、ほとんど行われていない。結果として、再生医療を提供する施設では、GMP準拠の設備、熟練技術者の多数雇用など、コストがかかる方法で

安全性を担保する以外には方法がないのが現状である。また、幾つかの企業による自動化等の検討は、工業的な生産を目的とした価格や構造となっており、現在再生医療の臨床応用が行われている現場や医師の現状から離れてしまっている。

本研究では、実際の医療と細胞調製を行う臨床現場からのニーズを反映させた、再生医療生産プロセスの効率化のためのシステム開発を行った。

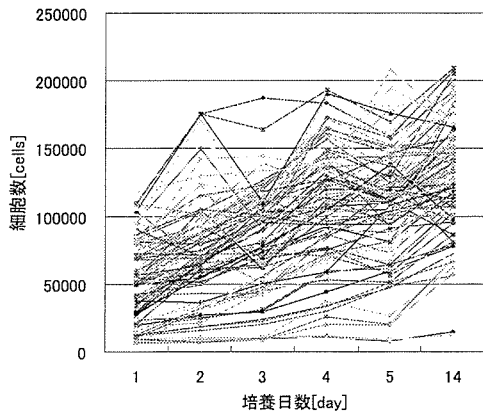
B. 研究方法

本研究では、効率的な培養を支援するシステムとして (i) 培養状況の予測システム、(ii) 培養工程の管理システムの2つの開発を試みた。

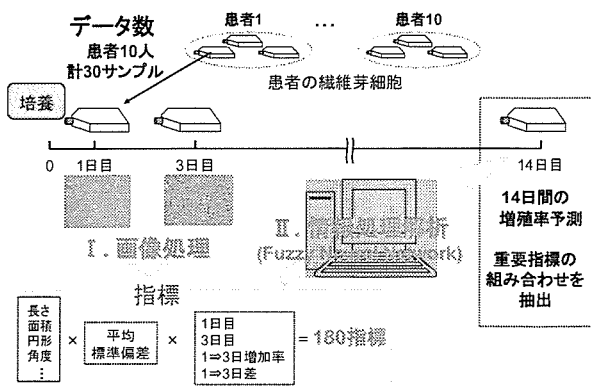
(i) 培養状況の予測システム：

培養予測のためのモデル構築には、少なくとも30個以上の培養データ（入力・出力データセット）が必要であるため、臨床研究において同意を得た患者38名の細胞を用いた経時的細胞増殖データをCASY（細胞数計測装置）にて測定し、同時に細胞形態の写真を顕微鏡にて取得した（図1）。本年度はまず、臨床現場の実情を踏まえ、患者細胞の細胞培養時期14日間を経て、患者来院日にどれくらいの細胞数を治療に用いることができるか（14日後の細胞増殖率）を予測することを第一目標とした。1日目、3日目の細胞の顕微鏡画像は、Metamorphにおいて独自のフィルターアルゴリズムを組み込むことによって、実際の細胞数に対してもっとも誤差が小さくなるような細胞認識と細胞形態指標（180項目）の取得を実現

した。これにより、各画像から180項目もの膨大な情報を抽出し、このデータを知識情報処理手法の一つであるFuzzy Neural Networkを用いて解析することで、最も有用な3つの指標の組み合わせルールを取得した。得られた3つの指標の組み合わせを用いて、各患者の14日後の増殖率（播種細胞数から何倍にまで増殖するか）を連続値で予測し、その精度を評価した。上記の研究プロセスを下記に図2に示す。



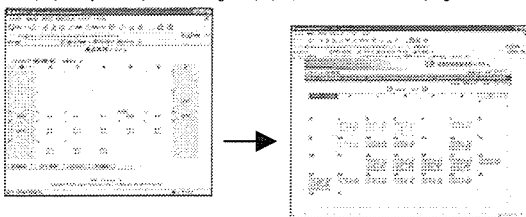
(図1) 臨床サンプルの増殖曲線 (38名×3測定)



(図2) 培養状況予測の予測方法のイメージ図

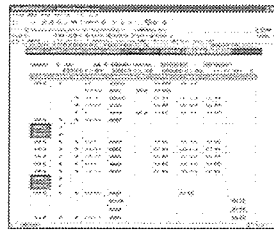
(ii) 培養工程の管理システム：

昨年度までASP形式にて開発して来たイントラネット型のソフトウェアプログラムを更に改良し、データベース管理ソフト（日立プラントテクノロジー）との統合を行った。具体的には、幾つかの機能を新たに配備し、GUIの一新を行った。①イントラネット操作性の向上、②プロコル表示・責任者承認システム、③作業予定予約機能の向上、を行った。下図にGUIを示す。

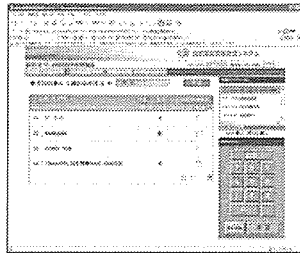


(図3) 工程管理ソフト画面1 (工程予約) 完全な院内

イントラネット+指定ユーザーとの通信を実現 (左：旧画面、右：新画面)



(図4) 工程管理ソフト画面2 (作業工程予約) プロトコルの組み合わせ (セット) を用いて一定期間の調整工程を全自動にて予約・調整



(図5) 工程管理ソフト画面2 (SOP表示・承認) 各作業のSOP表示と、遠隔管理者による承認のシステムを実現

(倫理面への配慮)

本研究で用いる細胞画像は、ヒトの組織採取を行う場合、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た細胞の培養画像である。説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されているものを用いた。また、各種写真は完全に匿名化されており、プライバシーの保護のためドナー情報が不明・秘密な状態で解析にのみ用いた。

C. 研究結果

(i) 培養状況の予測システム：

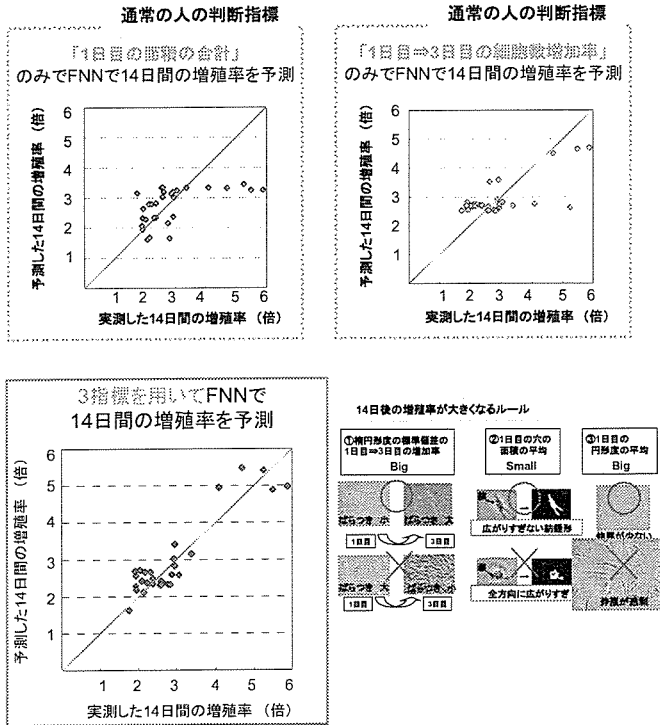
本研究において、我々は新たに知識情報処理技術であるFuzzy Neural Networkを解析ソフトとして用いる品質管理システム (Bioinformatic Quality Control : Informatic QC) を確立した。即ち、①治療用に培養している細胞の非接触から得られるデータ (写真) を効率的・効果的に画像処理して膨大な形態指標を抽出する手法と、②様々な形態指標の中から人間が感覚的にしか把握していなかった情報を数値モデル化し、未知サンプルの予測をする手法との組み合わせを行った。

具体的には、①画像解析からの数値データ取得においては、独自のフィルタリングアルゴリズムを構築することにより、60枚の顕微鏡写真の正確な数値化に所用する時間を400分から40分へと短縮することに成功した。

手動(一般的) ノイズ率: 11.2% 測定時間: 400分 (60画像測定)	⇒	自動化(今回) ノイズ率: 15.1% 測定時間: 40分 (60画像測定)
---	---	--

(図6) フィルタリングアルゴリズムによる効率化

次に、得られた大量の指標の中から、品質管理の第一目標として14日後の「生産性」の予測を行った。



(図7) 上図：通常の人が生産性を予測する場合に用いる指標での予測。下図：FNNで選ばれた指標を用いた予測。

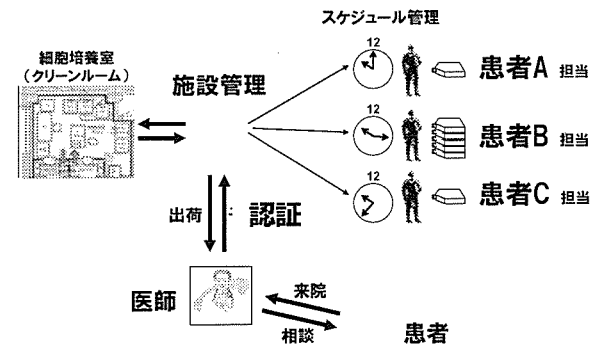
図7に示すように、これまで多くの作業者が14日後の取得細胞数を予想するのに用いていた指標よりも、Fuzzy Neural Network (FNN)によって180項目の中から選ばれた3つの指標の組み合わせを用いた方が、連続値としての増殖率を遙かによく予測できることがわかった。

臨床の現場において、治療当日に安定した細胞数を得るような細胞調整工程とすることは、実用化における品質管理では非常に重要である。特に培養の自動化を考える際、どのタイミングで継代や培地交換を行うかはこれまで人の感に頼るしか無かった。しかし、本研究のように数値モデルを用いた予測を培養初期から行うことで、細胞不足の場合には継代や増殖因子の添加を行うなどの制御が可能となる。このため、本研究で得た解析方法は、自動培養装置の制御ソフトウェアと成り得る可能性を示唆するものである。

(ii) 培養工程の管理システム：

培養効率化のためには、実際の細胞調製施設における細胞供給シミュレーションから作業者の工程・予定を情報処理的に管理する有効性が強く臨床現場から求められた。このため、細胞調製施設1室、作業者3名、医師1名という細胞治療体制を仮定(図5)し、各作業者がイントラネットで自分の作業内容を公開・確認し、これを作業責任者・医師が確認できる管理ソフトウェア開発し、

今年度はデータベース管理ソフトとの統合を行うことで、製品としての利便性・現実性を向上させた。特に、本格的なイントラネット体制を導入することで、作業現場における工程の進捗を、医師が遠隔確認できる体制を構築できたことは、医師法下での再生医療の安全性をさらにサポートすることになると考えられる(図8)。また、各データベースにおける匿名性・暗号化・トレーサビリティに関する問題点を細かく検証・解決したため、ソフト内に蓄積されるデータの匿名性が確保され、同時に記録媒体としてGMP準拠の記録性を保持するシステムとなった。残念ながら、本年度では機能性の改良・修復に時間がかかったため、実際の臨床データにおける稼働までは至らなかったが、次年度は臨床現場との連動を行い、実際の可動性・有用性のデータを蓄積する。



(図8) 培養工程管理での医師主導の管理システム

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、本研究では情報処理技術(モデル化・ソフトウェア化)という工学的な技術を導入することによって、人間の感覚を数値化したり、人間の作業の不安定性をサポートすることによって、培養工程の大幅な効率化と、これに伴う安全性の向上が期待できることが示唆された。

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。特に本年度では、「効率化」を「品質管理」という現実的な工業的問題点と合わせて研究することで、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強力にサポートできる工学的な「解析手法」を確立できたと考えている。

また、本年度の研究成果は、本研究班における分担研究者である紀ノ岡らの「画像処理技術を用いた培養細胞の動的評価法の開発」における画像処理のノウハウ、鈴木らの「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」におけるハード(装置)を導入することで更に融合的な研究が行えることを示

唆しており、本研究班の各サブテーマにおける研究成果を交換・発展させることにより、H19年度には、よりシステマティックな実用化のための技術や手法の提案が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

本研究の推進にあたり、研究遂行者の健康への影響は原理的に考えられず、結果として無かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yasuyuki Tomita, Hiroyuki Asano, Hideo Izawa, Mitsuhiro Yokota, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda: "Classification Method for Predicting the Development of Myocardial Infarction by Using the Interaction between Genetic and Environmental Factors", IPSJ Digital Courier, Vol. 2, pp.691-709. (2006)

Hiro Takahashi, Hiroyuki Honda : Prediction of peptide binding to MHC classII molecules using boosted fuzzy classifier with sweep operator method, Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(2), 137-141(2006)

Mina Okochi, Mari Nakanishi, Ryuji Kato, Takeshi Kobayashi, Hiroyuki Honda : High-throughput screening of cell death inducible short peptides from TNF-related apoptosis-inducing ligand sequence, FEBS Letters, 580, 885-889(2006)

Kazunori Shimizu, Akira Ito and Hiroyuki Honda : Enhanced cell-seeding into 3-D porous scaffolds use of magnetic nanoparticles, Journal of Biomedical Materials Research Part B, 77(2), 265-272 (2006)

2. 学会発表

山本 若菜, 加藤 竜司, 蛭沢 克己, 各務 秀明, 上田 実, 本多 裕之, 「細胞治療用細胞生産のための細胞形態の情報解析、化学工学会第72回、京都、2007年3月

R. Kato, Y. Tomita, M. Okochi, H. Honda. Application of bioinformatic prediction for supporting high-throughput experiments in proteome, The 4th International Forum on Post-Genome Technologies (4th IFPT), HangZhou, China, September, 2006

R. Kato, C. Kaga, Y. Tomita, M. Kunimatsu, H. Honda. Application of bioinformatic prediction for supporting high-throughput experiments in proteome, International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Engineering Meeting, Yokohama, Japan, November, 2006

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

特願2006-226332 2006/8/23 培養スケジュール管理装置及び培養スケジュール

・細胞品質予測ソフトウェア（出願手続き予定）

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。本研究では、実用化において最も評価の難しい3次元組織として軟骨細胞をモデルに選び、分化度の評価と分化誘導最適材料の開発を目標として検討を行った。特に本年度は、昨年度まで明かにしてきた間葉系幹細胞から軟骨細胞の分化に伴って活性発現が変導する糖鎖合成酵素の活性の変動とその制御機構解明を行い、3次元組織（軟骨）の評価として糖鎖合成酵素の活性を測定することが新たな有用な機能評価マーカーと成り得ることが明らかとなった。

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。

分化した軟骨組織の典型的な主要マトリックス成分の一つは、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンで、約90%がaggrecanと呼ばれる分子である。分化前の間葉系幹細胞では、異なるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを合成している。今回は、最近明らかにしたコンドロイチン硫酸の骨格糖鎖に関与する生合成酵素の6種類（CSS1、CSS2、CSS3、CSGalNAcT-2、CSGalNAcT-1、CSGlcAT）のうち、間葉系幹細胞から軟骨細胞の分化に伴って活性発現が変動するものがあるのか、軟骨組織に特異に発現するものはあるのか、さらにそれらの制御の機構について検討を加えた。これらの結果は、研究課題である「間葉系幹細胞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」に極めて有益な示唆を与える。

B. 研究方法

コンドロイチン硫酸の骨格糖鎖に関与する生合成酵素の6種類（CSS1、CSS2、CSS3、CSGalNAcT-2、CSGalNAcT-1、CSGlcAT）について、間葉系幹細胞から軟骨細胞の分化に伴う発現の変動を調べ、軟骨再生における分子生物学的、細胞生物学的評価のマーカーとして有用かどうかを、in situ hybridization法により検討した。分化した軟骨の程度はaggrecanの発現を同方法により調べることで解析した。各酵素とaggrecanのcDNA断片をPCR

により得た後、pBluescript IISKベクターにサブクローニングし、DIG RNAラベリングキットにより各RNAプローブを調整した。胎性16.5日のマウス上腕骨を含む切片（4マイクロメートル）について常法によりin situ hybridizationを行った。マウスATDC5細胞はテラトカルシノーマより樹立されたインスリン/BMPの誘導により軟骨細胞に分化する未分化細胞株である。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再生に関わるマトリックスの研究に重要な示唆を与えるものと考え、この系におけるコンドロイチン硫酸の骨格糖鎖に関与する生合成酵素の6種類とaggrecanの発現変動をリアルタイムRT-PCR法による発現測定により検討した。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りアグリカンの合成及び細胞外マトリックスにおける分布蓄積の程度を定量化した。リアルタイムRT-PCR法は、ATDC5培養細胞よりmRNAをMicro-Fast-TrackTM法により抽出し、SuperScriptTMFirst-Strand法によってcDNAを合成し、それぞれに調製したTagMan Probeを用いてApplied Biosystems ABI Prism 7700によりリアルタイムPCRを行い、コントロールcDNAを標準にして定量化した。

ラットのコンドロサルコーマより樹立された軟骨細胞のGalNAcT-1遺伝子の発現導入により得た細胞の作るaggrecanについて、ゲル濾過、塩化セシウム溶液による密度勾配遠心法により分子を同定した。

（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

CS糖鎖骨格の合成に関与する糖転移酵素群が、ほとんど我々の手で、近年、次々に同定され、現在、グルクロ

ン酸転移活性とN-アセチルグルコサミン活性の両方を持つCSS-1、CSS-2、CSS-3、グルクロン酸活性のみを持つCSGlcAT、N-アセチルグルコサミン活性のみを持つCSGalNAcT-1とCSGalNAcT-2の計6種類が関与することを報告した。しかし、大量のCS合成能を持つ軟骨組織におけるこれら酵素の個々の役割については全くわかっていない。そこでin situハイブリダイゼーションを用いてこれら6種類の酵素の発現を検討したところ、胎生14.5日のマウス軟骨組織においてCSS-1、CSS-2、CSGlcAT、CSGalNAcT-1の4種類の酵素の発現がアグリカンコアタンパク質の発現と一致して成長板の前肥大軟骨細胞層中心に認められた。リアルタイムRT-PCRを用いて軟骨分化系細胞株のATDCにおける酵素群の発現を調べたところ、分化に伴ってCSGlcATとCSGalNAcT-1の発現の顕著な亢進がみられた。さらに他の軟骨分化能を持つマウス培養細胞を用いた場合も同様な結果を得た。そこで、これらの酵素をラットの軟骨細胞株(LTC)に各々強制発現させ検討したところ、コンドロイチン硫酸鎖合成能がそれぞれ2倍、5倍に増加していることが確認できた。強制発現させた軟骨細胞の作るaggrecanについて、塩化セシウム密度勾配遠心法による分子密度の検討と、ゲル濾過による分子サイズの比較、さらにaggrecanに結合しているコンドロイチン硫酸鎖自体の分子サイズの比較検討し、CSGlcATとCSGalNAcT-1の遺伝子導入による発現亢進により結合コンドロイチン硫酸鎖本数が約2.2倍程に多くついた分子(super aggrecan)が作られることを明らかにした。

D. 考察

コンドロイチン硫酸系とヘパラン硫酸鎖系の糖鎖合成は、まず架橋領域と呼ばれる特殊な4糖構造が、コアタンパク質のセリン残基に転移されて形成されることによって始まる。結合領域の構造は、セリン(Ser)-キシロース(Xyl)-ガラクトース(Gal)-ガラクトース-グルクロン酸(GlcA)という4糖配列をつ。この部分は、キシロース転移酵素(XylT)、ガラクトース転移酵素I(GalT-I)、ガラクトース転移酵素II(GalT-II)、グルクロン酸転移酵素(GlcAT-I)が担当する。コンドロイチン硫酸鎖合成は、この架橋領域にCSGalNAcT-1酵素によりGalNAc残基が結合することにより開始される。上記の結果から、軟骨細胞によるCS鎖の合成にはCSGalNAcT-1が主たる役割を果たしており、人工的な条件であるが、遺伝子導入によるこれらの酵素の強制過剰発現によって結合CS鎖が飛躍的に増加したaggrecanも合成されることがわかった。

E. 結論

軟骨組織の主要なプロテオグリカンであるaggrecanは、通常、100本以上のコンドロイチン硫酸鎖を有し、この部分の保水作用を通して軟骨組織に特有な弾力性を与えている。従って今回の研究の結果から、aggrecan

のコンドロイチン硫酸鎖の結合本数をCSGalNAcT-1の活性が制御していることが明らかになった、つまり、軟骨特有の性質の発揮はこの酵素活性の発現が鍵を握っていることが示唆された。この結果は、逆にこの酵素の活性を測定することによって、軟骨として機能の評価ができる新たな有用なマーカーが本研究により得られたことを意味している。今回、このような軟骨の質の評価を可能にする分子が明らかになったことは貴重である。

F. 健康危険情報F. 健康危険情報

この研究推進にあたり、研究遂行者の健康への影響は無かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

(国際論文)

K. Sakai, K. Kimata, T. Sato, M. Gotoh, H. Narimatsu, K. Shinomiya, H. Watanabe. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 plays a critical role in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. *J Biol Chem* 2006;282:4102-4161.

K. Matumoto, N. Kamiya, K. Suwan, F. Atumi, K. Shimizu, T. Shinomura, Y. Yamada, K. Kimata, H. Watanabe. Versican/Pg-M aggregates in cartilage: identification and characterization. *J Biol Chem* 2006;281:18257-18263.

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.

A. Sakai, N. Akifusa, N. Itano, K. Kimata, T. Kawamura, T. Koseki, T. Takehara, T. Nishihara. Potential role of high molecular weight hyaluronan in the anti-Candida activity of human oral epithelial cells. *Medical Mycology* 2007;45:73-79.

N. Sugiura, S. Shimokata, H. Watanabe, K. Kimata. MS analysis of chondroitin polymerization: effects of Mn²⁺ ions on the stability of UDP-sugars and chondroitin synthesis. *Analytical Biochemistry* 2007; in press.

T. Minamisawa, K. Suzuki, H. Maeda, S. Shimokata, N. Sugiura, K. Kimata. Characterization of isomeric unsulfated glycosaminoglycan oligosa

carbohydrides by mass spectrometry/ mass spectrometry. J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 2007;55:1-6.

L. Zhuo, A. Kanamori, R. Kannagi, N. Itano, J. Wu, M. Hamaguchi, N. Ishiguro, K. Kimata. SHAP Potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. J Biol Chem 2006;281:20303-20314.

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;281:10381-10388.

(国内論文)

羽瀧弘子, 羽瀧脩躬, 木全弘治. ヘパラン硫酸プロテオグリカンと形態形成. THE LUNG perspectives 2007;15:75-81.

渡邊裕規, 渡辺秀人, 木全弘治. 連載 軟骨代謝の研究—基礎と臨床—最近の進歩<10> 基礎—軟骨におけるプロテオグリカンの役割 CLINICAL CALCIUM 第16巻6号. 医療ジャーナル社 2006:146-149.

3. 著書 (単行本) (2006-2007)

坂井頭一郎, 木全弘治, 渡辺秀人. 細胞接着と細胞増殖を制御するプロテオグリカン. 再生医療の基礎シリーズ2 再生医療のための細胞生物学. コロナ社, 2007:49-75.

K. Kimata, O. Habuchi, H. Habuchi, E. Watanabe. Knockout mice and proteoglycans (Chapter 3.11). Comprehensive Glycoscience—From Chemistry to Systems Biology. Elsevier, 2006: in press.

H. Habuchi, O. Habuchi, K. Uchimura, K. Kimata, T. Muramatsu. Determination of substrate specificity of sulfotransferases and glycosyltransferases (proteoglycans). Methods in Enzymology. Glycomics. Academic Press, 2006: 225-242. vol 416).

2. 学会発表

坂井頭一郎, 木全弘治, 佐藤隆, 後藤雅式, 成松久, 四宮謙一, 渡辺秀人. Analysis of glycosyltransferases involved in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. 第38回日本結合組織学会学術大

会. 前橋, 2006. 5-11, 12.

渡邊裕規, 塩生真史, 木全弘治, 木村友厚, 渡辺秀人. Splicing Factor 3b binds BMPR-IA and negatively regulates osteochondral differentiation. 第38回日本結合組織学会学術大会. 前橋, 2006. 5-11, 12.

スワン ケイティサック, 幡野その子, 渡辺秀人, 木全弘治. Analysis of fibroblasts whose versican/PG-M lacks the A subdomain. 第38回日本結合組織学会学術大会. 前橋, 2006. 5-11, 12.

柿崎育子, 板野直樹, 木全弘治, 花田勝美, 今淳, 山口真範, 高橋照, 高垣啓一. Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. 第38回日本結合組織学会学術大会. 前橋, 2006. 5-11, 12.

A. Murakawa, N. Itano, K. Kimata, R. Kannagi, T. Mori, Y. Okahata. Preparation of hyaluronan synthase 2 by baculovirus-infected insect cells expression system. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.

T. Kobayashi, H. Habuchi, K. Tamura, H. Ide, K. Kimata. Essential role of heparan sulfate O-sulfotransferases in chick limb bud patterning and development. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.

N. Sugaya, H. Habuchi, S. Ashikari-hada, N. Nagai, K. Kimata. Different regulation of FGFs signaling in fibroblast producing little-6-O-sulfated heparan sulfate (HS). Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.

N. Masukane, Y. Yamaguchi, H. Yagi, N. Sugiura, K.

- Kimata, K. Kato. NMR and HPLC analyses of substrate recognition by K4 chondroitin polymerase. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- N. Nagai, S. Kitazume, H. Toyoda, Y. Hashimoto, H. Habuchi, K. Kimata. Regulation of 6-O-sulfation of heparan sulfate by β -glucuronidase activity and HS6ST3. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- S. Ohtake, K. Kimata, H. Habuchi. Sulfation of a highly sulfated nonreducing terminal sequence in chondroitin sulfate. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- T. Mori, A. Fujishima, N. Sugiura, K. Kimata, Y. Okahata. Direct monitoring of carbohydrate elongations by chondroitin polymerase on a 27-MHz quartz-crystal microbalance. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- A. Murakawa, N. Itano, K. Kimata, R. Kannagi, T. Mori, Y. Okahata. Effect of phospholipid for stabilization of hyaluronan synthase 2 expressed by baculovirus-infected insect cells. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress in conjunction with 79th annual meeting of the Japanese biochemical society and 29th annual meeting of the molecular biology society of Japan "life: molecular integration & biological diversity" (第20回国際生化学、分子生物会議。第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議。第79回日本生化学会大会・第29回日本分子生物学会年会)。京都 国立京都国際会館, 2006. 6. 18-6. 23.
- T. Kobayashi, H. Habuchi, K. Tamura, H. Ide, K. Kimata. Chick limb buds development requires appropriate O-sulfation patterns of heparan sulfate. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress in conjunction with 79th annual meeting of the Japanese biochemical society and 29th annual meeting of the molecular biology society of Japan "life: molecular integration & biological diversity" (第20回国際生化学、分子生物会議。第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議。第79回日本生化学会大会・第29回日本分子生物学会年会)。京都 国立京都国際会館, 2006. 6. 18-6. 23.
- S. Hatano, K. Kimata, N. Hiraiwa, M. Kusakabe, E. Adachi, Z. Isogai, T. Shinomura, H. Watanabe. VEGFR-1/2 is essential for microvascular and dermal development. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress in conjunction with 79th annual meeting of the Japanese biochemical society and 29th annual meeting of the molecular biology society of Japan "life: molecular integration & biological diversity" (第20回国際生化学、分子生物会議。第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議。第79回日本生化学会大会・第29回日本分子生物学会年会)。京都 国立京都国際会館, 2006. 6. 18-6. 23.
- 芦刈-羽田智子, 羽瀧弘子, 菅谷典子, 木全弘治. 2-O-硫酸化ヘパラン硫酸8糖によるFGF2活性の特異的阻害. 第26回日本糖質学会年会. 仙台, 2006. 8. 23-25.
- 南澤俊和, 鈴木喜義, 前田浩, 下方郷嗣, 芦刈-羽田智子, 杉浦信夫, 木全弘治, 平林淳. グリコサミノグリカン・オリゴ糖鎖のMSフラグメンテーション挙動. 第26回日本糖質学会年会. 仙台, 2006. 8. 23-25.
- 幡野その子, Keittisak Suwan, 渡辺秀人, 木全弘治. サブドメイン欠失バージョン/PG-Mによる細胞の不死化およびがん化. 第65回日本癌学会学術総会: 横浜, 2006. 9. 28-30.

F. 健康危険情報

本研究の推進にあたり、研究遂行者の健康への影響は原理的に考えられず、結果として無かった。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特許出願中：日本出願番号 2006-45813

発明の名称 コンドロイチン硫酸合成促進剤

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

自動培養装置の開発・リスク低減密閉系培養容器の開発

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 (3.0×10^7 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ため、培養工程の自動化は再生医療の実用化において非常に重要である。

我々はこれまで、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、線維芽細胞に特化した細胞培養の自動化装置を開発してきた。本研究では、昨年度まで自動培養装置の試作機としてのハードの設計・開発を行い、本年度はより実用的なニーズが挙げられていた省スペース化・多台連立稼働化を参考機の開発として行った。

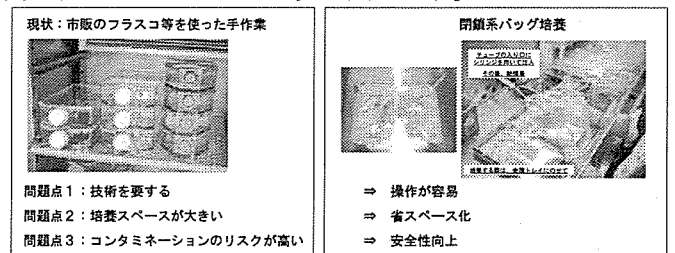
また参考機の販売に向けてのビジネス的展開期間において新たに、自動培養装置以外のヒューマンエラーやコンタミネーションのリスク低減の1つの方法として、密閉系バッグ型培養容器の開発を、自動培養装置内の密閉系培養皿の設計ノウハウを生かしてスタートした。

ここでは、参考機として新しく開発した装置と、新しい取り組みとしての密閉系培養容器の開発成果について述べる。

B. 研究手法

これまで開発した培養装置を、横置型として改良し、省スペース化を試みた参考機的设计・開発を行い、製品を完成させた。この際、サンプル回収を目的とした内部チューブ配線の工夫や、各種製品自動調整のためにヒートシーリングにより分離できるバッグを装置内ディスプレイプラスチックチューブに加工した。

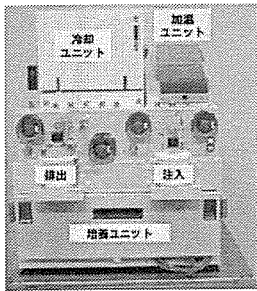
バッグ培養の検討においては、これまで自動培養装置内において配管として利用してきた完全密閉系のチューブ・培養皿設計のノウハウを生かして、凍結バッグ（株式会社ニプロ）を改良・加工することで、フラスコの代替品として誰でも初心者がコンタミネーションのリスクが少なく培養を行える容器の検討を行った。具体的には、各種類のバッグの形状や透明度、表面加工などを工夫した培養バッグを複数個準備し、これで臨床研究から得られたヒト細胞組織をテスト的に培養してみることで通常のフラスコ培養との増殖・活性比較を行った。閉鎖系培養バッグのコンセプトを次の図に示す。



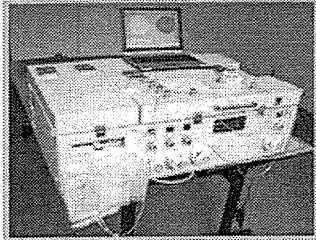
C. 研究結果

(i) 自動培養装置の開発

本装置は、試作機の86x70x80cmの高さ（図1）を大幅に小さくしたもので（90x65x45cm）並列稼働を想定して積載することが可能な仕様である（図2）。

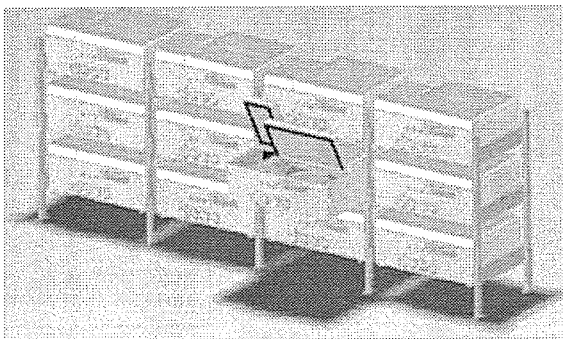


(図1) 式号機の仕様



(図2) 参考機の仕様

結果として、今回の改良により約4平米に12台を積載し、並列運転することが可能となり、狭い細胞調整室においてもより多くの患者細胞を取り扱えることとなった。このような省スペース化は、現実の細胞調整室内では非常に重要であり、本研究の成果より、現状の多くの施設であっても多検体の培養を可能とする機器開発ができたと考えられる。



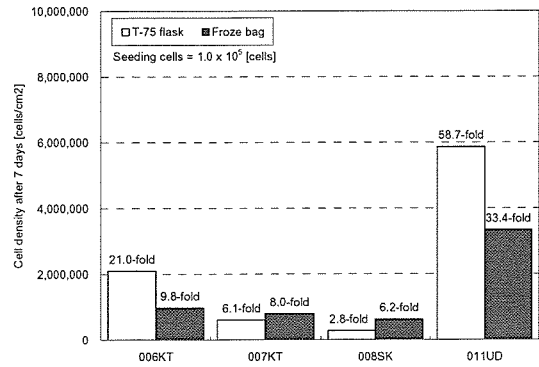
(図3) 自動培養装置の並列運用図

(ii) 培養バッグの開発

本研究では、元々臍帯血保存用として利用されていたバッグ(株式会社ニプロ)を、フラスコのように培養に利用し、問題点を改良するという形で開発を行った。

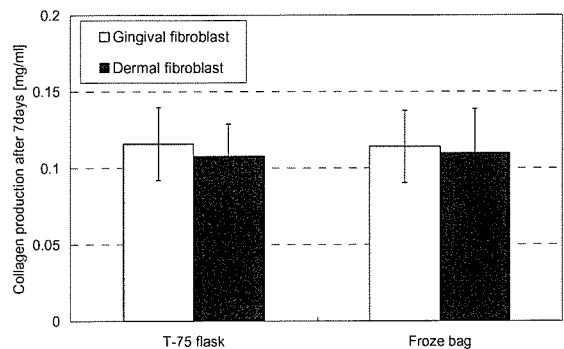
結果、培養バッグは密閉系かつ臍帯血保存用であったとしても通気性、細胞接着性もある程度あるため、細胞増殖能としては十分にフラスコ培養に代用できることが示唆された(図4)。増殖能だけでなく、コラーゲン産生などの活性も、研究用フラスコとほぼ同等であることが示唆された(図5)。また、市販の培養バッグには、簡便な培養のためのポートや、顕微鏡観察のための透過性が不足していたため、透過性を増すためにポリブチレン系の素材に内部を親水性処理し、様々なポートを付けるこ

とによって、コンタミネーションの可能性が低い、完全密閉系の培養バッグのプロトタイプを完成することができた。



4名の患者細胞：006KT (dermal fibroblast), 007KT, 008SK, 011UD (gingival fibroblast)

(図4) 密閉系培養バッグを用いた細胞増殖率



1名の患者細胞：006KT (dermal fibroblast), 007KT (gingival fibroblast)間での比較

(図5) 密閉系培養バッグを用いた細胞培養におけるコラーゲン産生



(図6) 密閉系バッグ培養の形状

D. 考察

本研究を通じて、我々の開発した培養装置の実用性をさらに向上することによって、現実的な臨床のニーズに応える省スペース化を達成できたと考えている。本研究の成果により開発された装置は、株式会社セルフォース (<http://cell-force.com/>) を通じて2006年11月から販売となり、製品の利用者の増大による認知度の向上と、臨床現場での問題解決に貢献できたと考えている。

昨年度の2号機開発の後、装置を用いた培養細胞をLOH解析によって品質評価することを課題として挙げていたが、LOH解析のデータ数の蓄積が遅延し、達成が難しかったことから、本年度は新たな取り組みとして自動培養装置内の培養容器の改良とリンクさせ、リスク低減のため

の密閉系培養容器の開発を行った。本研究は、市販の製品である細胞保存用バッグをフラスコの代替として利用するところから始まったが、内部の親水化とポートの導入によって、コンタミネーションリスクが非常に低だけでなく、密閉性が高く細胞間のコンタミネーションのリスクを著しく低減できる容器を開発するに至り、フラスコと比較して同等以上の培養能を有していることが確認できた。

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さらなる改良と、販売まで至る商品開発が完了した。本研究の成果として得られた自動培養装置は、今後更に他の分担研究者（紀ノ岡、本多ら）の研究手法を制御システムとして導入することを検討することで、次年度には、品質管理の観点からも制御能を持った培養装置として改良を検討したい。また、新たにスタートした密閉系培養容器の開発では、今後自動培養装置の内部培養器の代替となるだけでなく、自動培養に入る前の培養初期に、リスクを少なく細胞培養をスタートできる可能性があるため、その有用性をさらに検討したいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

Ryuji Kato, Wakana Yamamoto, Yasuyuki Tomita, Masahiro Nakatochi, Yasuyuki Tomita, Mina Okochi, Hiroyuki Honda, Hideaki Kagami, Katsumi Ebisawa, Minoru Ueda, Development of morphological process-control analysis for the automation of processes in regenerative medicine, *Biochemical Engineering XV*, Quebec, Canada 2007. June

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

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
 1. 特願2006-008521 2006/1/17
自動培養装置
 2. 特願2006-279476 2006/10/13
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)

H.Hibi, Y.Yamada, H.Kagami, M.Ueda. Distraction Osteogenesis Assisted by Tissue Engineering in an Irradiated Mandible: A Case Report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 141-147, 2006.

M.Ueda, Y.Yamada, M.Ohya, H.Hibi. Use of Tissue-Engineered Bone Cells for Sinus Augmentation with Simultaneous Implant Placement. *Quintessence books 'The Sinus Bone Graft' (Edited by Ole Jensen)* 341-348, 2006.

M.Murata, M.Momose, K.Okuda, Y.Ninagawa, M.Ueda, H.Yoshie. Immunohistochemical Localization of Cytokeratin 19, Involucrin and Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Cultured Human Gingival Epithelial Sheets. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 8 (1) 33-38, 2006

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, 3/4, 489-496, 2006.

M.Ohya, Y.Yamada, K.Wada, K.Watanabe, R.Ozawa, H.Hibi, M.Ueda. Bone Regeneration Method Using Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) Complexes for sinus Floor Elevation in Rabbits. *Dentistry in Japan*, 42, 61-64, 2006.

H.Hibi, Y.Yamada, M.Ueda, Y.Endo. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J. Oral Maxillofac Surg*, 35, 551-555, 2006.

Y.Yamada, A.Fujimoto, A.Ito, R.Yoshimi, M.Ueda. Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials* 27, 3766-3781, 2006.

M.J.Honda, T.Shimodaira, T.Ogaeri, Y.Shinohara, K.Hata, M.Ueda. A novel culture system for porcine odontogenic epithelial cells using a feeder layer. *Archives of Oral Biology* 51, 282-290, 2006.

Y.Yamada, M.Ueda, H.Hibi, S.Baba. A Novel Approach to Periodontal Tissue Regeneration with Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma Using Tissue Engineering Technology: A Clinical Case Report. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, vol.26(4), 363-370, 2006.

H.Mizuno, K.Hata, K.Kojima, L.J.Bonassar, C.A.Vacanti, M.Ueda. A Novel Approach to Regenerating Periodontal Tissue by Grafting Autologous Cultured Periosteum. *Tissue Engineering*, vol.12(5), 1227-1235, 2006.

K.Ito, Y.Yamada, T.Naiki, M.Ueda. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin.Oral. Implant Res.* 17, 579-586, 2006.

M.Ohya, Y.Yamada, R.Ozawa, K.Ito, M.Takahashi, M.Ueda. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin.Oral. Implant Res.* 17, 579-586, 2006.

H. Agata, I Asahina, Y. Yamazaki, M. Uchida, Y. Shinohara, M. J. Honda, H. Kagami, M. Ueda. Effective Bone Engineering with Periosteum-derived Cells. *J. Dent Res* 86(1), 79-83, 2007.

山田陽一、上田実 幹細胞・ES細胞—歯・歯周組織—歯槽骨の再生医療 日本再生医療学会雑誌 Vol.5 (1) , 105-111, 2006.

日比英晴、上田実 細胞移植による顎骨の再生 医学のあゆみ Vol.217 No.3, 2006.

山田陽一、上田実 幹細胞・ES細胞—歯・歯周組織—歯周組織の再生医療 日本再生医療学会雑誌 Vol.5 (2) , 87-92, 2006.

山田陽一、上田実 間葉系幹細胞を用いた骨の再生医療 日本老年医学会雑誌 Vol.43 (3) , 338-341, 2006.

日比英晴、上田実 口腔・顎・顔面領域の疾患と歯科材料 臨床歯科理工学 289-29, 2006.

山本憲幸、上田実 癌治療における再生医療—口腔癌を中心に— *Biotherapy* vol. 20(4), 355-362, 2006.

各務秀明、上田実 歯科における再生治療の現状 治療 Vol.88 (10) , 2605-2609, 2006.

上田実 再生医療の現状と未来 現代医学 第54巻1号, 3-8, 2006.

上嶋伸知、岡田邦彦、各務秀明、上田実 間葉系幹細胞を用いた骨粗鬆症患者の骨折治癒促進および予防に関する研究. *Osteoporosis Japan*, Vol.14(4), 2006

<分担研究者>

(各務 秀明)

M. Tatebe, R. Nakamura, H. Kagami, K. Okada, M. Ueda. Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiological study for Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytotherapy* vol.7 (6) , 520-530, 2006.

Y. Murase, Y. Narita, H. Kagami, K. Miyamoto, Y. Ueda, M. Ueda, T murohara. Evaluation of Compliance and Stiffness of Decellularized Tissues as Scaffolds for Tissue-Engineered Small Caliber Vascular Grafts Using Intravascular Ultrasound. *ASAIO*, 450-455, 2006.

D. Mizuno, H. Kagami, H. Mizuno, J. Mase, K. Usami, M. Ueda. Bone regeneration of dental implant dehiscence effects using cultured periosteum membrane. *Clinical Oral Implants Research*, 2007, in press.

H. Matsunuma, H. Kagami, Y. Narita, K-I Hata, Y. Ono, S. Ohshima, and M. Ueda. The potential of bone marrow-derived mononuclear cells for enhancing angiogenesis in ureteral acellular matrix. *Tissue Engineering*, 12, 509-518, 2006.

(紀ノ岡正博)

M. -H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Response of Human Epithelial Cells on Culture Surfaces with Varied Roughnesses Prepared by Immobilizing Dendrimers with/without D-Glucose Display", *J. Biosci. Bioeng.*, Vol.103, No.2, pp.192 -199, 2007.

(本多裕之)

Y. Tomita, H. Asano, H. Izawa, M. Yokota, T. Kobayashi and H. Honda: "Classification Method for Predicting the Development of Myocardial Infarction by Using the Interaction between Genetic and Environmental Factors", IPSJ Digital Courier, Vol. 2, pp.691-709, 2006.

H. Takahashi, H. Honda : Prediction of peptide binding to MHC classII molecules using boosted fuzzy classifier with sweep operator method, Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(2), 137-141, 2006.

M. Okochi, M. Nakanishi, R. Kato, T. Kobayashi, H. Honda : High-throughput screening of cell death inducible short peptides from TNF-related apoptosis-inducing ligand sequence, FEBS Letters, 580, 885-889, 2006.

K. Shimizu, A. Ito and H. Honda : Enhanced cell-seeding into 3-D porous scaffolds use of magnetic nano particles, Journal of Biomedical Materials Research Part B, 77(2), 265-272, 2006.

(木全弘治)

K. Sakai, K. Kimata, T. Sato, M. Gotoh, H. Narimatsu, K. Shinomiya, H. Watanabe. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 plays a critical role in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. J Biol Chem , 282:4102-4161, 2006.

K. Matumoto, N. Kamiya, K. Suwan, F. Atumi, K. Shimizu, T. Shinomura, Y. Yamada, K. Kimata, H. Watanabe. Versican/PG-M aggregates in cartilage: identification and characterization. J Biol Chem, 281:18257-18263, 2006.

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 , 281:2390-400, 2006.

A. Sakai, N. Akifusa, N. Itano, K. Kimata, T. Kawamura, T. Koseki, T. Takehara, T. Nishihara. Potential role of high molecular weight hyaluronan in the anti-Candida activity of human oral epithelial cells. Medical Mycology, 45:73-79, 2007.

N. Sugiura, S. Shimokata, H. Watanabe, K. Kimata. MS analysis of chondroitin polymerization: effects of Mn²⁺ ions on the stability of UDP-sugars and chondroitin synthesis. Analytical Biochemistry, in press, 2007.

T. Minamisawa, K. Suzuki, H. Maeda, S. Shimokata, N. Sugiura, K. Kimata. Characterization of isomeric unsulfated glycosaminoglycan oligosaccharides by mass spectrometry/ mass spectrometry. J. Mass Spectrom. Soc. Jpn, 55:1-6, 2007.

L. Zhuo, A. Kanamori, R. Kannagi, N. Itano, J. Wu, M. Hamaguchi, N. Ishiguro, K. Kimata. SHAP Potentiate the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. J Biol Chem, 281:20303-20314, 2006.

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 spacran. J Biol Chem, 281:10381-10388, 2006.

渡邊裕規, 渡辺秀人, 木全弘治. 連載 軟骨代謝の研究—基礎と臨床—最近の進歩<10> 基礎—軟骨におけるプロテオグリカンの役割 CLINICAL CALCIUM 第16巻6号. 医療ジャーナル社, 146-149. 2006.

羽瀧弘子, 羽瀧脩躬, 木全弘治. ヘパラン硫酸プロテオグリカンと形態形成. THE LUNG perspectives, 15:75-81, 2007.

坂井顕一郎, 木全弘治, 渡辺秀人. 細胞接着と細胞増殖を制御するプロテオグリカン. 再生医療の基礎シリーズ2 再生医療のための細胞生物学. コロナ社, 49-75, 2007.

K. Kimata, O. Habuchi, H. Habuchi, E. Watanabe. Knockout mice and proteoglycans (Chapter 3.11). Comprehensive Glycoscience-From Chemistry to Systems Biology. Elsevier, in press, 2006.

H. Habuchi, O. Habuchi, K. Uchimura, K. Kimata, T. Muramatsu. Determination of substrate specificity of sulfotransferases and glycosyltransferases (proteoglycans). Methods in Enzymology. Glycomics. Academic Press, 225-242. vol 416, 2006.

特許出願

特願2005-190374 2005/6/29 皮膚組織改善材及びその利用
上記のPCT: PCT/JP2006/308317 2006/6/28

特願2006-226332 2006/8/23 培養スケジュール管理装置及び培養スケジュール管理プログラム

特願2006-008521 2006/1/17 自動培養装置

特願2006-279476 2006/10/13 自動培養装置

特願2006-45813 発明の名称 コンドロイチン硫酸合成促進