

厚生労働科学研究費補助金  
長寿総合科学研究事業

歯周組織再生を基盤とした  
咀嚼機能改善技術の開発

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 齋藤 正寛

平成19 (2007) 年 4月

# 目次

I.	総括研究報告 -----	1
	ヒト顎骨由来骨芽細胞の調整と生体外増幅 -----	1
II.	分担研究報告 -----	9
	1. 動物モデルを用いた「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」 評価系の確立に関する研究 -----	11
	村上 伸也	
	2. ヒト顎骨由来間葉系細胞の調整 -----	13
	梅澤 明弘	
	3. ヒト正常細胞の生体外増幅に関する研究 -----	15
	清野 透	
	4. 歯髄幹細胞を用いた歯槽骨再生療法の可能性 -----	19
	松下 健二	
	5. ヒト顎骨由来間葉系細胞の骨芽細胞分化に関する研究 -----	21
	渡辺 研	
III.	研究成果に関する一覧表 -----	23
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	29
V.	参考資料 -----	273

## I. 総括研究報告

### ヒト顎骨由来骨芽細胞の調整と生体外増幅

齋藤 正寛

## 歯周組織再生を基盤とした咀嚼機能改善技術の開発

(H18-長寿-003)

主任研究者 齋藤正寛  
大阪大学 大学院歯学研究科  
口腔分子免疫制御学講座 生化学教室  
講師

**研究要旨** 高齢化社会を向かえた今、歯および口腔の健康維持は、高齢者のQOL維持およびADL改善に重要な因子である。高齢者にとって歯周病は歯の喪失の最大原因であり、重篤に進行したケースでは有効な治療法がなく、より症状が悪化してしまう。そこで本研究では、顎骨由来骨芽細胞を用いた再生療法により、歯周病により失われた骨を再生して、咀嚼機能の回復に有効な治療法の研究開発を目指す。そのため高齢者より効率よく顎骨由来骨芽細胞を採取するプロトコルを作製すると共に、適切な生体外増幅を検討する。

### A. 研究目的

歯周病は40歳を超える国民の約50%以上が罹患する生活習慣病であり、その約10%は外科的処置を必要とする大きな骨欠損を伴う重篤な歯周病に罹患していることが「平成17年度歯科疾患実態調査報告」(厚生労働省医政局歯科保健課)より報告されている(参考資料1)。これは、我が国で1,000万人以上の歯周疾患患者が歯を喪失する可能性が非常に高い状態にあることを示している。また80歳以上の高齢者においては1人平均現在歯数が4.6歯となっており、さらには約半数の人がすべての歯を喪失している。このことは他の疾患と比較してもその有病状況は類を見ないほど高率で、厚生労働省が提唱・推進している生涯を通じて20歯以上を保つ「8020運動」の目標から大きく下回る現状が伺える。したがって歯周病への対処ならびに咀嚼機能の維持、回復のための新しい治療技術の開発は、健全な咀嚼能力を維持し、健やかに楽しい生活を過ごそうという「8020運動」の一層の推進を図るものである。

現在の歯周病の再建治療は患者自身の治療能力に依存するため、軽度の歯周病には効果を示すものの、広範囲の骨欠損を有する歯周病には対応することが困難である(参考資料2)。そこで本研究の目的は、生体外増幅したヒト顎骨由来間葉系細胞と、細胞移植製剤

の安全性を確立し、広範な骨欠損を伴う歯周病患者に対する新たな細胞治療法を開発することである。具体的には、高齢者より顎骨由来骨芽細胞の採取プロトコルを作製し、得られた骨芽細胞の生体外増幅を可能にする技術開発を試みる。同時に細胞移植製剤の安全性を確立する評価系を確立する。そして、ハイドロキシアパタイトを足場として移植モデルを作製して、骨形成能力を判定する。これらの結果に基づき、細胞及び足場の製剤化の検討、安全性の高い生体外増幅技術の確立、および臨床への探索的研究への着手を目的としている。

### B. 研究方法

#### (1)ヒト顎骨由来骨芽細胞の採取

24歳から66歳まで、インフォームドコンセントを得て、さらに本研究計画の主旨に同意して頂いた患者から提供された、智歯を抜歯する時に外科的に切除された骨片から骨芽細胞を採取する。具体的には、得られた顎骨をゲンタマイシン、ファンギゾンを含むphosphate buffered salineで洗浄後に、細菌性コラゲナーゼを含むphosphate buffered salineにて37°Cで20分間消化した。その後、消化液より遠心分離により細胞を採取した。同じ操作を8回段階的

に消化を繰り返して細胞を採取した。得られた8つの骨芽細胞画分を各種細胞培養用専用培地で培養を行い、ヒト顎骨由来骨芽細胞に適した培養条件を検討した。

#### (2)ヒト骨芽細胞の評価

得られた骨芽細胞画分の分化能力を判定するため、骨芽細胞分化誘導培地で3週間培養を行う。その後、アリザリンレッド染色による石灰化能力の判定とアルカリフォスファターゼ活性を測定する。また骨芽細胞マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法で解析した。

#### (3)骨形成能力の評価

骨芽細胞の生体内での骨形成能力を解析する。具体的には、骨芽細胞とハイドロキシアパタイトを混ぜ合わせ8時間培養を行った。その後フィブリン塊を形成させ、免疫不全症マウスへ皮下移植した。一ヶ月移植した後に組織片を取り出し、組織化学的手法により骨形成の解析を推進した。次に骨芽細胞への分化を確認するために、移植片からtotal RNAを抽出し、ヒト骨芽細胞マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法で解析した。

#### (4)安全性の評価

得られた骨芽細胞製剤の安全性を調べるために、染色体診断を行う。具体的にはSKY法とGバンド法を用いて、核型に変化が生じていないかを解析する。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されているため、機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。神奈川歯科大学においては、ヒト顎骨由来間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(神奈川歯科大学、受付番号8平成14年3月承認、受付番号18、平成15年10月承認)。医療を前提とした品質管理システムの構築、標準操作手順書の作製、試薬等の受入試験検査、ならびに細菌・真菌・ウィルス等

の汚染の危険性排除については、本研究の課題でもあり、それらの記録、最新技術の反映を含めて検討する。

### C. 研究結果

#### (1)ヒト顎骨由来骨芽細胞の採取

合計8名の患者より提供された骨片よりコラゲナーゼ消化法で骨芽細胞を採取した結果、牛胎児血清と成長因子を組み合わせたヒト間葉系細胞専用培地を用いることにより培養可能であることが確認された。次に65歳の患者から提供された骨芽細胞の増殖能力を解析した結果、100日以上培養可能であることが確認された。得られた骨芽細胞を、HAOB (Human Alveolar bone derived Osteoblast)と命名した。また54歳、52歳の患者からもHAOBを採取できることから、同方法を用いれば高齢者からHAOBを分離培養できることが判明した。そこで54歳より採取されたHAOB (HAOB3)を用いて解析を進めることにした。

#### (2)ヒト骨芽細胞の評価

コラゲナーゼ消化法により得られたすべての画分のHAOBの分化能力を解析した結果、fraction (Fr) 4および5の細胞が最も高い石灰化能力とアルカリフォスファターゼ活性を有していることが判明した。次に、HAOB3 Fr5の骨芽細胞マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法で確認したところ、強いオステオカルシン、骨シアロタンパク質の発現が確認された。これらの結果より、HAOBは骨芽細胞の特性を有していることが確認された。

#### (3)骨形成能力の評価

HAOBを免疫不全症マウスへ移植した結果、スキヤホールドであるハイドロキシアパタイトの周辺に顕著な骨形成を誘導することが観察された。またHAOBにより形成された骨は、ヒト特異抗体に陽性反応を示すことから、HAOB自身に骨形成能力を有することも確認できた。次にRT-PCR法で移植片の遺伝子発現を解析した結果、強いオステオカルシン、骨シアロタンパク質の発現が確認され、HAOB5が移植により骨芽細胞に分化していることが確認された。

#### (4)安全性の評価

HAOB3の安全性を調べるために、染色体診断を行った。SKY法とGバンド法により解析し

た結果、核型に異常は観察されなかった。次に長期培養によるHAOBの染色体安定性の影響を解析した結果、異常は見られなかった。これらの結果より本培養方法により、核型に影響は与えないことが明らかになった。

#### D. 考察

これまで骨の再生医療には骨髄由来の間葉系細胞を用いた移植治療が使用されてきた。これらの細胞は1. 生体外増幅が可能である、2. 多分化能力を有する、の特性を有することから、神経幹細胞、造血幹細胞と共に再生医療という治療戦略の重要な一翼を担い、細胞治療における事実上の標準となっている。歯科界においても、顎骨より骨髄由来間葉系細胞を採取して、歯周病により失われた骨組織を再生させる治療技術の開発が行われている。骨髄由来の間葉系細胞は高い骨形成能力を有することが示されており、実際に再生培養骨を用いた変形性骨関節症の再生医療が行われている。しかし高齢者から骨形成能力の高い細胞製剤の開発は未だに報告が見られない。従って高齢者に急増する歯周病を対象にした場合、高齢者からも入手可能な細胞製剤の開発が急務になっている。

顎骨より採取されたHAOBは高い増殖活性を有しており、また免疫不全マウスへ移植することにより骨形成能力を有していた。また65歳の患者からも採取できることから、将来骨再生医療に有望な細胞製剤の候補であることが確認された。HAOBは、牛胎児血清を主成分とする通常の細胞培養用培地では増殖せず、少量の牛胎児血清ならびに成長因子とホルモンを調製したヒト間葉系細胞専用培地を用いることで培養が可能になった。現在の培養方法では異種動物由来のレトロウイルス、異種タンパク質の混入が考えられるため、異種由来物質を排除した培地を用いた培養方法の開発が急務になっている。このような現状の中で、HAOBは従来の増殖培地では増殖せず、再生医療を目的とした低血清タイプのヒト間葉系細胞専用の培地で培養が可能であることが確認された。しかし細胞の継代数が増えると、ゲノムレベルで変異が蓄積し、本来細胞の有する分化能力を失うばかりか、危険性が高まることが報告されている。例えば細胞増殖を停止させる細胞周期調節タンパク質の遺伝子発現が

抑制されてしまうなどの変化が生じてしまう。このようなゲノムレベルの変化を控えるために、酸化ストレスにより影響を控えた低酸素濃度(10%以下)を保った環境で培養することが考えられる。従って次年度は、培養回数による影響をゲノムレベルで網羅的に解析し、HAOBの大量増幅を可能にする培養条件に検討が必要になる。

HAOBを、歯周病治療に利用する新たな戦略を現実化するステップとして、1)HAOBを安全に機能維持した状態で増殖させる培養技術の開発、2)細胞の品質管理の標準化、がある。これらの問題は、HAOBの寿命延長の研究から得られるバイオインフォティクスからの情報の蓄積、臨床への探索的研究が必要になる。HAOBを薬品、医療機器の範疇としてとらえ米食品医薬品局(FDA)基準を指標とする細胞提供システムの確立した上で、ならびにその安全性と倫理性を確立したうえで、「歯周組織再生を基盤とした咀嚼機能改善技術の開発」を目指すことが肝要である。

#### E. 結論

独自に開発したヒト顎骨由来骨芽細胞培養システムを用いて、65歳以上の中老年層からも骨芽細胞を採取することに成功した。この細胞はin vitroによる骨芽細胞分化誘導ならびに移植実験により高い骨形成能力を有する細胞集団が含まれていることが確認された。これらの実験はすべて継代数の少ない細胞で実験を行ったことから、継代による影響はまだ観察できていない。従って大量培養に必要な継代数による骨芽細胞分化への影響を調べることも重要になるであろう。また、ヒト間葉系細胞専用培地を用いることで培養が可能になっているが、実際には患者由来の血清を用いて同様の効果が有るかを調べる必要性が有る。今後は高齢者の歯周病治療に使用できる細胞移植製剤の供給源とする細胞提供システムを速やかに構築することを目指す。

細胞移植による新たな歯周病治療技術は、8020運動を達成させるために、予防の次に重要な項目である。従って高齢者の方々に健康な生活を提供するために、必須の医療技術になる。ヒト顎骨より骨芽細胞を採取して、歯周病により影響を受けた部位へ移植する系を確立することは、移植医療の新たな分野の獲

得につながり、再生医療による咀嚼機能回復を通じて、高齢者の健康維持に貢献することが大きく期待される。

## F.健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表(英文)

1. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saito M., Y. Tomooka, T. Tsuji, 2007 The development of a bioengineered organ germ method., *Nature Method*,4(3):227-230,2007
2. Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M., Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T, Thesleff I. 2007 Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation*, in press
3. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, Tsubakimoto T, Harada H, Eto K, Noguchi T, Teranaka T: Establishment of Immortalized Dental Follicle Cells for Generating Periodontal Ligament *In Vivo*. *Cell and Tissue Research*, 327(2):301-311, 2006.
4. Nishida E, Saito M, Yokoi T, Tsubakimoto T, Kosaka K, Aino M, Teranaka T: Establishment of gene expression profiling database from human periodontal ligament. *The Bulletin of Kanagawa Dental College*, 34(2): 109-111, 2006.
5. Kosaka K, Yokoi T, Saito M, Nishida E, Tsubakimoto T, Aino M, Teranaka T: Establishment of dental follicle cells culture system that generating periodontal ligament in vivo. *The Bulletin of Kanagawa Dental College*, 34(2): 112-114, 2006.

### 著書

1. 齋藤正寛: 歯小囊細胞の発生機構(歯の再生, 歯の発生生物学から歯の再生研究まで). 真興貿易(株)医書出版部, 75-82, 2006.
2. 齋藤正寛: セメント質の発生・再生機構(歯の再生, 歯の発生生物学から歯の再生研究まで). 真興貿易(株)医書出版部, 200-208, 2006.

### <国外>

1. Saito M: A Novel Extracellular Matrix, ADAMTSL-4 regulates periodontal ligament development via microfibril assembly. 84<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, Brisbane Convention & Exhibition Centre, June 30, 2006
2. Nishida E, Saito M, Sasaki T, Ishikawa S, Noguchi T, Shimizu N and Teranaka T: Transcriptome analysis of extracellular matrix genes regulating periodontal ligament development. 84<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, Brisbane Convention & Exhibition Centre. July 1, 2006
3. Yokoi T, Saito M, Noguchi T and Teranaka T. ADAMTSL-4 Regulated Assembly of Oxytalan Fiber during Periodontal Ligament Development. 84th IADR 2006年6月30日 Brisbane, Australia
4. Tsubakimoto T, Saito M, Yokoi T, Nishida E, Kousaka K, Aino M and Teranaka T. Establishment of Immortalized Mouse Dental Papilla Cells with Progenitor Property 84th IADR 2006年6月29日 Brisbane, Australia
3. PDL-cells with gene mutation encode Shiga M, Saito M, Kosaki K, Kiyono T, Hattori M and Suda N fibrillin1 cause disorganized cell alignment. 2006年6月28日 84th IADR Brisbane, Australia

### <国内>

1. 齋藤正寛: KK-Periome データベースの構築と歯周組織再生医療の可能性. COE シンポジウム 2006「歯周組織のバイオリジー—基礎から臨床まで—」, 大阪大学中之島センター・佐治敬三メモリアルホール, 2006年10月22日
2. 齋藤正寛: 歯周組織の発生・再生に関わる細胞外マトリックス因子の機能解析. 第49回秋季日本歯周病学会学術大会, p.62-63, 大阪国際交流センター, 2006年10月21日
3. 齋藤正寛: 歯周靭帯発生に関わる新規 ECM 因子の解析と歯周病再生医療への展開. 第27回日本炎症再生学会, p.299, 京王プラザホテル, 2006年7月11日
4. 齋藤正寛, 西田英作, 佐々木貴史, 清水信義, 寺中敏夫: 歯周靭帯発生機構に関わる細胞外マトリックス因子の解析と歯周病再生医療の可能性. 第24回日本骨代謝学会学術総会, p.74, 東京ファッションタウン, 2006年7月7日

5. 西田英作, 齋藤正寛, 横井隆政, 椿本貴教, 高坂一貴, 相野 誠, 野口俊英, 寺中敏夫: ヒト歯根膜 EST database の構築と歯根膜形成過程に関わる遺伝子群の網羅的解析. 第 49 回秋季日本歯周病学会学術大会, p.106, 大阪国際交流センター, 2006 年 10 月 21 日
6. 西田英作, 齋藤正寛, 横井隆政, 椿本貴教, 高坂一貴, 相野 誠, 野口俊英, 寺中敏夫: ヒト歯根膜 EST library の作製とデータベース化. 第 48 回歯科基礎医学会, p.113, 鶴見大学記念館, 2006 年 9 月 22 日
7. 西田英作, 齋藤正寛, 横井隆政, 椿本貴教, 高坂一貴, 相野 誠, 野口俊英, 寺中敏夫: ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイリングデータベースの構築と歯根膜マーカー分子の探索. 第 124 回日本歯科保存学会春季学術大会, p.32, 神奈川県民ホール, 2006 年 5 月 25 日
8. Kosaka K, Saito M, Yokoi T, Noguchi T, Kiyono T and Teranaka T: Establishment of dental follicle cells culture system that generating periodontal ligament in vivo. 第 38 回日本結合組織学会学術大会, p.24, 前橋商工会議所会館, 2006 年 5 月 11 日
9. 高坂 一貴, 齋藤 正寛, 西田 英作, 相野 誠, 米田 俊之: 歯周組織発生過程に発現する新規細胞外マトリックス因子の機能解析. 第 5 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会, p.46, 千里ライフサイエンスセンタービル, 2007 年 3 月 4 日
10. 西田 英作, 齋藤 正寛, 米田 俊之: ヒト歯根膜形成に関わる細胞外マトリックス因子の探索. 第 5 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会, p.50, 千里ライフサイエンスセンタービル, 2007 年 3 月 4 日

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1) 特許取得

なし

##### 2) 実用新案登録

なし

##### 3) その他



## II. 分担研究報告

1. 動物モデルを用いた「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」評価系の確立に関する研究  
村上 伸也
2. ヒト顎骨由来間葉系細胞の調整  
梅澤 明弘
3. ヒト正常細胞の生体外増幅に関する研究  
清野 透
4. 歯髄幹細胞を用いた歯槽骨再生療法の可能性  
松下 健二
5. ヒト顎骨由来間葉系細胞の骨芽細胞分化に関する研究  
渡辺 研

## 動物モデルを用いた「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」評価系の確立に関する研究

分担研究者 村上 伸也  
大阪大学 大学院歯学研究科  
口腔分子免疫制御学講座 口腔治療学教室  
教授

**研究要旨** ビーグル犬を用いて、「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」の評価系を確立するために、本年度はビーグル犬歯槽骨骨片より骨芽細胞様細胞 (DAOB) を採取し、DAOB の機能解析を行った。その結果、DAOB は、高い石灰化物形成能力とアルカリフォスファターゼ活性を有することが、*in vitro* および *in vivo* の実験系により明らかとなった。

### A. 研究目的

細胞の製剤化を視野に、医薬品 GCP(平成9年厚生省令第28号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」と等しいレベルでの科学性を確保した評価系を確立するための第1歩として、ビーグル犬を用いた「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」の評価系を確立することを目標とした。そこで本年度は、ビーグル犬歯槽骨骨片より骨芽細胞様細胞 (DAOB) を採取する方法を確立すること、および DAOB の機能解析を行うこと、を目的として、以下の研究を行った。

### B. 研究方法

#### 歯槽骨欠損モデルの作製

#### (1) イヌ骨芽細胞の採取

ビーグル犬顎骨より外科的に切除された歯槽骨骨片から、既に確立しているヒト歯槽骨由来骨芽細胞 (HAOB) 採取プロトコールに従い、イヌ骨芽細胞 (DAOB: Dog Alveolar bone derived Osteoblast) を採取した。

#### (2) イヌ骨芽細胞の評価

得られた DAOB の分化能力を判定するため、DAOB

を骨芽細胞分化誘導培地で1週間培養を行った。その後、アリザリンレッド染色による石灰化能力の判定と、アルカリフォスファターゼ活性を通法に従い測定した。また各種骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法にて解析した。

#### (3) 骨形成能力の評価

以下の方法に従い、DAOB の骨形成能力を *in vivo* にて解析した。DAOB に GFP 遺伝子を導入後、ハイドロキシアパタイトと混和し、免疫不全症マウスの背部皮下へ移植をした。移植一ヶ月後に、移植塊を取り出し、組織化学的に DAOB の骨形成能力を判定した。また骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法にて解析した。

#### (倫理面への配慮)

本動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得た上で行われた。

### C. 研究結果

#### 1. イヌ顎骨由来骨芽細胞の採取と評価

ビーグル犬歯槽骨骨片より骨芽細胞を採取した結果、HAOB と同様にヒト間葉系細胞専用培地を

用いることにより培養可能な骨芽細胞 (DAOB) の採取に成功した。DAOB の分化能力を *in vitro* にて解析した結果、高い石灰化物形成能力とアルカリフォスファターゼ活性を有していることが判明した。また強いオステオカルシンの発現が DAOB において確認された。以上のことから、DAOB はいわゆる骨芽細胞の特性を有していることが確認された。

## 2. 骨形成能力の評価

DAOB の骨形成能力を判定する目的で、免疫不全症マウスへ移植した結果、スキャホールドであるハイドロキシアパタイトの周辺に顕著な骨形成を誘導することが観察された。

また DAOB により形成された骨は GFP 陽性反応を示すことから、DAOB 自身に骨形成能力を有することも確認できた。次に RT-PCR 法で移植片の遺伝子発現を解析した結果、強いオステオカルシンの発現が確認され、DAOB が骨芽細胞に分化していることも確認された。

## D. 考察

イヌ歯槽骨より採取された、DAOB は骨芽細胞のように硬組織形成能を有することが、*in vitro*, *in vivo* の解析により明らかにされた。DAOB と既に確立されているビーグル犬歯周病モデルを組み合わせることにより、「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」の評価系が確立出来るものと期待される。

## E. 結論

ビーグル犬歯槽骨骨片より、高い石灰化物形成能力とアルカリフォスファターゼ活性を有する、骨芽細胞様細胞 (DAOB) の採取に成功した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. S. Yamada, Y. Ozawa M. Tomoeda, R Matoba, K. Matsubara and S. Murakami Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. J Dent Res 85(5):447-451, 2006

2. 村上伸也 島袋善夫北村正博 山田 聡  
歯周組織再生医療と DDS 技術に期待するもの  
再生医療 日本再生医療学会雑誌 6(1)  
32-37 2007

### 著書

1. 村上 伸也：歯周組織（歯の再生、歯の発生生物学から歯の再生研究まで）。真興貿易（株）医書出版部，127-136，2006。  
2. ：ティッシュエンジニアリング（臨床歯周病学）  
医歯薬出版，242-249，2006

### 学会発表

1. S. Murakami Emerging Trends in periodontal regeneration Annual meeting of American Academy of Periodontology, Sep 18, 2006 (San Diego USA)  
2. 村上 伸也、歯周組織再生療法の流れを探る  
第 5 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会  
2007 年 3 月 4 日（豊中市、大阪）

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし  
2. 実用新案登録  
該当なし  
3. その他  
該当なし

## ヒト顎骨由来間葉系細胞の調整

分担研究者 梅澤 明弘  
国立成育医療センター  
生殖医療研究部  
部長

**研究要旨：**高齢化社会を向かえた今、歯および口腔の健康維持は、高齢者の QOL 維持および ADL 改善に重要な因子である。高齢者にとって歯周病は歯の喪失の最大原因であり、重篤に進行したケースでは有効な治療法がなく、より症状が悪化してしまう。そこで本研究では、口腔外科手術検体由来間葉系細胞を用いた歯周病再生治療法の安全性を細胞レベルで検討した。

### A. 研究目的

高齢化社会を向かえた今、歯および口腔の健康維持は、高齢者の QOL 維持および ADL 改善に重要な因子である。高齢者にとって歯周病は歯の喪失の最大原因であり、重篤に進行したケースでは有効な治療法がなく、より症状が悪化してしまう。そこで本研究では骨に分化しやすい間葉系幹細胞を投与し、歯槽骨の機能再生について検討する。本研究遂行のために、ヒト多指症由来細胞・ヒト外骨症由来細胞の分離培養後、網羅的遺伝子発現解析や染色体検査等を行い、細胞のプロファイルを確定し、治療に有効な細胞の検索を行う。

### B. 研究方法

#### (1) 口腔外科手術検体由来組織、小児多指症手術検体からの間葉系細胞の分離・培養

倫理委員会にて承認を受けた各手術検体より、間葉系細胞の分離・培養を行った。これらの手術検体は組織として培養室に運ばれ、切断、細分、コラゲナーゼ処理をしたのちに間葉系細胞用培地に10%の牛血清を用いて培養を行った。

#### (2) 得られた間葉系細胞のプロファイリング

培養過程を経て得られた間葉系細胞について、骨形成活性をALP活性、オステオカルシンの測定、von Kossa染色にて評価した。また、Affimetrix社製マイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を行い、歯槽骨再生に有用な細胞の検索を行った。

(倫理面への配慮)

当研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認)。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

### C. 研究結果

#### (1) 口腔外科手術検体由来組織、小児多指症手術検体からの間葉系細胞の分離・培養

各手術検体より、間葉系細胞様の細胞が出現し、分離培養が可能であった。しかしながら、これらの細胞は培養初期は増殖が旺盛であったが、継代を重ねるごとに増殖能力が落ちていき、最終的にはシネッセンスに陥ることを確認した。細胞の寿命延長、ストレスのない培養条件の検討は今後の課題である。

## (2) 得られた間葉系細胞のプロファイリング

培養過程を経て得られた間葉系細胞様細胞について、骨分化形成能を検討した結果、骨分化誘導後細胞について、著しいALP活性、オステオカルシン量の増加がみられた。また、von Kossa染色性細胞の出現が確認された。また、網羅的遺伝子発現解析より、骨特異的マーカー遺伝子の発現がみられた。

## D. 考察

本研究にて、口腔外科由来手術検体、ヒト多指症由来間葉系細胞を培養可能であることが示された。また、それぞれの持つ骨分化能も確認できた。しかしながら、現在の間葉系細胞培養に使用されている条件は、ウシ血清、ウシ胎児血清、ならびに動物細胞、大腸菌等で作製されたヒト増殖因子が利用されており、外来種由来感染源の混入は否定できない。このため治療法としての安全性、有効性の基準の確立は急務であり、分子基盤を明らかにすると同時に推進していくことが社会への責務である。

## E. 結論

本研究にて、口腔外科由来手術検体、ヒト多指症由来間葉系細胞を培養可能であることが示された。また、それぞれの持つ骨分化能も確認できた。in vivoにおける検討を加え、さらなる有効性・安全性の検討に着手していく。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells Mol. Biol. Cell, in press.2007
2. Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. Exp Cell Res. in press.2007

3. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. J Cell Biochem. in press.2007
4. Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stemcells. Inflammation and Regeneration 27(1):28-36. 2007
5. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. Stem Cells. 24(10):2270-8. 2006
6. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL)cells and colony-forming units in spleen(CFU-S)following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. J. Cellular Physiology 208:188-194.2006
7. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. Endocrinology. 147(9):4104-11. 2006

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1) 特許取得

なし

### 2) 実用新案登録

なし

### 3) その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)  
分担研究報告書

ヒト正常細胞の生体外増幅に関する研究

分担研究者 清野 透

国立がんセンター研究所 ウイルス部  
部長

**研究要旨** ヒトの正常体細胞を培養すると一定回数分裂した後増殖を停止する。そのためヒト体細胞を用いた再生医療の研究において、必要な十分量の細胞数を得るのは多くの場合困難であり、再現性を確認するのも一般に困難である。本研究ではヒト正常体細胞をできるだけ正常なまま増幅または不死化する技術を開発し再生医療の研究に資することを目的とする。ヒト細胞の不死化には p16/RB 経路の不活化と、テロメラーゼの活性化が必須であるとの仮説を基にこれまで E7-TERT あるいは bmi-1+TERT の組み合わせで多くのヒト正常細胞の不死化を確認している。また、p16 特異的 shRNA と TERT の組み合わせで乳腺上皮細胞の不死化にも成功した。さらに、p16 に感受性のない変異 cdk4 と cyclin D1+TERT などの組み合わせでより良い不死化法の開発を進めている。ヒト顎骨由来間葉系細胞の不死化を試みると共に、臨床応用に欠かせない動物実験のためにマウスならびにイヌ顎骨由来間葉系細胞の不死化を試みた。

A. 研究目的

本研究の最終目的は、生体外増幅したヒト顎骨由来間葉系細胞と、細胞移植製剤の安全性を確立し、広範な骨欠損を伴う歯周病患者に対する新たな細胞治療法を開発することである。そのため、自家、及び他家移植モデル作製のための顎骨由来間葉系細胞株を作製すると共に、より安全性の高い生体外ヒト細胞増幅・不死化技術の確立を目的としている。

B. 研究方法

TERTに加えHPVのE6やE7あるいはbmi-1、変異型cdk4, cyclin D1, p16-shRNAなどの遺伝子導入によってヒト体細胞あるいは動物顎骨由来間葉系細胞を延命、不死化し、細胞周期関連遺伝子群の発現、テロメア長などを調べ増殖停止に至る分子機構を検討する。不死化された細胞について染色体異常を指標に染色体の不安定性を評価した。また、不死化した細胞が歯周組織の再構成能力を維持しているかどうか、腫瘍原性を獲得していないことなどを斎藤らが既に確立した方法を用いて確認する。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞全般の不死化研究については国立がんセンター倫理審査委員会の承認(承認番号14-69)を得ている。

C. 研究結果

不死化研究の進んでいるヒト乳腺上皮細胞に加え、気管支上皮細胞、皮膚角化細胞などをbmi-1+TERTで不死化した。乳腺上皮細胞についてはp16-shRNA+TERTで効率よく延命不死化できることを示した。骨髄間葉系幹細胞、筋芽細胞、卵巣表層上皮細胞などはBmi-1+TERT, E6E7+TERT, E7+TERTなど異なる組み合わせで不死化した。これらの細胞は共通してp16/RB経路の不活化が延命に必要であり、テロメラーゼの活性化が不死化に必須であった。Bmi-1, p16-shRNAを導入した細胞ではp16の発現は低く、E6E7, E7を導入した細胞では高かった。予想通りE6E7を導入した細胞ではp53レベルは低くE7を導入した細胞では高かった。これらの不死化細胞について染色体をG-bandingあるいはSKY法により解析した結果、E6E7-TERTでは多倍体化や異数性などに加え転座など多くの染色体異常が見られたのに対し、bmi-1+TERT, p16-shRNA+TERTで不死化した細胞では一部染色体のトリソミーなどが見られたものの、ほぼ正常2倍体を保っている細胞が多くを占めた。それに対しE7+TERTで不死化した3つの異なる細胞種では、異数性も転座もない正常2倍体染色体を長期間培養後も大部分あるいは100%の細胞で維持されていることが分かった。また、E7+TERTで不死化した筋芽細胞や間葉系幹細胞はそれぞれ筋細胞や神経細胞への分化能も良く保たれていることが示された。

この結果に基づき、p16非感受性変異型 cdk4+cyclin D1 +TERTで不死化した細胞も正常2倍体染色体を維持していることが示された。

また、ヒト顎骨由来間葉系細胞の体外増幅・不死化を試みた。ヒト顎骨由来間葉系細胞は集団としては比較的長期間培養を維持できることから、TERTのみで長期延命できる可能性もある。しかし、歯周組織への分化能を維持しているかどうかをモニターするため、Collagen type I promoterあるいはオステオカルチン promoter制御下にGFP遺伝子をつないだキメラ遺伝子を導入し、分化誘導を可視化できるかどうかを検討した。

一方、動物実験モデルでの解析を目的として、マウスならびにイヌ由来の顎骨由来間葉系細胞の不死化を試みた。マウス体細胞はテロメラーゼ活性陽性であること、マウス細胞の不死化にはp53の不活化が有効であることが知られていることからトランスフォーム活性を欠いたC末欠損E6を導入し延命に成功した。

#### D. 考察

様々な遺伝子導入によるヒト細胞の不死化法を開発した。幾つかの細胞種では正常細胞の分化能を維持し、染色体不安定性を伴わない細胞株の樹立に成功した。これらの結果は、正常なp53経路が染色体の安定性に極めて重要であることに加え、p16の存在も染色体の安定性に関わっている可能性が示唆された。テロメラーゼの活性化に加えp16/Rb経路の不活化が重要であることが再確認された。p16/Rb経路の不活化法のうち、意外にもE7がp16の発現抑制より染色体異常を誘導しないことが明らかになった。最終的には遺伝子導入に依らない体外細胞増幅技術の開発が期待されているが、E7+TERTで体外増幅後、Cre-loxPシステムなどで導入遺伝子を除く方法も有望であり、ベクター開発に着手している。最近、乳腺上皮細胞と同様に不死化研究の進んでいる前立腺上皮細胞はc-mycの単独導入で不死化されることが報告された。この際、Mycはbmi-1とTERTの転写を活性化する機構が推定されている。顎骨由来間葉系細胞など他の細胞種での検証が必要である。以前、ES細胞がGSK3b阻害剤によって維持されるとの報告があったが、培地中へのGSK3b阻害剤やWntの

添加によって理論的にはc-mycなどを制御することも可能である。このような解析を通じ、遺伝子導入によらないp16の発現増加の回避やテロメラーゼの活性化が可能となると考えている。これが実現すれば、各種細胞療法の臨床応用に向け大きなステップとなることは間違いない。

#### E. 結論

種々のヒト正常細胞を用い、種々の遺伝子の組み合わせによる細胞不死化を進めてきた。これらの不死化細胞の分化能の解析や、染色体解析を行った。意外なことにE7+TERTあるいは変異cdk4+cyclin D1+TERTで不死化した細胞はbmi-1+TERTあるいはp16-shRNA+TERTなどで不死化した細胞よりもより染色体異常が少な胃事が分かった。不安定性を伴わないこれらの細胞ではp53とp16の高発現が維持されていた。P53経路に加えp16が染色体の維持に関わっている可能性が示唆された。また、遺伝子導入によらない細胞不死化技術の開発が現実味を帯びてきた。

#### F. 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換えDNA安全委員会の承認のもと、適切な計画が基準に従った施設において行われている。

#### G. 研究発表

1. Hashimoto N., Kiyono T., Wada M.R., Shimizu S., Yasumoto S., and Inagawa M., Immortalization of human myogenic progenitor cell clone retaining multipotentiality. *Biochem Biophys Res Commun*, 348: 1383-1388, 2006.
2. Yamashita Y., Tsurumi T., Mori N., and Kiyono T., Immortalization of Epstein-Barr virus-negative human B lymphocytes with minimal chromosomal instability. *Pathol Int*, 56: 659-667, 2006.
3. Ito Y, Hasuda H, Kitajima T, and Kiyono T *Ex vivo* expansion of human cord blood hematopoietic progenitor cells using glutaraldehyde-fixed human bone marrow stromal cells. *J. Biosci. Bioeng*,

102: 467-469, 2006.

4. Yokoi T., Saito M., Kiyono T., Iseki S., Kosaka K., Nishida E., Tsubakimoto T., Harada H., Eto K., Noguchi T., and Teranaka T., Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res*, 327:301-11, 2007.
5. Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, Umezawa A. Menstrual Blood-derived Cells Confer Human Dystrophin Expression in the Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy via Cell Fusion and Myogenic Transdifferentiation. *Mol Biol Cell*, in press.
6. 清野 透 子宮頸癌の発がん分子機構に関するoverview 産科と婦人科17 169-178 2006
7. 斎藤真子、清野 透 HPVによる発がん機構 細胞 38 522-526 2006
8. 温川恭至、清野 透 解明が進むヒトパピローマウイルスによる子宮頸癌の発症機構 実験医学 24 2958-2964 2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1) 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」 出願中

「(抗HPV16 E6)モノクローナル抗体またはその結合活性断片、ハイブリドーマおよびキット」 出願中

##### 2) 実用新案登録

なし

##### 3) その他

なし



## 歯髄幹細胞を用いた歯槽骨再生療法の可能性

分担研究者 松下 健二  
国立長寿医療センター研究所  
口腔疾患研究部  
部長

**研究要旨:** 歯周病で高度に吸収した歯槽骨の再生は、歯の喪失を防ぎ、高齢者の QOL と ADL を維持するための最良の方法の一つと考えられているが、その素材となるべき細胞としてどのようなものを用いれば良いか、確固たる知見が得られていない。本研究では、歯髄由来幹細胞の細胞性状を調べ、歯槽骨再生への応用の可能性を検討した。その結果、歯髄幹細胞は、自己複製能とともに骨組織形成能を含む多分化能を有し、歯槽骨再生のための素材として有用である可能性が明らかになった。

### A. 研究目的

高度な歯槽骨の吸収を起こした歯周病に対する治療法の開発は、歯科医師の悲願であり、高齢化社会を迎えた日本の重要課題の一つである。骨芽細胞あるいは間葉系幹細胞はその治療材料として有用であると考えられるが、その有用性は十分に検討されていない。歯髄組織から歯髄幹細胞を単離し、それを応用できれば、患者への侵襲が少なく採取が比較的容易であるため、有効な歯周組織再生治療の材料となりえる。そこで本研究では歯髄組織から幹細胞画分を採取し、その性状を解析した。

### B. 研究方法

#### (1) 歯髄組織からの幹細胞画分の分離

ブタ歯髄組織においてHoechst33342を強く排出する細胞、side population(SP) 細胞を分離した。

#### (2) 歯髄SP細胞の性状解析

得られたSP細胞について、各種幹細胞マーカーの解析を RT-PCR法およびフローサイトメトリーを用いて解析した。また、各種増殖因子を用いて、骨様組織、軟骨組織、および脂肪組織形成能などを検討した。

### (倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮を

おこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

### C. 研究結果

#### (1) SP細胞の自己複製能

SP、non SP、primary 細胞の継代培養を行い経時的に総細胞数を測定すると non SP、primary細胞は 10代目で SP細胞は19代目で平衡に達した。

#### (2) SP細胞の性状解析

リアルタイム RT-PCR にて Bmi1 や stat3 を比較すると SP 細胞は他の細胞に比べて高い発現がみられた。また、同細胞は間葉系幹細胞の細胞表面マーカーである CD13, 34, 105, 146, 150 の高発現が認められた。また、SP 細胞を pellet culture 法で三次元培養を行うと骨様組織の形成が認められたことから、同細胞が骨芽細胞様細胞へ分化することが明らかになった。さらに同細胞は、脂肪細胞、軟骨細胞および神経細胞にも分化することがわかった。

### D. 考察

本研究の結果から、歯髄SP細胞は間葉系幹細胞としての性質を有し、骨芽細胞様細胞へも分化することから、歯槽骨を再生するための素材として有用である可能性が示唆された。ただ、歯髄組織は微小な組織であるため、そこから採取できる幹細胞はごく僅かである。したがって、その細胞を効率的に増幅する技術を開発することが必要である。また、用いた細胞はブタ由来であるのでヒト歯髄においても同様の細胞は採取できるのか確認する必要がある。また、ヒトへの応用に際した安全性、有効性の確認も並行して行う必要がある。

## E. 結論

ブタ歯髄由来 SP 細胞が間葉系幹細胞の性質を有し、骨形成能も有することから、歯槽骨および歯周組織再生に応用できる可能性が示唆された。

## F.健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Zheng L, Iohara K, Ishikawa M, Into T, Takano-Yamamoto T, Matsushita K, Nakashima M. Runx3 negatively regulates Osterix expression in dental pulp cells. Biochem J., in press.2007
2. Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. Stem Cells. 24(11):2493-503. 2006

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1)特許取得

なし

### 2) 実用新案登録

なし

### 3)その他

なし

## ヒト顎骨由来間葉系細胞の骨芽細胞分化に関する研究

分担研究者 渡辺 研

国立長寿医療センター研究所

運動器疾患研究部

骨機能再建研究室長

**研究要旨** 生体外増幅したヒト顎骨由来間葉系細胞(HAOB)の骨芽細胞分化における、骨形成因子(BMP)や Wnt ファミリーサイトカインによる効率的な分化誘導について検討を行った。HAOBは良好な骨芽細胞分化能を有し、BMPとWnt3a処理により、より効率良く分化する事が明らかとなった。

### A. 研究目的

生体外増幅したヒト顎骨由来間葉系細胞を広範な歯槽骨欠損を伴う歯周病に対する新しい細胞移植治療へ応用するため、不死化ヒト顎骨由来間葉系細胞の骨芽細胞分化における表現型の検討を行い、治療応用への有効性ならびに安全性における学術根拠の一部を得る事を目的とする。

### B. 研究方法

主任研究者の齋藤らが樹立したヒト顎骨由来間葉系細胞(HAOB)を得て、間葉系細胞増殖培地(MSCGMプレートキット、Cambrex社)で培養し、実験に用いた。骨芽細胞分化には骨芽細胞系分化培地(Osteogenic、Cambrex社)を使用した。BMP4ならびにWnt3aはR&D社より購入した。定量PCRは、QIAGEN社 QuantiTect STBR Green キットを用い、ABI7300(Applied Biosystems社)で行った。各遺伝子検出のためのPCRプライマーは既報の配列情報を参考に作成した。

(倫理面への配慮)

当該分担研究課題では、ヒト由来細胞を用いているがin vitroでの分化条件の検討のみに用いており、ヒトゲノム・遺伝子解析を対象としていない。同ヒト由来細胞については、ドナー情報は主任研究者のみ有し、細胞分与・保存等についても厳格に管理されている。また、動物実験は行っていない。

### C. 研究結果

ヒト顎骨由来間葉系細胞は、増殖培地(MSCGM)及び骨芽細胞分化培地で培養すると、MSCGMでは線維芽細胞様形態を示すのに対して、骨芽細胞分化培地では、よりフラットな

形態を呈していた。すでに培地条件(アスコルビン酸、デキサメサゾンなどの添加)により分化に差異が認められた。さらに、骨形成誘導因子BMP4ならびに、近年、骨芽細胞分化と密接であると考えられているWntファミリーサイトカインであり、 $\beta$ -cateninの安定化を介すcanonical pathwayの活性化リガンドであるWnt3aを添加する事により、骨芽細胞分化は亢進した。さらに、BMP4とWnt3aを共存させると分化はさらに促進される傾向にあった。Wnt3aは比較的高価であるため、Wnt3a同様、canonical pathwayの活性化因子であり、より安価な塩化リチウム(LiCl)処理(GSK3の阻害)を試行したが、in vitroの長期培養系では、細胞の生存性に影響を及ぼしたため、Wnt3a添加のような顕著な分化促進効果は認められなかった。

### D. 考察

BMPは一般的に高い骨芽細胞分化誘導活性をもつ事が知られているが、一方で脂肪細胞分化を一部誘導することも知られている。Wntシグナルは、脂肪細胞分化を抑制する事が知られており、両者の共存により、より効果的な骨芽細胞誘導能を発揮できる可能性が考えられた。

### E. 結論

ヒト顎骨由来間葉系細胞(HAOB)は、骨芽細胞に効率良く分化した。また、BMPとWnt3aで処理する事により、骨芽細胞分化を促進することが可能であった。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sato T, Watanabe K, Masuhara M, Hada N & Hakeda Y. Production of IL-7 is increased in ovariectomized mice, but not RANKL mRNA expression by osteoblasts/stromal cells in bone, and IL-7 enhances generation of osteoclast precursors in vitro. *J. Bone Miner. Metab.* 25, 19-27, 2007.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1) 特許取得

なし

### 2) 実用新案登録

なし

### 3) その他

なし