

## BONE MARROW MSCs

- transduction pathway in periodontal cells. *J Periodontol* 74:1320–1328.
24. Kundra V, JA Escobedo, A Kazlauskas, HK Kim, SG Rhee, LT Williams and BR Zetter. (1994). Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta. *Nature* 367:474–476.
  25. Koyama N, CE Hart and AW Clowes. (1994). Different functions of the platelet-derived growth factor-alpha and -beta receptors for the migration and proliferation of cultured baboon smooth muscle cells. *Circ Res* 75:–682–691.
  26. Siegbahn A, A Hammacher, B Westermark and CH Heldin. (1990). Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest* 85:916–920.
  27. Fiedler J, N Etzel and RE Brenner. (2004). To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. *J Cell Biochem* 93:990–998.
  28. Higashiyama S, JA Abraham and M Klagsbrun. (1993). Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J Cell Biol* 122:933–940.
  29. Panagakos FS. (1994). Transforming growth factor—alpha stimulates chemotaxis of osteoblasts and osteoblast-like cells *in vitro*. *Biochem Mol Biol Int* 33:643–650.
  30. Andresen JL and N Ehlers. (1998). Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta. *Curr Eye Res* 17:79–87.
  31. Chwieralski CE, I Schnurra, L Thim and W Hoffmann. (2004). Epidermal growth factor and trefoil factor family 2 synergistically trigger chemotaxis on BEAS-2B cells via different signaling cascades. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:528–537.
  32. Leeb SN, D Vogl, W Falk, J Scholmerich, G Rogler and CM Gelbmann. (2002). Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors* 20:81–91.
  33. Corti S, S Salani, R Del Bo, M Sironi, S Strazzer, MG D'Angelo, GP Comi, N Bresolin and G Scarlato. (2001). Chemotactic factors enhance myogenic cell migration across an endothelial monolayer. *Exp Cell Res* 268:36–44.
  34. Chuma H, H Mizuta, S Kudo, K Takagi and Y Hiraki. (2004). One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 12:834–842.
  35. Bischoff R. (1997). Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn* 208:505–515.
  36. Grano M, F Galimi, G Zambonin, S Colucci, E Cottone, AZ Zallone and PM Comoglio. (1996). Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7644–7648.
  37. Noda Heiny H and BE Sobel. (1995). Vascular smooth muscle cell migration mediated by thrombin and urokinase receptor. *Am J Physiol* 268:C1195–1201.
  38. Facchiano A, F De Marchis, E Turchetti, F Facchiano, M Guglielmi, A Denaro, R Palumbo, M Scoccianti and MC Capogrossi. (2000). The chemotactic and mitogenic effects of platelet-derived growth factor-BB on rat aorta smooth muscle cells are inhibited by basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* 113:2855–2863.
  39. Hooshmand-Rad R, L Claesson-Welsh, S Wennstrom, K Yokote, A Siegbahn and CH Heldin. (1997). Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase and Rac in platelet-derived growth factor-induced actin reorganization and chemotaxis. *Exp Cell Res* 234:434–441.
  40. Cao H, N Dronadula and GN Rao. (2006). Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C172–C182.
  41. Ossovskaya VS and NW Bunnett. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84:579–621.

Address reprint requests to:

Dr. Masahiro Nishimura

Department of Prosthetic Dentistry

Graduate School of Biomedical Sciences

Hiroshima University

1-2-3, Kasumi, Minami-ku

Hiroshima 734-8553, Japan

E-mail: maakun@hiroshima-u.ac.jp

Received June 26, 2006; accepted August 11, 2006.

2007

vol.26 no.12 December 別刷

ザ・クインテッセンス  
Quintessence

12

## 特別座談会

# 再生歯科の新たな潮流

—再生歯科医療に歯科界の活路を見出せるか—

### 【出席者】

- 中内啓光 東京大学医科学研究所・教授, **日本再生医療学会・理事長**  
加藤幸夫 広島大学大学院・教授  
村上伸也 大阪大学大学院・教授  
上田 実 名古屋大学・教授, **日本再生歯科フォーラム代表** / 司会進行  
水上哲也 福岡県開業, **日本再生歯科フォーラム九州支部長**

### 座談会開催にあたって(上田)

歯科界が厳しい状況であるなか、医科・大学人・臨床家・産業界が連携を模索しはじめた「再生医療」には明るい未来が垣間みえます。このようななか、日本再生歯科フォーラムが2008年3月に日本再生医療学会の歯科分科会に移行することが決定し(正式に合流するか、分科会のままかは2009年3月に決定)、今後いっそう医科および産業界との連携が強化されることが期待されます。

本座談会では、「再生歯科の新たな潮流—再生歯科医療に歯科界の活路を見出せるか—」と題し

て、再生医療の研究に従事されている大学の先生方と開業医の先生にお集まりいただき、日本の再生医療の現状について理解を深めたいと思います。日本再生歯科フォーラムが日本再生医療学会の歯科分科会に移行することで、歯科における再生医療は今後どのような展開をみせるのか、FGF-2をはじめ臨床応用はいつ可能となるのかなどについて議論をしていきたいと思います。

(内容をより理解していただくために p.44~p.45に用語解説欄を設けました)



# 1 再編をはじめた再生医療の学会：その背景と意義

**上田** 日本の医科には、3つの代表的な再生医療の関連学会があります。「日本組織工学会」「日本再生医療学会」「日本炎症・再生医学会」です。発足当初はそれぞれの学会に特徴があり、研究者の棲み分けもされていました。しかし次第にオーバーラップするようになり、それでは効率も悪いということから学会を1つにまとめようという再編の動きが起りました。まず「日本再生医療学会」と「日本組織工学会」の合流が決定し、さらに「日本炎症・再生医学会」の合流をめざした協議会が設けられています。このように、日本の再生医療の学会は再編に向かって動きだしています。

一方、歯科の分野でも、再生医療に関する団体はいくつかありますが、各専門分野に分散している研究者が一堂に会する場がありませんでした。上記の医科の再編の動きを受けて、再生医療は歯科単独で行うよりも医科と連携し、お互いに情報交換するほうがよいのではないかと考えました。そこで今回、「日本再生歯科フォーラム」が「日本再生医療学会」に合流するという形をとりまして、会員から承認をいただきました。

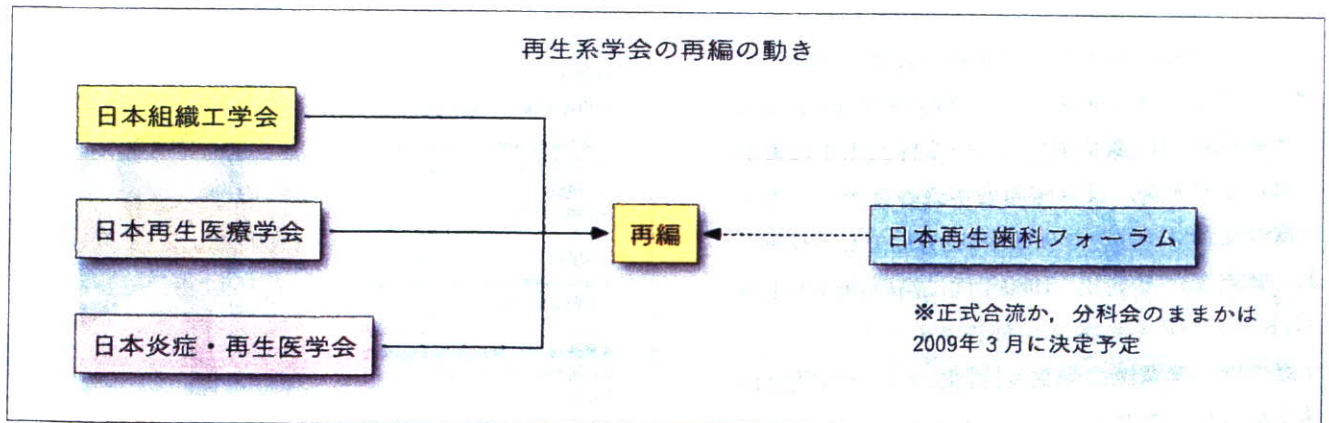
それでは、まず日本再生医療学会につきまして、理事長の中内先生からご説明をと思います。

## 日本再生医療学会とは

**中内** 再生医療は、21世紀の新しい医療として、また難病治療の切り札として注目されている最先端の分野です。この再生医療は大きく2つの分野があります。1つは、ES細胞などで注目を浴びている幹細胞生物学の分野で、もう1つが組織の再生を促進する技術開発という組織工学を中心にした分野です。また、再生医療は、生殖医学、移植医学、医療産業とも密接に関連していて、新しい医療を進めていくには、倫理的あるいは社会的なコンセンサスを形成していくことも大事だと考えています。

私は、日本再生医療学会が、再生医療がもっている特異性を踏まえて、いろいろな分野の知恵を集約することによって1日も早く実際に使える有効な治療法の実現をめざす学会であると理解しています。

先ほど上田先生の発言にもあったように、来年は日本組織工学会との統合が決まっており、さらに日本再生歯科フォーラムの先生方にも参加していただくことになっています。幹細胞の可能性を考えますと、人間の身体を構成するすべての細胞を再生する可能性があるわけですので、多くの人に加わって



ただきたいと考えています。

### 日本再生歯科フォーラムとは

**上田** 「日本再生歯科フォーラム」は2003年9月30日に設立されました。当時、「再生医療は実用化目前」という雰囲気がありました。現在は、大学の研究者、一般開業医、歯科技工士、歯科衛生士、そして企業を含めて約450名で構成しています。また、多くの歯科学生にも参加を募っており、学生は会費無料で参加してもらっています。歯科界のなかなか先のみえない暗闇に、再生医療がその活路を開きたいと考えます。いま日本再生医療学会の会員は約3,000名で、そこに日本再生歯科フォーラムの約400名が入っていくこととなります。

### 日本再生歯科フォーラムが 日本再生医療学会に参加する意義とは

**上田** 広島大学で間葉系幹細胞の研究で活躍されている加藤先生は、幹細胞の研究者として、医科と歯科が「再生医療」というキーワードで一緒に学会活動を行っていくことの意義をどのように考えますか。

**加藤** 歯科だけで幹細胞に依拠することはあまりにも閉鎖的であり、現在はそういう時代ではないと思います。私たち歯科医師は歯槽骨の再生という、骨の再生のなかでもからだ全体からしてみれば一部分の研究を行っていますが、医科に対しても骨や幹細胞という共通の基盤があることから、同じ学会のなかでディスカッションすることは、歯科だけではなくて医科の分野にもメリットがあると思います。

**上田** そうですね。つづいて、大阪大学でFGF-2の研究・臨床応用に取り組まれている村上先生にお聞きしたいのですが、日本歯周病学会のなかでいま再生医療の位置づけはかなり高いものなのでしょうか。

**村上** 歴史をたどると、1980年代に歯周組織再生療法(GTR法)に関する論文が報告されました。そういう点では、開業医の先生も「再生」という言葉自体は早くから耳になじんでいて、なおかつ臨床応用を

行ってきた背景があると思います。

日本歯周病学会でも、歯周組織再生療法に関する基礎研究や臨床報告は活発に行われています。ただ、再生医療を考える際、医科と少しニュアンスが違うことを知る必要があります。歯周病は中高年の8割近い方が罹患している疾患であり、歯周組織再生療法はこうした common disease を対象にした再生医療となります。ですから、ある特定の施設だけで再生医療を展開するのではなく、できるだけ広く再生医療を提供できる環境を整えないと、歯科のなかでは再生医療は十分に根づいていかないのではないかと思います。最終的には、開業医の先生方も臨床に用いることができる再生医療を実現しなければならないと思います。

**上田** 同感です。本当に開業医の先生のところには技術が届かないと、歯科ではあまり貢献できません。歯科は圧倒的多数が開業医の先生ですから、その先生方が最終的には再生医療を行わないと患者さんを治療できないと思います。

医科の中内先生からみて、歯科の再生医療研究者にどのようなことを期待されますか。あるいは歯科の開業医が入ってくることによって、日本再生医療学会にどのような影響があると予測されていますか。

**中内** 日本再生医療学会へのよい影響としては、歯科の先生方が何をめざし、何を望んでいるかということをもう少し具体的に把握できることです。そし

#### 中内啓光 (Hiromitsu Nakauchi)

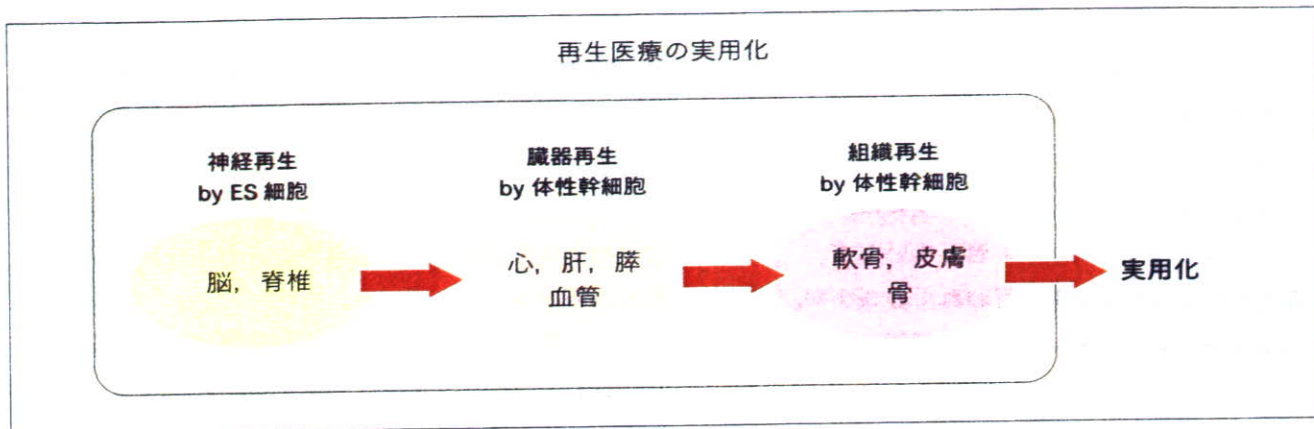
東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター高次機能研究分野・教授  
日本再生医療学会・理事長



[主な研究内容] 造血幹細胞を中心とした幹細胞の分化と自己複製の制御機構に関する研究を行っている。このような研究を基礎に臓器再生医学や免疫遺伝子治療など、次世代の医学を確立することをめざしている。



## 再生医療の実用化



てわれわれ医科サイドも、歯科で実際に再生医療が臨床応用されているケースから学ぶことも多いと思います。異分野との交流は本当に意味があることだと思います。

ただ、先ほど上田先生は「再生医療の実現は目前」とおっしゃいましたが、私は「再生医療はこれからの学問」だと思っています。私はもともと免疫学が専門で、免疫学はこの50年でもっとも進歩した学問といわれているのですが、それでも臨床分野に貢献

できるようになったのは最近です。たとえばモノクローナル抗体での治療、いわゆる抗体療法など、免疫学が副産物を臨床に応用しているだけというレベルでも30年かかっています。

**上田** 確かにパーキンソン病の治療やES細胞を使った医療がすぐに実現できるとは思いませんが、局所である歯科はわりと臨床応用が進んでいる印象をもっています。

## 2 再生医療の実用化：今後の課題と高まる期待

**上田** 村上先生は、すでに治験に着手されていますが、その実用化はいかがですか。

**村上** 2007年3月末で、後期Ⅱ相の治験が終了しました。歯科の領域でも、エビデンスが重要です。治験という過程をふんで、FGF-2製剤の安全性と有効性を注意深く評価する必要があります。もし、その過程にあと数年かかるとしたら、治験のつぎのステップとして、何を準備しておくべきかということを考えて、前臨床研究をその数年間を利用して始めておく必要があると思います。そして、開業医の先生にもみえる形で成果を上げ、夢をつないでいくことが重要であると考えています。

歯科の先生方は生体親和性材料で病気を治療することにすごく慣れています。そのような背景にくわえて、「生物学的な問題を生物学的に解決する」といった考えをこれまで以上に加味することにより、



**加藤幸夫**  
(Yukio Kato)

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻探索医科学講座・教授

[主な研究内容] 間葉系幹細胞による再生医療、間葉系幹細胞の増殖と分化にかかわる転写因子、骨が縦軸方向へ伸びる仕組み(内軟骨骨形成)、時計遺伝子 Dec1 / Dec2 の役割および時間医療学。

歯科医療はさらに魅力的になれると思います。

**上田** 「再生医療は現実化するのだろうか」という開業医の方々の熱い期待を感じる一方、「このまま現実化しないまま終わってしまうのではないか」という声すら聞きます。しかし歯科というのは、その突破口になり得るのではないかと考えています。

加藤先生はもちろん臨床も行われていますが、歯科の再生医療の実用化というのはまだ遠いものなのでしょうか。

**加藤** 2003年に、上田先生が「再生医療はあと数年で実現するかもしれない」という機運を感じられ、私も確かにそういう時期があったと思います。しかし当時に比べると現在はもう少し慎重になっていると思います。ただ私は、10年後にはかなり順調に進んでいるのではないかと感じています。

われわれも、細胞を使って骨やセメント質や歯根膜をつくることのできる可能性はかなり大きいと思っています。ただし、幹細胞の能力を具体的にどのように生かすのか、さまざまな細かい技術とどのように組み合わせるのかといった経験はまだあまりにも乏しいですね。開業医の先生方が使えるプロトコルまで到達させるには、今後5年で相当頑張らないといけないと思いますし、日本で細胞を使った歯科治療を広く行ってほしいですね。いくつかの施設で細胞を使った治療を行っていますが、細々とやっていたのでは経験の積み重ねが遅いのではないかと考えています。

### 再生医療の実用化を阻むものとは

**上田** 米国の大学はいまわれわれが行っているような臨床研究レベルになったときに企業が入ってきて、臨床研究が加速していきます。しかし、日本の場合は、それを大学自身が行うという特殊なケースです。この体制を変えていかないと、臨床研究がたいへん進みづらいと思います。日本では、臨床研究に対する企業の参入が明らかに消極的ですよね。

**中内** いま話題になっている TR(translational research)：基礎研究で見出された新規発見を臨床に役立

つ応用として翻訳するために、必要な一連の研究を立案・実行する過程のこと)のシステムあるいは臨床試験にもっていく制度など、審査する側の経験もすべて不足しているのが現状です。それは歯科でも同じだと思います。ですから、臨床試験に基礎研究の成果を持ち込むという体制をきちんとつくることが非常に大切です。

私が所属している東京大学医科学研究所はまさに TR を行ううえの研究のはずですが、実際にそんなに TR に持ち込めるようなシーズがたくさんあるかという点必ずしもそうでもない。やはり基礎研究と臨床医学の間では、まだまだ大きなギャップがあると私自身も考えています。

**上田** そういう意味では先ほどから何度もいっていますが、歯科は比較的臨床応用しやすい分野であるかもしれません。村上先生はどう考えますか。

**村上** 実際に、いまわれわれが行っている FGF-2 研究は、その基礎研究を1990年代前半から始めており、いま治験をやっと展開している状況です。いろいろな意味で時間がかかりますね。厳格な基準を1つずつクリアしていくためには、時間をかけて慎重に行わなければなりません。もし臨床現場で何か問題が起こってしまったら、再生医療全体にブレーキがかかることになりかねません。そういう意味でも、患者さんの安全を最優先にして慎重にプロジェクトを進めていく必要があると思います。

**村上伸也**  
(Shinya Murakami)

大阪大学大学院歯学研究科分子病態口腔科学専攻口腔分子免疫制御学講座歯周病分子病態学歯周病診断制御学・教授

[主な研究内容] 歯周組織再生の分子基盤を明らかにすることが1つのテーマ。とりわけ、FGF-2 や幹細胞移入による新規歯周組織療法の確立や、歯根膜組織のトランスクリプトーム(mRNA)解析を精力的に行う。





## 開業医が再生医療に期待するもの

**上田** 福岡県で開業されている水上先生にお聞きしたいのですが、開業医の間で「再生医療は早く実用化できないのか？」という声はでてきませんか。

**水上** たいへん多くの声があがっています。海外で新しい分野の治療法が開発されたとしても日本に早期に入ることはこれからも難しい状況だと思いますので、われわれ開業医からすれば、ますます日本の研究者にぜひとも開発を進めていただきたいという気持ちは非常に強くあります。

ただ、再生医療について開業医として希望をもてることがあります。それは、いままで行ってきた歯科治療にそういった再生医学的な考え方が導入されたことで、歯根膜由来の未分化間葉系の細胞をどのように有意な方向へもっていくかで再生が決まっていくという話が初めていわれるようになり、われわれ開業医がいま現場で治療をしていくことの意味は何かということ初めて示された点です。ただ治療をするということではなくて、そういう目的をもって行うことの大切さをわからせてくれたのが、再生医療ではないかと思っています。

## 3 再生医療実現に向けて：いま一番重要なことは何か


**上田** 再生医療が歯科界の活路の1つになるであろうことは、皆さん思っているようです。では、現在のそれぞれの先生方のお立場で、将来的に再生医療実現に向けて重要と考え、興味をもっていることについて、近未来の再生医療の予測を絡めてお話してください。

### ●中内「再生医療はいずれは臓器をつくる時代に」

**中内** ヒトのES細胞はたいへん注目されていますが、まだ実際にヒトには応用されていません。米国のジェロン社は、脊髄損傷の患者さんにES細胞

から誘導した神経細胞を移植しようと考えていて、FDAに審査を依頼しているところです。しかし、世界で最初のヒトES細胞を使った再生療法です。慎重に審査されていて時間がかかっています。安全性が確認できれば、それを皮切りにいろいろな分野でヒトES細胞を使った再生療法が行われるようになります。2007年、霊長類で初めてサルのコロン胚からES細胞が樹立されましたので、やがてヒトでも応用されるようになると思います。そうになると、患者さん由来の細胞を免疫の問題がない形で再生医療に供給できる可能性があります。

ヒトのES細胞よりもさらに世界的な注目を浴びているのは、京都大学の山中伸弥先生が2006年5月に発表された「iPS細胞」です。山中先生らの報告によると、たった4つの遺伝子を皮膚の細胞に入れるだけで、ES細胞とほぼ同じ能力をもつ細胞をつくることのできたというのです。これによりES細胞が抱える倫理的あるいは社会的な問題もほぼ回避され、いちだんと再生医療に近づいたといえます。まだマウスでの実験ですが、ヒトへの応用も時間の問題だと思います。これがヒトで応用できるとなると、ES細胞にかわって患者さんからそういった細胞を

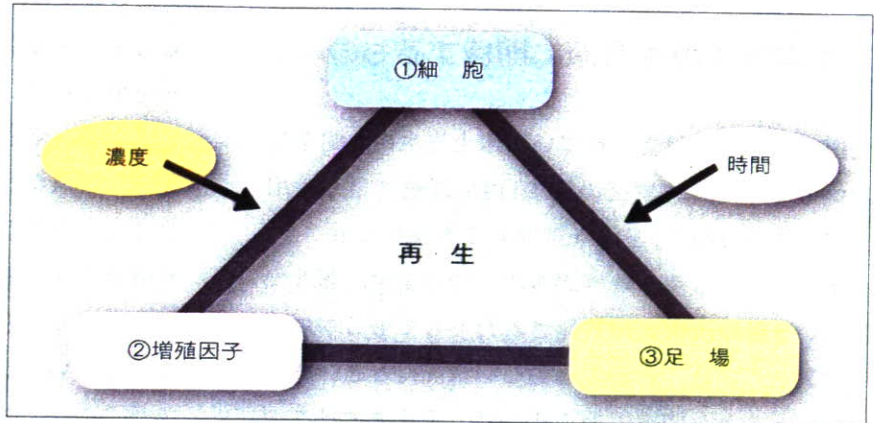


**上田 実**  
(Minoru Ueda)

名古屋大学医学部口腔外科・教授  
日本再生歯科フォーラム代表

[主な研究内容] 皮膚粘膜の再生医療、骨軟骨の再生医療、線維芽細胞を使ったしわ治療、歯髄幹細胞の分離とキャラクタライゼーション、幹細胞の同種移植。





組織再生の3要素。これらの要素が適切な濃度で、適切な時間作用しあい、統合されてはじめて完全再生が可能となる。

つくりることができる技術が確立され、再生医療にとってのものすごく大きな発展になります。

歯科に関していえば、間葉系幹細胞の正体ははっきりしつつあります。別に培養してからできたわけではなく、骨髄のなかに存在する細胞だといわれています。その起源についてもなかなかおもしろい知見がでてきていますので、ここ1～2年の間にはっきりしてくるのではないのでしょうか。

現在の再生医療はほとんど細胞治療であり、細胞をつくってそれを移植するのがほとんどですが、将来的には細胞だけではなくて臓器をつくるのが重要だと思います。これは今後5年、10年の課題です。それが実現すると再生医療は本来の意味での臓器再生の医療になると思っています。

●村上「日本発の再生医療を」

村上 PDGF-BB と  $\beta$ -TCP をミックスした再生材料(GEM21S®)が米国のFDAの製造承認を得て、昨年発売が開始されました。

私としては、サイトカイン単独で本当に臨床的に意味のある歯周組織の再生が誘導できるのかどうかということを知りたいと思いました。それに関していうと、前期II相の治験でFGF-2製剤の投与で臨床的にも意味があると思われるような再生誘導がヒトで確認できました。2007年3月末で後期II相の治験も無事に終了し、いまその解析を行っている状況です。今後の展開についてですが、世界初の「再生

誘導薬」と銘打った薬を歯科医療から発信できれば、たいへん意義深いのではないかと楽しみにしています。

また、われわれは大阪大学医学部附属病院の未来医療センターとの共同研究で、脂肪組織に由来する間葉系幹細胞を使って、歯周組織の再生誘導ができないかと考えています。近未来的にティッシュエンジニアリングの「幹細胞」「足場」「シグナル分子」の3要素のすべてが揃い、うまく融合させることができれば、水平性吸収等にも対応可能な歯周組織再生療法を樹立できるのではないかと期待をもっています。

歯科のいろいろな技術は、日本から発想されるものも多いのですが、最終的な製品は外国から輸入されているという構図が一部ででき上がってしまっているのがすごく残念です。ですから、再生医療はぜひとも日本発で、と思っています。

水上哲也  
(Tetsuya Mizukami)

福岡県開業 水上歯科クリニック  
日本再生歯科フォーラム九州支部長、九州大学歯学部臨床教授

[再生医療とのかかわり] 歯周治療において骨移植、歯間部歯槽骨露出術、GTR、エムドゲイン®など再生的手法を用いた治療を手がけている。またインプラント治療においてもGBRを用いて適応症の拡大を図るとともに審美性の改善に取り組んでいる。





### ●加藤「マーカーが重要なキーワード」

**加藤** 村上先生のサイトカイン療法と、われわれや上田先生の細胞療法には、それぞれ利点と欠点があると思います。

細胞療法の利点としては、大きな組織欠損に対しても有効であることや、将来的にはサイトカイン療法との併用もあると思います。しかも細胞を使った場合は、組織工学の方向に発展することが可能であり、新しい臓器をつくるなどの理想へのステップになりやすい、それが細胞を使う利点かと思います。ですから、サイトカイン療法と細胞療法を2本柱として、臨床および基礎研究を進歩させていかないと、将来の発展へと結びつけにくいのではないかと思います。

細胞療法の欠点としては、ヒトリコンビナイトのタンパクは品質が一定であるのに対して、細胞はその品質が一定ではない点です。つまり、患者さんの個体差や年齢差、血清ロット、培養方法によって、移植用細胞の品質にばらつきがやすいのです。そこで私は患者さんに移植する細胞の品質のばらつきをできるだけ減らしたいと考え、無血清培地を使って実験しているところです。

もう1つは、その細胞が本当に間葉系幹細胞であるかどうか、他の細胞が混入していないかどうか不明である点です。厚生労働省は、移植用細胞の純度と、移植する細胞が目的の細胞であることを何らかのマーカーによって示しなさいという課題を与えています。そこでわれわれは、間葉系幹細胞の分子マーカーを主にDNAマイクロアレイの方法でみつけだして、パッセージ(継代)、個体差、年齢の影響を受けないマーカーを選択し、それらを用いて細胞の品質保証をしたうえで移植したいと考えています。

もう1つの細胞療法の欠点は、リスクは非常に低いものの、細胞が癌化するかもしれない点です。移植用細胞が癌化していないことを100%証明できる方法はないとしても、何らかの検査が必要だと思います。そういうマーカーをいま探求しているところです。

### ●上田「ニーズのない分野はいずれなくなる」

**上田** 私は、歯科の再生医療としては非常に早い時期から研究をスタートしておりまして、1990年代にすでにハワード・グリーン培養表皮のつくり方を学び、臨床応用しました。以降、再生医療の第一世代のグループでティッシュエンジニアリングの分野をずっと担い、大学発ベンチャーのようなものを使いながら実用化という道をひた走ってきました。再生医療の実用化はなかなか難しいのですが、ただ私は歯科の分野ではそれが可能だと考えており、ぜひ歯科を突破口にして将来の臓器の再生医療への道筋をつくりたいと思っています。

いまの私の研究は実用化に向かいやすい研究、たとえば美容や毛髪や爪といったQOL型の医療の研究にシフトしています。また、新しい幹細胞の研究としては、東京大学医科学研究所で歯髄のなかの幹細胞の分離をしています。それと骨の再生医療に関しては治験の準備をしており、J-TEC(ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)がやっと9年目にして培養表皮の承認が得られそうだということです。薬事法の規制のなかで進めるのはかなりの時間と労力が必要だと考えています。

確かに国の規制は緩和の方向を向いていますが、まだまだ足りないという現実があります。国を後押ししてもらいたいのは、やはり開業医の先生の声でして、もっと再生医療に期待を寄せていただいて、声を上げていただくのが一番の応援になるだろうと思います。私はやはり日本発の技術に大きくこだわってみたいと思います。

一研究者としてスタートして、再生医療について産業化まで全体をみるチャンスに恵まれた立場として申し上げるならば、やはり国民の支持を得ていない医療はいずれなくなると考えています。患者さんに安全で有効な手段としての医療が提供できない限り、これは開発する意義もありませんし、やがて廃れてしまいます。ですので、われわれもこの機会に再び原点に戻って、有効な治療法を安全に提供するという希望に戻りたいと思います。

## 4 開業医から研究者への4つの質問

**上田** では、ここで水上先生に開業医の立場から研究者に対して質問していただこうと思います。

**Q1 FGF-2にはどのような効果があるのですか？**

**水上** 村上先生のお話を聞いて、FGF-2の治験もだいぶ進み、もう少しでわれわれ一般開業医も臨床応用できそうだとすごく楽しみにしているところで、FGF-2は、エムドゲイン®と同じ生理活性をもったタンパクですが、基本的にどこが違って、どのような効果が期待できるのでしょうか。

**村上** FGF-2の生理活性としては、線維芽細胞の増殖促進だけでなく血管新生作用が非常に強いこと、幹細胞に対しては多分化能を保持させたまま細胞増殖させるなど、多くの働きがあることがわかっています。また細胞をとりかこむ各種細胞外基質の産生もコントロールすることもわかってきています。

また、治験薬としては、基剤にヒドロキシプロピルセルロースを使っていますが、これは日本では食品添加物として用いられています。そしてこの基剤は安全ではあっても、再生に関しては“何もしない”ことを治験前に確認しています。つまり治験薬により得られた効果はFGF-2の効果であると評価できるのです。もしも近未来的にFGF-2製剤が皆

さんに使ってもらえるような状況になれば、それは作用機序の明確なシグナル分子の1つが歯周治療の分野で使えるようになったことを意味し、歯周治療が大きく発展するチャンスになるのではないかと思います。ですので、まずはFGF-2の安全性と有効性の評価をしっかりとすることが、いま大きな目標になっています。

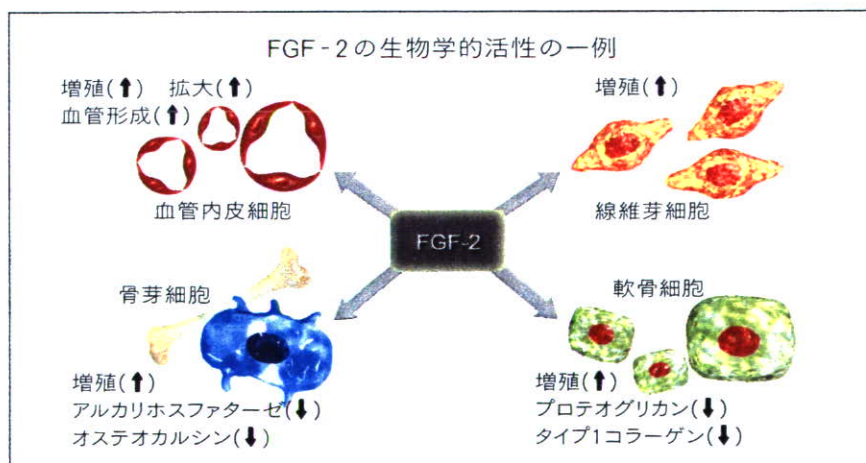
**水上** 足場材との併用効果等の検討などは、その後からということですか。

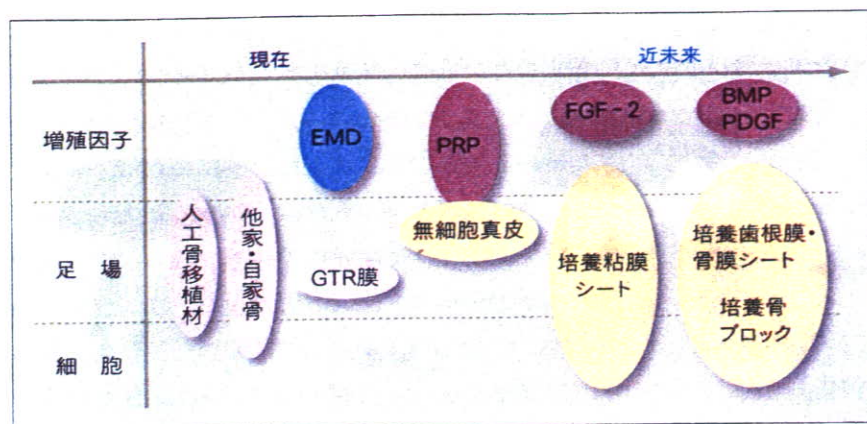
**村上** そうですね。いま動物実験でその点について検討しています。動物実験で根分岐部病変 Class II や2壁・3壁性の骨内欠損に対してはFGF-2の単独投与で対応が可能でしょうが、1壁性のような骨欠損の場合には、スペースメイキングのできる足場材が必要となるでしょう。たとえばβ-TCPとFGF-2をミックスすることで、1壁性のような欠損に対しても、有意な歯周組織再生が誘導できることが動物実験で確認できています。

**Q2 骨にかわりうる肉芽組織とは何ですか？**

**水上** 加藤先生にお聞きしたいのですが、骨にかわりうる肉芽組織とはどういうものですか。

**加藤** 骨にかわりうる肉芽組織とは、間葉系幹細胞





歯周組織再生の現在と未来。各再生材料と再生3要素のかかわりと、応用が可能となる時期の推定を表している。

胞が遊走して集積することのできる組織です。一方、白血球などの炎症細胞の浸潤があまりにも大きい場合は、幹細胞は遊走・集積できないかもしれません。したがって炎症性肉芽細胞は除去したほうがよい。しかし、除去しすぎると今度は再生用の細胞がマイグレーションして来る場を失ってしまう。そこが判断基準だと思います。

**水上** 臨床的にいつも迷うところですので、そのメカニズムを教えていただけると、われわれもたいへんよく理解できます。

### Q3 培養骨は経年的に吸収しないとは本当ですか？

**水上** 骨の再生療法で歯槽堤増大などで骨をつくったときに、その骨が経年的に吸収してなくなっていくという報告がなされるようになっていきます。苦勞して再生させた骨が、5年くらいで収縮してなくなっているというのです。上田先生のお話では、培養骨でつくった骨は経年的に吸収するどころか、むしろ増殖していく方向にあるということですが本当ですか？

**上田** われわれが研究している培養骨は5年半が最長ケースですが、そのケースに関しては吸収はしていません。もちろん4年、3年、2年のケースもありますが、全体をみても、自家骨よりは吸収しないと思います。われわれのところで使った自家骨はほとんど腸骨なので、異所性の骨を移植しているの

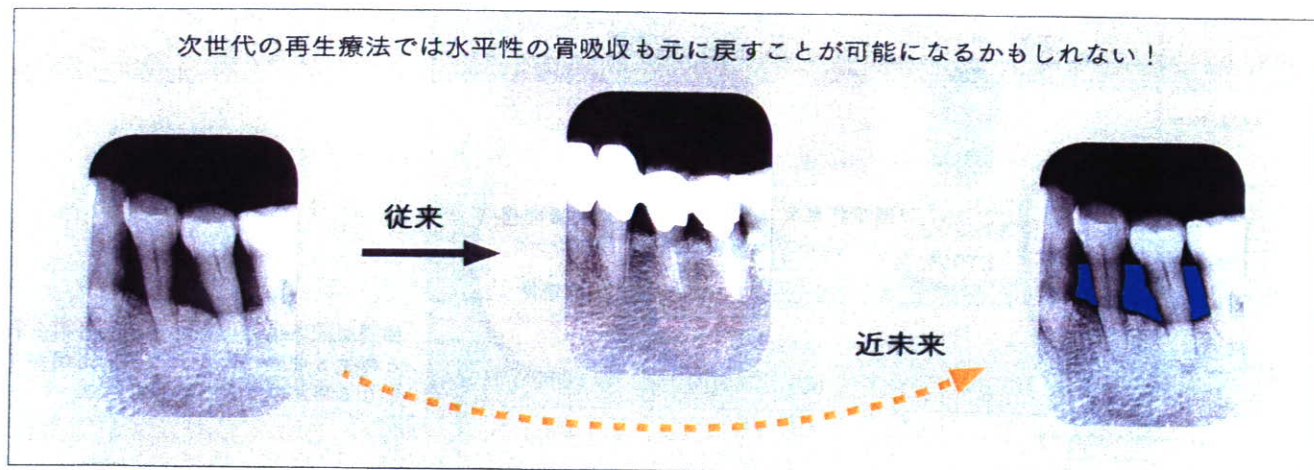
ですが、骨吸収はあまりみられないですね。10年、20年後に吸収していないかどうかはわかりませんが、それは生理的な吸収の範囲だと予測しています。

### Q4 培養による結合組織は実現しますか？

**水上** われわれは軟組織にも期待しています。患者さんのQOLも年々高まっており、たとえば歯ぐきが1本だけ下がってしまってみるとか、見た目が悪いといったときは歯肉移植を行います。その際、その移植片は口蓋を供給側としています。海外ではアロダームという脱灰凍結された人工真皮があります。もし培養によって結合組織を皮膚と同じようにつくることができて、それを一時的に露出歯根の表面に移植してそれが生着すれば、おそらくそれが術者にとっても患者さんにとっても一番よいのではないかと考えるのですが、村上先生はいかがお考えでしょうか。

**村上** 歯周治療の究極のゴールの1つは、歯槽骨が水平性吸収をしてしまい、歯肉退縮が顕著なケースにおいて、歯肉縁の高さをもう一度元に戻してあげることでしょう。もしFGF-2と至適な足場材を併用することにより、その歯肉縁の位置を歯冠側に引き上げてあげるような工夫が近未来的にできると、歯肉退縮したケースに対処できるチャンスがでてくるのではないかと思います。まずは、先行しているGEM21Sが、いかに用いられ、どのよう

次世代の再生療法では水平性の骨吸収も元に戻ることが可能になるかもしれない！



▲このような重度の歯周病の症例が次世代の再生療法により、補綴修復することなく回復できることを期待したい。

な臨床効果を生むのかといった報告が、数年のうちに米国からなされてくるのではないかと思います。

**水上** 現在、臨床家の間では、PRPは治療の促進に効果はあるけれど、骨の再生にはあまり有意に働いていないのではないかとわれははじめました。そのようななか、今度はGEM21Sというもっとリコンビナントされた濃度の高いPDGFを用いた薬がでてきて、治療がたいへん早い。ただ、PRP同様、骨の再生に本当に効果があるのだろうかという議論が、治験を行っている大学のなかででていました。

**加藤** PDGFが幹細胞、MSCの増殖に有意に働くことは確かです。ですが、村上先生が研究されているFGF-2のほうが作用が大きいように思われます。

**水上** ただ単に発生学的な過程をたどるだけではなくて、血管をつくっていくというのは骨の再生にはすごく大事だと思うんです。そういった副次的な作用があるから、治療もすごくよいのではないかと考えています。

**村上** 血管新生は確かに促進します。それから体性幹細胞の数もきっと増すでしょう。また細胞増殖だけではなくて細胞の遊走、すなわち欠損部への移動も促進することが確認されています。また、いくつかの細胞外基質の産生もコントロールしていることがわかってきましたから、種々の細胞が組織再生を果たすのにふさわしいような外部環境を創出するよ

うにFGF-2が働いてくれていると思います。

**水上** すばらしい期待がもてますね。

## おわりに

**上田** 本座談会では、「再生歯科の新たな潮流—再生歯科医療に歯科界の活路を見出せるか—」と題して議論してきました。2008年の3月13日～14日には、愛知県名古屋市で第7回日本再生医療学会が開催され、私が大会長を務めます。学会のテーマの1つの柱が、歯科分科会の設立記念シンポジウムです。歯科分科会が設立されて、1年間の試験期間を経たうえでできれば合流をしたいと思っています。歯科の再生医療が一層活性化して新しい活路を開いてくれるようなものになるように期待しています。





## これだけは知っておきたい再生療法用語解説

ここでは、本座談会で登場する再生療法に関連した用語について、簡単に解説しています。

**赤枠** 再生療法の基本についての用語、**青枠** 細

胞(cell)に関連する用語、**緑枠** 増殖因子(growth factor)に関連する用語、**黄枠** 足場(scaffold)に関連する用語となっています。

### 再生 regeneration

失われた組織・臓器が形態・機能ともに元どおりになること。再建外科、臓器移植と並んで、細胞を利用して生体組織を再生する再生医療が現在注目を浴びている。

### 細胞工学 (ティッシュエンジニアリング、 再生医学) tissue engineering

①「細胞」  
②「増殖(成長)因子」  
③「足場」  
の3つを利用し、組織・臓器を再生する学問。

### 細胞 cell

組織工学の3要素の1つ。胚性幹細胞、骨髄幹細胞、組織幹細胞、組織前駆細胞を用いた組織再生がさかんに研究されている。

### 間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell

自己複製機能と間葉系組織(骨、軟骨、筋、脂肪等)への多分化能を有する体性細胞。口腔領域では類似した細胞として歯髄幹細胞、歯周組織幹細胞の存在が示唆されている。

### 骨髄幹細胞 bone marrow stem cell

骨髄に存在する幹細胞の総称。代表的なものとして血液幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞などがある。歯槽骨・歯周組織の再生医療にも応用されている。

### 胚性幹細胞(ES細胞) embryonic stem cell

受精後5~7日経過した胚のなかにある細胞を取りだして培養し、株化した細胞。半永久的な増殖能と多分化能をもつことから、再生医療の材料として注目されている。

### 増殖因子(成長因子) growth factor

細胞の増殖を促すタンパク。正常な細胞サイクルに必須であり、細胞工学の3要素の1つであるシグナル分子として用いられる。PDGF、VEGF、IGF、EGF、FGF、TGF- $\beta$ 等が代表的な増殖因子である。

**エムドゲイン®**  
emdogain®

幼若ブタ歯胚から主にエナメルタンパクを抽出・精製したものの商品名。フラップ手術時にエムドゲイン®を根面、骨面、歯根膜に塗布することにより、歯周組織再生を促す。

**血小板由来増殖因子**  
platelet derived growth factor :  
PDGF

血小板の $\alpha$ 顆粒に存在する。結合組織、骨の再生・治癒を促進させる。米国で歯周組織再生誘導材料としての臨床試験が終了し、FDAの承認がとられている。

**サイトカイン**  
cytokine

細胞から産生されるタンパクまたはペプチドで、細胞間の情報伝達において局所的仲介物質として作用する。サイトカインと特異的に結合する受容体をもつ細胞に働き、細胞の増殖・分化・機能発現を行う。サイトカインの定義のなかに増殖因子が含まれる。

**線維芽細胞増殖因子**  
fibroblast growth factor : FGF

線維芽細胞の増殖を促進するタンパク。シグナル分子として、細胞増殖、血管新生、形態形成、組織修復など、さまざまなはたらきをもつ。塩基性FGF(FGF-2)が現在国内において臨床試験の段階で、臨床応用が期待されている。

**多血小板血漿**  
platelet rich plasma : PRP

採血した血液を遠心分離することにより、血球層を分離して濃縮した、血小板を含む血漿成分。創傷治癒や骨再生に関与するPDGFやTGF- $\beta$ が濃縮されており、自家のPRPは歯周組織再生治療に臨床応用されている。

**足場**  
scaffold

組織工学の3要素の1つ。組織再生においては、細胞に再生すべき組織の形態を伝え、その細胞の増殖・分化を支持するための足場を供給する必要がある。

**無細胞真皮(アロダーム®)**  
AlloDerm®

ヒトの皮膚から上皮細胞層を除去し、さらに結合組織中の細胞を取り除き、結合組織の間質のみにして、抗原性をなくした無細胞真皮の商品名。歯肉歯槽粘膜(歯周)形成手術、歯肉退縮の処置や付着歯肉付与のために他家(同種)移植材として米国にて臨床使用されている。

**コラーゲン**  
collagen

骨の有機成分の90%以上を占める主要なタンパク。機械的な力が加わる方向に沿って配列し、骨の石灰化結晶の重要な足場を形づくる。また、結晶組成においても重要な成分で、再生治療の足場としても利用されている。

—Mini Review—

## Human Sperm Processing in Assisted Reproduction Technology

Satoru Kaneko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College, 5-11-13 Sugano, Ichikawa, Chiba 272-8513, Japan

**Abstract:** In ART, once ovum is successfully yielded, embryologists have to progress the treatments as arranged regardless of the quality of semen. Sperm qualities are, therefore, the most variable factor in each case. Embryologist is certainly well informed about physiology and genetics of ovum and embryo, it is also essential to study how to evaluate and prepare the sperm according to their physiology.

**Key words:** Human sperm, ART, DNA, Motility

Progress in assisted reproduction technology (ART) has intended to make shortened the distance between the male and female gametes prior to fertilization. Intrauterine insemination (IUI) omits the passage through the cervix artificially, and IVF-ET facilitates the fertilization by incubating the oocyte and the sperm, *in vitro*. The ultimate method, intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI), the distance between the two types of gametes becomes 0 by means of artificial injection. The aim of sperm preparation in ART is to deputize for some of the events which occur in the female genital tract.

### Spermatogenesis

Sperm is the end product of the process of gametogenesis in the male, occurring within the seminiferous tubules of the testes. This involves a series of meiotic divisions of spermatogonial stem cells, two meiotic divisions by spermatocytes, extensive morphological remodeling of the spermatid during spermatogenesis, and the release of the free cell into the lumen of the seminiferous tubule by spermiation. It is an interesting paradox that the process of spermatogenesis produces a cell that is highly differentiated in structure and function, while at the

same time is developmentally totipotent, being able to combine with an egg and thereby begin the process that give rise to a new individual.

### Ejaculate

Many millions of sperm are produced daily in the testes, these are stored in the epididymis and released at regular intervals (ejaculation). The ejaculate once coagulates and liquefies at room temperature after about 10–30 min due to protein splitting enzymes from the prostate. Although the semen contains a variety of components, only the sperm with progressive motility start to penetrate into the cervical mucus and finally a small part of them reach the ampulla of the uterine tube. All the other components such as immotile sperm, bacteria, leucocytes, and the seminal plasma remain in the vagina.

### Sperm DNA

Mammalian sperm has two main components, the head and tail. The head consists of the acrosome, the nucleus and a small amount of cyto-skeletal structures and cytoplasm. The acrosome is a large secretory granule that closely surrounds and overlies the anterior end of the nucleus. The sperm nucleus is haploid, containing only one member of each chromosome pair, and chromatin becomes highly condensed during the latter part of spermatogenesis. The volume of the sperm nucleus is less than that of somatic cells, and its chromatin is highly condensed. The sperm nucleus is unique, both in the amount of DNA present and in the composition of its nucleoproteins. The major nucleoproteins associated with sperm DNA are protamines. These are relatively small (27–65 amino acids) highly basic proteins rich in arginine and cysteine. The highly condensed DNA-protamine

Received: January 21, 2005

Accepted: February 7, 2005



complex is stabilized by disulfide bonds between protamines.

Programmed cell death is recognized as an essential event in morphogenesis as well as normal turnover of cells [1], and it is known as apoptosis, which distinguishes it from necrosis or pathologic cell death [2]. Apoptosis plays important roles in germ cell loss [3]. It is the dominant process during spermatogenesis and is regulated by p53, p21, caspase, bcl2, and Fas expression levels, with many alternative pathways [4]. It is commonly recognized that human ejaculate contains heterogeneous sperm populations, which possess a variety of abnormalities at nuclear, cytoskeletal and organelle levels. To date, numerous authors have reported the existence of sperm with DNA damage, and the rate was increased in severe oligo-asthenozoospermia [5, 6].

### **Quality assurance of human sperm provided for ICSI**

Since ICSI has diminished the quantitative limitation of sperm required for insemination as minimum as possible, it is accepted that most male infertilities can be overcome, except azoospermia. In ICSI, the injection of sperm is regarded as the transplantation of male chromosomes into the oocyte. As described above, the ejaculate has a heterogeneous sperm population. The selection of sperm in ICSI is, however, merely based on motility and gross morphology under a low magnification microscope. There is no proven method for sorting sperm by DNA integrity. The quality assurance of the sperm for the injection, especially the integrity of the DNA structure, is a minimum premise for the clinical application of ICSI in severe male infertility.

To resolve the above issue, three innovative technologies are necessary. First, we need to develop some methods to measure nuclear damage at multiple levels such as chromosome, gene and DNA structures in individual human sperm with high detection sensitivity. Second, the sperm, which possess DNA damage prior to ejaculation, have to be eliminated by means of the *in vitro* processing, and post-ejaculate DNA degradations have to be reduced to the minimum.

### **Significance of human sperm preparation in ART**

During migration in the female genital tract, the sperm is selected and undergoes various physiological changes to achieve fertilization. The aim of sperm

selection in ART is to synthesize these events by the *in vitro* processing. The ejaculate is polluted with bacteria during passage through the urethral orifice. Bacteria should be sterilized by the addition of antibiotics to the suspension or separated physically according to the differences in their apparent densities. After centrifugation, the sediment (sperm) is often recovered by aspirating the supernatant with a Pasteur pipette. In this way, a part of the supernatant adhering to inner surface of the tube descends, and the sediment is re-polluted with bacteria.

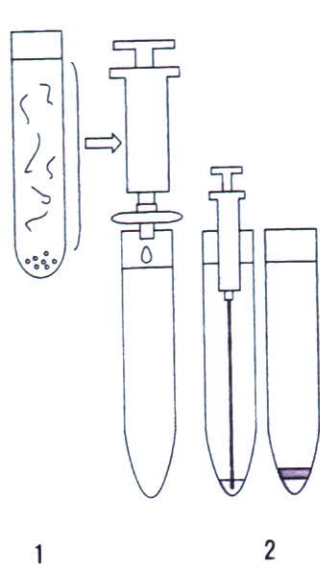
The ejaculate includes not only the sperm but also a variety of debris such as fine urethral calculus, mucinous gel, fibers of under wear, etc. Bacterial colonies are often observed on the surface of debris. The density gradient centrifugation technique is capable of separating free bacteria in the ejaculate, whereas those adhering to the debris are recovered in the sediment. After liquefaction, a small number of sperm with progressive motility start to penetrate into the cervical mucus, and all other components remain in the vagina.

To date, various procedures for sperm preparation have been reported [7–10]. Figures 1 and 2 show sperm preparation procedure to exclude debris in the ejaculate and for selecting the sperm with progressive motility. Prior to centrifugation, the debris has to be excluded by means of unit gravity sedimentation and subsequent filtration (ART filter, Nipro, Japan). The resulting suspension is condensed by the cushion method. Then the concentrated fraction is loaded on 5.0 ml of 90% Percoll in a separable fine neck tube (SFNT, Nipro, Japan), which is squeezed at the bottom to make the volume of sediment as small as possible. The linear density gradient is created by slow rotation, and centrifuged at 400x g for 30 min. To recover the sperm precipitated in the bottom of the tube, the top of the tube is plugged with a rubber cap, and the middle of the squeezed bottom is snapped off to avoid recontamination of the sediment by the seminal plasma and bacteria.

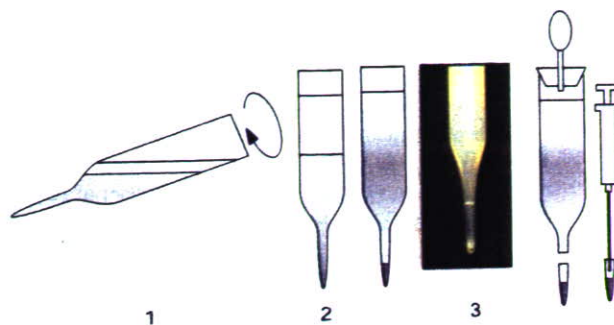
The motile sperm are separated by the modified swim-up method. The motile sperm are allowed to swim-up at 37°C, and the upper layer containing swim-up sperm is collected.

### **Observation of DNA fragmentation in human sperm**

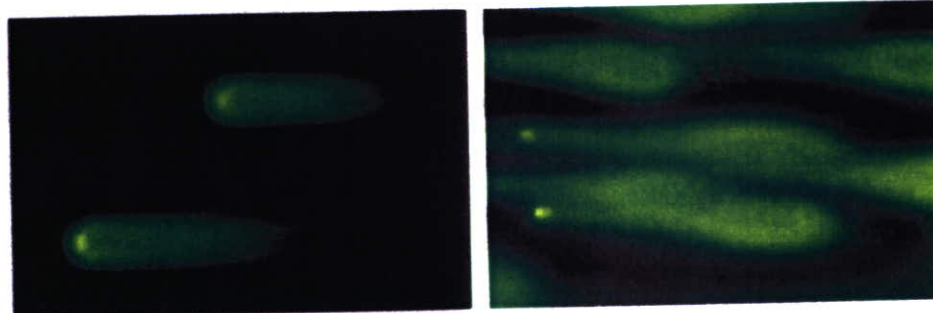
To observe DNA fragmentation in individual sperm, we employ single cell gel electrophoresis. The sperm is



**Fig. 1.** Semen pretreatment prior to centrifugation. 1. Dilute semen and allow to precipitate debris. 2. Filtrate the suspension, introduce 0.1 ml Percoll to the bottom of the tube, then centrifuge (cushion method), then centrifuge.



**Fig. 2.** Sperm fractionation in the continuous density gradient of Percoll. 1. Isotonic 90% Percoll (5.0 ml) was placed in a centrifuge tube; 1.0 ml of Hanks solution is loaded and a linear density gradient is formed by slow rotation. 2. The sperm re-suspension is layered, then centrifuged at 400 xg for 30 min. 3. The end of the test tube is cut off to recover the sediment. 4. The sperm suspension is introduced into the bottom of the culture medium to swim up. 5. Recover of swum-up sperm.



**Fig. 3.** Electrophoretogram of human sperm. Left: sperm with DNA integrity, Right: sperm with fragmented DNA.

suspended in melted agarose, and a thin layer is formed on the surface derivatized glass slide. The disseminated cells are lysed with some detergent and proteinase (trypsin). Electrophoresis is performed at pH 8.4 for 10 min (2.0 V/cm voltage gradient). Figure 3 shows the electrophoretogram of human sperm. Intact sperm gives continuous DNA fibers from the origin (left photo). On the other hand, sperm with DNA fragmentation gave elongated granular particles.

### Conclusion

The essence of ART is transplantation of the male

chromosomes into the oocyte. Quality assurance of the sperm chromosome is, therefore, essential in not only ICSI, but also the other insemination techniques. Microscopic measurements of sperm concentration, motility and morphology may describe some aspects of the function, whereas the predictive value of these measurements is limited, even though some progress has been made in recent years by the developments of the computer assisted sperm motility analyzer. In future, some molecular biological examinations of the sperm function, especially DNA integrity may play important role for the infertile therapy.

### References

- 1) Clarke, P.G.H. (1990): Developmental cell death. Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.*, 181, 195-213.
- 2) Eastman, A. (1993): Apoptosis: A product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 121, 161-164.
- 3) Roosen-Runge, E.C. (1973): Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *Reprod. Fertil.*, 35, 339-348.
- 4) Sinha Hikim, A.P. and Swerdloff, R.S. (1999): Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev. Reprod.*, 4, 38-47.
- 5) Sun, J.G., Jurisicova, A. and Casper, R.F. (1997): Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.*, 56, 602-607.
- 6) Morris, I.D., Iltott, S., Dixon, I. and Brison, D.R. (2002): The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reprod.*, 17, 990-998.
- 7) Kaneko, S., Oshio, S., Kobanawa, K., Kobayashi, T., Mhori, H. and Iizuka, R. (1986): Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn. *Biol. Reprod.*, 35, 1059-1063.
- 8) Kaneko, S., Sato, H., Kobanawa, K., Oshio, S., Kobayashi, T. and Iizuka, R. (1987): Continuous-step density gradient centrifugation for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen. *Arch. Androl.*, 19, 75-84.
- 9) Sato, H., Kaneko, S., Kobayashi, T. and Iizuka, R. (1990): Improved semen quality following a continuous-step density gradient centrifugation: its application in artificial insemination and pregnancy outcome. *Arch. Androl.*, 24, 87-93.
- 10) Kaneko, S., Kobayashi, T., Oda, T., Ohno, T. and Iizuka, R. (1990): Isolation of progressively motile sperm from poor quality human semen by the modified swim down procedure. *Arch. Androl.*, 24, 81-86.

# Serum-Free Spheroid Culture of Mouse Corneal Keratocytes

Satoru Yoshida,<sup>1,2</sup> Shigeto Shimmura,<sup>1,3</sup> Jun Shimazaki,<sup>3</sup> Naoshi Shinozaki,<sup>1</sup> and Kazuo Tsubota<sup>1,3,4</sup>

**PURPOSE.** To develop a serum-free mass culture system for mouse keratocytes.

**METHODS.** Corneas of C57BL6/J mice were enzyme digested after the epithelium and endothelium were removed. Stromal cells were cultured in serum-free DMEM/F12 (1:1) containing epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor 2 (FGF2), and B27 supplement. Primary spheres were dissociated by trypsin and subcultured as suspended secondary spheres. Cells from postnatal day (P)6 to P10 spheres were subcultured onto plastic dishes or type I collagen gels for phenotype analysis. The expression of the keratocyte markers keratocan, aldehyde dehydrogenase (Aldh), and CD34, were analyzed by RT-PCR, and vimentin and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) were examined by immunocytochemistry.

**RESULTS.** Primary keratocytes formed spheres, which were cultured for over 12 passages. Suspended sphere cells expressed vimentin, keratocan, CD34, and lumican, but were negative for cytokeratin K12 (K12) and Pax6. Sphere cells subcultured on plastic exhibited a dendritic morphology characteristic of keratocytes, and maintained keratocan, Aldh, and CD34 expression in serum-free medium. Sphere cells subcultured with 10% serum became fibroblastic, and expressed  $\alpha$ -SMA when stimulated by transforming growth factor (TGF)- $\beta$ .  $\alpha$ -SMA-positive cells demonstrated contractile properties on collagen gels, compatible with the myofibroblast phenotype.

**CONCLUSIONS.** The phenotype of mouse keratocytes can be maintained in vitro for more than 12 passages by the serum-free sphere culturing technique. (*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:1653-1658) DOI:10.1167/iovs.04-1405

The corneal stroma is characterized by a well-organized extracellular matrix consisting of a dense network of collagen fibrils and proteoglycans that are produced by keratocytes, the principal stromal mesenchymal cell of cranial neural crest origin.<sup>1,2</sup> In adult tissue, keratocytes are mitotically quiescent cells with a flat, dendritic morphology. Keratocytes form a three-dimensional network of cells through their extensive dendritic processes, linked via gap junctions,<sup>3-10</sup> and secrete collagens and keratan sulfate proteoglycans such as lu-

mican, mimecan, and keratocan.<sup>11-15</sup> The corneal stroma is rich in total keratan sulfate proteoglycan content,<sup>16</sup> but contain relatively small amounts of dermatan sulfate proteoglycans.<sup>17</sup>

During corneal wound healing, the quiescent keratocytes are activated and transform into fibroblasts and/or myofibroblasts, losing their characteristic dendritic morphology. Keratan sulfate proteoglycans are downregulated,<sup>11,18</sup> whereas keratocytes proliferate and migrate to the site of injury, causing scar formation.<sup>19-22</sup> The conversion to myofibroblasts, characterized by intense expression of the contractile protein  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA),<sup>21,23,24</sup> is induced by endogenous and exogenous transforming growth factor (TGF)- $\beta$ .<sup>25-27</sup>

Ex vivo expansion of keratocytes is often performed to investigate keratocytes in vitro, and various culture techniques have been reported involving the use of plastic substrates. However, when cultured in serum-containing medium, collagenase-isolated keratocytes from bovine<sup>28</sup> and rabbit<sup>27,29</sup> corneas readily lose their in vivo quiescent phenotype and acquire a fibroblastic phenotype with altered physiological properties.<sup>28,30,31</sup> In the presence of 2% to 10% serum, keratan sulfate proteoglycan production is greatly reduced or absent in keratocyte-derived fibroblasts,<sup>28,32,33</sup> whereas production of dermatan sulfate proteoglycans is upregulated. Furthermore, TGF- $\beta$  stimulation or culture at low densities<sup>30</sup> causes corneal fibroblasts to differentiate further into myofibroblasts with a more spread-out morphology.<sup>26,29,32,34</sup> Serum-free cultures have been reported to be effective in the maintenance of the dendritic morphology of keratocytes and the production of keratan sulfate proteoglycans.<sup>27,28,30-33,35,36</sup> However, the cultivation of a large quantity of cells by subculturing has been difficult.

In this report, we introduce our method for subculturing mouse corneal keratocytes in large quantities, using a modified version of a suspension culture method originally described for neural stem cells.<sup>37-39</sup> In our study, the sphere culture of keratocytes did not require serum, and the dendritic keratocyte phenotype was restored when subcultured on plastic substrate in serum-free medium.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

All animals were handled in full accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Stromal cells were dissociated from adult C57BL6/J mice (7-8 weeks old) and then cultured as described previously<sup>40</sup> with modifications. In brief, cornea tissue was excised in Hanks' balanced salt solution (HBSS) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) by circular incision outside the limbus. The iris, ciliary body, and Descemet's membrane including the endothelium were bluntly dissected from the cornea. The remaining stroma with epithelium was incubated in 5 mg/mL of Dispase II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) at 4°C overnight. Loose epithelial sheets were then removed, and corneal stromal discs were cut into small segments and digested in 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 30 minutes at 37°C, followed by 78 U/mL

From the <sup>1</sup>Cornea Center and the <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College, Chiba, Japan; <sup>2</sup>SEED Co., Ltd, Tokyo, Japan; and the <sup>4</sup>Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

Supported in part by a grant for Advanced and Innovative Research Program in Life Sciences from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

Submitted for publication December 2, 2004; revised January 25, 2005; accepted January 26, 2005.

Disclosure: S. Yoshida, Seed Co., Ltd. (E); S. Shimmura, None; J. Shimazaki, None; N. Shinozaki, None; K. Tsubota, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Shigeto Shimmura, Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College, 5-11-13 Sugano, Ichikawa 272-8513, Japan; shimmura@tdc.ac.jp.