

200706021A

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

再生医療の実用化の安全性・効率性に関する基盤技術の整備に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 上田 実

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
再生医療の実用化の安全性・効率性に関する基盤技術の整備-----	1
上田 実	
II. 分担研究報告	
1. 自動培養装置および安全性評価機能を備えた細胞供給システムの開発-----	19
各務 秀明	
2. 画像処理技術を用いた培養細胞の評価法の開発-----	27
紀ノ岡正博	
3. 情報処理理論を用いた細胞培養の効率化-----	29
本多 裕之	
4. 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-----	33
木全 弘治	
5. 自動培養装置の開発・初代培養細胞の網羅的遺伝子解析-----	37
鈴木 力	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表・別刷-----	40

研究要旨

培養細胞を用いた初めての臨床例が報告されて以来約20年が経過し、臓器移植や人工材料による治療に代わる新たな医療として、培養細胞を用いた再生治療には大きな期待が寄せられている。治療対象や症例数はますます広がる傾向にあり、一部はすでに臨床研究から実用化の段階に達しているが、その反面安全性や製品の品質管理に関する基礎研究は必ずしも十分とはいえない。本研究は、再生医療に必要とされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術の確立をめざすものである。本年度は第1の課題である安全性について、特に血清の影響と無血清培地に関する検討を行なった。また、品質の確保に関する検討として、培養組織製品の極小部分をサンプリングして質的に観察評価を行う、弱侵襲的評価法の開発を行った。また、角化細胞の残存ダブリング数を予測するモデル構築を行った。これは、再生医療において重要な品質である残存ダブリング数を、形態情報だけから予測できるかの検討である。一方、品質の確保には培養細胞の分化誘導法の開発と再生組織の形態制御が大きな課題である。本年度は、ニワトリ未分化肢芽における四肢の軟骨パターン形態の形成について、マトリックス分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカンの時空間的な発現がFGFの発現と活性の調節因子として作用して一定の軟骨形態パターンが形成されることを明らかにした。効率化については、これまで開発してきた自動培養装置の評価を行い、長期無人操作がコンタミネーション無しで行うことができたことや得られた細胞の機能評価から、本研究を通じて開発された培養装置の有用性が示された。

分担研究者

各務 秀明 名古屋大学医学部組織工学講座
助教授

紀ノ岡正博 大阪大学大学院基礎工学研究
科・化学工学領域 助教授

本多 裕之 名古屋大学大学院工学研究科生
物機能工学専攻生物プロセス工学講座 教授

木全弘治 愛知医科大学分子医科学研究所
教授

鈴木 力 株式会社日立メディコ 主任技師

生した場合には、これまで以上の大きなインパクトを与えることが予想され、感染防止など再生医療の安全性の確保は、まさに待つことのできない課題と考えられる。

一方、臨床応用が進められる中で新たに理解されてきた問題もある。実際の臨床で対象となる患者はさまざまな背景を持ち、採取可能な細胞や組織も動物実験ほどには均一にすることができない。われわれが臨床で経験する細胞培養の過程でも、増殖能や、形態に個体差が見られることがあるが、これらの変化をどの程度許容できるのか、あるいはどのように評価すべきなのかといった報告はない。したがって、増殖能や形態に見られる差位と細胞生物学的な特徴、そして治療効果とを結びつける研究の必要性が痛感される。本申請では培養細胞の品質確保のためにこれら基礎的研究を行う。

現在行われている細胞培養操作は人手に頼っており、さらに安全性確保のために高額な施設と管理のための膨大な労力が必要とされて

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療に必要とされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術を確立することである。

再生医療の対象患者はますます増加しており、対象疾患もいわゆるlife threatening diseasesから日常的な疾患まで拡大されつつある。したがって、細胞を用いた治療に問題が発

いる。そのため、再生医療は高額な医療とならざるを得ない現実があり、現在のシステムのままでは高額な医療費を負担できる一部の患者のための医療となることが懸念される。しかしながら、将来は疾患によっては再生医療以外に治療方法がないといった場合も想定され、特殊な治療を除いては、より多くの患者が再生医療の恩恵を受けられるようになるべきである。本研究では、安全性を確保しつつも効率的な培養方法の開発を行い、治療コストの削減を目指す。

本研究を通じて安全性や品質管理において現時点で考え得る最良の手段を提供することにより、今後広く臨床応用され、実用化されるであろう再生医療、あるいは細胞治療に対し、科学的な根拠をもって評価がなされるものと期待される。また、この情報を効率的な培養システムの開発と組み合わせることで、はじめて再生医療が多くの国民の健康に奉仕するものになるものになると考えている。

B. 研究方法

・無血清培養および自己血清を用いた培養システムの開発

これまでの予備的実験から、一部の無血清培地は、わずかながら動物由来の成分を含んでいた。しかしながら、安全性を考慮すれば、現時点では動物由来成分を全く含まない新たな無血清培地が望まれる。しかしながら、実際に再生医療にこのような無血清培養は採用されておらず、増殖能や細胞のキャラクターなどの基礎的検討を行う。一方、安全性確保のためには、動物由来ではなく自己の血清を用いた培養も重要な選択肢であるが、個々の患者においてばらつきのある自己血清を用いて、どの程度安定して細胞培養が可能かについては十分なデータがない。

本研究では、ボランティアより同意を得て採取した骨髄由来細胞、および細胞バンクや購入可能なさまざまな細胞系列を用いて、それぞれの細胞の表面抗原の違いをFACSを用いて解析した。次に、培養された骨髄由来間質細胞 (BMSCs) の遺伝子発現について、骨関連遺伝子を中心としてRT-PCRを用いて検討した。

次に、これらの細胞に対する血清の影響について検討を行なった。特に、血清濃度や血清の種類は分化誘導に与える影響について検索した。また、血清を含まず、動物由来成分を含まない新たな幹細胞用培地の提供をうけ、ヒト由来BMSCsの細胞増殖と分化誘導について検討を行ない、さらにFACSにて表面抗原の違いについて検討を行なった。

・動的 (あるいは準静的) および静的細胞診断技術の開発

動的評価では、培養中に細胞を破壊することなく評価可能であり、再生医療に適している。すべての培養細胞を調べることが可能であるばかりでなく、評価して安全性を確認した細胞を移植することができる。しかしながら、細胞の動きを定量的に評価する研究は十分ではない。本研究課題では、画像処理技術を用いた細胞モニタリング法を利用して、培養中に細胞の増殖曲線、細胞面積、外部刺激に対する細胞面積変化、回転運動等を評価するこの画像情報を機能的評価の結果と対比させることで、培養細胞の分化度や機能異常を検知することを目標とする。

蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法の構築

乳腺上皮細胞シートを、TOPROおよび抗ki-67抗体にて、全核ならびに増殖細胞核を蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて、シート内細胞密度 (X_t)、増殖細胞密度 (X_p) を立体的に算出する手法を開発する。算出には、取得立体画像を、市販のImage Pro Plusにて画像処理を行った。

残存ダブリング数の予測モデル構築のための画像処理手技の開発

角化細胞の増殖形態は、昨年度に画像処理手技を確立した線維芽細胞とは異なり、敷石状の小さい細胞がコロニーを形成しながら増殖するものである。このため細胞と細胞は、線維芽細胞よりも常に密接した状態にあり、コロニー

としての細胞集塊の特徴も重要であることが考えられた。このため、我々は細胞を1個1個認識させるだけではなく、コロニーとしての細胞集塊の特徴量をも画像から取得する画像処理方法を確立した。

残存ダブリング数の予測モデルの比較と有効性を検証

残存ダブリング数の予測のため、従来様々な生物情報処理に用いられてきていた(1)主成分分析(PCA)、(2)重回帰分析(MRA)、(3)我々の開発したツールであるFuzzy Neural Network(FNN)の3手法に関して、多変量を用いたモデルとして比較した。

入力項目としては、各画像から得られる細胞形態の特徴量(22指標)と、継代培養期間中の形態情報の変化量を含む134指標を用いてモデル構築を行った。

・効率的分化誘導法および再生組織の形態維持に関する基礎的検討

ヘパラン硫酸のO-硫酸化は、2-O-硫酸転移酵素(HS2ST)、6-O-硫酸転移酵素(HS6ST)、3-O-硫酸転移酵素(HS3ST)の特異的な硫酸転移酵素群によって行われるから、これらのO-硫酸転移酵素活性によるヘパラン硫酸鎖の硫酸化パターンが細胞増殖因子の局在を制御しているものと考えられる。ニワトリ胚では、HS2STとHS6ST-1、-2が発生中の肢芽に部位特異的に発現されていることを見出している。肢芽形成前の揺籃2日卵のニワトリ胚(Stage 13-14)に空気孔部分の卵殻を破って接近し、予定翼芽領域へHS2STやHS6STのsiRNAを導入した。(HSST cDNAを基に合成したRNA 2重鎖をRNaseIII消化したものをエレクトロポレーションによりターゲットに遺伝子導入の効率と導入部位確認のコントロールであるGFP発現ベクターと共に注入後に15Vで3回パルスで細胞内導入し、それらの発現抑制(ノックダウン)を行った。パラフィンで被い、時間を追って観

察した。肢芽形成に大きく関与する因子として、FGF-10、FGF-8、ソニックヘッジホッグ(Shh)発現についてwhole mount in situ hybridizationや組織切片上のin situ hybridizationを常法に従って行った。ヘパラン硫酸糖鎖の組成変化をin situ FGF-2 binding assayや免疫組織化学で確認した。増殖因子からのシグナルの変化をERKとAktのリン酸化を特異抗体組織染色と組織抽出物のWestern blot解析で評価した。

・効率的培養法の開発

現在再生治療に用いる細胞は、ほとんどが手作業で培養されているが、ヒューマンエラーによるコンタミネーションなどの問題がある。また、技術者の勘にたよる部分が多く、産業化の障害となっている。申請者らはこれまで完全閉鎖系の自動培養装置の開発を行っており、動的評価システムや情報処理理論と組み合わせることにより、安全で効率的な細胞培養システムの構築を行う。

自動培養装置を用いたMSCの培養と分化誘導

開発した自動培養装置を用い、PCからの遠隔操作を行いながら、ヒト骨髄由来のMSCを用いた培養を行った。培養行程は、初期培養を10日間に設定し、10日目にトリプシンで細胞を剥離し均一に再播種した後、4日間培養後に分化培地を投入して骨分化を誘導した。培地交換頻度は1週間に1度とした。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、組織採取を行う場合、治療(手術時)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。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会および東京大学医学研究所倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。また、動物実験につ

いては名古屋大学動物実験指針に基づき、学内動物実験委員会にて承認された内容を遵守して行った。

C. 研究結果

昨年度の報告にて、臨床研究で培養された患者由来BMSCsの個体差についての報告を行なった。自己血清による培養は可能であったが、細胞数およびALP活性には大きな差が認められた(図1)。これらの症例全例で骨再生を認め、インプラントの埋入が可能であったことから、骨再生への影響は明らかではない。しかしながら、安定して効率的な骨再生法の確立には、得られる細胞が一定の増殖と活性を持つことが必須と考えられる。したがって、本年度の研究として、BMSCsの個体差について詳細な検討を行なった。

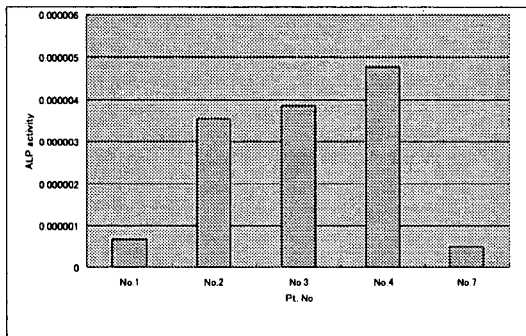


図1. 自己血清による間葉系幹細胞の培養。ALP活性の比較。ALP活性には、細胞数同様最大8倍程度のばらつきが見られた。

はじめに、さまざまな由来のBMSCsを用いて、FACSにより細胞の表面抗原の解析を行なった(図2)。用いた細胞は実験用として購入可能なヒトMSC、Riken細胞バンク由来のMSC、健康なボランティアの骨髄由来BMSCs2種類である。ボランティア由来のBMSCsについては、臨床研究同様の培養法を用いた。

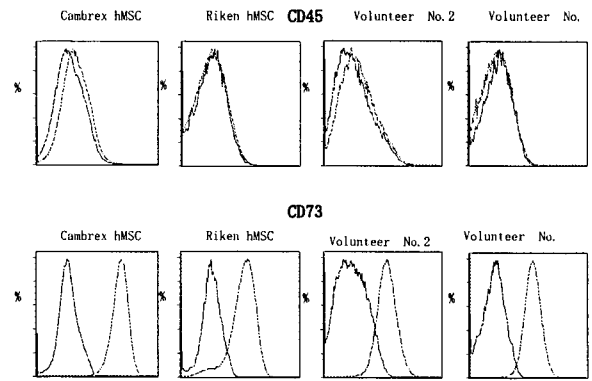


図2. FACSによる細胞表面抗原の解析(CD45, CD73).

培養細胞の表面抗原は、その由来に係わらずほぼ一定であり、継代による変化もわずかであった。このことから、培養される細胞のpopulationは、患者に係わらずほぼ一定していると考えられる。差が見られた部分はCD14, CD34そしてCD106であった(図3)。

<p>Cambrex hMSCs passage 5</p> <p>CD3⁺, CD10⁺, CD14^{int}*, CD19⁺, CD29⁺, CD34^{low}, CD45⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁺, CD146⁺, HLA-ABC⁺, HLA-D^R</p>
<p>Riken hMSCs passage 4 (HMS0052: passage 2)</p> <p>CD3⁺, CD10⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁺, CD146⁺, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁺</p>
<p>Volunteer No. 2 hBMSCs passage 3</p> <p>CD3⁺, CD10⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD29⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁺, CD146⁺, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁺</p>
<p>Volunteer No. 3 hBMSCs passage 3</p> <p>CD3⁺, CD10⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁺, CD146⁺, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁺</p>

図3. FACS解析結果のまとめ(赤は差あり)

次に、さまざまな系列のBMSCsを用いて、骨

関連マーカーの発現を検討した。臨床で見られるBMSCsには、形態的にはさまざまな分化段階の細胞が認められる。また、個人差があるようにも思われるが、臨床研究で認めたALP活性の差が、もともとの細胞の分化度の差や分化度の異なる細胞の混在による可能性が考えられるため、さまざまな細胞系列を用いて、骨関連マーカーの発現をRT-PCRにて調べた（図4）。

RT-PCRによる骨関連遺伝子の発現

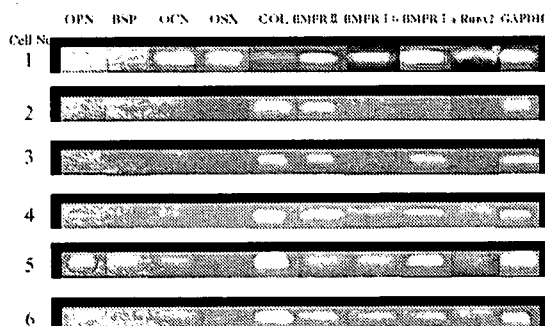


図4. 各細胞系列における骨関連遺伝子発現の解析

驚くことに、臨床に用いられるBMSCsでは、分化誘導前から多くの細胞系列でさまざまな分化マーカーの発現が認められた（図4）。しかしながら、分化マーカーの発現には個体差があり、すでに分化傾向にある細胞を含む細胞系列と、比較的未分化な細胞が中心である系列との差があることが示された。臨床研究で見られたALP活性の差は、分化誘導刺激への反応性のみならず、分化誘導前の細胞に、実際にはさまざまな分化度の細胞が混在している事実を示しているものと考えられる。したがって、安定した骨再生のためには、培養中に細胞の分化度を一定に保つための培地等の工夫が必要と考えられた。

骨再生の臨床では、通常1継代あるいは2継代目の細胞が用いられており、経験的には継代数の増加は骨再生に影響を与えることが知られている。しかしながら、具体的にどの継代（P

DL）の細胞まで用いることができるかについては十分な根拠が示されていない。臨床では再生する組織の量により、必要な細胞数は異なる。したがって、継代数も異なる可能性があるが、どの程度の培養や継代が可能かについては、十分理解されていない。そこで、本研究では、第1継代培養から第5継代までの細胞のALP活性、および骨形成能の比較検討を行なった。本研究により骨再生能の継時的変化を知るとともに、安定した骨再生を得るための諸条件を明らかにすることを目的とした。

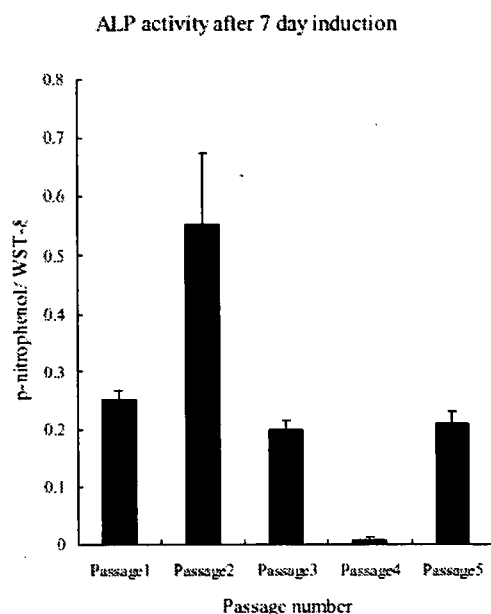


図5. 継代によるBMSCsのALP活性の変化。（1週間骨分化培地にて培養）

個体差はあるものの、およそ第2継代の細胞がもっとも高いALP活性を示し、第1および第3以降では下降する傾向であった（図5）。第1継代では細胞は比較的未分化な状態であり、第3継代以降では、非誘導活性が低下するものと推測された。

次に、このALP活性の変化が実際の骨形成能に対する影響を調べるために、各継代の細胞を担体に播種し、ヌードマウスの皮下に移植して、異所性の骨形成能の違いを検討した（図6）。

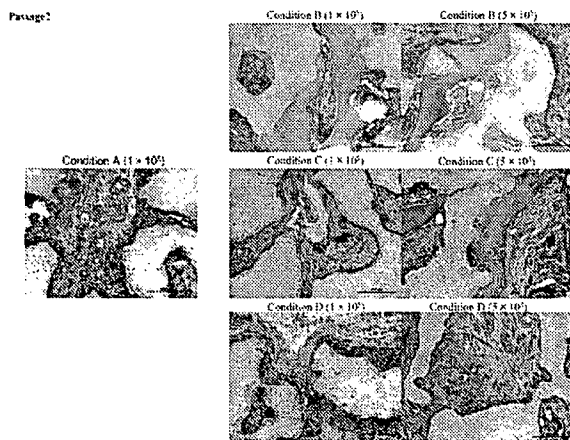


図6. 第2継代の細胞による骨再生。移植条件により差を認めるものの、移植後4週にて骨再生が認められた。

異所性に骨を形成する能力は継代とともに失われ、またin vitroでのALP活性と良く対応していた(図7)。また、同じ継代数であっても、移植条件によっては骨再生能を示さないなど、BMSCsによる骨再生には、至適条件を確保する必要があると考えられた。異所性の骨再生は、ほとんど第2継代(細胞や分化誘導条件によっては第1および第2継代)に限局しており、継代により失われることが示された。

Rate of bone regeneration (new bone containing transplants/ total transplants)

		Condition A	Condition B	Condition C	Condition D
Passage 1	1 x 10 ⁵	0/2	0/1	0/1	0/1
	5 x 10 ⁵	0/0	0/1	0/1	0/1
Passage 2	1 x 10 ⁵	0/3	1/2	0/2	0/2
	5 x 10 ⁵	0/6	1/1	1/1	0/2
Passage 3	1 x 10 ⁵	0/1	0/1	0/1	0/1
	5 x 10 ⁵	0/1	0/1	0/1	0/1
Passage 4	1 x 10 ⁵	0/3	0/2	0/2	0/2
	5 x 10 ⁵	0/0	0/1	0/1	0/1
Passage 5	1 x 10 ⁵	0/2	0/2	0/2	0/2
	5 x 10 ⁵	0/1	0/1	0/1	0/1

図7. 継代数がBMSCsの骨形成能に及ぼす影響。この細胞では、第2継代の細胞にのみ骨形成能が認められた(1週間の分化誘導後)。

・ 無血清培地によるBMSCs培養の評価

新たに開発された動物由来成分を全く含ま

ない無血清培地を用いてBMSCsの初代培養を行ない、細胞の形態と増殖の比較を行なった。

ヒトBMSCsにおいては、無血清培地でも通常の培地であるα-MEM+血清と同様のコロニー形成を認め、細胞の増殖もほぼ同様であった。特に、用いた無血清培地は動物由来成分を含まない培地であり、次世代の培地といえる。この培地にて、通常培地と遜色ないコロニー形成と増殖を示したことは、有望な結果であった。しかしながら、継代後において、細胞の増殖は無血清培地では遅くなり、形態にも明らかな変化を認めた。

無血清培地による培養細胞は、紡錘形であり、培養期間が長くなっても多角形は示さず、石灰化noduleの形成も認めなかった。一方、血清入り培地で培養された細胞は、継代後には徐々に多角形を示し、一部は分化したと思われる細胞が存在した。増殖については、初代培養時は無血清培地、血清入り培地ともほぼ同等であったが、継代後は血清入り培地と比較して、無血清培地における増殖は緩やかであった。

異なる培地の評価のためには、初代培養よりそれぞれの培地で培養を行なうことが重要と考えられる。今回学内倫理委員会の承認とボランティアからの採取が可能となったため、同時に異なる培地での培養を行ない、得られた細胞の表面抗原の解析を行なうことが可能であった。得られた細胞は、CD45(-)、CD73(+)で、いわゆる間葉系幹細胞の表面抗原のプロファイルと一致していた。表面抗原の詳細な検討からは、BMSCsはmixed populationであり、CD105、CD90などの陽性率はサンプルにより異なる。しかしながら血球系のマーカーであるCD34は常に(-)である。しかしながら、今回無血清培地にて培養されたBMSCsでは、一部のCD34陽性細胞が見られた。

現時点では、培地により異なる細胞分画が選

扱われたのか、あるいは培地により細胞の表面抗原の発現が変化したのかは明らかではない。いずれにせよ、形態の変化を考えると、無血清培地により培養された細胞と、通常血清入り培地で培養された細胞とでは、質的な変化があることが推測される。

・血清が細胞の骨分化に及ぼす影響について

次に、それぞれの血清で培養された細胞のALP活性について検討を行なった。無血清培地では、血清入りの通常培地と比較して、分化誘導前のALP活性が極めて低く、未分化な状態が維持されている可能性が示された。一方、15日間の分化誘導では、ALP活性の上昇が認められなかった。一方通常デキサメタゾンによる骨分化誘導培地では、分化誘導前と比較して、約1.5%のALP活性の上昇を認めた。また、分化誘導前の状態でも、一定のALP活性を示したことから、培地に含まれる血清成分により、分化誘導前の状態でも一定の分化細胞の存在が示唆された。

次に、血清が培養細胞の分化誘導に与える影響について検討を行なった。BMSCsに対して、デキサメタゾンを含む骨分化誘導培地にて7日間分化誘導を行なった。血清濃度が上がるにつれ、細胞増殖は促進されたが、ALP活性は1%~2%の低血清でもっとも上昇した。一方、血清濃度が上がるにつれて、ALP活性は下がる傾向であった。

次に、BMP-2による分化誘導についても、さまざまな血清濃度にて検討した。血清濃度が2%で最大のALP活性を示したが、5%以上10%でもALP活性に変化はみとめなかった。

以上から、BMP-2による分化誘導は、血清濃度の影響を受けることが示唆されるが、通常使用する血清濃度では大きな低血清ほど有効であると考えられるが、その一方で、BMP-2による分化誘導は、血清の種類による影響を大きく受けることが明らかとなった。

同一患者から培養された細胞をグループ分けし、それぞれに対して異なる血清を用いた培養液で培養し、同一の分化誘導刺激を与えた。その結果、血清により分化誘導の結果には違いがあることが明らかとなった。特に、BMP-2など増殖因子を用いた分化誘導では、血清に含まれる成分の違いにより、antagonistの誘導を起す可能性が示唆された。それを明らかにするために、分化誘導の得られなかった細胞と血清の組み合わせを用いて、BMP-2のantagonistであるnogginとfollistatinの発現をリアルタイムPCRにて定量的に測定を行なった。

リアルタイムPCRでは、BMP-2の添加によりnogginの発現が誘導されるが、follistatinの発現は誘導されなかった。その一方、分化誘導する前の細胞には、すでにnoggin、follistatinの発現が認められ、これがBMP-2に対する反応性に影響している可能性が示唆された。

・D-グルコース提示面の特性解明

GLUTを介する細胞形態のメカニズムを証明するために、0, 50, 100%D-glucose提示培養面を用いインスリンを含まない培養条件で培養した乳腺上皮細胞に、インスリンを添加した際の細胞形態変化の動的観察を行った。0%D-glucose提示培養面では、インシュリン添加前後で細胞の形態変化は無かったが、50%においては、伸展形態から円形形態、100%においては、円形形態から伸展形態へと変化した。これらの応答は、約30分であったことから、インシュリン添加によるGLUT4の提示増加による応答であることが示唆された。

・蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法の構築

立体的かつ定量的増殖能の評価を目指し、画像処理技術にて、上皮細胞の重層シートに対する増殖能評価を行った。ここで、基底層核に対する判定高さZTは単層培養時の値を採用した。培養の経過に伴い、基底上層の細胞密度が上昇

したが、増殖細胞は低下した。さらに、基底層の増殖細胞に比べ基底上層においては、その頻度がより低下していることが分かった。

本手法を、予備的に角化細胞からなる表皮シートへ展開したところ、増殖細胞が基底層に存在することが分かり、基底層安定性への展開が示された。以上より、蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法は、重層の程度ならびに基底層の安定性評価に有効であることが分かった。

・残存ダブリング数の予測モデル構築のための画像処理手技の開発

角化細胞の増殖形態は、昨年度に画像処理手技を確立した線維芽細胞とは異なり、敷石状の小さい細胞がコロニーを形成しながら増殖するものである。このため細胞と細胞は、線維芽細胞よりも常に密接した状態にあり、コロニーとしての細胞集塊の特徴も重要であることが考えられた。このため、我々は細胞を1個1個認識させるだけでなく、コロニーとしての細胞集塊の特徴量をも画像から取得する画像処理方法を確立した。

・残存ダブリング数の予測モデルの比較と有効性を検証

確立した画像解析手法を元に数値化した全ての画像情報量を用いて、残存ダブリング数を予測するモデルを構築した。モデルとしては、(1)主成分分析(PCA)、(2)重回帰分析(MRA)、(3)Fuzzy Neural Network(FNN)を比較した。

結果、各独立した画像から得た数値情報だけを用いる場合、各多変量解析手法には大きな差が無いことがわかった。しかし、現実的な運用を考えた場合、予測機能だけでは、予測ミスや異常データを作業者が検出することはほぼ不可能であり、作業者により安心してこのようなシステムを利用してもらうためには、ルール抽出という機能のあるFNNがやはり有用であることが考えられた。このため、FNNを予測モデル

として選択し、精度をより高めるための検討を行った。

様々な画像から得られる形態特徴量を検討し、層別化によって年代別のモデル構築なども行った結果、結果としては、継代培養の継代間における細胞形態の変化率を用いることが最も予測精度を向上させることがわかった。また同時に、変化率②としてルール中で表現されている細胞集塊(コロニー)としての形態情報も、角化細胞の品質予測には重要だったことがわかった。

・軟骨形態制御メカニズムの検討

ニワトリ胚ではHS2STとHS6ST-1、-2が発生中の肢芽に部位特異的に発現されており、肢芽形成に関わる増殖因子の作用を制御していると推測し、肢芽形成前のニワトリ胚の予定翼芽領域へまずHS2STのsiRNAを導入し、そのノックダウンを行った。RNAi法による発現抑制により肢芽の発生に以下の異常がみられた。一つは肢芽の外胚葉性頂堤(AER)の一部の欠損で、重度のものでは肢芽が二股に裂ける例もみられる、もう一つは異常な(指様の)突起構造の形成である。前者は肢芽の先端側で起こり、後者は基部側の間充織で起こったと思われる。RNAiによる発現阻害の結果siRNA導入細胞では2-O硫酸をもたない、又は少ないヘパラン硫酸プロテオグリカンが一過的に生成されることになる。このため、ヘパラン硫酸結合性をもつFGFなどの形態形成、細胞増殖因子のシグナリングが正常におこなわれなかった可能性が高く、結果として異常な細胞死又は細胞増殖を示したものと思われた。まず、ヘパラン硫酸糖鎖の組成のsiRNA処理有無での変化をin situ FGF-2 binding assayや免疫組織化学で確かに2-O-硫酸化低下があることを確認した。次いで、in situ hybridization法および免疫染色法により肢芽組織における増殖因子発現への影響を調べた。siRNA処理により肢芽のパターンの異常や伸長

の阻害が観察された肢芽ではAER部分のFGF-8の発現が著しく低下しており、また、間充織中ではFGF-10の発現も著しい低下が認められた。肢芽の形成及び成長には、FGF-8とFGF-10のシグナルフィードバックループが作用することが明らかにされており、ヘパラン硫酸糖鎖の2-O-硫酸化の異常低下によりAER-間充織間におけるこれらの増殖因子のシグナルループの破綻が肢芽の発生の異常をもたらしたと思われる。シグナルの異常はERKとAktのリン酸化（前者はMAPキナーゼの、後者はホスファチジルイノシトール3-O-キナーゼの活性上昇による）の上昇となって細胞死などを誘導したと判断された。確かにsiRNA処理した肢芽ではその後の肢骨前駆体軟骨の発生異常により正常形態の四肢骨の形成が見られなくなった。さらに、cHS6STについても同様の実験をおこないヘパラン硫酸6-O硫酸化も肢芽形態形成に大きく関与することを明らかにした。

・自動培養装置を用いたMSCの培養と分化誘導

これまでに開発した自動培養装置を用いてヒトMSCの培養を行い、手作業による培養との比較検討を行った。結果、装置を用いた場合にも、手作業で培養した場合にも、分化誘導への応答性、増殖能の変化はなかった。培養後の細胞は、アルカリフォスファターゼ活性（ALP活性）において、手作業と変化がなかったため、自動培養装置での培養行程が幹細胞にダメージを与えることは無いことが示唆された。

即ち、本研究を通じて開発された自動培養装置は、幹細胞を未分化のまま培養が可能で、手作業によるルーチン作業を十分に代替できることがわかった。また、自動培養装置で培養・骨分化を行ったMSCを、ヌードマウス皮下への細胞移植によりin vivoで評価した。移植した組織片は4週後に取り出し、HE染色を行い顕微鏡で観察した結果、TCP顆粒中に混ぜられた細

胞の中に、骨に分化した部分が存在しており、得られた細胞には骨分化能が存在することが判明し、自動培養装置で培養したMSCが骨分化誘導後、生体内で十分に骨となっていることが確認された。

D. 考察

臨床研究で見られた個人差について、本年度は細胞の表面マーカーおよび骨関連遺伝子の発現から原因の検索を行なった。その結果、培養によって得られるBMSCsのpopulationはほぼ一定であるものの、分化についてはさまざまな細胞が混在することが示された。このことが、個体差の一つの原因と考えられ、今後培養する細胞の分化度を一定に保つ、あるいは一定の分化状態の細胞を選択することが、安定した骨再生実現には重要と考えられた。

細胞の分化に影響を与える因子として、培養に用いられる血清の影響が考えられる。したがって、一定の細胞を得るための問題点として、自己血清のように個体によって異なる材料を用いることは問題が多い。本年度は、新たに開発された幹細胞用の無血清培地を用いて、その可能性について検討を行なった。無血清培地では初代培養から可能であった。その一方で、細胞増殖は継代とともに遅くなり、 α -MEMと比較して得られる細胞数には限界があった。得られる細胞の表面抗原の発現はほぼ一定であり、通常培地で培養された細胞との差はわずかであった。細胞は比較的未分化な状態を保っていたが、分化誘導刺激への反応性は低くなっていた。以上から、現在の幹細胞用無血清培地では、必要な細胞数を得るためには、培養条件や添加因子についての検討が必要と思われた。また、十分な骨分化を得るためには、分化誘導法および期間についても更なる検討が必要と考えられた。これらの課題は残るが、無血清培地による細胞培養には血清を含む通常の培地に見られ

たさまざまな問題を解決する可能性があり、今後も引き続き重要なテーマになると考えられた。

同じく、血清が分化誘導に与える影響について、詳細な検討を行なった。細胞のALP活性には、添加する血清濃度が影響を与えることが明らかとなった。また、BMP-2による分化誘導では、血清により分化誘導が影響を受けたが、その原因として血清によるBMP-2 antagonistの誘導考えられた。以上の結果からも、安定した骨再生のためには、できるだけ血清を含まない培地による細胞培養の重要性が示されたと考えている。

細胞の品質評価の方法として、本研究では一貫して細胞形態から細胞の状態を診断するための動的評価システムの構築を目指している。細胞表層の提示GLUT密度変化による細胞形態変化は、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。よって、細胞種に応じ適度なグルコース提示は細胞形態の変化を引き起こし、特に、細胞移動能力の測定に活用できることが示唆された。また、本研究にて開発された立体組織片の定量評価法は、立体的不均一構造を有する表皮、角膜、口腔粘膜などのシートに対し、増殖能、幹細胞存在率、分化マーカー分布など位置的かつ定量的評価が可能であることが示唆された。

もう一方の形態からの細胞評価方法として、Fuzzy Neural Networkを用いた情報解析による、細胞の品質予測モデルの確立を行なっている。細胞の画像情報を元にした細胞品質の予測において、他の手法に比べても優位性が高いことが示唆された。本年度は、線維芽細胞のみでなく、角質化細胞の増殖予測も出るとしても、FNN応用が充分可能であることが強く示唆されるものであった。線維芽細胞・角化細胞の2種

類の予測モデル構築が成功した結果から、今後はさまざまな細胞の増殖予測モデルとして利用できることが期待される。ただ、同時に、細胞種に合わせた細胞数値化には細胞種に合わせた最適化が必要であり、同じモデルが全てを説明することができないことも明らかとなった。

安定した再生治療のためには、培養された細胞が目的の細胞へと分化することが重要であり、そのためには効率的な分化誘導法の開発が必要である。本研究では、骨分化に関してはBMP-2の有用性について検討を行なった。従来のデキサメタゾンを用いた分化誘導法と比較して有用性が示されたが、血清による影響を受ける点が問題であり、今後の検討課題である。一方、軟骨を対象として、分化へのマトリックス成分の影響についても検討を行なってきた。脊椎動物の四肢の原基である肢芽において、ヘパラン硫酸 (HS) 鎖はFGF, Wnt, BMPなどの増殖因子や形態形成因子、さらにそのレセプターと相互作用をし、一定の形態を持った軟骨組織が分化発生する。本研究から、HSの硫酸残基パターンの違いは細胞増殖因子の時空間的なパターンやシグナリングを調整し、肢芽の伸長やパターン形成に関与している可能性が強いと考えられた。

H19年度の本研究では、再生医療を実用化するための培養システム作りとして「得られる細胞を均質にするための基礎的検討」「非接触品質評価指標」「効率的な分化誘導法開発のための基礎的研究」を行なった。各研究課題で得られた成果を相互に結びつけ、より総合的な細胞供給システムを構築することが今後の課題である。

E. 結論

これまでの研究から、BMSCsを用いた骨再生治療については、その有効性や安全性を示して

きたが、同時に安定した骨再生を実現するための課題も明らかとなってきた。今後はこれらの問題点を解決するための基礎研究の継続が望まれる。特に、新たな分化誘導法の確立や、再生組織の形態を一定に保つための遺伝子制御などが新たな課題である。一方、細胞の形態から機能や品質を評価するための方法については、従来にない先進的な試みを行ってきた。細胞の品質の確保には全数評価の可能な非侵襲評価が必須と思われ、今後の安全性評価法に一定の方向性をもたらすことが出来たと考えている。しかしながら、まだまだ未開拓の分野であり、今後この分野に多くの研究者が参入することが望まれる。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

<主任研究者>

(上田 実)

Masaki J. Honda, Shuhei Tsuchiya, Yoshinori Sumita, Hiroshi Sagara, Minoru Ueda. The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regeneration. *Biomaterials*, 28, 680-689, 2007

Hideyuki Nakashima, Kazunori Hamamura, Toshiki Houjou, Ryo Taguchi, Noriyuki Yamamoto, Kenji Mitsudo, Iwai Tohnai, Minoru Ueda, Keiko Furukawa and Koichi Furukawa. Overexpression of caveolin-1 in a human melanoma cell line results of ganglioside GD3 from lipid rafts and alteration of leading edges, leading to attenuation of ma-

lingnant properties. *Cancer Sci*, vol.98, no. 4, 512-520, 2007.

Kazuhiko Kinoshita, Hideharu Hibi, Yoichi Yamada, Minoru Ueda. Promoted New Bone Formation in Maxillary Distraction Osteogenesis Using a Tissue-engineered Osteogenic Material. *Journal of Craniofacial Surgery* in press

Treatment of Human Infrabony Periodontal Defects by Grafting Human Cultured Porous Hydroxyapatite Granules: Three Case Reports. *Journal of the International Academy of Periodontology* in press.

上田実 実用化に向かう歯槽骨の再生医療 *J. I.C.D.*, 2006, Vol. 37, No. 1, 28-32.

上田実 特集にあたって—運動器の再生医療の最新情報 *THE BONE*, Vol. 21, No. 4, 17-18 (413-414), 2007.

上田実 “Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century” 翻訳 *THE BONE*, Vol. 21, No. 4, 19-26 (415-422), 2007.

山田陽一、上田実 骨の再生(歯槽骨) *THE BONE*, Vol. 21, No. 4, 51-56 (447-452), 2007.

上田実 老年医学領域における再生医療 医学のあゆみ Vol. 222, No. 5, 311-317, 2007.

上田実「再生医療とインプラント」(上田実編) クインテッセンス出版, 2007.

<分担研究者>

(各務 秀明)

Agata H, Kagami H, Watanabe N, Ueda M. Effect of ischemic culture conditions on the survival and differentiation of porcine dental pulp-derived cells. *Differentiation* in press

Mizuno D, Kagami H*, Mizuno H, Mase J, Usami K & Ueda M. Bone regeneration of dental implant dehiscence defects using cultured periosteum membrane. *Clin. Oral Imp. Res.* in press

Tonomura A, Sumita Y, Ando Y, Iejima D, Kagami H*, Honda MJ, Ueda M. Differential inducibility of human and porcine dental pulp derived cells into odontoblasts. *Connect. Tissue Res.* 48, 229-238, 2007

Iejima D, Sumita Y, Kagami H*, Ando Y, Ueda M. Odontoblast marker gene expression is enhanced by a CC-chemokine family protein MIP-3 \cdot in human mesenchymal stem cells. *Arch. Oral Biol.* 52, 924-931, 2007

Shimizu K, Ito A, Arinobe M, Murase Y, Iwata Y, Nariita Y, Kagami H, Ueda M, Honda H. Effective Cell-Seeding Technique Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force onto Decellularized Blood Vessels for Vascular Tissue Engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 472-478, 2007

Agata H, Asahina I*, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda M, Kagami H, Ueda M. Effective bone engineering using periosteum-

um-derived cells. *J. Dent Res.* 86, 79-83, 2007

(紀ノ岡正博)

Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi, and Masahito Taya: "Synergistic Effect of D-glucose and EGF Display on Dynamic Behaviors of Human Epithelial Cells", *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 104, No. 5, pp. 428-431 (2007)

Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi, and Masahito Taya: "Glucose Transporter Mediation Responsible for Morphological Change of Human Epithelial Cells on Glucose-Displayed Surface", *J. Biosci. Bioeng.*, in press.

(本多裕之)

Akira Ito, Masatake Fujioka, Tatsuro Yoshida, Kazumasa Wakamatsu, Shousuke Ito, Toshiharu Yamashita, Kowichi Jimbow, Hiroyuki Honda : 4-S-Cysteaminyphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma, *Cancer Science*, 98(3),424-430(2007)

Akira Ito, Hiroyuki Honda, Takeshi Kobayashi : Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression, *Cancer Immunol Immunother*, 55(3), 320-38(2007)

Kazunori Shimizu, Akira Ito, Jong-kook Lee, Tatsuro Yoshida, Keiko Miwa, Hisaaki Ishiguro, Yasushi Numaguchi, Toyoaki Murahara, Itsuo Kodama, Hiroyuki Honda : Construction of multilayered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force, *Biotechnology and Bioengineering*, 96(4), 803-809(2007)

Kousuke Ino, Akira Ito, Hirohito Kumazawa, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, Hiroyuki Honda : Incorporating of capillary-lake structures into dermal cell sheets constructed by magnetic force-based tissue engineering, *Journal of Chemical Engineering Japan*, 40(1), 51-58(2007)

C. Kaga, M. Okochi, M. Nakanishi, H. Hayaishi, R. Kato, H. Honda: Screening of a novel octamer peptide, CNSCWSKD, that induces caspase-dependent cell death, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2007) 362(4), :1063-1068.

加藤竜司、山本若菜、各務秀明、上田実、本多裕之：「再生医療における細胞品質管理を目指した細胞画像データへの多変量解析の有効性」, ソフトウェアバイオロジー, 生物工学会出版音 (2007) in press

(木全弘治)

Sugaya N, Habuchi H, Nagai N, Ashikari-Hada S, Kimata K. 6-O-sulfation of heparan sulfate differentially regulates various FGFs-dependent signaling in culture. *J Biol Chem*. 2008: 283: in press

Morita H, Yoshimura A, Kimata K. The role

of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Kidney International* 2008: 73: 247-248

Kobayashi T, Habuchi H, Tamura K, Ide H, Kimata K. Essential role of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase in chick limb bud patterning and development. *J Biol Chem*. 2007: 282: 19589-19597

Habuchi H, Nagai N, Sugaya N, Atsumi F, Stevens RL, Kimata K. Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation and late embryonic lethality. *J Biol Chem*. 2007: 282: 15578-15588

Kurup S, Wijnhoven TJM, Jenniskens GJ, Kimata K, Habuchi H, Li J-P; Lindahl U, van Kuppervelt TH, Spillmann D. Characterization of anti-heparan sulfate phage-display antibodies A04B08 and HS4E4. *J Biol Chem*. 2007: 282: 21032- 21042

Yamaguchi T, Ohtake S, Kimata K, Habuchi O. Molecular cloning of squid N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase and synthesis of a unique chondroitin sulfate containing E-D hybrid tetrasaccharide structure by the recombinant enzyme. *Glycobiology* 2007: 17: 1365-1376

Nagai N, Habuchi H, Kitazume S, Toyoda H, Hashimoto Y, Kimata K. Regulation of heparan sulfate 6-O-sulfation by beta -sulfatase activity. *J Biol Chem*. 2007: 282: 14942-14951

神村圭介、中藤博志、木全弘治. ヘパラン硫酸の微細構造に秘められた機能- 1 : 線虫 ショウジョウバエを用いた解析 実験医学 羊土社 2007: 27 No. 7: 1049-1053

小林孝、羽瀧弘子、木全弘治. ヘパラン硫酸の微細構造に秘められた機能- 2 : 脊椎動物におけるヘパラン硫酸 O-硫酸転移酵素による形態形成制御 実験医学 羊土社 2007: 27 No. 7: 1054-1059

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 メディカルレビュー社 2007: 5 No. 1: 75-79

幡野その子、渡辺秀人、木全弘治. プロテオグリカンの生物学 ティッシュエンジニアリング2007 日本医学館 2007: 82-87

単行本

Kimata K, Habuchi O, Habuchi H, Watanabe H. Knockout mice and proteoglycans in *COMPREHENSIVE GLYCOSCIENCE*. Elsevier, (2007) Vol. 3, Chapter 4.10, 159-191

J. Esko, U. Lindahl, K. Kimata: Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. Essentials of Glycobiology, 2nd edition. Edited by A. Varki, C. Bertozzi, R. Cummings, Etzler M, Esko J, Freeze H, Hart G, Stanley P, Cold Spring Harbor Laboratory (2007)

Kusafuka K, Watanabe H, Kimata K, Hiraki Y, Shukunami C, Kameya T.

Minute pleomorphic adenoma of the submandibular gland in patients with oral malignancy: a report of two cases with histolo-

gical and immunohistochemical examination. Histopathology 2007: 51: 1258-1261.

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

Koyama H, Hibi T, Isogai Z, Yoneda M, Fujimori M, Amano J, Kawakubo M, Kannagi R, Kimata K, Taniguchi S, Itano N. Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M. Am J Pathol. 2007 Mar: 170: 1086-99.

Sakai K, Kimata K, Sato T, Gotoh M, Narimatsu H, Shinomiya K, Watanabe H. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 play a critical role in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. J Biol Chem. 2007: 282: 4152-4161

2. 学会発表

上田 実 熱傷治療における再生医療の役割 日本熱傷学会近畿地方会 2007.1.20 大阪

上田 実 夢を実現する歯科再生医療 群馬県歯科医学会講演 2007.1.21 群馬

Minoru Ueda/Tissue Engineering and Anti-aging Therapy 国際シンポジウムBMMP 2007.1.25 名古屋

上田 実 相次ぐ再生医療センターの開設と

今後の見通し 第5回再生歯科シンポジウム
2007.1.28 東京

上田 実 関西地区における再生医療センターの開設と今後の見通し 再生歯科フォーラム関西支部フォーラム 2007.2.18 大阪

Minoru Ueda/Tissue Engineering and Anti-aging Therapy /Finnish Dental Society APOLLONIA' s Research Days 2007.3.15 Finland

上田 実 再生医療に向けてーES細胞とクローン臓器ー 日本医学会総会シンポジウム 2007.4.6 大阪

上田 実 臨床応用を先導する歯科の再生医療 横浜市緑区歯科医師会スタディーグループ 2007.4.21 横浜

Minoru Ueda/Tissue Engineering and Anti-aging Therapy
MolecularBiomimeti& Bionanotechnology- I I 2007.5.25 Turkey

上田 実 再生医療と美容
日本成人矯正歯科学会 2007.6.24 東京

上田 実 最先端医療培養の技術進歩
医療・福祉タウン研究会例会 2007.6.25 名古屋

上田 実 臨床応用を先導する歯科の再生医療 東京医科歯科大学同窓会茨木支部講演会 2007.6.30 茨木

上田 実 再生医療とアンチエイジング
化粧品技術者学会学術講演会

2007.7.26 東京

上田 実 臨床応用を先導する歯科の再生医療 第28回日本炎症再生学会 2007.7.26 東京

上田 実 臨床応用を先導する歯科の再生医療 第28回日本炎症再生学会 2007.7.26 東京

上田 実 安全なインプラント治療のために 第1回市民公開講座 2007.9.9 名古屋

Minoru Ueda /Commercialization for Tissue Engineered Products
BioKore2007 2007.9.14 Turkey

上田 実 臨床応用を先導する歯科の再生医療 鶴舞公開講座 2007.10.21 千葉

上田 実 再生医療でお肌の若返りを!
鶴舞公開講座 2007.10.27 名古屋

上田 実 再生医療が実現する高齢社会のQOLー若々しい歯、眼、骨、そして皮膚ー
東京テクノフォーラム21 2007.12.8 東京

上田 実 再生医療とインプラント
第2回市民公開講座 2007.12.16 名古屋

各務秀明、朝比奈泉、縣 秀樹、本田雅規、山下直秀、東條有伸、長村登紀子、河野美保子、土屋周平、新村優佳、上田実 「自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生法」先端医療研究開発シンポジウム 2008.1.22 東京

各務秀明 体性幹細胞を用いた顎口腔領域の再生医療: 歯槽骨再生の臨床研究 東京医科歯科大学シンポジウム東京医科歯科大学21世紀COEプログラム 「歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティア」第12回公開シンポジウム「インプラント治療の最近の進歩: 再生医療との融合」2008.1.20 東京

Hideaki Kagami Safety and efficacy of alveolar bone tissue engineering using bone marrow stromal cells and β -TCP, International Symposium for Musculoskeletal Bioorganic Center 2007.11.23 Korea

各務秀明、朝比奈 泉、本田雅規、縣 秀樹、山下直秀、東條有伸、長村登紀子、田端美帆、河野美保子、土屋周平、新村優佳、上田実 「自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生法」橋渡し研究支援推進プログラム 第一回 橋渡し研究カンファレンス2007.11.30 東京

各務 秀明 教育講演II「再生医療の未来は？」第18回日本歯科審美学会・第26回日本接着歯学会合同大会2007.11.18福岡

各務秀明、朝比奈泉、本田雅規、縣秀樹、上嶋伸知、上田実(ワークショップ2 臨床応用を先導する歯科の再生医療)口腔領域の再生医療—顎骨再生臨床研究の現状と今後の可能性について— 2007.8.9 第28回日本炎症・再生医学会 東京

各務秀明、朝比奈泉、成田祐司、上田実 (シンポジウム1 口腔癌の診断と治療)口腔組織の再生医療—顎骨再生の臨床研究と血管・神経の再生について— 2007.6.14 第31回日本頭頸部癌学会横浜

各務秀明、本田雅規、山田陽一、水野裕和、上田 実 (シンポジウム2 口腔領域のStem Cell Biology)体性幹細胞の分化誘導と口腔組織再生への応用。第61回日本口腔科学会総会 2007.4.19 神戸

鍵田祥吾, 金 美海, 紀ノ岡正博, 田谷正仁: ヒト上皮細胞培養における基底層安定性の評価, 第72回化学工学会, 京都(2007,3).

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: “Enhancement of Cell Migration in Culture of Human Epithelial Cells on Surface with EGF and D-glucose Display”, TERMIS -EU, London, UK (September 4-7, 2007).

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: “Stimulated Migration of Human Epithelial Cells on Co-immobilized Surface of D-glucose and EGF”, TERMIS-AP, Tokyo, Japan (December 3-5, 2007).

加藤竜司、加賀千晶、大河内美奈、国松己歳、本多裕之「情報処理を用いたペプチドスクリーニングの効率化」化学工学会、京都、2007年3月

R. Kato, W. Yamamoto, Y. Tomita, M. Nakatochi, Y. Tomita, M. Okochi, H. Honda, H. Kagami, K. Ebisawa, M. Ueda: Development of morphological process-control analysis for the automation of processes in regenerative medicine, Biochemical Engineering XV (Engineering Biology from Biomolecules to Complex Systems), Quebec City, Canada, July, 2007.

加藤竜司、山本若菜、本多裕之、蛭沢 克己、上田 実、各務秀明「再生医療実用化のための画像情報処理による品質管理技術の開発」化学工学会秋季大会、札幌、2007年9月

加藤竜司、加賀千晶、富田康之、大河内美奈、国松己歳、本多裕之「降圧作用短鎖ペプチドのペプチドインフォマティクスによる活性向上」農芸化学会中部支部大会、春日井、2007年9月

山本若菜、加藤竜司、蛭沢克己、各務秀明、上田実、本多裕之「再生医療実用化のための画像情報処理による品質管理技術の開発」生物工学会、広島、2007年9月

木全弘治、生物の形作りを操るへパラン硫酸。文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節 Functional Glycomics」研究成果公開発表シンポジウム、東京（有楽町朝日ホール）、2008: 1-25, 26

Yusa A, Fujii M, Goto Y, Miyaura M, Kim S, Iwata H, Kimata K, Kyogasima M, Kannagi R. Increase of Heparan Sulfate, FGF and VEGF on Cancer Cell Surface in Serum-depleted Culture. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 パシフィコ横浜 ワークショップ11 2007 10-3~5 : p. 719

羽瀧脩躬、大竹しおり、近藤幸子、山口照由、日下部教子、伊藤達郎、羽瀧弘子、木全弘治。N-アセチルガラクトサミン4-硫酸 6-O-硫酸転移酵素の機能解析。第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会。横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11~15

芦刈-羽田智子、羽瀧弘子、菅谷典子、木全弘治。2-O-硫酸化へパラン硫酸8糖による FGF-2活性の特異的阻害。第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会。横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11~15

Zhu L, Zhuo L, Watanabe H, Kimata K. Equi

valent involvement of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain isoforms in forming covalent complexes with hyaluronan.

第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会。横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11~15

佐藤祐哉、上村俊人、盛満圭介、杉浦信夫、木全弘治、長田亜樹、眞鍋理一郎、高木淳一、山田雅司、関口清俊。ネフロネクチンのドメイン機能の解析。第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会。横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11~15

永井尚子、菅谷典子、木全弘治。へパラン硫酸 6-O-硫酸基転移酵素 3 (HS6ST-3) に結合する細胞内因子の探索。第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会。横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11~15

杉浦信夫、角田佳充、大澤拓男、下方郷嗣、木全弘治、渡辺秀人。大腸菌由来コンドロイチンポリメラーゼ変異酵素による高分子コンドロイチン多糖の合成。第27回日本糖質学会年会。福岡 九州大学医学部百年講堂 2007、8-1~3

山口照由、大竹さおり、木全弘治、羽瀧脩躬。イカのリコンビナント硫酸転移酵素によるE-D4糖を含むコンドロイチン硫酸の合成。第27回日本糖質学会年会。福岡 九州大学医学部百年講堂 2007、8-1~3

木全弘治。グリコサミノグリカン硫酸転移酵素:種々の動物系におけるへパリン結合性活性分子の生理機能の調節因子としての役割。文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節 Functional Glycomics」第5回公開シンポジウム 東京 東京ガ

Lohmander L, Zhu L, Zhuo L, X-Y RS, Ma K, Blake S, Kimata K. Hyaluronan-linked inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (SHAP), interleukin 8, MMP-3 and hyaluronan in human synovial fluid and serum in osteoarthritis, joint injury and inflammation. 53rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS); 2007 2.11-14; San Diego, California; 2007.

R. Kato, W. Yamamoto, Y. Tomita, M. Nakatomi, Y. Tomita, M. Okochi, H. Honda, H. Kagami, K. Ebisawa, M. Ueda: Development of morphological process-control analysis for the automation of processes in regenerative medicine, Biochemical Engineering XV (Engineering Biology from Biomolecules to Complex Systems), Quebec City, Canada, July, 2007

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許出願

「細胞品質予測モデル」

加藤竜司、山本若菜、本多裕之、他：特許出願
番号2007-212116

3. その他

特になし

2. 実用新案登録

なし