

間葉系幹細胞の分化に関する分子生物学的、細胞生物学的評価
—軟骨再生における至適材料評価に関する研究—

分担研究者 木全 弘治 愛知医科大学分子医科学研究所 名誉教授

研究要旨

再生医療の実用化のためには、軟骨組織の再生において未分化間充織からの細胞分化の制御や軟骨細胞の安定維持の制御とともに組織としての軟骨形態の制御が大きな課題である。本研究では、これらの制御に大きくかかわる細胞外マトリックス、特にヘパラン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンに注目して、より効率的な軟骨細胞への分化に関わるマトリックスの検討を実際の臨床応用を視野に入れて検討を行った。ヘパラン硫酸プロテオグリカンと細胞増殖因子との相互作用の軟骨形態形成における役割、また間充織細胞が合成するヒアルロン酸結合性コンドロイチンプロテオグリカンを主とするマトリックス形成の間充織細胞の凝集現象と軟骨分化に果たす役割を明らかにできた。これらの結果は、研究課題である「間葉系幹細胞の分化に関する分子生物学的、細胞生物学的評価—軟骨再生における至適材料評価に関する研究」に極めて有益な示唆を与える。

A. 研究目的

再生医療におけるティッシュエンジニアリング組織の中で、軟骨は比較的臨床応用されやすく、また移植軟骨組織を必要とする患者の数も多い。本研究では、軟骨移植の臨床応用に向けてより効率的な軟骨移植組織作製を目的として、未分化間充織から軟骨細胞へと分化する細胞培養系において、また一定のパターンを持った軟骨組織を形成する胎児肢芽間充織において、これらの現象に関わるマトリックス成分、特にプロテオグリカンの実体と機能の解析を実際の臨床応用を視野に入れて検討を行った。

B. 研究方法

N1511細胞は実光らによってp53ノックアウトマウス肋軟骨より確立された不死化細胞株で、通常は繊維芽細胞様であるがBMPまたはdexamethasoneとPTHの添加により軟骨細胞へと分化する。この分化に伴う細胞外マトリックスの分子変化の検討を以下のように行った。軟骨分化マーカー分子のアグリカン、II型コラーゲン、IX型コラーゲンなどのrealtimePCRによる発現量の測定、またアルシアンブルー染色法および特異抗体を用いた蛍光抗体染色法によるアグリカンの合成及び細胞外マトリックスへの分布蓄積の有無とその量の測定より、軟骨分化への関与を定量化した。分化した軟骨細胞の特性の一つは多量のコンドロイチン硫酸を合成する能力である。この糖鎖の骨格合成に関与する6種類の酵素（CSS1, CSS2, CSS3, CSGalNAcT-2, CSGalNAcT-1, CSGlcAT）について、間葉系細胞から軟骨細胞の分化に伴う発現の変動を、in situ

hybridization法により染色像とリアルタイムRT-PCR法による発現測定から調べ、軟骨再生における分子生物学的、細胞生物学的評価のマーカーとして有用かどうかを、検討した。分化した軟骨の程度はaggrecanの発現を同方法により調べて解析した。ヘパラン硫酸と細胞増殖因子との結合は、主に2-O-硫酸転移酵素（HS2ST）と6-O-硫酸転移酵素（HS6ST）によって付加されるO-硫酸基がその特異性決定因子になっている。ニワトリの肢芽を実験系として、これらのO-硫酸転移酵素の発現をsiRNA法により抑制しヘパラン硫酸鎖のO-硫酸化パターンを変化させて細胞増殖因子との相互作用を異常にし、肢芽軟骨分化とその形態への影響を観察した。さらに細胞増殖因子の発現と分布の変化、また増殖因子からのシグナルの変化をERKとAktのリン酸化で評価した。

（倫理面への配慮）マウスやニワトリを実験材料に用いた研究であり、ヒト材料は今回の研究では使用していない。

C. 研究結果

N1511細胞が軟骨細胞へ分化する時、大型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるPG-M/versicanの合成とマトリックスへの蓄積が必須であることを明らかにした。結合コンドロイチン硫酸鎖部分を特異的に消化分解、またプロテオグリカン結合コンドロイチン硫酸鎖量の抑制剤であるβ-キシロシド添加により、軟骨分化への抑制が観察されたことから、コンドロイチン硫酸鎖部分が重要であることが分かった。この糖鎖の骨格の合成に関与する糖転移酵素群、グルクロン酸

転移活性と *N*-アセチルグルコサミン活性の両方を持つ CSS-1、CSS-2、CSS-3、グルクロン酸活性のみを持つ CSGlcAT、*N*-アセチルグルコサミン活性のみを持つ CSGalNAcT-1 と CSGalNAcT-2 の計 6 種類が関与することを報告したが、大量の CS 合成能を持つ軟骨組織におけるこれら酵素の個々の役割については全くわかっていない。そこで *in situ* ハイブリダイゼーションを用いてこれら 6 種類の酵素の発現を検討したところ、胎生 14.5 日のマウス軟骨組織において CSS-1、CSS-2、CSGlcAT、CSGalNAcT-1 の 4 種類の酵素の発現がアグリカンコアタンパク質の発現と一致して成長板の前肥大軟骨細胞層中心に認められた。リアルタイム RT-PCR を用いて軟骨分化系細胞株の ATDC における酵素群の発現を調べたところ、分化に伴って CSGlcAT と CSGalNAcT-1 の発現の著しい亢進がみられ、この二つの酵素が軟骨分化に大きく関与していることが明らかになった。肢芽軟骨発生における分化と組織形態は Wnt や FGF などの数種類の細胞増殖因子の作用で制御されている。ヘパラン硫酸プロテオグリカンのヘパラン硫酸糖鎖とこれらの因子との相互作用が制御に重要であることが分かっている。相互作用はヘパラン硫酸糖鎖の *O*-硫酸基が決定因子になっているので、*O*-硫酸化に関与する酵素の一つである 2-*O*-硫酸転移酵素 (HS2ST) を siRNA 方法により発現抑制して糖鎖構造を変換して増殖因子との相互作用の異常、それによる形態形成の異常を期待した。四肢形態の異常とその後の四肢軟骨のパターンに大きな異常が観察された。この結果はヘパラン硫酸プロテオグリカンも軟骨分化と形態を制御する重要な機能分子であることを示唆した。

D. 考察

軟骨分化におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンやヘパラン硫酸糖鎖プロテオグリカンの糖鎖部分の重要性が今回の研究で決定的になった。従って組織工学的手法による注入型軟骨作製を視野に入れた軟骨再生の 3 次元培養におけるマトリックスの至適材料について考察すると、これらの糖鎖結合マトリックススキャフォールドの有効性の確認が不可欠であると思われた。細胞増殖因子作用の重要性を考えると、この点から系を改善して、より良好な組織をつくるように出来ると思われた。また、再生軟骨について軟骨特有の性質の発揮と形態の形成にはプロテオグリカンの糖鎖部分の合成酵素活性の発現が鍵を握っていることが示唆されたから、この結果は、逆にこの酵素の活性を測定することによって、軟骨として機能の評価ができる新たな有用なマーカーが本研究により得られたことを意味している。今回、このような軟骨の質の評価を可能にする分子が明らかになったことは貴重である。

E. 結論

実際の軟骨へと分化する間充織において数種のヘパラン硫酸プロテオグリカンとヒアルロン酸結合性のコンド

ロイチン硫酸プロテオグリカンを主に含む細胞外マトリックスの合成が盛んである。それぞれが軟骨分化の方向に有利に作用していると思われ、前者はそのヘパラン硫酸糖鎖部分が軟骨誘導増殖因子である FGF や BMP、軟骨の組織形態の形成に関与するソニックヘッジホッグと結合しその作用を制御し、また活性を促進していると思われた。後者はヒアルロン酸リッチマトリックスを構成し細胞形態や運動に作用して分化を制御していると思われ、今回の研究で初めてそのコンドロイチン硫酸糖鎖の合成自体も軟骨分化に連動して制御されていることが分かった。またヘパラン硫酸糖鎖の合成についても、軟骨分化と形態形成に必要な細胞増殖因子の有機機能発現を誘起するように制御されていることが分かった。従って、ヘパラン硫酸プロテオグリカンやコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの分子自体、またそれらの糖鎖合成を行う酵素自体も軟骨再生における至適材料評価に関する研究において重要な位置を占めると結論された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 AO4B08 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:

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

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 histological and immunohistochemical examination. Histopathology 2007; 51: 1258-1261.

Minamisawa T, Suzuki K, Maeda H, Shimokata S, Sugiura N, Kimata K, Hirabayashi. 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

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

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, Stanle P, Cold Spring Harbor Laboratory (2007)

Matsumoto K, Kamiya N, Suwan K, Atsumi F, Shimizu K, Shinomura T, Yamada Y, Kimata K, Watanabe H. Identification and characterization of versican/PG-M aggregates in cartilage. J Biol Chem. 2006; 281: 18257-1826

Kamiya N, Watanabe H, Habuchi H, Takagi H, Shinomura T, Shimizu K, Kimata K. Versican/PG-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecule crucial for mesenchymal condensation. J Biol Chem. 2006; 281: 2390-2400

Zhuo, L., Kanamori, A., Kannagi, R., Itano, N., Wu, J., Hamaguchi, M., Ishiguro, N., Kimata, K. (2006) SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. J Biol Chem. 281(29): 20303-20314.

Kamimura K, Koyama T, Habuchi H, Ueda R, Masu M, Kimata K, Nakato, H. Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in Drosophila FGF signaling. J Cell Biol. 2006; 174: 773-778

Inoue, Y., Yoneda, M., Zhao, J., Miyaishi, O., Ohno-Jinno, A., Kataoka, T., Isogai, Z., Kimata, K., Iwaki, M., Zako, M. (2006) Molecular cloning and characterization of chick SPACRCAN. J Biol Chem. 281: 10381-10388.

Habuchi H, Habuchi, O, Uchimura K, Kimata K, muramatsu T. Determination of substrate specificity of sulfotransferases and glycosyltransferases (proteoglycans). Methods Enzymol. 2006; 416, Section 5, Chapter14: 225-243

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

渡邊裕規, 渡辺秀人, 木全弘治. 連載 軟骨代謝の研究—基礎と臨床—最近の進歩<10> 基礎 — 軟骨に

におけるプロテオグリカンの役割 CLINICAL CALCIUM 医療ジャーナル社 2006: 16, No 6: 146-149.

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

Sawada T, Fujii S, Nakano H, Ohtake S, Kimata K, Habuchi O. Synthesis of sulfated phenyl 2-acetamido-2-deoxy-D-galactopyranosides. 4-O-Sulfated phenyl 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-galactopyranoside is a competitive acceptor that decreases sulfation of chondroitin sulfate by N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase. Carbohydr. Res. 2005: 340: 1983-1996.

Ohtake S, Kimata K, Habuchi O. Recognition of sulfation pattern of chondroitin sulfate by uronosyl 2-O-sulfotransferase. J Biol Chem. 2005: 280: 39115-39123.

Koga T, Inatani M, Hirata A, Inomata Y, Zako M, Kimata K, Oohira A, Gotoh T, Mori M, Tanihara H. Expression of a chondroitin sulfate proteoglycan, versican (PG-M), during development of rat cornea Curr Eye Res. 2005: 30: 455-463.

Furutani Y, Manabe R, Tsutsui K, Yamada T, Sugimoto N, Fukuda S, Kawai J, Sugiura N, Kimata K, Hayashizaki Y, Sekiguchi K. Identification and characterization of photomedins: novel olfactomedin-domain-containing proteins with chondroitin sulphate-E-binding activity. Biochem J. 2005: 389: 675-684

Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Kimata K, Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. J Biol Chem. 2005: 280: 31508-31515

澤井崇博, 板野直樹, 木全弘治. マウス初代軟骨細胞における bone morphogenetic protein-2 のヒアルロン酸合成酵素発現制御. 愛知医科大学医学会雑誌 2005; 33: 1-6.

蛭沢克己, 木全弘治, 渡辺秀人. プロテオグリカン. ティッシュエンジニアリング 2005. 日本医学館, 2005: 25-30. (日本組織工学会編集)
卓麗聖, 木全弘治. 第1編 糖鎖を科学する 第1章 糖

鎖のしくみ 第3節プロテオグリカン 1 ヒアルロン酸の構造と機能. 糖鎖科学の新展開. NTS, 2005: 40-47.

渡辺秀人, 木全弘治. 3. 糖鎖遺伝子研究 1. 糖転移酵素 1.17 コンドロイチン硫酸合成関連遺伝子群. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005: 172-174.

板野直樹, 木全弘治. 3. 糖鎖遺伝子研究 1 糖転移酵素 1.19 ヒアルロン酸合成酵素. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005: 176-177.

木全弘治. 4. 糖鎖機能解析 7 再生医療・移植 7.1 組織再生におけるプロテオグリカン. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005: 303-309.

羽瀧弘子, 木全弘治. 4. 糖鎖機能解析 9 発生・分化・形態形成 9.6 形態形成におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能. 未来を拓く糖鎖科学. 金芳堂, 2005:339-432.

羽瀧脩躬, 羽瀧弘子, 木全弘治. 第1章 基礎編 3. 糖鎖の細胞生物学 4)グリコサミノグリカンの硫酸化と疾患. 遺伝子医学MOOK3 糖鎖と病気 (編集 谷口直之) 株式会社メディドゥ, 2005 : 123-129

Itano, N., Kakizaki, I., Mita, S., Endo, M., Kimata, K. A mechanism for 4-methylumbelliferone-mediated inhibition of hyaluronan biosynthesis. Hyaluronan Structure, Metabolism, Biological Activities, Therapeutic Applications Volume I (Balazs E. A., and Hascall, V. C., eds) , Matrix Biology Institute, New Jersey, U.S.A. 2005: pp. 147-53

Zhuo, L., Salustri, A., Atsumi, F., Kawano, M., Wu, J., Shen, L., Ogura, A., Yasue, H., Hascall, V. C., Kimata, K. (2005) Role of serum-derived hyaluronan-associated protein in the construction of cumulus matrix and oocyte maturation. Hyaluronan Structure, Metabolism, Biological Activities, Therapeutic Applications Volume II (Balazs, E. A., and Hascall, V. C., eds), Matrix Biology Institute, New Jersey, U.S.A. 2005: pp. 731-5,

2. 学会発表

木全弘治. 生物の形作りを操るヘパラン硫酸. 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-硫酸化ヘパラン硫酸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. Equivalent 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。ヘパラン硫酸 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ヘ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 東京ガーデンパレス 2007 2-9

坂井頭一郎、木全弘治、佐藤隆、後藤雅式、成松久、四宮謙一、渡辺秀人。Analysis of glycosyltransferases involved in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. 第38回日本結合組織学会学術大会。前橋, 2006.5-11,12.

渡邊裕規、塩生真史、木全弘治、木村友厚、渡辺秀人。Splicing Factor 3b binds BMPR-1A and negatively regulates osteochondral differentiation. 第38回日本結合組織学会学術大会。前橋, 2006.5-11,12.

スワン ケイティサック、幡野その子、渡辺秀人、木全弘治。Analysis of fibroblasts whose versican/PD-M lacks the A subdomain. 第38回日本結合組織学会学術大会。前橋, 2006.5-11,12.

柿崎育子、板野直樹、木全弘治、花田勝美、今淳、山口真範、高橋照、高垣啓一。Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. 第38回日本結合組織学会学術大会。前橋, 2006.5-11,12.

板野直樹、小山洋、磯貝善蔵、米田雅彦、藤森実、神奈木玲児、木全弘治、谷口俊一郎。Overexpression of hyaluronan synthase-2 enhances angiogenesis and stroma reaction in neu-induced mammary tumors. In: 第38回日本結合組織学会学術大会; 前橋, 2006 5-11,12.

A.Murakawa, N. Itano, K. Kimata, R.Kannagi, T.Mori, Y.Okahata. Preparation of hyaluronan synthase 2 by baculovirus-infected Insect cells expression system. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006.6.15-6.17.

T. Kobayashi, H. Habuchi, K. Tamura, H. Ide, K. Kimata. Essential role of heparan sulfate O-sulfotransferases in chick limb bud patterning and development. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006.6.15-6.17.

N. Sugaya, H.Habuchi, S.Ashikari-hada, N.Nagai, K. Kimata. Different regulation of FGFs signaling in fibroblast producing little-6-O-sulfated heparan sulfate(HS). Extracellular glycomatrix in health and disease

(グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center(淡路夢舞台国際会議場), 2006.6.15-6.17.

N.Masukane, Y.Yamaguchi, H.Yagi, N.Sugiura, K.Kimata, K.Kato. NMR and HPLC analyses of substrate recognition by K4 chondroitin polymerase. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議).

The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006.6.15-6.17.

N.Nagai, S.Kitazume, H.Toyoda, Y.hashimoto, H.Habuchi, K.Kimata. Regulation of 6-Osulfation of heparan sulfate by beta-secretase activity and HS6ST3. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006.6.15-6.17.

S. Ohtake, K. Kimata, O. Habuchi. Sulfation of a highly sulfated nonreducing terminal sequence in chondroitin sulfate. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006.6.15-6.17.

T.Mori, A.Fujishima, N.Sugiura, K.Kimata, Y.Okahata. Direct monitoring of carbohydrate elongations by chondroitin polymerase on a 27-MHz quartz-crystal microbalance. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006.6.15-6.17.

T. Kobayashi, H. Habuchi, K. Tamura, H. Ide, K. Kimata. Chick limb buds development requires appropriate O-sulfation patterns of heparan sulfate. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress in conjunction with 79th annual meeting of the Japanese biochemical society and 29th annual meeting of the molecular biology society of Japan "life: molecular integration & biological diversity" (第20回国際生化学、分子生物学会議 第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議 第79回日本生化学会大会・第29回日本分子生物学会年会). 京都 国立

京都国際会館, 2006.6.18-6.23.

S.Hatano, K.Kimata, N.Hiraiwa, M.Kusakabe, E.Adachi, Z.Isogai, T.Shinomura, H.Watanabe. VERSICAN/PG-M is essential for murine cardiovascular and dermal development. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress in conjunction with 79th annual meeting of the Japanese biochemical society and 29th annual meeting of the molecular biology society of Japan "life: molecular integration & biological diversity" (第20回国際生化学、分子生物学会議 第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議 第79回日本生化学会大会・第29回日本分子生物学会年会). 京都 国立京都国際会館, 2006.6.18-6.23.

芦刈-羽田智子, 羽渕弘子, 菅谷典子, 木全弘治. 2-O-硫酸化ヘパラン硫酸8糖によるFGF2活性の特異的阻害. 第26回日本糖質学会年会. 仙台, 2006.8.23-25.

南澤俊和, 鈴木喜義, 前田浩, 下方郷嗣, 芦刈-羽田智子, 杉浦信夫, 木全弘治, 平林淳. グリコサミノグリカン・オリゴ糖鎖のMSフラグメンテーション挙動. 第26回日本糖質学会年会. 仙台, 2006.8.23-25.

幡野その子, Keittisak Suwan, 渡辺秀人, 木全弘治. サブドメイン欠失バーシカン/PG-Mによる細胞の不死化およびがん化. 第65回日本癌学会学術総会: 横浜, 2006.9.28-30.

小山洋, 神奈木玲児, 木全弘治, 谷口俊一郎, 板野直樹. ヒアルロン酸糖鎖合成異常が引き起こすがん発展の分子機構. 第26回日本糖質学会年会; 2006 8.23-25; 仙台; 2006.

小山洋, 藤森実, 磯貝善蔵, 米田雅彦, 神奈木玲児, 木全弘治, 谷口俊一郎. 乳癌発症モデルマウスを用いたヒアルロン酸細胞外マトリックスの癌進展促進機構の解明. 第14回日本乳癌学会学術総会; 2006 7-7,8; 石川 石川県立音楽堂・金沢全日空ホテル・ホテル日航金沢・ポルテ金沢; 2006.

坂井頭一郎, 木全弘治, 佐藤隆, 後藤雅式, 成松久, 四宮謙一, et al. 軟骨におけるコンドロイチン硫酸合成酵素群の解析. 第19回日本軟骨代謝学会; 2006 3.4; 横浜; 2006

張大光, 木全弘治, 西田佳弘, 佐藤啓二, 渡辺秀人. 外骨腫におけるヘパラン硫酸の解析. 第19回日本軟骨代謝学会; 2006 3.3; 横浜; 2006.

渡邊裕規, 塩生真史, 木全弘治, 木村友厚, 渡辺秀人. Splicing factor 3b は BMPR-IA に結合し骨軟骨分化を抑制する. 第 19 回日本軟骨代謝学会; 2006 3.4; 横浜; 2006.

木全弘治. 糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節. 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究・第 4 回公開シンポジウム; 2006 1.31; 名古屋

Habuchi H, Nagai N, Sugaya N, Ashikari-Hada S, Kimata K. Functions of heparan sulfate-6-O-sulfation learnt from mice with deficient heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 or -2 (HS6ST-1, -2). In: 6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium; 2005 11.30-12.5; Hawaii, U.S.A.; 2005.

Habuchi H, Sugaya N, Nagai N, Kimata K. Different responses to heparin-binding growth factors (HB-GFs) of fibroblasts from different responses to heparin-binding growth factors (HB-GF) of fibroblasts from HS6ST-1 and/or HS6ST-2 deficient mice. In: Proteoglycans in Signaling; 2005 9.7-11; Stockholm, Sweden; 2005.

Habuchi O, Ohtake S, Kimata K. Recognition of sulfation pattern of chondroitin sulfate by uronosyl 2-O-sulfotransferase. In: Proteoglycans in Signaling; 2005 9.7-11; Stockholm, Sweden; 2005.

Hatano S, Kimata K, Hiraiwa N, Kusakabe M, Adachi E, Shinomura T, et al. Versican/Pg-M is essential for mice cardiovascular and dermal development. In: 6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium; 2005 12.3; Hawaii, U.S.A.; 2005.

Kakizaki I, Itano N, Kimata K, Kon A, Yamaguchi M, Yoshihara S, et al. An inhibition mechanism of hyaluronan synthesis by 4-methylumbelliferon. In: 第 9 回弘前国際医学フォーラム; 2005 11.10-11; 弘前; 2005.

Kamimura K, Habuchi H, Kimata K, Nakato H. Specific sulfation of heparan sulfate in Drosophila FGF signaling. In: Proteoglycans in Signaling; 2005 9.7-11; Stockholm, Sweden; 2005.

Kamimura K, Habuchi H, Kimata K, Nakato H. Roles of 2-O and 6-O sulfated heparan sulfate during Drosophila development. In: 第 78 回日本生化学会大会; 2005 10.21; 神戸; 2005.

Kobayashi T, Habuchi H, Ashikari-Hada S, Suzuki H, Tamura K, Ide H, Kimata K. Possible roles of heparan

sulfate 2-O-sulfotransferase in chick limb development. In: The 3rd annual CDB Symposium Origin and Development of the Vertebrate Traits; 2005 4.11-13; 神戸; 2005.

Mori T, Fujishima A, Nihira T, Sugiura N, Kimata K, Okahata Y. Gravimetric analysis of carbohydrate elongations by chondroitin synthase on a 27-MHz quartz-crystal microbalance. In: 第 78 回日本生化学会大会; 2005 10.20; 神戸; 2005.

Nagai N, Kitazume S, Toyoda H, Habuchi H, Kimata K. Regulation of 6-O-sulfation in heparan sulfate by β -secretase activity. In: 第 78 回日本生化学会大会; 2005 10.20; 神戸; 2005.

Nakato H, Kimata K. Specificity and flexibility : Regulation of Drosophila FGF signaling by heparan sulfate modifications. In: Proteoglycans in Signaling; 2005 9.10; Stockholm, Sweden; 2005.

Ohtake S, Kimata K, Habuchi O. Enzymatic synthesis of oligosaccharides derived from highly sulfated nonreducing terminal structures in chondroitin sulfate. In: 第 78 回日本生化学会大会; 2005 10.21; 神戸; 2005.

Sakai K-i, Kimata K, Narimatsu H, Shinomiya K, Watanabe H. Expression patterns of glycosaminoglycan-synthesizing enzymes during chondrogenesis. In: 第 78 回日本生化学会大会; 2005 10.20; 神戸; 2005.

Sugaya N, Habuchi H, Nagai N, Kimata K. Different responses of fibroblast derived from heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 (HS6ST-1) and/or HS6ST-2 deficient mice to heparin-binding growth factors (HB-GFs). In: 第 78 回日本生化学会大会; 2005 10.21; 神戸; 2005.

Suwan K, Hatano S, Watanabe H, Kimata K. Knockin fibroblasts whose versican/Pg-M lacks the A subdomain. In: 第 78 回日本生化学会大会; 2005 10.21; 神戸; 2005.

Watanabe H, Hatano S, Adachi E, Kimata K. The role of the proteoglycan aggregate in matrix assembly. In: 第 78 回日本生化学会大会; 2005 10.22; 神戸; 2005.

Watanabe H, Kimata K, Watanabe H. Identified the novel molecule interacts with BMPR IA. In: 第 78 回日本生化学会大会; 2005 10.20; 神戸; 2005.

芦刈-羽田智子, 羽瀨弘子, 荻谷豊, 木全弘治. ヘパリンによる VEGF165 依存的細胞増殖、管腔形成及びレ

セプターリン酸化の制御. In: 第 25 回日本糖質学会年
会; 2005 7.22; 大津; 2005.

磯貝善蔵, 長谷川佳子, 宮石理, 大野安季子, 雑喉正泰,
木全弘治, 米田雅彦. パーシカン/PG-M は真皮の主要
なヒアルロン酸結合分子であり、弾性線維の凝集を阻
害する. In: 第 37 回日本結合組織学会学術大会; 2005
5.27; 富山; 2005.

河合育子, 太田祐理, 白井智香子, 廣田未央, 小島千佳,
平尾佳美, 卓麗聖, 木全弘治, 米田雅彦. マウス組織
におけるヒアルロン酸リッチマトリックス-SHAP-HA
複合体の局在. In: 第 37 回日本結合組織学会学術大
会; 2005 5.27; 富山; 2005.

坂井頭一郎, 木全弘治, 渥美ふき子, 成松久, 四宮謙一,
渡辺秀人. 軟骨分化における糖鎖合成酵素の発現. In:
第 18 回日本軟骨代謝学会; 2005 3.18; 大阪; 2005.

小林孝, 羽瀧弘子, 田村宏治, 井出宏之, 木全弘治. ニ
ワトリ胚芽形態形成におけるヘパラン硫酸 2-O-硫
酸転移酵素の機能の研究. In: 日本発生物学会第 38
回大会; 2005 6.2; 仙台; 2005.

小林孝, 羽瀧弘子, 田村宏治, 井出宏之, 木全弘治. ニ
ワトリ胚芽形態形成におけるヘパラン硫酸 2-O-硫
酸転移酵素の機能の研究. In: 第 25 回日本糖質学会年
会; 2005 7.21; 大津; 2005.

小林孝, 羽瀧弘子, 田村宏治, 井出宏之, 木全弘治. ニ
ワトリ胚芽形態形成におけるヘパラン硫酸硫酸転移酵
素の機能. In: 第 28 回日本分子生物学会年会; 2005 12.10;
福岡; 2005.

松本和, 塩生真史, 郷通子, 清水克時, 篠村多摩之, 木
全弘治, 渡辺秀人. PG-M/パーシカンとヒアルロン酸、
リンク蛋白との結合様式の解析 第 18 回日本軟骨代
謝学会; 2005 3.18; 大阪; 2005.

大竹しおり, 木全弘治, 羽瀧脩躬. ウロノシル 2-O-硫
酸転移酵素によるコンドロイチン硫酸の硫酸化パター
ンの認識. In: 第 25 回日本糖質学会年会; 2005 7.22; 大
津; 2005.

大野安季子, 磯貝善蔵, 米田雅彦, 宮石理, 井上洋子,
片岡卓也, 趙勁松, 岩城正佳, 木全弘治, 雑喉正泰.
パーシカン PG-M は fibrillin microfibrils の親水性能を毛

様体において調節する. In: 第 37 回日本結合組織学会
学術大会; 2005 5.27; 富山; 2005.

嶋本桂子, 眞鍋理一郎, 福田友彦, 筒井仰, 中野伊津子,
木村美奈, 下野知性, 小栗康子, 三千典子, 浄住大慈,
佐渡義一, 佐藤祐哉, 河合純, 林崎良英, 木全弘治, 妹
尾春樹, 関口清俊. マトリオーム解析: III 細胞外マト
リックス蛋白質の腸基底膜での空間・時間特異的発現
パターン. In: 第 52 回マトリックス研究会大会; 2005
3.19; 大分; 2005.

筒井仰, 眞鍋理一郎, 中野伊津子, 福田友彦, 木村美奈,
小栗康子, 河合純, 林崎良英, 木全弘治, 関口清俊.
マトリオーム解析: IV 骨格系形成過程における新規細
胞外マトリックス因子群の発現パターンの多様性. In:
第 52 回マトリックス研究会大会; 2005 3.19; 大分;
2005.

幡野その子, 木全弘治, 安達栄治郎, 平岩典子, 日下部
守昭, 篠村多摩之, 渡辺秀人. Versican/PG-M の器官
形成における役割: ノックインマウスの解析. In: 第 37
回日本結合組織学会学術大会; 2005 5.27; 富山; 2005.

福田友彦, 眞鍋理一郎, 筒井仰, 中野伊津子, 嶋本桂子,
木村美奈, 下野知性, 小栗康子, 三千典子, 浄住大慈,
佐渡義一, 佐藤祐哉, 河合純, 林崎良英, 木全弘治, 妹
尾春樹, 関口清俊. マトリオーム解析: II 細胞外マト
リックス蛋白質の腎臓基底膜での空間・時間特異的発現
パターン. In: 第 52 回マトリックス研究会大会; 2005
3.19; 大分; 2005.

眞鍋理一郎, 筒井仰, 福田友彦, 中野伊津子, 木村美奈,
下野知性, 小栗康子, 嶋本桂子, 三千典子, 浄住大慈,
佐渡義一, 佐藤祐哉, 河合純, 林崎良英, 木全弘治, 妹
尾春樹, 関口清俊. マトリオーム解析: I 新規細胞外
マトリックス蛋白質の網羅的探索と基底膜蛋白質ボデ
ィーマップデータベースの作成. In: 第 52 回マトリッ
クス研究会大会; 2005 3.19; 大分; 2005.

G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

特許出願中: 日本出願番号 2006-45813

発明の名称

コンドロイチン硫酸合成促進剤

自動培養装置の開発・LOH解析による培養細胞のがん化検出システムの開発

分担研究者 鈴木 力 株式会社日立メディコ 主任技師

研究要旨

再生医療の実用化のためには、細胞調整工程の自動化は培養コストの削減と安全性向上の両観点から非常に重要である。現在、多くの再生医療を提供しようとする医療施設において最もコスト的に大きいのは、大がかりなCPC施設そのものの建設と、内部でのルーチンワークを運用する熟練者業者の雇用である。密閉された培養装置内においてすべての培養工程を終了することができれば、CPC施設そのものを大幅に小さく、コンパクトに設計することができる。また、もっともコンタミネーションのリスクが高く、清浄領域への出入りだけで消耗品が嵩む人による作業を大幅に削減すると、細胞の供給はもっと安全かつ安定したものになると考えられる。このような命題のもと、我々は自動培養装置の開発と、関連する安全性試験と適応性の高い細胞種の検討を行った。

初年度、本研究では自動培養装置の初号機を開発し、ディスプレイザブルな配線によって完全に無菌な空間を装置内に作り、長期に自動運転できることを立証した。

次年度は、接着依存性細胞であるヒト線維芽細胞をモデル細胞として用い、培養プロセスを自動化する培養装置の開発と評価を行った。結果として、本研究で開発された自動培養装置を用いたヒト線維芽細胞培養では、3週間以上の無人操作と正常な培養細胞（ 3.0×10^7 cells）が可能であることが確認され、組織片からの初代培養も、組織の処理条件と培養装置の稼働を最適化することにより、非常に有効な細胞回収数（ $1.82 \sim 2.3 \times 10^7$ cells）を得ることができると確認した。

最終年度は、より複雑な制御を必要とするであろう未分化な幹細胞（ヒト骨髄由来間葉系幹細胞：MSC）の培養と分化誘導が可能かを評価し、自動培養装置の性能と可能性を検討した。

各年度では、平行して安全性の自動検出システム構築を目標としたLOH解析手法の確立や、実際の運用を想定した初代培養に用いる細胞のキャラクタリゼーションをマイクロアレイによる遺伝子プロファイル解析により行った。

A. 研究目的

再生医療に用いる細胞の多くは、手作業による細胞培養を必要としている。この作業は熟練を要し、扱う器材も多岐に渡るため、ヒューマンエラー、コンタミネーションのリスクが高い。また培養条件の均一化と品質の再現性向上も重要なファクターであり、医療品と同等以上の安全性を確保する仕組みが必要である。さらに、現在の再生医療の多くは研究フェーズにあるが、産業化を進めるに当たっては、コストの問題も配慮する必要がある。すなわち、培養作業に伴う工数と、その人的・物的管理費用、高潔な施設の建設ならびに管理には莫大な費用がか

かることが予想されており、新しい医療技術の普及を阻害する要因になり得ると考えられる。このように、安全性の確保とコスト低減の両立を図る必要があり、現状では大きな課題がある。

このような課題に対して、我々は安全性やコストの課題を克服する解の一つとして、細胞培養の自動化装置を開発してきた。開発を始めるに際しては、医薬品製造などに係るレギュレーションを精査し、また一般病院の臨床医師、大学研究者などのアドバイスを参考に、従前の細胞培養プロトコルを尊重しながらも、安全性をバリデートできない外気の侵入を阻止し、マイクロコンピュータで全自動

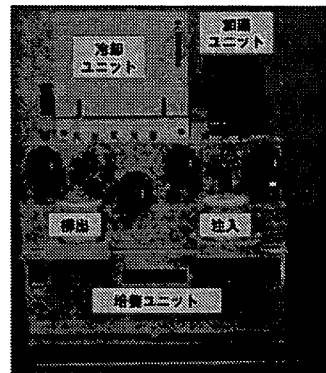
制御するシステムを開発することに成功した。このシステムは、培養プロトコルをプログラマブル化することにより、多目的に使用可能となっており、再生医学の研究が加速できることが期待された。このためこれを実証するために、培養が比較的簡単であり臨床応用としての可能性の高いヒト線維芽細胞の培養を行い、長期培養における装置の利便性・安全性・機能性を評価した。また、培養工程が分化しきった線維芽細胞よりも複雑であり、分化能を維持した培養や、分化誘導などの操作が求められる幹細胞 (MSC) においても、その培養の利便性・安全性・機能性を評価することで、自動培養装置の有効性を示すこととした。特に我々は、実際の臨床ヒト細胞を長期培養することで、株化細胞の培養とはことなるより実用的な機能性の評価をすることに努めた。また、実際の再生医療によって重要なステップである、組織からの初代培養を自動培養装置内で行うための諸条件の最適化も行った。

装置の開発と平行して、平行して安全性の自動検出システム構築を目標とした LOH 解析手法の確立や、実際の運用を想定した初代培養に用いる細胞のキャラクターゼーションをマイクロアレイによる遺伝子プロファイル解析により行い、自動培養装置を医療施設に導入するための周囲インフラの確立と検討も行った。

B. 研究手法

小型かつ内部消耗品が完全にディスプレイ可能な無菌的培養チュービングを配した自動培養装置を開発し、これを用いて線維芽細胞・MSC の培養を行った。継

代培養、培地交換、画像取得などはすべて遠隔 PC からの操作およびジョブリストの構築によって行い、細胞の装置内への播種以外の工程をすべて自動で行った。



(図 1) 開発自動培養装置外装

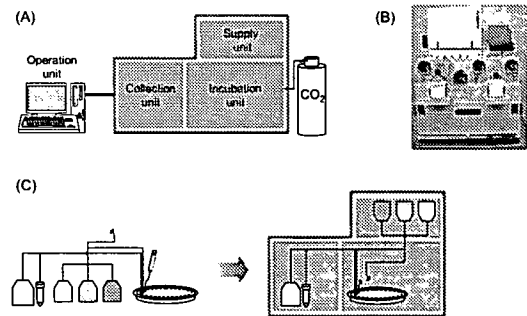


Fig. 1

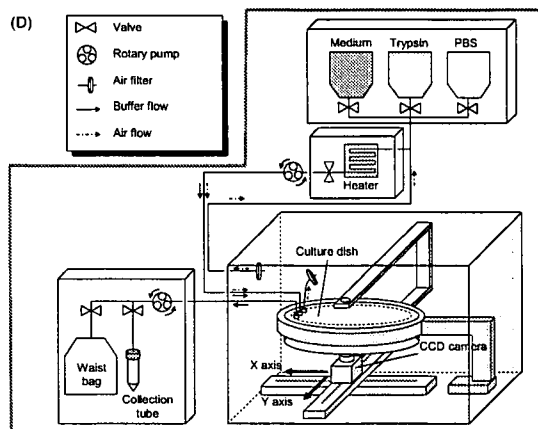


Fig. 1

(図 2) 開発自動培養装置外装

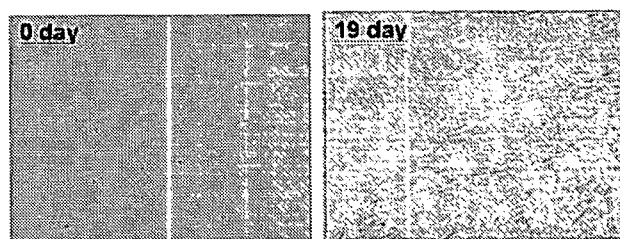
細胞（Cambrex 社正常ヒト線維芽細胞、歯肉由来ヒト臨床サンプル、皮膚由来ヒト臨床サンプル、ヒト由来 MSC）、培地、トリプシン、PBS を無菌的に装置内部にセットした送液チューブを通じて送液し、直径 30cm 特製培養皿にて培養を行った。継代、培地交換、回収の全ての工程は、プログラミングした工程として自動的に装置が行い、培養中の細胞の状態の映像は 30 分置きに画像化して保存した。一定期間の培養の後、装置で培養した細胞は PC からのプログラム操作によって培養皿から回収し、回収した細胞液をクリーンベンチにて操作後、細胞計測装置を用いて細胞数・生存率などを測定した。培養中の画像を定期的に保存することで、細胞の育成状況をモニタリングし、回収のタイミング・操作の条件を微調整しながら培養を繰り返した。

C. 研究結果

図 1 の自動培養装置を用いた購入ヒト正常細胞の培養では、19 日間の継代培養（自動培地交換 3 日間隔）を経て、1 培養皿から 3.0×10^7 cells を得ることができた。この細胞数は、例えば皮膚修復に用いる場合を想定すると、約 1.5 回分の数であるため、正常ヒト線維芽細胞を全自動で十分に培養できることを確認した（表 1）。さらに、この培養における細胞の形態は画像から正常であり、回収細胞の生存率も 90.7% と非常に高いことが明らかとなった（図 2）。

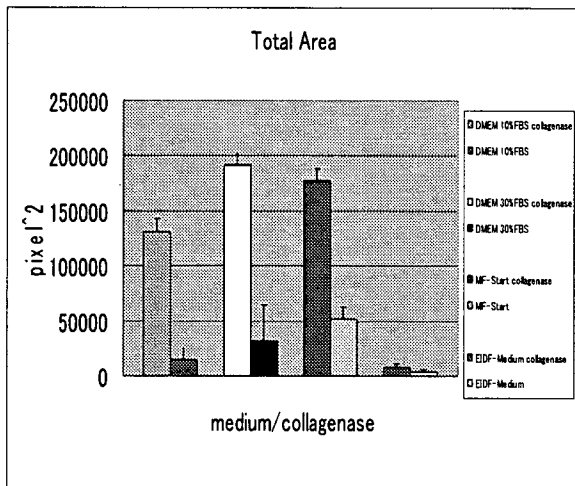
（表 1）正常ヒト線維芽細胞の自動培養装置を用いた培養(19 日)結果

Cell Type	Normal human fibroblast (Adult oriented) (Cambrex)
Medium	D-MEM (Sigma) + 10% FBS + 2% Antibiotic Antimicotic
Frequency of medium change	Every 3 days
Cell culture period	19 days
Seeding cell number	1.0×10^6 cells
Collected cell number	3.1×10^7 cells
Collected cell viability	90.7%



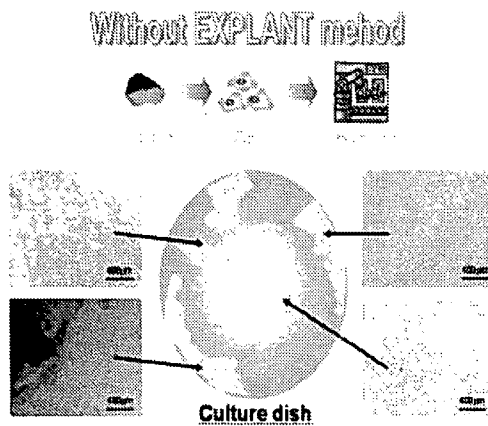
（図 2）自動培養装置を用いた細胞培養中の細胞モニタリング画像

通常の再生医療における細胞培養では、組織片から細胞を、初代培養を経て得る工程があり、これは熟練と経験を要する工程である。自動培養装置を用いた培養も、このような現実的な課題を克服する必要があったため、次ぎにこのような組織片からの初代培養を試みた。この際、得られた組織片を酵素処理する条件の最適化を行い、手作業で初代培養の効率を確認した（図 3）。



(図 3) マウス組織上皮の酵素処理条件検討。酵素処理によって初代培養の効率が飛躍的にあがることが確認された。

最適化した酵素処理を施した組織片を図 1 の培養装置に PC を介した操作で投入して培養した結果、図 4 のような偏りを持った増殖ではあったが、 $1.82 \sim 2.3 \times 10^7$ cells を 2 例のヒト線維芽細胞を歯肉片より回収できることを確認した。回収された初代培養細胞は、88% という生存率であり形態的にも、通常の手培養と同じような細胞を得られていた。

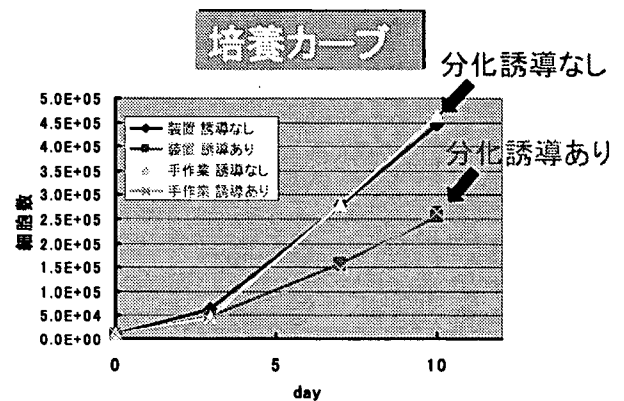


(図 4) 培養皿 (自動培養装置) における初代培養細胞の増殖図
次に、図 1 の自動培養装置を用いてヒト

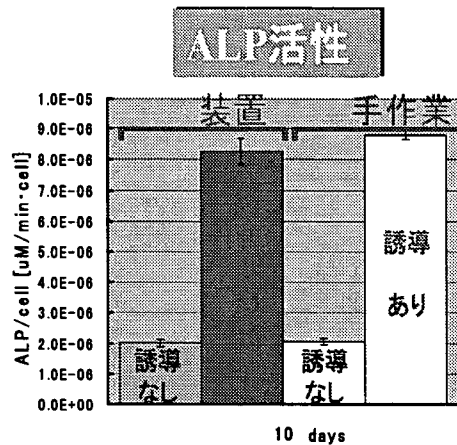
MSC の培養を行い、手作業による培養との比較検討を行った。

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、手作業と変化が無かったため、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。



(図 5) MSC 培養における自動培養装置の影響



(図 6) 自動培養装置を用いて培養した MSC の骨形成能評価

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。

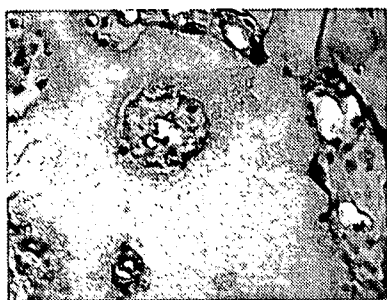


図7: 図1の装置を用いて培養した細胞による骨形成

今回開発した培養装置では、同一ディッシュを使った継代培養方法を導入したため、大幅な装置自体のコンパクト化が可能であった。結果として、約60cmx60cmx60cmの培養装置にサイズダウンすることが可能であった。このようなコンセプトに基づいた装置設計を発展させ、積載ラックなどと組み合わせれば、臨床現場で一人一台の培養装置を必要とする場合、省スペースで大量の患者を受け入れることができる可能性が示唆された。

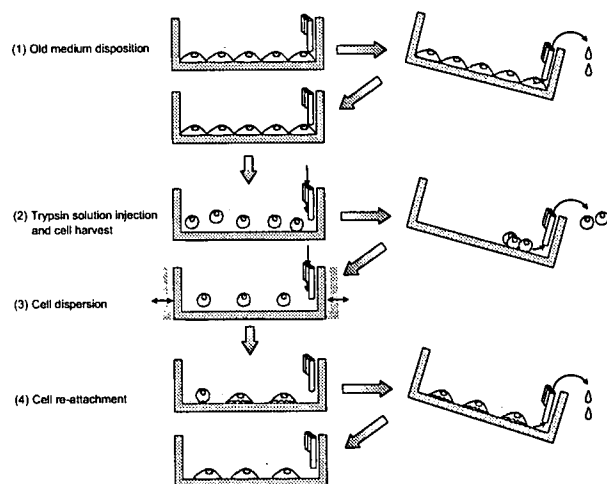


Fig. 4

(図8)同一ディッシュを用いたコンパクト継代培養システム

マイクロアレイを用いた歯肉・真皮由来の線維芽細胞の遺伝子プロファイル比較

臨床ヒト線維芽細胞（皮膚由来8例、歯肉由来8例）における遺伝子発現データを解析したところ、8,500遺伝子において114遺伝子が皮膚由来の線維芽細胞で優位に高く発現し、154遺伝子が歯肉由来の線維芽細胞で優位に高く発現していることがわかった。総じて、年齢にかかわらず歯肉由来の線維芽細胞の方がより多くの活性化因子を多く発現していることが示唆された。

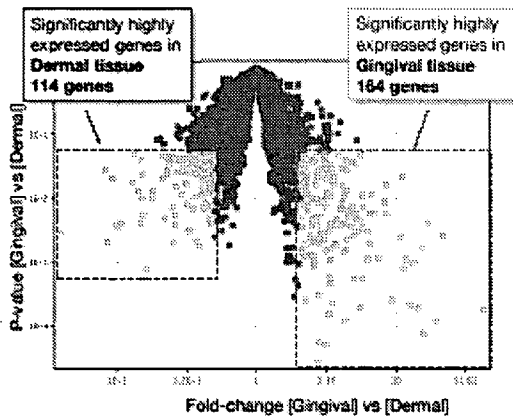


図 8: 皮膚由来・歯肉由来の線維芽細胞の遺伝子発現プロファイル比較

また、各組織に特異的に高発現していた遺伝子をピックアップし、Gene Ontology解析を行ったところ、抗加齢に関連する遺伝子の多くが、歯肉由来の細胞で高く発現していることがわかった。例えば、抗加齢に関与していると考えられる抗酸化酵素関連遺伝子(superoxide dismutase 2、superoxide dismutase 1/3)は歯肉由来の線維芽細胞の方が 1.5~2.8 倍の高発現を示していた。歯肉細胞は、皮膚よりも組織採取が主義的に簡単であり、患者的にも受け入れられやすい場合が多い。また、酵素処理によって自動培養装置への投入もしやすいため、皮膚の癬痕・皺などの修復に対しての細胞治療においては、自動培養装置とも相性が良く、外科的手技も勘弁で、抗加齢的な治療効果が期待される歯肉細胞の有効性が示唆されるものであった。

図 6: 皮膚由来・歯肉由来の線維芽細胞の遺伝子発現プロファイル比較(Gene Ontology 解析)

GO hierarchy	Gene Title	Gene Symbol	p-value	Regulation (up: gingival, down: dermal)
Aging	T-box 2	TBX2	0.002	up
	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2	SRD5A2	0.038	down
Oxidoreductase activity	retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis)	RDH5	0.016	down
	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	PTGS1	0.003	down
	EH-domain containing 3	EHD3	0.002	down
	cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	CYP26B1	0.010	down
	24-dehydrocholesterol reductase	DHCR24	0.015	up
	lectin, octylglicosyl-binding, soluble, 3 binding protein	LGAL3BP	0.000	up
	glutathione peroxidase 3 (plasma)	GPX3	0.021	up
	isoprene dehydrogenase 2 (family (mitochondrial))	ALDH2	0.004	up
	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NDQ1	0.019	up
	fatty acid oxidase 2	FAO2	0.033	up
	dehydrogenasetransferase (SDR family) member 3	DHRS3	0.000	up
	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1	CYP27A1	0.000	up
	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	HSD17B2	0.000	up
	superoxide dismutase 3, extracellular	SOD3	0.004	up
	flavin containing monooxygenase 1	FMO1	0.020	up
	alpha-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	AKR1B10	0.002	up
cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1	CYP7B1	0.029	up	
prostaglandin G/H synthase (cyclooxygenase) 1	PTGS1	0.044	up	
fatty acid desaturase 1	FADS1	0.013	up	
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	HSD17B14	0.011	up	
Antioxidant activity	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	PTGS1	0.003	down
	glutathione peroxidase 3 (plasma)	GPX3	0.021	up
	superoxide dismutase 3, extracellular	SOD3	0.004	up
	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorby fundus dystrophy, pseudoinf)	TIMP3	0.011	down
	tenascin C (hexabrachion)	TNC	0.006	down
	matrix metalloproteinase 1 (interleukin collagenase)	MMP1	0.011	down
	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	MMP12	0.003	down
	latent transforming growth factor beta binding protein 2	LTBP2	0.029	down
	thrombospondin 4	TNBS4	0.045	down
	fibroblast growth factor 1 (acidic)	FGF1	0.015	down
Extracellular matrix	secreted phosphoprotein 1	SPP1	0.041	down
	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	GABBR2	0.043	down
	collagen, type VIII, alpha 1	COL8A1	0.025	down
	collagen, type X, alpha 1(Schmid metaphyseal chondrodysplasia)	COL10A1	0.005	down
	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	MMP14	0.005	up
	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	LGAL3BP	0.000	up
	transforming growth factor, beta-induced 5(kDa)	TGFBI	0.011	up
	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFCAM1	0.025	up
	feritin 2 (nonpolar contractural arachidonic acid)	FBN2	0.022	up
	collagen, type V, alpha 1	COL5A1	0.024	up
	heparan sulfate-rich transmembrane protein 2	FLRT2	0.003	up
	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon	GABRE	0.010	up
	superoxide dismutase 3, extracellular	SOD3	0.004	up
	glypican 3	GPC3	0.001	up
	collagen, type IV, alpha 1	COL4A1	0.000	up
	spandin 2, extracellular matrix protein	SPON2	0.002	up
CD243 molecule, encosianin	CD248	0.001	up	
heparan sulfate-rich transmembrane protein 3	FLRT3	0.016	up	
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	0.009	up	

D. 考察

我々の開発した自動培養装置は、再生医療の産業化の際に現実性の高い「既に分化した細胞」であるヒト線維芽細胞を用いた場合でも、分化能を維持した幹細胞を培養する場合であっても、安定に長期間自動培養が行えることが確認された。また、購入細胞及び、同意を得たヒト正常細胞は、どれも自動培養装置を用いて、十分な細胞を得ることができた。さらに、自動化が難しいと考えられた初代培養を、酵素処理を通じて簡易化できたため、現実的な細胞取得現場における有効性が期待されるものであった。

開発した自動培養装置は、プログラムしたジョブリストに沿った自動培養を行うことができるが、各個体の生育具合に

合わせた「本来の」自動培養にはまだ至っていない。これは本研究を通じて同じく分担研究者である本多らのインテリジェント化ソフトを組み込むことで、達成できるのではないかと考えられる。実際に、本培養装置で取得した画像(CCD画像)を解析したが、どのような細胞形態特徴量を抽出することができたため、今後のインテリジェント化によって、再生医療におけるルーチンワークを効率的かつ安全にこなし、実用化に大きく貢献できるのではないかと考えられた。

E. 結論

本研究を通じて、再生医療の実用化を推進するための安全性向上のための自動培養装置の開発と、そのコンセプトの有用性を立証することができた。また、結果としてヒト臨床サンプルを十分な回収量にまで自動培養することができたため、本研究で開発された自動培養装置は接着依存性の細胞を用いた再生医療施設へ導入されれば、その効率を大幅に向上することが期待されるものである。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

R. Kato, K. Okada, T. Suzuki, Y. Komori, H. Tachikui, D. Iejima, H. Kagami, M. Ueda: Development of Fully-Automated Cell Culture System Adopted to Adhesive Cells for Clinical Usage, 8th Tissue Engineering Society International (TESI), Shanghai, China, October, 2005.

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、岡田邦彦、各務秀明、上田実 再生医療実用化に向けた線維芽細胞自動培養装置の開発, 再生医療学会, 東京, 2006年3月

加藤竜司、岡田邦彦、各務秀明、上田実 再生医療の産業化を目指した細胞自動培養装置の開発, 化学工学会, 東京, 2005年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2006-008521 自動培養装置
出願準備中 自動培養装置

2. 実用新案登録 なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

〈主任研究者〉

(上田 実)

M.Ueda, Y.Yamada, R.Ozawa, Y.Okazaki :Clinical Case Reports of Injectable Tissue-engineered Bone Applied for Alveolar Augmentation with Simultaneous Implant Placement, *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 25(2), 129-137, 2005

H.Maeda, T.Kasuga, M.Noagami, M.Ueda : Preparation of bonelike apatite composite for tissue engineering scaffold, *Science and technology of Advanced Materials* 3, 48-53,2005

K.Ito, Y.Yamada, T.Nagasaka, S.Baba, M.Ueda Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: A comparison among autogeneous bone, bone substitute(Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings, 15, 64-72, 2005

K.Hamamura, Keiko.Furukawa, T.Hayashi, T.Hattori, J.Nakano, H.Nakashima, T.Okada, H.Mizutani, H.Hattori, M.Ueda, T.Urano, K O.Lloyd, Koichi Furukawa : Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells, *PNAS*, 102(31), 11041-11046, 2005

K.Hamamura, K.Tanahashi, K.Furukawa, T.Hattori, H.Hattori, H.Mizutani, M.Ueda, T.Urano, K.Furukawa : G M1 expression in H-ras-transformed NIH3T3 results in the suppression of cell proliferation inducing the partial transfer of activated H-ras from non-raft to raft fraction, *International Journal of Oncology*, 26, 897-904, 2005

H.MJ, Sumita Y, Ueda M : Histological and Immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis, *Arch Hitol Cytol* 68(2), 89-101, 2005

M.Murata, M.Momose, K.Okuda, Y.Ninagawa, M.Ueda, H.Yoshie : Immunohistochemical Localization of Cytokeratin 19, Involucrin and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Cultured Human Gingival Epithelial Sheets, *International of the International Academy of Periodontology*, 7/4, 129-134, 2005

A.Ito, K.Ino, M.Hayashida, T.Kobayashi, H.Matsunuma, H.Kagami, M.Ueda, H.Honda: Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force : *Tissue Engineering*, 11, 2005

A.Ito, E.Hibino, C.Kobayashi, H.Terasaki, H.Kagami, M.Ueda, T.Kobayashi, H.Honda: Construction and Delivery of Tissue-Engineered Human Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets, Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force, *Tissue Engineering*, 11, 489-496,2005

H.Hibi, M.Ueda, M.Sakai, Y.Ikemori. Orthodontic Anchorage System Using a Locking Plate and Self-Drilling Screws. *J Oral Maxillofac Surg* 64, 1173-1175, 2006.

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

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

M.Murata, M.Momose, K.Okuda, Y.Ninagawa, M.Ueda, H.Yoshie. Immunohistochemical Localization of Cytoker

- atin 19, Involucrin and Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Cultured Human Gingival Epithelial Sheets. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 8 (1) 33-38, 2006
- M. Honda, T Ohara, Y. Sumita, T Ogaeri, H. Kagami, M Ueda. Preliminary Study of Tissue-Engineered Odontogenesis in the Canine Jaw. *Journal Oral Maxillofac Surg* 64, 283-289, 2006.
- Ito, E. Hibino, C. Kobayashi, H. Terasaki, H. Kagami, M. Ueda, T. Kobayashi, H. Honda. Construction and Delivery of Tissue-Engineered Human Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets, Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force. *Tissue Engineering*, 11, 3/4, 489-496, 2006.
- M. Ohya, Y. Yamada, K. Wada, K. Watanabe, R. Ozawa, H. Hibi, M. Ueda. Bone Regeneration Method Using Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) Complexes for sinus Floor Elevation in Rabbits. *Dentistry in Japan*, 42, 61-64, 2006.
- H. Hibi, Y. Yamada, M. Ueda, Y. Endo. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J. Oral Maxillofac Surg*, 35, 551-555, 2006.
- Y. Yamada, A. Fujimoto, A. Ito, R. Yoshimi, M. Ueda. Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials* 27, 3766-3781, 2006.
- Y. Sumita, M. J. Honda, T. Ohara, S. Tsuchiya, H. Sagara, H. Kagami, M. Ueda. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3238-3248, 2006.
- M. J. Honda, T. Shimodaira, T. Ogaeri, Y. Shinohara, K. Hata, M. Ueda. A novel culture system for porcine odontogenic epithelial cells using a feeder layer. *Archives of Oral Biology* 51, 282-290, 2006.
- Y. Yamada, M. Ueda, H. Hibi, S. Baba. A Novel Approach to Periodontal Tissue Regeneration with Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma Using Tissue Engineering Technology: A Clinical Case Report. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, vol. 26(4), 363-370, 2006.
- H. Mizuno, K. Hata, K. Kojima, L. J. Bonassar, C. A. Vacanti, M. Ueda. A Novel Approach to Regenerating Periodontal Tissue by Grafting Autologous Cultured Periosteum. *Tissue Engineering*, vol. 12(5), 1227-1235, 2006.
- K. Ito, Y. Yamada, T. Naiki, M. Ueda. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin. Oral. Implant Res.* 17, 579-586, 2006.
- M. Ohya, Y. Yamada, R. Ozawa, K. Ito, M. Takahashi, M. Ueda. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin. Oral. Implant Res.* 17, 579-586, 2006.
- H. Agata, I. Asahina, Y. Yamazaki, M. Uchida, Y. Shinohara, M. J. Honda, H. Kagami, M. Ueda. Effective Bone Engineering with Periosteum-derived Cells. *J. Dent Res* 86(1), 79-83, 2007.
- H. Agata, I. Asahina, Y. Yamazaki, M. Uchida, Y. Shinohara, M. J. Honda, H. Kagami, M. Ueda. Effective Bone Engineering with Periosteum-derived Cells. *J. Dent Res* 86(1), 79-83, 2007
- D. Mizuno, H. Hideaki, H. Mizuno, J. Mase, K. Usami, M. Ueda. Bone regeneration of dental implant dehiscence

defects using cultured periosteum membrane. *Clinical Oral Implants Research*, 2007 (Accepted)

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

Kazunori Shimizu, Akira Ito, Manabu Arinobe, Yosuke Murase, Yoshihisa Iwata, Yuji Anrita, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, and Hiroyuki Honda. Effective Cell-Seeding Technique Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic force onto Decellularized Blood Vessels for Vascular. *Tissue Engineering*.

Kazunori Shimizu, Akira Ito, Manabu Arinobe, Yosuke Murase, Yoshihisa Iwata, Yuji Narita, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, and Hiroyuki Honda. Effective Cell-Seeding Technique Using Magnetite Nanoparticles and Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force onto Decellularized Blood Vessels for Vascular Tissue Engineering. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, Vol.103, No. 5, 472-478, 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* (Accepted).

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

D. Iejima, Y. Sumita, H. Kagami, A. Ando, M. Ueda. Odontoblast marker gene expression is enhanced by a CC-chemokine family protein MIP-3 α in human mesenchymal stem cells, *Archives of oral biology* vol.52, 924-931, 2007.

上田実:再生医療は歯科をどう変えるかー 第8回「再生医療とアンチエイジング」日本歯科評論 2:97-100, 2005

上田実:再生医療は歯科をどう変えるかー 第9回「再生医療と特許法」. 日本歯科評論 3:85-88, 2005

上田実:人体再生はどこまで可能になったか. *Medical Science Digest* 31:13-15, 2005

上田実:ティッシュエンジニアリングと産業化. 日本医学館 181-187, 2005

上田実:再生医療は歯科をどう変えるかー 第10回「再生医療の臨床応用に向けて」. 日本歯科評論 4:101-104, 2005

上田実:求められる歯科医療2. *Dental Tribune Japan Edition* 2:24, 2005

上田実:21世紀の歯科医療. 歯界展望特別号 58-62, 2005

上田実:実用化に向かう歯と歯槽骨の再生医療. 中・四国矯正歯科学会雑誌 17:1-7, 2005

上田実:総括. 日本再生医療学会雑誌 11:17, 2005

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

上田実 培養皮膚ビジネスの開始と再生医療 日本炎症・再生医学会雑誌 第26巻第2号80-81, 2006.

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

上田実 再生医療をめざすバイオベンチャー 医学のあゆみ Vol.217 (4), 2006.

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

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

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

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

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

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

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

三ッ口秀幸, 上田実, 平田仁 神経再生誘導管の有効性試験 骨軟部吸収性材料フォーラム2007 (抄録集), 22

上田実 再生医療の成り立ちと実用化に向けた新たな取り組み 美容医療への応用ティッシュエンジニアリング2007, 275-285.

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 「再生医療と美容」(上田実編) 南山堂, 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)

- Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 21: 141-147, 2006.
- Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials*. 27: 3238-3248, 2006.
- Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Shear stress facilitates tissue-engineered odontogenesis. *Bone*. 2006 in press
- Honda MJ, Ohara T, Sumita Y, Ogaeri T, Kagami H, Ueda M. Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J Oral Maxillofac Surg*. 64: 283-289, 2006.
- Ohno K, Hattori T, Kagami H, and Ueda M. Effects of Preceding Sialadenitis on Development of Autoimmunity against Salivary Gland. *Oral Diseases* in press.
- Mase J, Mizuno H, Okada K, Sakai K, Mizuno D, Usami K, Kagami H, Ueda M. Cryopreservation of cultured periosteum: effect of different cryoprotectants and pre-incubation protocols on cell viability and osteogenic potential. *Cryobiology* in press.
- Matsunuma H, Kagami H, Narita Y, Hata K-I, Ono Y, Ohshima S, and Ueda M. The potential of bone marrow-derived mononuclear cells for enhancing angiogenesis in ureteral acellular matrix. *Tissue Engineering* in press.
- Tatebe M, Nakamura R, Kagami H, Okada K, Ueda M. Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytototherapy* 7, 520-530, 2005.
- Ito A, Ino K, Hayashida M, Kobayashi T, Matsunuma H, Kagami H, Ueda M, Honda H. Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng*. 11, 1553-61, 2005.
- Kobayashi C, Kagami H, Kito K, Ishikawa K, Ebisawa K, Ueda M, Terasaki H. Selective and Efficient Culturing of Retinal Pigment Epithelial Cells Using a Feeder Layer. *Cytototherapy* 7, 427-37, 2005.
- Michael A Hale, Kagami H, Ling Shi, Holland Andrew M, Elsasser Hans-Peter, PhD; Hammer Robert E, Raymond J. MacDonald. The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas. *Dev Biol*. 286, 225-37, 2005.
- Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol* 68, 89-101, 2005.
- Ito A, Hibino E, Kobayashi C, Terasaki H, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T, Honda H. Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng*. 11, 489-96, 2005.
- Kito K, Kagami H, Kobayashi C, Ueda M, Terasaki H. Effects of cryopreservation on histology and viability