

厚生労働科学研究費補助金  
長寿総合科学研究事業

**歯周組織再生を基盤とした  
咀嚼機能改善技術の開発**

平成19年度 総括研究報告書

**主任研究者 齋藤 正寛**

平成20 (2007) 年 4月

# 目次

|      |   |    |
|------|---|----|
| I.   | 総括研究報告                                      | 3  |
|      | ヒト顎骨由来骨芽細胞の調整と生体外増幅                         | 4  |
| II.  | 分担研究報告                                      | 9  |
| 1.   | 動物モデルを用いた「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」評価系の確立に関する研究 | 10 |
|      | 村上 伸也                                       |    |
| 2.   | ヒト顎骨由来間葉系細胞の調整                              | 13 |
|      | 梅澤 明弘                                       |    |
| 3.   | ヒト正常細胞の生体外増幅に関する研究                          | 16 |
|      | 清野 透  |    |
| 4.   | 歯髄幹細胞を用いた歯槽骨再生療法の可能性                        | 18 |
|      | 松下 健二                                       |    |
| III. | 研究成果に関する一覧表                                 | 21 |
| IV.  | 研究成果の刊行物・別冊                                 | 26 |

## I. 総括研究報告

ヒト顎骨由来骨芽細胞の調整と生体外増幅

齋藤 正寛

## 歯周組織再生を基盤とした咀嚼機能改善技術の開発

(H19-長寿-003)

### ヒト顎骨由来骨芽細胞の調整と生体外増幅

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

**研究要旨** 高齢化社会を向かえた今、高齢者の口腔機能の改善はQOL維持およびADL改善、すなわち介護予防に繋がる重要な因子であると考えられる。しかし高齢者の口腔機能は歯周病による歯の喪失で著しく低下する。この歯周病では、慢性炎症により歯槽骨が崩壊を受ける。そこで本研究では、骨芽細胞製剤を開発し、骨再生療法により歯周病を治療し、口腔機能の回復させる研究開発を目指す。そのため高齢者より効率よく顎骨由来骨芽細胞を採取するプロトコルを作製すると共に、得られた骨芽細胞製剤の骨形成能力を判定する。

#### A. 研究目的

高齢化社会を迎えた現代社会において、要介護者の増加が深刻な社会問題になりつつある。このような問題に対処するため、介護予防の推進が重要視されている。この介護予防の3本柱として運動器の機能向上、栄養改善、口腔ケアが挙げられており、高齢者の口腔機能の維持が鍵になっていることが伺える。しかし高齢者の口腔機能は、歯周病により著しく低下する。歯周病は40歳を超える国民の約50%以上が罹患する生活習慣病であり、75歳以上の後期高齢者になると15本以上の歯を失っていることが「平成17年度歯科疾患実態調査報告」(厚生労働省医政局歯科保健課)より報告されている。また80歳以上の高齢者においては1人平均現在歯数が4.6歯となっており、さらには約半数の人がすべての歯を喪失している。したがって歯周病への対処ならびに咀嚼機能の維持、回復のための新しい治療技術の開発は、健全な咀嚼能力を維持し、健やかで楽しい生活を過ごそうという介護予防の一層の推進を図るものである。

現在の歯周病の再建治療は患者自身の治療能力に依存するため、軽度の歯周病には効

果を示すものの、広範囲の骨欠損を有する歯周病には対応することが困難である(参考資料2)。そこで本研究の目的は、生体外増幅したヒト顎骨由来間葉系細胞と、細胞移植製剤の安全性を確立し、広範な骨欠損を伴う歯周病患者に対する新たな細胞治療法を開発することである。具体的には、高齢者より顎骨由来骨芽細胞の採取プロトコルを作製し、得られた骨芽細胞の生体外増幅、安全性の確保、骨形成能力の判定する技術開発を試みる。同時に細胞移植プロトコルを確立する評価系を確立する。当該年度は前年度に確立したヒト骨芽細胞製剤の骨形成能力を判定すると共に安全性の高い生体外増幅技術の確立することを目標にしている。

#### B. 研究方法

##### (1)ヒト歯槽骨由来骨芽細胞(HAOB)の骨形成能力の評価

平成18年度の研究計画で確立した骨芽細胞採取プロトコルを用いて得られた55歳の歯槽骨より採取した骨芽細胞(Human Alveolar bone derived Osteoblast:HAOB)を用い、以

下の実験で骨芽細胞分化能力を判定した。まずHAOBを組み換えヒトbone morphogenic protein 2 (rhBmp-2)を添加して9日間培養した後に、石灰化能力をアリザリンレッド染色、骨芽細胞分化能力をアルカリフォスファターゼ(ALPase)活性にて評価した。またrealtime PCR法にて骨芽細胞分化マーカーであるbone sialoprotein, osteocalcin, RUNX2およびOSTERIXの遺伝子発現を確認した。

## (2)培養操作によるHAOBの分化能力に対する影響

生体外増幅したHAOBの骨芽細胞分化の維持能力を解析するため、継代数によるHAOBの骨芽細胞分化を解析した。そのため、相対倍加係数(population doubling:PD)3、6、9、12、15、18、21、24、27、30のHAOBを用意し、(1)方法に従い骨芽細胞の分化能力を判定した。

## (3)HAOBの遺伝子プロファイリング解析

骨芽細胞製剤の遺伝子診断基準を作成するために、HAOBの遺伝子プロファイリング解析をDNAマイクロアレイ解析で評価した。この目的に(2)で用意したHAOBよりHAOBの遺伝子発現プロファイリング解析をDNAマイクロアレイ解析で比較検討した。

## (4)安全性の評価

HAOBの安全性を調べるために、HAOBの染色体診断を行った。具体的にはG-バンド法による染色体数と形態を観察し、またSKY法により転座の有無を観察して、核型に変化が生じていないかを解析する。また培養操作による染色体の影響を調べるため、PD3とPD30のHAOBを用意して、染色体診断の比較検討を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されているため、機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。神奈川歯科大学にお

いては、ヒト顎骨由来間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(神奈川歯科大学、受付番号8平成14年3月承認、受付番号18、平成15年10月承認)。医療を前提とした品質管理システムの構築、標準操作手順書の作製、試薬等の受入試験検査、ならびに細菌・真菌・ウイルス等の汚染の危険性排除については、本研究の課題でもあり、それらの記録、最新技術の反映を含めて検討する。

## C. 研究結果

### (1)HAOBの骨芽細胞分化能力

55歳の患者より提供された骨片より採取したHAOBを用いてrhBmp-2刺激による骨芽細胞分化誘導を行った。10ng/mlから400ng/mlのrhBmp-2濃度の範囲内で骨芽細胞の分化誘導を行った結果、50ng/ml以上の濃度でアリザリンレッド染色陽性の石灰化物を形成することが観察された。そこで100ng/mlのrhBmp-2濃度でHAOBを刺激したところ、ALPase活性陽性の骨芽細胞へと分化することが観察された。rhBmp-2刺激後のHAOBの骨マーカー遺伝子の発現をrealtime PCRで確認した結果、bone sialoprotein, osteocalcin, RUNX2およびOSTERIXの発現が有意に上昇している事が確認された。以上の結果よりHAOBはrhBmp-2により骨芽細胞へ分化誘導される事が判明した。

### (2) HAOB分化能力の影響

継代によるHAOBの骨芽細胞分化能の維持に対する影響を調べた結果、PD16まではアリザリンレッド染色陽性の石灰化物を形成し、ALPase活性を示した。しかしPD21から石灰化物の形成ならびにALPase活性は顕著に低下し、PD29では全く観察されなかった。Osteocalcinの発現をrealtimePCRで解析したところ、PD16までは発現に変化は見られなかったが、PD21以降で発現量が低下した。これらの結果よりHAOBは継代により脱分化しすることが判明した。

### (3)HAOBの遺伝子プロファイリング解析

HAOBの脱分化に係わる遺伝子群を解析する目的に、PD6,21,35のHAOBから全RNAを採取し、DNAマイクロアレイ解析を行った。クラスタリング解析を行い変動する遺伝子を解析した結果、継代回数を重ねるごとに発現量が低下する遺伝子群と発現が上昇する遺伝子群が存

在する事が判明した。中でも骨形成に関わるosteocalcinは継代を重ねる事にその発現は顕著に低下し、またF-spondinなどの細胞外マトリックスの発現が顕著に上昇する事が判明した。これらの結果よりHAOBは、骨芽細胞マーカーを発現している前骨芽細胞の特性を有しており、継代と共にその形質は失われていくことが確認された。

#### (4)安全性の評価

HAOBの安全性を調べるために、PD3の染色体診断を行った。SKY法とG-バンド法により解析した結果、核型に異常は観察されなかった。次にPD35のHAOBの染色体安定性の影響を解析した結果、PD3と同様に異常は見られなかった。これらの結果より本培養方法により、核型に影響は与えないことが明らかになった。

#### D. 考察

これまで骨髄由来の間葉系細胞は高い骨形成能力を有することが報告されており、実際に再生培養骨を用いた変形性骨関節症の再生医療が行われている。近年、間葉系細胞は顎骨の骨髄由来からも採取可能であることが報告され、同細胞を用いて歯周病により失われた骨組織を再生させる治療技術の開発が行われている。このように間葉系骨細胞は骨再生医療という治療戦略の重要な一翼を担い、細胞治療における事実上の標準となっている。しかし、高齢者から骨形成能力の高い細胞製剤の開発は未だに報告が見られない。このような難題を解決するため本研究班では、高齢者から骨芽細胞の採取プロトコルの作成を試みた。

60歳代の顎骨歯槽骨より採取したHAOBは高い増殖活性を有しており、rhBmp-2刺激による骨芽細胞へ分化誘導されることが確認されたことから将来骨再生医療に有望な細胞製剤の候補であることが確認された。昨年度までの研究成果でHAOBが高い生体外増幅活性を有している事を確認していたが、骨芽細胞分化能力の維持に関しては不明であった。そこで分裂回数による骨芽細胞への分化能力の影響を調べた結果、分裂回数15回までは骨芽細胞分化誘導能力を維持している事が判明した。この分裂回数を境に急激に骨芽細胞の分化能力が低下することが判明した。このHAOB

の分化能力低下は、継代数増加に伴うゲノムレベルの変異が原因である可能性が考えられたため、染色体診断を行った。その結果、核型の異常は観察されなかったことから、HAOBは継代を重ねることにより脱分化して骨芽細胞分化能力を失う可能性が考えられた。そこでHAOBの脱分化の指標となるマーカー分子の同定を行う目的に、遺伝子プロファイリング解析をDNAマイクロアレイ法で行ったところ、osteocalcinの発現が脱分化の指標になることが判明した。Osteocalcinは骨芽細胞のマーカー分子の一つであるが、HAOBは増殖している状態でも同遺伝子を発現していることから、同細胞が骨芽細胞前駆体である可能性が示唆された。従ってosteocalcinの一定レベルの発現がヒト骨芽細胞前駆体のマーカーになる可能性が示唆された。次年度は、HAOBの分裂回数増加に伴い発現が低下する遺伝子群を同定し、HAOBの骨形成能力を判定する基準を作成することを予定している。

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

#### E. 結論

独自に開発したHAOBの骨形成能力を迅速に判定する評価システムの構築に成功した。HAOBは65歳以上の中高年層からも採取可能な骨芽細胞であり、in vitroによる骨芽細胞分化能を判定する事ができる。さらにHAOBの骨芽細胞の機能維持した状態での継代数も判明し、また通常の培養状態で骨芽細胞分化能を判定するマーカーを同定する事にも成功した。

ここまでの研究成果は、ヒト間葉系細胞専用培地を用いることで培養が可能になっているが、実際には患者由来の血清を用いて同様の

効果が有るかを調べる必要性が有る。今後は高齢者の歯周病治療に使用できる細胞移植製剤の供給源とする細胞提供システムを速やかに構築することを目指す。

細胞移植による新たな歯周病治療技術は、高齢者の口腔機能に重要な項目である。従って今後増加する要介護の後期高齢者に歯止めをかける、介護予防を推進するために、必須の予防医療技術になる。ヒト顎骨より骨芽細胞を採取して、歯周病により影響を受けた部位へ移植する系を確立することは、骨再生医療を必要とする移植医療の新たな分野の獲得につながることが考えられる。以上の理由により、再生医療による咀嚼機能回復は、高齢者の健康維持に貢献することが大きく期待される。

## F.健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表(英文)

1. K. Yoshizaki, S. Yamamoto, A. Yamada, K. Yuasa, T. Iwamoto, E. Fukumoto., H. Harada, **M. Saito**, A. Nakasima, K. Nonaka, Y. Yamada, and S. Fukumoto. 2008, Neurotrophic factor NT-4 regulates ameloblastin expression via full-length TrkB. *J Biol Chem.*283:3385-3391
2. S. Tsuchiya, M. Honda, Y. Shinohara, **M. Saito**, M. Ueda. 2008 Collagen type I matrix affects the molecular and cellular behavior of purified porcine dental follicle cells. *Cell Tissue Res*, 331(2):447-59
3. M. Shiga, **M. Saito**, M. Hattori, C.Torii K. Kosaki, T. Kiyono, and N. Suda. 2008, Characteristic phenotype of immortalized periodontal cells isolated from a Marfan syndrome type I patient. *Cell Tissue Res*, 331(2):461-464
4. E. Nishida, T. Sasaki, S. Kazuko Ishikawa, K. Kosaka, M. Aino, T. Noguchi, T. Teranaka, N. Shimizu and **M. Saito**. 2007 Transcriptome Database KK-Periome for Periodontal Ligament Development:Expression Profiles of the Extracellular Matrix Genes. *Gene* 404(1-2):70-79
5. E Hjiantonou, M Anayasa, P Nicolaou, I Bantounas, **M Saito**, S Iseki, JB Uney, LA Phylactou, 2007 Twist induces reversal of myotube formation. *Differentiation*, 76(2):182-92

6. N. Yoshida, K. Yoshida, A. Hosoya, **M. Saito**, T. Yokoi, T. Okiji, N. Amizuka, H. Ozawa, 2007 Association of TIMP-2 with extracellular matrix exposed to mechanical stress and its co-distribution with periostin during mouse mandible development. *Cell Tissue Res*, 330(1):133-45
7. **S.Yamada**, **M.Tomoeda**, **Y. Ozawa**, **S. Yoneda**, **Y. Terashima**, **K. Ikezawa**, **S. Ikegawa**, **M. Saito**, **S. Toyosawa**, **S. Murakami**. 2007 PLAP-1/Asporin, a Novel Negative Regulator of Periodontal Ligament Mineralization. *J Biol Chem* 282(32):23070-23080
8. T. Yamashiro, L. Zheng, Y. Shitaku, **M. Saito**, T. Tsubakimoto, K. Takada, T. Takano-Yamamoto, I. Thesleff. 2007 Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation*, 75(5):452-62
9. 齋藤正寛、歯科再生医療はどこまで到達し、どこへ向かうのか？歯根再生のキーワードとして[HERS]のメカニズムに迫る-EST データベースを用いた歯根膜発生機構の解析-、歯界展望、Inpress
10. 齋藤正寛、辻 孝、2007、臓器置換技術を応用した次世代歯科再生医療の開発、第 32 巻第 8 号、デンタルダイヤモンド、p80-84

### 著書

1. 西村理行、齋藤正寛、波多賢二、米田俊之、2007、分子生物硬組織研究のイノベーション(生命歯科医学のカットニング・エッジ)大阪大学出版会 p 2-19

### < 国外 >

1. **M Saito** Transcriptome Database for Periodontal Ligament Development:Expression Profiles of the Extracellular Matrix Genes, The 3rd international Symposium of Kyung Hee University School of Dentistry -Regeneration of Oral Tissue- 2007 December 17 Seoul, Korea
2. **M Saito** Transcriptome Database for Periodontal Ligament Development:Expression Profiles of the Extracellular Matrix Genes. Program of Osaka University - UCSF Joint Symposium in San Francisco Cutting Edge of BioDentistry - 2007 November 28, SanFrancisco USA
3. **M Saito** Transcriptome analysis of extracellular matrix genes involved in periodontal ligament development. 9th international conference on

tooth morphogenesis and differentiation 2007  
2007 September 8, Zurich, Switzerland

4. K Kosaka, **M Saito**, K Tsutsui, R Manabe, T Kiyono, H Ohshima, N Suda, G Ganjargal, T Teranaka, K Sekiguchi and T Yoneda  
ADAMTSL-4 and fibrillin-1 cooperate in the formation of oxytalan fiber during periodontal ligament development. 9th international conference on tooth morphogenesis and differentiation 2007 (TMD2007) 2007年9月8日 Zurich, Switzerland

<国内>

1. 相野誠、齋藤正寛、村上伸也、梅澤明弘、清野透、野口俊英、米田俊之 顎骨由来骨芽細胞を用いた歯槽骨再生療法の確立 第7回日本再生医療学会総会 2008年3月13日名古屋
2. **M Saito**, Molecular mechanisms of periodontal ligament development., 21<sup>st</sup> Century COE Program Symposium 2007 "Organization of Frontier BioDentistry Network" Japan-Korea International Symposium, 2008 February 1. Osaka
3. **M Saito** The forefront of regeneration therapy for tooth: 15th World Congress on Dental Traumatology. 2008 January 14, Nagoya
4. 齋藤正寛、高坂一貴、筒井仰、眞鍋理一郎、清野透、須田直人、Ganburged Ganjargal、寺中敏夫、関口清俊、米田俊之、新規細胞外マトリックスである ADAMTSL-4 は歯周靭帯のマイクロフィブリル形成を促進する。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 2007年12月15日 横浜
5. 齋藤正寛 歯周病の再生医療の最前線 東京理科大学 総合研究機構フォーラム 2007年11月12日 東京
6. 齋藤正寛、EST データベースを用いた歯根膜発生機構の解析 第49回歯科基礎医学会学術大会 8月29日 札幌
7. 齋藤正寛、西田英作、佐々木貴史、清水信義、米田俊之 歯周靭帯再生に関わる遺伝子データベースの構築 第28回炎症再生学会 2007年8月2日
8. 西田 英作、齋藤 正寛、佐々木 貴史、石川 サビヌ、清水 信義、米田 俊之 歯周靭帯特異的に発現する細胞外マトリックス因子の網羅的解 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 2007年12月12日 横浜
9. **M Saito**, E Nishida, T Sasaki, S K Ishikawa, N Shimizu, and T Yoneda, Establishment of transcriptome database for analyzing periodontal ligament development 1st Asian Biomaterials Congress, December 6, 2007, Tsukuba
10. 高坂一貴、齋藤正寛、大島勇人、須田直人、Ganburged Ganjargal、寺中敏夫、米田俊之、ADAMTSL-4 は Fibrillin-1 と協調してオキシタラン線維形成に関わる。第49回歯科基礎医学会学術大会・総会 2007年8月30日 札幌
11. 西田 英作、和田 知子、齋藤 正寛、米田俊之 歯根膜細胞系譜特異的に発現する細胞外マトリックス遺伝子の網羅的探索；歯小嚢と歯根膜における F-spondin と Tenascin N の特異的発現 第49回歯科基礎医学会学術大会・総会 2007年8月31日 札幌
12. 高坂 一貴、齋藤 正寛、西田 英作、相野 誠、野口 俊英、寺中 敏夫、米田 俊之 歯根膜微小線維形成に関わる新規細胞外マトリックス因子の解析 第50回春季日本歯周病学界学術大会 2007年5月18日 横須賀
13. 高坂 一貴、齋藤 正寛、筒井仰、眞鍋 理一郎、清野 透、大島 勇人、須田 直人、Ganburged Ganjargal、寺中 敏夫、関口 清俊、米田 俊之 ADAMTSL-4 と Fibrillin-1 はオキシタラン線維形成を介して歯根膜発生に協調的に働く。第39回日本結合組織学会、第54回マトリックス研究会 2007年5月10日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得  
なし
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし



## II. 分担研究報告

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

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

分担研究者 村上 伸也  
大阪大学 大学院歯学研究科  
口腔分子免疫学講座  
歯周病分子病態学・教授

**研究要旨** ビーグル犬を用いて、「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」の評価系を確立するために、昨年度確立したイヌ歯槽骨由来骨芽細胞(DAOB)を用いて移植プロトコルの確立を試みた。DAOBを歯槽骨欠損部位に移植した結果、DAOB移植群において新生骨の形成が認められた。一方、細胞を移植していない部位では十分な歯槽骨の新生が見られず、DAOBが骨再生能力を有することがin vivoで確認された。

### A. 研究目的

細胞の製剤化を視野に、医薬品GCP(平成9年厚生省令第28号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」と等しいレベルでの科学性を確保した評価系を確立するための第一歩として、ビーグル犬を用いた「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」の評価系を確立することを目標とした。昨年度までにビーグル犬歯槽骨骨片より骨芽細胞様細胞(DAOB: Dog Alveolar bone-derived Osteoblast)の採取プロトコルを確立しており、本年度はDAOBの移植プロトコルを確立することを目的に、以下に記す動物モデルを用いて研究を行った。

### B. 研究方法

#### 歯槽骨欠損モデルの作製

##### (1)歯周病動物モデルの作製

生後2.5年メスのビーグル犬を実験に供した。全身麻酔下にて左右下顎第四前臼歯および第一後臼歯部の歯肉を剥離した後に、両臼歯の分岐部に3 X 5mmの裂開状の骨欠損(2級根分岐部病変)を作成し、その後同部位にシリコンパテを挿入した。一ヵ月後にシリコンパテを除去し分岐部病変が作成されているのを確認した後に、歯根面にルートプレーニングを施し、移植受容床を作成した。

##### (2)DAOB移植プロトコルの作製

歯周病動物モデル作成時に外科的に切除された歯槽骨骨片から、既に確立しているヒト歯槽骨由来骨芽細胞(HAOB)採取プロトコルに従い、DAOBを採取した。得られたDAOBを、骨芽細胞分化誘導培地で1週間培養を行い、その後、アリザリンレッド染

色による石灰化能力の判定と、アルカリフォスファターゼ活性を測定し骨芽細胞への分化能力を確認した。また骨芽細胞マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法にて解析した。

次にDAOBを担体と混ぜ合わせた後に、(1)で作製した実験的分岐部病変にDAOBを自家移植した(50万細胞個/欠損部)。また細胞を移植せずに担体のみを移植した群をコントロールとして用いた。なお担体としては、顆粒状のハイドロキシアパタイト(OSferion:オリンパス)あるいはフィブリンゲルを用いた。

##### (3)骨形成能力の評価

移植6週後に顎骨を取り出し、マイクロCTにて骨再生量を判定した。その後、移植部位をトリミングし、ギ酸を用いて2ヶ月間脱灰を行った後にパラフィン標本を作成し、組織学的に骨再生量を判定した。

#### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

#### 1. DAOBの採取と骨芽細胞分化能力の評価

移植を行う動物より採取されたDAOBの骨芽細胞分化能力を解析した結果、高い石灰化物形成能力とアルカリフォスファターゼ活性を有していることが判明した。また強いオステオカルシンmRNAの発現が確認されたことから、DAOBは骨芽細胞の特性を有していることが確認された。

## 2. 動物モデルを用いたDAOBの歯槽骨再生能力の評価

DAOBを用いた移植プロトコルを確立する目的で、分岐部病変を有する上記動物モデルへの自家移植実験を行った。DAOB自家移植による骨再生能力をマイクロCTで判定した結果、フィブリンゲルを担体として用いた群で骨欠損部位に新生骨の形成が観察された。また同部位をヘマトキシリンエオジン染色にて組織学的に観察したところ、骨欠損部位に顕著な新生骨の形成が確認された。

一方、ハイドロキシアパタイトを担体としてDAOBを移植した群においては、骨欠損部位に肉芽組織が形成されており、十分な新生骨の形成は観察されなかった。またコントロール群でも新生骨の形成は観察されなかった。

## D. 考察

本歯周病動物モデルにDAOB+フィブリンゲルを移植することにより、骨再生を誘導できることが判明した。この結果よりDAOBは、骨再生医療用の細胞製剤として開発できる可能性が強く示唆された。

今後の課題として、DAOBにより再生された歯槽骨と宿主由来の歯槽骨を判別する評価系を確立し、DAOBの生体内における骨再生能力を詳細に検討する必要があると考えられた。また本実験において、DAOB移植時に用いる生体材料として顆粒状のハイドロキシアパタイトの有効性は認められなかったが、今後はDAOBの親和性を高める新たな生体材料の探索が必要になると思われる。

## E. 結論

歯周病動物モデルを用いてDAOBの移植プロトコル確立に成功した。また本実験系は「顎骨由来間葉系細胞を用いた骨再生医療技術」の評価系に適していることも確認された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) S. Yamada, M. Tomoeda, Y. Ozawa, Y. Terashima, S. Ikegawa, M. Saito, S. Toyosawa, S. Murakami. PLAP-1/asperin: A novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J. Biol. Chem.* 282 : 23070-23080, 2007
- 2) 村上伸也、島袋善夫、北村正博、山田 聡 歯周組織再生医療とDDS技術に期待するもの再生医療 (日本再生医療学会雑誌) 6:32-41, 2007.
- 3) Y. Shimabukuro, T. Ichikawa, Y. Terashima, T.

Iwayama, H. Oohara, T. Kajikawa, R. Kobayashi, H. Terashima, M. Takedachi, M. Terakura, T. Hashikawa, S. Yamada, S. Murakami. Basic fibroblast growth factor regulates expression of heparan sulfate in human periodontal ligament cells. *Matrix Biology*, 27: 232-241, 2008

### 4) 村上伸也、橋川智子

歯周組織再生の現状と将来の展望

再生医学のいま —基礎研究から臨床への展開に向けて—、治療、90: 609-616, 2008

## 著書

なし

## 学会発表

1. 橋川智子、島袋善夫、小笹匡雄、柴田恭子、安孫子宜光、村上伸也  
脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の硬組織形成細胞への分化誘導  
第50回春季日本歯周病学会学術大会 (横須賀市) 2007.05.18
2. 友枝美樹、山田 聡、小澤康宏、米田晋也、藤原千春、田内拓史、村上伸也  
歯根膜特異的分子PLAP-1におけるBMP-2との結合部位の検索  
第50回春季日本歯周病学会学術大会 (横須賀市) 2007.05.19
3. 村上伸也  
(シンポジウム) Periodontal Tissue Engineeringが変える歯周治療の未来  
第126回日本歯科保存学会春季学会 (さいたま市) 2007.06.08
4. 米田晋也、山田 聡、友枝美樹、藤原千春、田内拓史、野崎剛徳、柳田 学、橋川智子、村上伸也  
ヒト歯根膜細胞の全遺伝子発現プロファイリング解析により同定された遺伝子の機能解析  
第126回日本歯科保存学会春季学会 (さいたま市) 2007.06.07
5. 寺嶋宏暉、島袋善夫、寺嶋祥充、植田真紀、市川朋生、寺倉まみ、山田 聡、村上伸也  
FGF-2がマウス歯根膜細胞の遊走に及ぼす影響について  
第126回日本歯科保存学会春季学会 (さいたま市) 2007.06.07
6. 藤原千春、山田 聡、米田晋也、田内拓史、梶川哲宏、小澤康宏、村上伸也  
(ポスター) メカニカルストレスがヒト歯根膜細胞に及ぼす影響の網羅的遺伝子発現解析  
日本歯周病学会50周年記念大会 (東京都千代田区) 2007.09.22
7. 村上伸也  
(シンポジウム) 「サイトカイン療法」が広げる歯周組織再生の可能性  
日本歯周病学会50周年記念大会 (東京都千代田区)

2007.09.22

8. 田内拓司、山田 聡、前田憲一郎、小澤康宏、米田晋也、藤原千春、梶川哲宏、村上伸也

新規歯根膜特異的Periostinアイソフォームの同定と機能解析

第127回日本歯科保存学会秋季学会(岡山)2007.11.09

9. H. TERASHIMA, Y. SHIMABUKURO, Y. TERACHIMA, M. TERAKURA, M. TAKEDACHI, T. HASHIKAWA, S. YAMADA, S. MURAKAMI

FGF-2 Regulates Expression of Osteopontin in Periodontal Ligament Cells

55nd Annual Meeting of the JADR (Yokohama)

2007.11.17

10. T. SAHO, Y. SHIMABUKURO, M. UEDA, M. YANAGITA, M. KITAMURA, S. MURAKAMI

Biological Effects of FGF-2 on Human Pulp cells

55nd Annual Meeting of the JADR (Yokohama)

2007.11.17

11. C. FUJIHARA, S. YAMADA, S. YONEDA, T. TAUCHI, T. KAJIKAWA, Y. OZAWA, S.

MURAKAMI

Mechanical Stress-Induced Glutamate Signaling in Periodontal Ligament Cells

55nd Annual Meeting of the JADR (Yokohama)

2007.11.18

12.村上伸也

FGF-2を用いたPeriodontal Tissue Engineering

(シンポジウム、再生医療の臨床応用:歯周組織)

第7回日本再生医療学会総会2008.3.13

13.橋川智子ら、

脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の移植による

歯周組織再生誘導療法の開発

第7回日本再生医療学会総会2008.3.13

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

## ヒト顎骨由来間葉系細胞の調整

分担研究者 梅澤 明弘  
国立成育医療センター 生殖医療研究部長

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

### A. 研究目的

高齢化社会を向かえた今、歯および口腔の健康維持は、高齢者のQOL維持およびADL改善に重要な因子である。高齢者にとって歯周病は歯の喪失の最大原因であり、重篤に進行したケースでは有効な治療法がなく、より症状が悪化してしまう。そこで本研究では骨に分化しやすい間葉系幹細胞を投与し、歯槽骨の機能再生について検討する。

本研究遂行のために、ヒト多指症由来細胞・ヒト外骨症由来細胞の分離培養後、網羅的遺伝子発現解析や染色体検査等を行い、細胞のプロファイルを確定し、治療に有効な細胞の検索を行う。

### B. 研究方法

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

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

#### (2) 得られた間葉系細胞のプロファイリング

培養過程を経て得られた間葉系細胞について、骨形成活性をALP活性、オステオカルシン量の測定、von Kossa染色にて評価した。また、Affimetrix社製マイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を行い、歯槽骨再生に有用な細胞の検索を継続した。また、主任研究者の研究室にて抽出・調整されたRNAを用いた遺伝子発現解析も行った。

### C. 研究結果

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

各手術検体より、間葉系細胞様の細胞が出現し、分離培養が可能であった。しかしながら、これらの細胞は培養初期は増殖が旺盛であったが、継代を重ねるごとに増殖能力が落ちていき、最終的にはシネッセンスに陥ることを確認した。

#### (2) 得られた間葉系細胞のプロファイリング

培養過程を経て得られた間葉系細胞様細胞について、骨分化形成能を検討した結果、骨分化誘導後細胞について、著しいALP活性、オステオカルシン量の増加がみられた。また、von Kossa染色性細胞の出現が確認された。また、網羅的遺伝子発現解析より、骨特異的マーカー遺伝子の発現がみられた。また、小児多指症由来細胞に関しては、現在、免疫不全マウスの皮下に長期的な移植実験を継続しており、腫瘍形成等の安全性についても検討を開始した。

### D. 考察

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

くことが社会への責務である。また、主任研究者の持つサンプルについての解析を梅澤らが行い、成果を共有できたことは、解析手法の標準化につながるという意味を持ち、意義深いことである。

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 倫理面への配慮

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

#### H. 研究発表

##### 論文発表

Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU,

Fujimoto J, Hata JI, Umezawa A,

Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol.* in press

Yazawa T, Uesaka M, Inaoka Y, Mizutani T, Sekiguchi T, Kajitani T, Kitano T, Umezawa A, Miyamoto K. Cyp11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone / human chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen; conservation and evolution of androgen metabolic pathway. *Endocrinology.* in press

Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, Ohtani A, Morita K, Hirano T, Terai M, Umezawa A, Mizusawa H. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 43(3-4):129-38. 2007

Yoshida Y, Shimomura T, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Matsuoka S, Watanabe Y, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Terai M, Umezawa A, Shiota G. A role of Wnt/beta-catenin signals in hepatic fate specification of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293(5):G1089-98. 2007

Sato B, Katagiri Y, Miyado K, Akutsu H, Miyashita Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 364:838-43. 2007

Kato S, Mohri Y, Matsuo T, Ogawa E, Umezawa A, Okuyama R, Nishimori K. Eye-open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility in LGR4 null mice. *FEBS Lett.* 581(24):4685-90. 2007

Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1160(1-2):263-9. 2007

Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A. Way

s for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state ex vivo. *Int J Hematol.* 86(1):1-4. 2007

Shimomura T, Yoshida Y, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Murai R, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Umezawa A, Shiota G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived UE7T-13 cells: Effects of cytokines and CCN family gene expression. *Hepatol Res.* 37(12):1068-79. 2007

Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. Working" cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res.* 313(12): 2550-62. 2007

Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The Significant Cardiomyogenic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem cells.* 25(8):2017-24. 2007

Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol Biol Cell.* 18(5):1586-94. 2007

Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs: Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration.* 27(1):28-36. 2007

Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res.* 313 :698-706. 2007

Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KU M5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem.* 100(5):1240-54. 2007

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1) 特許取得

1. 「心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法-テルミサルタン、バルサルタンを用いる」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：特願2007-315920, H19.12.6

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2. 「心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法-ピオグリタゾンを用いる」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：特願2007-315921, H19.12.6

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

3. 「心筋細胞への分化能を有する細胞」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：PCT/JP2006/301043, H18.1.25

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

#### 2) 実用新案登録

なし

#### 3) その他

なし

## ヒト正常細胞の生体外増幅に関する研究

分担研究者 清野 透

国立がんセンター研究所 ウイルス部長

**研究要旨：**ヒト細胞の不死化には p16/RB 経路の不活化と、テロメラーゼの活性化が必須であるとの仮説を基にこれまで E7-TERT あるいは bmi-1+TERT の組み合わせで多くのヒト正常細胞の不死化を確認している。マウスと異なり移植により骨形成能を維持するヒト骨芽細胞株の報告はない。そこで、移植時の骨形成能の高いヒト顎骨由来骨芽細胞の不死化を試みた。E7-TERT あるいは bmi-1+TERT の組み合わせでレトロウイルスベクターにより遺伝子を導入した。また、bmi-1 や E7 を loxP 配列で挟み、不死化後に Cre-loxP システムにより除去できる細胞株も樹立した。これらの細胞は石灰化能など分可能を維持していたものの Cre 発現により細胞増殖が止まり、分化誘導と Cre 発現のタイミングが難しいことが分かった。

### A. 研究目的

ヒトの正常体細胞を培養すると一定回数分裂した後増殖を停止する。そのためヒト体細胞を用いた再生医療の研究において、必要な十分量の細胞数を得るのは多くの場合困難であり、再現性を確認するのも一般に困難である。本研究ではヒト正常体細胞をできるだけ正常なまま増幅または不死化する技術を開発し再生医療の研究に資することを目的とする。本研究の最終目的は、生体外増幅したヒト顎骨由来間葉系細胞と、細胞移植製剤の安全性を確立し、広範な骨欠損を伴う歯周病患者に対する新たな細胞治療法を開発することである。そのため、自家、及び他家移植モデル作製のための顎骨由来間葉系細胞株を作製すると共に、より安全性の高い生体外ヒト細胞増幅・不死化技術の確立を目的としている。

### B. 研究方法（倫理面の配慮含む）

TERTに加えHPV16のE6やE7あるいはbmi-1、変異型cdk4, cyclin D1, p16-shRNAなどの遺伝子導入によってヒト顎骨由来骨芽細胞(HAOB)の延命、不死化を試みた。不死化細胞から不死化に用いた外来遺伝子を除去できるよう、loxP配列で挟んだレトロウイルスベクターや除去できなかった細胞を排除できるようHSV TK遺伝子を不死化遺伝子の下流にIRES配列を介して繋いだ構築をもつレトロウイルスベクターを作製した。また、不死化した細胞の骨形成能を維持しているかどうか、腫瘍原性を獲得していないことなどを斎藤らが既に確立した方法を用いて確認する。

（倫理面への配慮）

ヒト細胞全般の不死化研究については各施設の倫理委員会ならびに国立がんセンター倫理審査委員会の承認（承認番号14-69）を得ている。

### C. 研究結果

ヒト顎骨由来骨芽細胞(HAOB3)にhTERT, hTERT+変異, hTERT+Bmi1, hTERT+E7の組み合わせで外来遺伝子を導入した。HAOB細胞を間葉系幹細胞用培地(MF培地)で培養すると、遺伝子導入なしでも70 PDほど培養可能であるが骨形成能は30 PD程度で失われる。しかし、E7+TERTを導入したHAOB細胞集団は30PDを過ぎても骨分化能を維持していた。一方、遺伝子導入なしに継代された細胞では約30PDで石灰化能が失われることから、HAOB細胞は継代により脱分化する可能性と、HAOB細胞集団には石灰化能を有する細胞と有しない細胞が混在し、石灰化能を有する細胞は早期に細胞老化を迎える可能性が示唆された。

延命した細胞からE7あるいはBmi-1を除くため、Creリコンビナーゼ発現アデノウイルスを感染させた後、Ganciclovirで処理すると予想通り耐性細胞が出現することが確認されたが、細胞増殖も止まり培養は維持できないことが分かった。これは、延命細胞でのp16発現が高いためと推測している。

筋芽細胞においてはhTERT+ CDK4+ cyclin Dで最も効率よく細胞が延命できることが分かった。分化能が維持されているかどうかを現在調べている。また、ヒト歯根膜細胞の不死化をbmi-1+hTERTにより成功した。Marfan症候群患者由来のヒト歯根膜細胞も同様に樹立し、Marfan症候群における歯根膜弾性線維の異常を培養皿上



で再現できるようになった。歯周組織への分化能を維持しているかどうかをモニターするため、Collagen type I promoterあるいはオステオカルチンpromoter制御下にGFP遺伝子をつないだキメラ遺伝子を導入し、分化誘導を可視化できるかどうかを検討したが、用いたこれらのプロモーター活性は弱く可視化はできなかった。特性が高く活性の十分高いプロモーターの選択が必要である。

#### D. 考察

骨髄間葉系幹細胞、骨芽細胞、卵巣表層上皮細胞などではE7+hTERTによる不死化によりほぼ正常2倍体を保ちかつ染色体不安定性を伴わない細胞株の樹立に成功している。これらの細胞ではp53発現が増加しており、正常なp53経路が染色体の安定性に極めて重要であることを示唆している。同様にhTERT+変異CDK4+cyclin D1で延命・不死化した卵巣表層上皮においてもp53の発現レベルは高くかつ正常2倍体を保っている。今回HAOB細胞はhTERT+変異CDK4で延命できなかったが、cyclin Dを追加することで延命できる可能性は十分ある。E7+hTERTあるいはBmi-1+hTERTで延命した細胞はCre-loxPシステムによるE7あるいはBmi-1の除去により増殖停止し、分化誘導能を調べることも困難であった。今後、E7やBmi-1あるいは変異cdk4とcyclin Dの発現レベルをtetracyclinなどで調節できる細胞株を樹立して、これらの外来遺伝子が延命と分化に与える影響を解析したい。

#### E. 結論

種々のヒト正常細胞を用い、種々の遺伝子の組み合わせによる細胞不死化を進めてきた。これらの不死化細胞の分化能の解析や、染色体解析を行った。HAOB細胞ではhTERT+E7により、分化能を維持したまま延命できることが示唆された。他の細胞種を用いた実験では、E7+TERTあるいは変異cdk4+cyclin D1+TERTで不死化した細胞ではp53とp16の高発現が維持され染色体異常が少ないことが示されている。寿命延長は脱分化を伴うことが多く、脱分化と老化の関係を解析することで、高い分化能を維持したまま延命する方法を検討したい。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

1. Yokoi T., Saito M., Kiyono T., Iseki S., Kosaka K., Nishida E., Tsubakimoto T., Harada H., Eto K., Noguchi T., and Teranaka T., Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. Cell Tissue Res, 327:301-11, 2007.
2. Kiyono T. Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells. Expert Opin Biol Ther. 11:1623-1637, 2007.
3. Shiga M, Saito M, Hattori M, Torii C, Kosaki K, Kiyono T, Suda N. Characteristic phenotype of immortalized periodontal cells isolated from a Marfan syndrome type I patient. Cell Tissue Res. 331:461-472, 2008.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 歯髄幹細胞を用いた再生医療の可能性の検討

分担研究者 松下 健二  
国立長寿医療センター 口腔疾患研究部長

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

### A. 研究目的

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

### B. 研究方法

#### (1) 歯髄組織からの幹細胞画分の分離

ブタ歯髄組織においてHoechst 33342を強く排出する細胞、side population (SP) 細胞を分離した。

#### (2) 歯髄SP細胞の性状解析

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

### C. 研究結果

#### (1) SP細胞の自己複製能

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

#### (2) SP細胞の性状解析

リアルタイム RT-PCR にて Bmi1 や stat3 を比較すると SP 細胞は他の細胞に比べて高い発現がみられた。また、同細胞は間葉系幹細胞の細胞表面マーカーである CD13, 34, 105, 146, 150 の高発現が認められた。また、SP 細胞を pellet culture 法で三次元培養を行うと骨様組織の形成が認められたことから、同細胞が骨芽細胞様細胞へ分化することが明らかになった。さらに、CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞は VEGF 存在下で血管内皮細胞に分化し、高い遊走能、増殖能がみられた。

### D. 考察

本研究の結果から、歯髄SP細胞は間葉系幹細胞としての性質を有し、骨芽細胞様細胞への分化とともに血管再生も強く誘導することから、歯槽骨を再生するための素材として有用であるばかりでなく、虚血臓器等への再生医療にも応用可能であることが示唆された。今後、効率的にSP細胞画分を分離し増幅する技術を開発することが必要である。また、用いた細胞はブタ由来であるのでヒト歯髄においても同様の細胞は採取できるのか確認する必要がある。また、ヒトへの応用に際した安全性、有効性の確認も並行して行う必要がある。

### E. 結論

ブタ歯髄由来 SP 細胞が間葉系幹細胞の性質を有し、骨形成能とともに血管再生能も有することが明らかになった。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 倫理面への配慮

実験動物を用いる研究については、国立長寿医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

## H. 研究発表

### 論文発表

1. Into T, Inomata M, Nakashima M, Shibata K, Hacker H, Matsushita K. Regulation of MyD88-dependent signaling events by S-nitrosylation retards toll-like receptor signal transduction and initiation of acute-phase immune responses. *Mol Cell Biol.* 28(4):1338-47. (2008)
2. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, Matsushita K. Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- $\beta$  signalling. *Cardiovasc Res.* 77(1):221-30(2008)
3. Inomata M., Into T., Ishihara Y., Nakashima M., Noguchi T., and Matsushita K. Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. *Microbes Infect.* 9(12-13): 1500-1506 (2007)
4. Into, T., Dohkan, J., Inomata, M., Nakashima, M., Shibata, K., and Matsushita, K. Synthesis and characterization of a dipalmitoylated lipopeptide derived from paralogous lipoproteins of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun.* 75(5): 2253-2259 (2007)
5. Into, T., Kanno, Y., Dohkan, J., Nakashima, M., Inomata, M., Shibata, K., Lowenstein, C.J., and Matsushita, K. Pathogen recognition by Toll-like receptor 2 activates Weibel-Palade body exocytosis in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 282(11): 8134-8141 (2007)
6. Into, T., and Matsushita, K. Recognition of bacterial compounds by aortic endothelial cells activates Weibel-Palade body exocytosis. *Inflammation and Regeneration* 27(2): 112-116 (2007).

7. Zheng L, Iohara K, Ishikawa M, Into T, Takano-Yamamoto T, Matsushita K, Nakashima M. Runx3 negatively regulates Osterix expression in dental pulp cells. *Biochem J.*, 405(1): 69-75 (2007).
8. Oyama T, Matsushita K, Sakuta T, Tokuda M, Tatsuyama S, Nagaoka S, Torii M. Roxithromycin inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-1 expression through regulating mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Ets-1 expression. *J Periodontal Res.* 42(1):53-61(2007).

### 学会発表

1. 松下健二：一酸化窒素制御を基盤とした血管病治療の新戦略。レドックス生命科学第170委員会研究会“レドックス研究のフロンティア”。大阪。2007年3月13日
2. 松下 健二：エキソサイトーシス制御を基盤とした血管病治療の新戦略。第8回Pharmaco-Hematologyシンポジウム。金沢。2007年6月8日。
3. 松下 健二：高血圧が炎症を惹起する仕組み。第6回松本ボーンフォーラム。塩尻。2007年5月12日。
4. 猪俣 恵, 引頭 毅, 中島 美砂子, 野口 俊英, 松下 健二：第50回春季日本歯周病学会学術大会。横須賀。2007年5月19日。
5. 松下健二 血管病としての歯周病の分子病態 第49回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウムIV。札幌。2007年8月29日。
6. 松下健二：公開市民講座 “ステキに歳を重ねるために～歯周病予防から始めるエイジングケア” 第13回口腔保健シンポジウム。大阪。2007年7月7日
7. 松下健二 血管機能を改善する天然由来成分。岐阜県工業会平成19年度第1回生物食品技術研究会。岐阜。2007年6月9日。
8. 松下健二 ステキに歳を重ねるために～生活習慣病・歯周病予防によるエイジングケア中部ものづくりネットワーク講演会。名古屋。2007年8月2日。
9. 松下健二 ステキに歳を重ねるために～歯周病予防から始めるエイジングケア NPOバイオものづくり中部第1回医療機器分科会特別講演。名古屋。2007年9月1日。
10. 松下健二 ステキに歳を重ねるために～生活習慣病予防から始めるエイジングケア 第9回東三河合同産学官技術交流会。名古屋。2007年9月5日
11. 松下健二：Meet the specialist 2007 “エキソサイトーシス制御を基盤とした血管病治療の可能性”。東京 2007年11月22日

12. 松下健二：良く老いるための口腔医科学のあり方。Dentistry Quo Vadis? (10). 東京 2007年12月16日.
13. 松下健二：循環器関連疾患のup-to-date “血管病としての歯周病の治療戦略. 名古屋 2007年12月22日.
14. 松下健二：よく老いるための口腔疾患治療の考え方。日本学術会議臨床系歯学分科会主催公開シンポジウム。東京 2008年1月25日.
15. 松下健二：エキソサイトーシス制御を基盤とした新しい脳血栓塞栓症治療法の開発 第33回本脳卒中学会総会 2008年3月、京都

I. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得  
なし
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし