

200821002 A

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20年度 総括研究報告書

主任研究者 齋藤 正寛

平成21 (2009) 年 4月

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20年度 総括研究報告書

主任研究者 齋藤 正寛

平成21（2009）年 4月

# 目次

I.	総括研究報告	1
	ヒト顎骨由来骨芽細胞の調整と生体外増幅	2
II.	分担研究報告	7
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	8
	村上 伸也	
2.	ヒト顎骨由来間葉系細胞の調整	11
	梅澤 明弘	
3.	ヒト正常細胞の生体外増幅に関する研究	14
	清野 透	
4.	歯髄幹細胞を用いた歯槽骨再生療法の可能性	17
	松下 健二	
III.	研究成果に関する一覧表	19
IV.	研究成果の刊行物・別冊	24

I. 総括研究報告

ヒト顎骨由来骨芽細胞の調整と生体外増幅

齋藤 正寛

## 歯周組織再生を基盤とした咀嚼機能改善技術の開発

(H18-長寿-003)

### 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。従って介護予防を推進するためには、高齢者の口腔機能を損なわせるような疾患に対する対策が必須になる。歯周病は高齢者で罹患率の高まる慢性炎症性疾患であり、歯を支える骨を吸収・破壊により、結果的に歯の喪失を導く。このよう歯周病で失われた高齢者の咀嚼能の回復させるため、歯周組織の再生を導く再生医療の研究開発を目指す。そのため高齢者より効率よく顎骨由来骨芽細胞を採取するプロトコルを作製すると共に、得られた骨芽細胞製剤の骨形成能力の判定ならびに細胞移植治療の臨床プロトコル作製を目指す。

#### 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。そこで当該年度はこれまで確立したヒト骨芽細胞製剤の品質管理を行う目的に、マーカー分子の同定、骨再生能力判定試験、ならび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)のマーカー分子の同定

平成19年度の研究計画で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

験で骨芽細胞のマーカー分子の同定を行った。HAOBが継代回数を繰り返すことで脱分化する性質を利用して、まず相対倍加係数 (population doubling:PD) 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30のHAOBを用意し、各々のHAOBにおける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、HAOBの脱分化に伴い低下する遺伝子群を解析した。

### (2)HAOBマーカー分子の機能解析

(1)で得られたマーカー分子の中よりHAOB特異的に発現している遺伝子マーカーを同定する目的で、候補遺伝子の発現について各種ヒト細胞を用いて、realtime PCR解析にて比較検討した。具体的にはヒト線維芽細胞、ヒト骨肉腫細胞ならびにヒト正常骨芽細胞を用い、これらの細胞とHAOBにおける候補遺伝子の発現レベルを比較検討した。

### (3)蛍光ラベルしたHAOBによる骨再生能力モニター実験

HAOBの生体内における骨再生能力をモニターするため、緑色蛍光タンパク質であるvenusをHAOBへ遺伝子導入し、生体内骨形成能力を判定した。VenusラベルしたHAOBをハイドロキシアパタイトと混和し、免疫不全マウス皮下へ移植し、一ヵ月後に移植片を取り出し、組織化学的に骨再生能力を判定した。

### (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マーカー分子の同定

昨年度までの研究成果で、HAOBはPD16まではアリザリンレッド染色陽性の石灰物を形成し、ALPase活性を示す骨芽細胞分化能力を示すが、PD21以降ではその分化能力は著しく低下することが明らかにされた。すなわち、HAOBは継代により脱分化しすることが判明した。そこでHAOBの脱分化の過程で特異的に発現の低下する遺伝子がHAOBのマーカーになると考え、PD3、6、9、12、15、18、21、24、27、30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、STMN2、MG PおよびNEBLの発現が顕著に低下することが判明した。

### (2)HAOBマーカー分子の機能解析

次にSTMN2、NEBLおよびMG PのHAOBにおける機能解析を行う目的に、増殖期と分化誘導後のHAOBにおける遺伝子発現量をrealtime-PCRで検証した。その結果、これらの遺伝子は増殖期の状態でhouse keeping遺伝子である $\beta$ -actinと比較して60%近くの発現量を示し、またrhBMP-2で分化誘導後もその発現量は顕著に上昇することが判明した。次に増殖期におけるこれらの遺伝子と骨芽細胞分化マーカーであるBSP、OCN、RUNX2、OSXとの発現量をRealtime-PCRで比較検討した。その結果、STMN2、NEBLおよびMG Pの遺伝子発現量は骨芽細胞分化マーカーと比較して、増殖期における遺伝子発現量が明らかに高いことが示された。

そこでSTMN2、NEBLおよびMG PがHAOBで特異的に発現しているか否かを解析するために、HAOB、ヒト線維芽細胞、ヒト骨肉腫細胞ならびに正常ヒト骨芽細胞におけるこれらの遺伝子発現量を比較検討した。Realtime-PCR解析の結果、STMN2、NEBLおよびMG PはHAOBにおいて最も高発現していることが判明した。また興味深いことに、HAOBは正常ヒト骨芽細胞の骨芽細胞分化能力を比較したところ、HAOBのほうが、低濃度のrhBMP-2で石灰化し、さらにBSP、OCN、RUNX2、OSXを高発現していることが判明した。これらの結果よりHAOBは高い骨原性を有する細胞であることが判明

し、さらにはSTMN2, NEBLおよびMGPがヒト未分化骨芽細胞のマーカーになりうる事が強く示唆された。

### (3) HAOBの骨再生能力モニター実験

生体内におけるHAOBの分化能力をモニターする評価系を確立する目的に、venusを遺伝子導入したHAOBを作製した。Venus導入型HAOBを皮下移植実験し分化誘導した結果、移植片内にvenus陽性のHAOB細胞の存在は確認出来たものの、石灰化物の形成は認められなかった。またコントロールとして用いた遺伝子導入を行っていないHAOBでは骨形成能を確認できたことから、venus遺伝子導入により、HAOBの骨芽細胞分化能力は著しく低下したことが判明した。本研究結果より、移植後のHAOBをモニターするためには、venus以外の蛍光タンパク質あるいは他の分子を用いてラベルする方法を検討する必要性が考えられた。

## 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。平成19年度までの研究成果でHAOBが高い生体外増殖活性を有し、そして高い骨芽細胞分化能力の維持に関しては不明であった。また平成20年度の研究成果より、HAOBは分裂回数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。しかし、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。この結果より、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の脱分化に伴い発現量が低下する遺伝子が、正常HAOBのマーカー分子になりうるかと仮説をたてた。この仮説にアプローチするために、HAOB脱分化過程における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。その結果、STMN2, NEBLおよびMGPがHAOBに高発現してことを見出した。これらの分子は増殖期のHAOBにおいて、骨芽細胞のマーカー遺伝子であるBSP, OCN, RUNX2, OSXと比較して、高発現していることが確認され、さらに骨肉腫細胞、線維芽細胞ではその発現が確認されないことから、同遺伝子がHAOBのマーカーになることが示された。さらにSTMN2, NEBLおよびMGPは、骨芽細胞の骨原生活性の低下に伴いその発現量も低下する事から、同遺伝子群の発現量がHAOBの骨再生能力判定基準の指標になる可能性が強く示唆された。

HAOBの安全性ならびに骨再生能力を判定する目的で、HAOBを蛍光ラベルし、生体内におけるHAOBのモニターを試みた。VenusラベルしたHAOBを免疫不全マウスへの移植実験では、HAOBをモニターすることは出来たが、骨形成能力を誘導することは出来なかった。この結果より、venusによりHAOBの石灰化能力が阻害された可能性が示唆された。最近肝臓由来の体性幹細胞のラベルに蛍光タンパク質であるcyanが有効であることが報告された。そこで、今後はcyanのような蛍光タンパク質を用いてHAOBをラベルし、生体内における動態を観察する必要性が示唆された。

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の機能解析から得られるバイオインフォティクスからの情報の蓄積、臨床への探索的研究が必要になる。HAOBを薬品、医療機器の範疇としてとらえ米食品医薬品局(FDA)基準を指標とする細胞提供システムの確立した上で、ならびにその安全性と倫理性を確立したうえで、「歯周組織再生を基盤とした咀嚼機能改善技術の開発」を目指すことが肝要である。

## E. 結論

独自に開発したHAOBのマーカー遺伝子を同定する事にも成功した。同遺伝子の発現がHAOBの骨再生能力を判定する指標になる可能性が強く示唆された。一方、HAOBの安全性を担保するためのラベル化に関しては、蛍光物質を検討する必要性が示唆された。

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. **M. Saito**, E. Nishida, T. Sasaki, T. Yoneda and N. Shimizu. The KK-Periome database for transcripts of periodontal ligament development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* Jan 8. [Epub ahead of print] 2009
2. **M. Saito**, E. Nishida and T. Yoneda. 2008 Comprehensive analysis of tissue specific markers involved in periodontal ligament development. *JAOB*, 50 (3), 175-182
3. N Yoshino, K Nakajima, K Nakamura, Y Kondo, K Ohashi, T Nihei, **M Saito** and T Teranaka Synthesis of bone formation deriving biosilanes. *Colloids Surf B*

*Biointerfaces*, 2008,

4. 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, 2008
5. 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,
6. 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,

### < 国外 >

1. Masahiro Saito, Ko Tsutsui, Naoto Suda, Ganburged Ganjargal, Kiyotoshi Sekiguchi and Toshiyuki Yoneda, ADAMTSL4 improves microfibril of Marfan syndrome derived cells. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2008, december 8, San Diego

### < 国内 >

1. 和田 知子, 齋藤 正寛, 歯の再生機構解明を目指した遺伝子改変型人工歯胚作製法の開発第 129 回 日本歯科保存学会 秋季学術大会 2008 年 11 月 7 日
2. 西田 英作, 齋藤 正寛, 吉成 伸夫, 歯小囊特異的に発現する細胞外マトリックス F-spondin の機能解析, 第 129 回 日本歯科保存学会 秋季学術大会 2008 年 11 月 6 日



3. 和田知子、本間宏実、齋藤正寛、米田俊之、器官原基法を応用した遺伝子改変型人工歯胚作製法の開発、第50回歯科基礎医学会学術大会・総会、2008年、9月24日、東京
4. M. Aino, M. Saito, A. Umezawa, T. Noguchi and T. Yoneda, Isolation and characterization of osteoblasts from alveolar bones of aged donors 30<sup>th</sup> ASBMR meeting, 2008, September 14, Montreal
5. 相野 誠、齋藤 正寛、村上 伸也、野口 俊英、米田 俊之ヒト歯槽骨由来骨芽細胞の樹立と機能解析、日本歯周病学会第51回春季学術大会 2008年4月24日 埼玉

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得  
骨組織再生用の細胞製剤：特願  
2008-210591
- 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** 研究要旨 「細胞移植製剤を用いた骨再生医療技術」を開発するために、マウス頭蓋冠欠損モデルを用いたヒト顎骨由来骨芽細胞 (HAOB) 製剤の骨再生能力判定試験の確立を試みた。HAOB細胞をラベルする目的にvenus遺伝子を導入後、PGLA-コラーゲンスポンジに播種し、マウス頭蓋冠欠損部に移植した。一ヶ月後に移植片を解析した結果、移植部位においてHAOB細胞の定着を観察できたが、少量の新生骨形成のみが認められた。一方、細胞を移植していない部位では骨再生は認められなかった。以上の結果より、HAOB細胞の骨再生能力は認められたものの、その効果が低かったため、venus遺伝子導入によりHAOB製剤の機能低下が引き起こされた可能性が考えられた。今後はHAOB細胞の骨形成能力を損なわずにラベルできる遺伝子導入技術を開発する必要性が考えられた。

### 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昨年度まで、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」の評価系の確立を行ってきた。しかし前年度の課題として、骨芽細胞製剤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が存在しないため、骨芽細胞製剤の生体内における骨再生能力を詳細に検討する事が不可能であった。そこで本年度は、蛍光ラベルしたHAOB細胞を用いて骨再生能力を判定する評価系を確立する目的に、マウス頭蓋冠欠損モデルを用いて同評価系の確立を試みた。そこで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

#### (1) HAOBの遺伝子導入

平成19年度の研究計画で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、以下の実験で同細胞のラベルを行った。

レンチウイルス発現系を用いて緑色蛍光タンパク質であるVenusをHAOB細胞への導入を試みた。Venusレンチウイルスは遠心濃縮し、力価が $1 \times 10^9$  cells/mlになるように調整し、HAOB細胞へ8時間感染させた。遺伝子導入48時間後に位相差蛍光顕微鏡でVenusの発現を確認後に、石灰化能を検討した。

#### (2) 頭蓋冠欠損モデルを用いた移植実験

HAOBの骨再生能力を判定するため、頭蓋冠欠損モデルを用いて解析した。具体的には免疫不全マウスの頭蓋冠にトレフィンバーを用いて直径3mmの骨欠損を作製した。次に、venusを遺伝子導入したHAOBをPGLA/コラーゲンシート上で培養を行い、欠損部位に播種した。一ヶ月後に移植片を取り出し、組織化学的に骨再生能力を判定した

### (3)骨形成能力の評価

移植部位をEDTAで脱灰後に凍結標本を作成し、蛍光顕微鏡にて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. HAOB細胞へのラベリングならびに石灰化能力の判定。

HAOB細胞にレンチウイルス発現系を用いて遺伝子導入した結果、全ての細胞にvenusを遺伝子導入することに成功した。そこで同細胞の骨芽細胞分化能力をin vitroにて解析した結果、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確認された。しかし遺伝子導入していないHAOBと比較すると、その分化能力は低下してことが判明した。

### 2. 動物モデルを用いたDAOBの歯槽骨再生能力の評価

VenusラベルしたHAOBの骨再生能力を判定する目的で、マウス頭蓋冠欠損部位に移植実験を行った。HAOB移植による骨再生能力を軟X線で判定した結果、移植部位と骨欠損部位の境界面でわずかな新生骨の形成が観察された。同部位を蛍光観察ならびに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、骨再生部位ではVenus陽性細胞が観察され、さらに同部位において新生骨の形成が確認された。

一方、細胞を移植していない群においては、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。

## D. 考察

本マウス頭蓋冠欠損モデルにvenusラベルしたHAOBを移植することにより、骨再生時にお

けるHAOB細胞の動態を観察できることが判明した。しかしvenusを遺伝子導入することで、HAOB細胞の骨芽細胞分化能力は低下してしまい、欠損部に十分な骨再生を誘導することが出来なかった。

今後の課題として、HAOB細胞の骨再生能力をモニターするために、細胞機能に影響を与えずにラベルできる蛍光分子を選択する必要性が考えられた。また本実験において、HAOBの骨再生能力を十分に検討することは出来なかったがPGLA/コラーゲンが細胞移植の足場として適していることが示唆された。

本実験において、HAOBの骨再生能力を十分に検討することは出来なかったがPGLA/コラーゲンはHAOB移植用の足場として適性を示唆する結果を得た。従って同生体材料が、ラベルしたHAOB細胞の骨再生能力の判定に有用な生体材料候補の一つになるとと思われる。

## E. 結論

マウス頭蓋冠モデルを用いてHAOB細胞のラベルならびにVenus遺伝子導入による骨再生能力を判定するプロトコール確立を試みた。Venus遺伝子導入に問題を残すものの、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が確認された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 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: 232-2

- 41, 2008
2. Y. Terashima, Y Shimabukuro, H. Terashima, M. Ozasa, M. Terakura, K. Ikezawa, T. Hashikawa, M. Takedachi, H. Oohara, S. Yamada, S. Murakami. Fibroblast growth factor-2 regulates expression of osteopontin in periodontal ligament cells. *J. Cell. Physiol.* 216: 640-650, 2008
  3. M. Takedachi, Qu D, Ebisuno Y, Oohara H, Joachims ML, McGee ST, Maeda E, McEver RP, Tanaka T, Miyasaka M, Murakami S, Krahn T, Blackburn MR, Thompson LF. CD73-generated adenosine restricts lymphocyte migration into draining lymph nodes. *J. Immunol.* 180: 6288-6296, 2008
  4. M. Kitamura, K. Nakashima, Y. Kowashi, T. Fujii, H. Shimauchi, T. Sasano, T. Furuichi, M. Fukuda, T. Noguchi, T. Shibusaki, Y. Iwayama, S. Takashiba, H. Kurihara, M. Ninomiya, J. Kido, T. Nagata, T. Hamachi, K. Maeda, Y. Hara, Y. Izumi, T. Hirofujii, E. Imai, M. Omae, M. Watanuki, S. Murakami. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: Randomized Controlled Phase II clinical trial. *PLoS One*, 3: e2611, 2008
  5. M. Tomoeda, S. Yamada, H. Shirai, Y. Ozawa, M. Yanagita, S. Murakami. PLAP-1/asparginin inhibits activation of BMP receptor via its leucine rich repeat motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371 : 191-196, 2008.
  6. M. Yanagita, Y. Kashiwagi, R. Kobayashi, M. Tomoeda, Y. Shimabukuro, S. Murakami. Nicotine inhibits mineralization of human dental pulp cells. *J Endodontol*, 34: 1061-1065, 2008
  7. S. Yamada, M. Kitamura, S. Murakami. PLAP-1: periodontal ligament specific molecule. *J. Japanese Dental Science review* 44: 137-144, 2008
  8. RT. Kao, S. Murakami, OR. Beirne. The use of Biologic Mediators and Tissue Engineering in Dentistry. *Periodontology* 2000, (in press), 2008
  9. 山田 聡、村上伸也 歯根膜の分子基盤研究 「歯周病研究の展開と治療戦略」 炎症と免疫、16: 43-47, 2008
  10. 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
- 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

## 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。歯周病は、高齢者にとって歯の喪失の最大原因である。重篤に進行したケースでは有効な治療法がないため、症状がより悪化してしまう。本研究は、生体外で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検証し、広範囲の骨欠損を伴う歯周病患者に対して新たな細胞治療法を確立することを目的とする。具体的には、ヒト多指症余剰指切除術検体、およびヒト多発性外骨症切除術検体由来より分離培養した細胞、ヒト顎骨由来間葉系細胞の網羅的遺伝子発現プロファイリングや染色体検査等を行うことにより細胞の特性を確認し、安全性の高い生体外細胞増幅技術の確立と臨床への探索的研究推進を目指す。

### B. 研究方法

(1) 小児多指症余剰指切除術検体、小児多発性外骨症切除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、インフォームドコンセントが得られた手術検体より、ヒト間葉系細胞の分離・培養を継続した。小児多指症余剰指切除術検体、および小児多発性外骨症切除術検体は、各組織（骨髄、皮質骨、海綿骨、骨膜、軟骨）に分離後、洗浄、細切した後に関葉系細胞用培地に10%の牛血清を用いて培養を行った。

(2) 手術検体由来間葉系細胞のプロファイリング

小児多指症余剰指切除術検体、小児多発性外骨症切除術検体由来の間葉系細胞に関しては、免疫不全マウス（NOGマウス；NOD/Shi-*scid*, IL-2R $\gamma^{\text{null}}$ ）の皮下に長期的な移植実験を継続しており、*in vivo*における骨形成能評価と腫瘍形成等の安全性について検討した。

Affymetrix社製マイクロアレイを用いて、小児多指症余剰指切除術検体、小児多発性外骨症切除術検体由来の間葉系細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。また、主任研究者の研究室にて抽出されたヒト顎骨由来間葉系細胞のtotal RNAを用いた網羅的遺伝子発現解析も行った。

検体由来の間葉系細胞の品質管理評価を目的として、上記の網羅的遺伝子発現データを用いて、階層型クラスタリングと主成分分析を行った。

さらに、歯槽骨再生に有効な細胞の選択を目的として、上記の遺伝子発現データに線形判別分析法を適用し、骨分化能をもつ細胞とそれ以外の細胞との判別を試みた。

### C. 研究結果

(1) 小児多指症余剰指切除術検体、小児多発性外骨症切除術検体からの間葉系細胞の分離・培養

本研究初年度より検討を重ねてきた、小児多指症余剰指切除術検体、および小児多発性外骨症切除術検体由来間葉系細胞の分離・培養方法が確立できた。本年度、多指症余剰指切除術由

来35検体、多発性外骨症切除術由来10検体より、同数の新規初代培養細胞株を樹立した。多指症余剰指切除術検体、および多発性外骨症切除術検体については、顕微鏡下で組織ごとに分離することにより、同一検体で由来組織の異なる間葉系細胞を樹立することができた。

## (2) 手術検体由来間葉系細胞のプロファイリング

免疫不全マウスへの移植実験の結果、小児多指症余剰指切除術検体、小児多発性外骨症切除術検体由来初代間葉系細胞は、生体外で継代を重ねるほど、*in vivo*において増殖能と骨分化能を失う傾向にあることが示唆された。

網羅的遺伝子発現解析より、得られた間葉系細胞において骨特異的マーカー遺伝子の発現が認められた。同一検体でも、由来組織の違いで骨特異的マーカー遺伝子の発現量は異なっていた。

また、同一検体のヒト顎骨由来間葉系細胞の継代毎の遺伝子発現データを訓練データとして用いることで骨分化能をもつ細胞とそれ以外の細胞を分ける判別関数を作成することに成功した。この判別関数を検証することを目的として、由来組織の異なるヒト間葉系細胞の遺伝子発現データで検証したところ、*in vivo*において骨分化能が確認されている細胞は骨分化能を有すると判定された。その一方で、*in vivo*において骨分化が認められなかった細胞は骨分化能を持たないと判定された。

## D. 考察

小児多指症余剰指切除術検体、および小児多発性外骨症切除術検体由来間葉系細胞の分離・培養方法を確立できたと同時に、同一検体から由来組織の異なる初代間葉系細胞株を樹立することに成功した。臨床においては、生体内における骨分化能が均一、かつ安全性の高い間葉系細胞の安定供給が望まれる。本研究において、同一検体でも由来組織の違いによって骨分化能に関与する遺伝子の発現様式に差が認められたことから、今後とも、新規手術検体由来初代間葉系細胞の樹立と、それらの*in vivo*、*in vitro*における詳細な特性解析が必要である。

同一検体のヒト顎骨由来間葉系細胞の継代毎の遺伝子発現データを利用して、骨分化能をもつ細胞とそれ以外の細胞を分ける判別関数を作成することに成功した。由来組織の異なる

数種のヒト間葉系細胞のデータを用いて上記の判別関数を検証した結果、*in vivo*における骨分化能評価と一致していたことから、歯槽骨再生に有効な細胞の選択に際し、この判別関数は非常に有用である。本研究で作成した骨分化能判別関数は、今後の細胞治療におけるリスクの大幅な軽減に貢献するに違いない。

判別関数の精度向上のためには、ヒト顎骨由来間葉系細胞由来の訓練データ、および由来組織の異なるヒト間葉系細胞由来の検証用データの蓄積が求められる。

主任研究者の持つサンプルを梅澤らが解析し、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、大変意義深いことである。

## E. 結論

小児多指症余剰指切除術検体、小児多発性外骨症切除術検体より、安定して初代間葉系細胞株を樹立できることが示された。また、*in vivo*、*in vitro*において、手術検体由来間葉系細胞の骨分化能が確認できた。マイクロアレイ解析の手法を取り入れたことにより、各手術検体由来間葉系細胞において発現している遺伝子を網羅的にプロファイリングすることができた。各手術検体由来間葉系細胞の遺伝子発現データを利用して、骨分化能判別関数を作成することに成功し、検証にも着手した。骨分化能判別関数は安全性の高い生体外細胞増幅技術の確立と臨床への探索的研究の推進に大きく寄与するに違いない。

## 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、付番号197、201、平成18年6月承認、受付番号237、238平成19年11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

1. Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, **Umezawa A**, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature*. 454(7202):345-349. 2008
2. Sullivan S, Ichida JK, **Umezawa A**, Akutsu H. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. *Reprod Biomed Online*. 16(1):41-50. 2008
3. Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, **Umezawa A**. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(35):12921-12926. 2008
4. Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, **Umezawa A**. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. *PLoS ONE*. 3(11):e3709. 2008
5. Kawakita A, Sato K, Makino H, Ikegami H, Takayama S, Toyama Y, **Umezawa A**. Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS ONE*. 3(12):e3945. 2008
6. Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, **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*. 28(7):2125-2137. 2008
7. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, **Umezawa A**. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*. 26(7):1695-1704. 2008
8. Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, **Umezawa A**. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE*. 3(6):e2407. 2008

### 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



## 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：研究要旨 ヒト細胞の不死化には p16/pRb 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多くのヒト正常細胞の不死化を確認している。移植により骨形成能を維持するヒト骨芽細胞株を樹立するため、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。p16/pRb 経路の不活化には pRb のキナーゼである CDK4 と Cyclin D1 を導入し hTERT との組み合わせで不死化に成功した。また、CDK4 と Cyclin D1 を tetON/OFF システムにより発現レベルを調節できる不死化細胞株を樹立した。これらの不死化細胞は高濃度のドキシサイクリン添加により外来遺伝子の発現が止まり、増殖も停止する。これらの外来遺伝子発現が分化や骨形成に与える影響を評価するのに有効である。

### 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）

今年度はHPV16のE6やE7などのウイルス遺伝子を用いず、p16と結合できない変異型CDK4とCyclin D1の発現によりヒト顎骨由来骨芽細胞(HA0B)の延命を試みた。さらに、hTERTの追加導入により細胞の不死化を試みた。不死化細胞から不死化に用いた外来遺伝子発現を調節できるよう、いわゆるtetON/OFFシステムをレンチウイルスベクターにより細胞集団に効率よく寄り厳密に遺伝子

発現調節できる系を樹立した。また、不死化した細胞が骨形成能を維持しているか、腫瘍原性を獲得していないか、正常2倍体を安定に維持できるかなどを齋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(HA0B3)に変異CDK4+Cyclin D1+hTERTの組み合わせで外来遺伝子を導入した。HA0B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、変異CDK4+Cyclin D1+hTERTを導入したHA0B細胞集団は30PDを過ぎても骨分化能を維持していた。次に、外来遺伝子の発現を調節可能にするため、Clontech社の最新のtetON/OFF advance システムをレンチウイルスベクター化し、初代培養細胞集団をtetON細胞あるいはtetOFF細胞化で

きるように改良した。tetOFF (tTA)とtetracycline responsive element (TRE)により発現調節される変異CDK4とCyclin D1を同時に導入しさらに恒常的に発現するhTERTを導入することで不死化細胞を得た。不死化に至る過程に増殖遅延は一切見られず、初代培養HAOB3細胞が集団として不死化されたことが示唆された。

これらの細胞では変異CDK4とCyclin D1が高発現しておりp53, p16なども発現が高くなっていることが示された。この細胞にドキシサイクリン (DOX) を添加すると、変異CDK4ならびにCyclin D1の発現が低下し増殖も遅くなりやがて増殖停止した。

#### D. 考察

卵巣表層上皮細胞では変異CDK4 +Cyclin D1+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。昨年度、HAOB細胞はhTERT+変異CDK4で延命できなかったが、cyclin Dを追加することで効率に延命することが明らかになった。さらにhTERTの追加導入により不死化に成功した。昨年度Cre-loxPシステムによる外来遺伝子の除去を試みたが除去後は急激に増殖停止するため分化誘導能を調べることも困難であった。今年度はtetON/OFFシステムを導入し外来遺伝子レベルをDOX濃度により自由に調節できる系を導入することにより問題点を解決することができた。現在、不死化細胞の移植やin vitro分化誘導系における骨形成能や外来遺伝子発現による分化・骨形成能への影響の解析を齋藤が進めている。

#### 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。HAOB細胞は変異CDK4+Cyclin D1+TERTの組み合わせで高率に不死化できること、不死化した細胞ではp53とp16の高発現が維持されているもののアポトーシスなどは誘導されなかった。正常p53の高発現により不死化細胞は正常2倍体を維持している可能性が高く、染色体異常も起きにくいことが推測される。これまでの細胞不死化法では脱分化を伴うことが多かったが、今回樹立した不死化細胞は、不死化遺伝子の発現量をDOX添加により調整できることから不死化維持に最低限必要な遺伝子発現レベルを調節することも可能である。また、不死化遺伝子が分化に悪影響を与える可能性があるが、分化誘導時に不死化遺伝子発現レベルを低下したり、なくしたりすることで排除することが可能であると考えられる。今後、目的に即した不死化遺伝子の至適発現レベルを明らかにしていきたい。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

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.

Omi H, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Kawaguchi R, Umehara N, Sugiura K, Saito M, Kiyono T, Tanaka T. Establishment of an immortalized human extravillous trophoblast cell line by retroviral infection of E6/E7/h

TERT and its transcriptional profile during  
hypoxia and reoxygenation Int J Mol Med 2  
3: 229-236, 2009.

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：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

ブタ歯髄組織においてHoechst133342を強く排出する細胞、side population (SP) 細胞を分離した。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。さらに、マウスの下肢虚血モデルを用いて、同幹細胞画分の血管再生能を *in vivo* で検証した。

### (倫理面への配慮)

本研究で用いる遺伝子操作や疾患モデル動物については、所属研究機関の各専門委員会の承認を受けて行った。また、疾患モデル動物の処置については動物愛護精神にのっとり慎重に行った。剖検脳の解析にあたっては所属研究機関の倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

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。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。さらに、下肢虚血マウスに同細胞を接種したところ、有意な血管再生が認められた。

### 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。特に、CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP細胞は口腔組織の再生に有用であることが示された。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