

200821002B

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18年度—20年度  
総合研究報告書

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18-20年度 総合研究報告書

主任研究者 齋藤 正寛

平成21（2009）年 4月

# 目次

|      |                           |    |
|------|---------------------------|----|
| I.   | 総括研究報告書 -----             | 1  |
|      | ヒト顎骨由来骨芽細胞の調整と生体外増幅 ----- | 2  |
|      | 齋藤正寛                      |    |
| II.  | 研究成果に関する一覧表 -----         | 23 |
| III. | 研究成果の刊行物・別冊 -----         | 31 |

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癒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. ヒト顎骨由来骨芽細胞の採取

24歳から66歳まで、インフォームドコンセントを得て、さらに本研究計画の主旨に同意して頂いた患者から提供された、智歯を抜歯する時に外科的に切除された骨片から骨芽細胞を採取する。具体的には、得られた顎骨

をゲンタマイシン、ファンギゾンを含む phosphate buffered saline で洗浄後に、細菌性コラゲナーゼを含む phosphate buffered saline にて37℃で20分間消化した。その後、消化液より遠心分離により細胞を採取した。同じ操作を8段階的に消化を繰り返して細胞を採取した。得られた8つの骨芽細胞画分を各種細胞培養専用培地で培養を行い、ヒト顎骨由来骨芽細胞に適した培養条件を検討した。

## 2. ヒト骨芽細胞の評価

得られた骨芽細胞画分の分化能力を判定するため、骨芽細胞分化誘導培地で3週間培養を行う。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する。また骨芽細胞マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法で解析した。

## 3. 骨形成能力の評価

骨芽細胞の生体内での骨形成能力を解析する。具体的には、骨芽細胞とハイドロキシアパタイトを混ぜ合わせ8時間培養を行った。その後フィブリン魂を形成させ、免疫不全マウスへ皮下移植した。一ヶ月移植した後組織片を取り出し、組織化学的手法により骨形成の解析を推進した。次に骨芽細胞への分化を確認するために、移植片からtotal RNAを抽出し、ヒト骨芽細胞マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法で解析した。

## 4. 安全性の評価

得られた骨芽細胞製剤の安全性を調べるために、染色体診断を行う。具体的にはSKY法とGバンド法を用いて、核型に変化が生じていないかを解析する。

## 5. 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。

## 6. 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。

## 7. HAOBマーカー分子の機能解析

6.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。

## 8. 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。

### (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、機関の外部委員会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・ウィ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. ヒト顎骨由来骨芽細胞の採取

合計8名の患者より提供された骨片よりコラゲナーゼ消化法で骨芽細胞を採取した結果、牛胎児血清と成長因子を組み合わせたヒト間葉系細胞専用培地を用いることにより培養可能であることが確認された。次に65歳の患者から提供された骨芽細胞の増殖能力を解析した結果、100日以上培養可能であることが確認された。得られた骨芽細胞を、HAOB (Human Alveolar bone derived Osteoblast) と命名した。また54歳、52歳の患者からもHAOBを採取できることから、同方法を用いれば高齢者からHAOBを分離培養できることが判明した。そこで54歳より採取されたHAOB (HAOB3) を用いて解析を進めることにした。

### 2. ヒト骨芽細胞の評価

コラゲナーゼ消化法により得られたすべての画分のHAOBの分化能力を解析した結果、fraction(Fr) 4および5の細胞が最も高い石灰化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。次に、HAOB3 Fr5の骨芽細胞マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法で確認したところ、強いオステオカルシン、骨シアロタンパク質の発現が確認された。これらの結果より、HAOBは骨芽細胞の特性を有していることが確認された。

### 3. 骨形成能力の評価

HAOBを免疫不全症マウスへ移植した結果、スキヤホールドであるハイドロキシアパタイトの周辺に顕著な骨形成を誘導することが観察された。またHAOBにより形成された骨は、ヒト特異抗体に陽性反応を示すこと

から、HAOB自身に骨形成能力を有することも確認できた。次にRT-PCR法で移植片の遺伝子発現を解析した結果、強いオステオカルシン、骨シアロタンパク質の発現が確認され、HAOB5が移植により骨芽細胞に分化していることが確認された。

## 4. 安全性の評価

HAOB3の安全性を調べるために、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。次に長期培養によるHAOBの染色体安定性の影響を解析した結果、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。

## 5. 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。

## 6. 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することが判明した。

## 7. 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、PD 3、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。クラスリング解析を行い変動する遺伝子を解析した結果、STMN2、MGPおよびNEBLの発現が顕著に低下することが判明した。

## 8. HAOBマーカー分子の機能解析

次にSTMN2、NEBLおよびMGP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MGP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MGP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、ヒト骨肉種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MGP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ことが強く示唆された。

## 9. 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。

骨より採取されたHAOBは高い増殖活性を有しており、また免疫不全マウスへ移植することにより骨形成能力を有していた。また65歳の患者からも採取できることから、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。HAOBは、牛胎児血清を主成分とする通常の細胞培養用培地では増殖せず、少量の牛胎児血清ならびに成長因子とホルモンを調製した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た。現在の培養方法では異種動物由来のレトロウイルス、異種タンパク質の混入が考えられる



ため、異種由来物質を排除した培地を用いた培養方法の開発が急務になっている。このような現状の中で、HAOBは従来の増殖培地では増殖せず、再生医療を目的とした低血清タイプのヒト間葉系細胞専用の培地で培養が可能であることが確認された。しかし細胞の継代数が増えると、ゲノムレベルで変異が蓄積し、本来細胞の有する分化能力を失うばかりか、危険性が高まることが報告されている。例えば細胞増殖を停止させる細胞周期調節タンパク質の遺伝子発現が抑制されてしまうなどの変化が生じてしまう。このようなゲノムレベルの変化を控えるために、酸化ストレスにより影響を控えた低酸素濃度(10%以下)を保った環境で培養することが考えられる。

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フィジ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

独自に開発したヒト顎骨由来骨芽細胞培養システムを用いて、65歳以上の中高年層からも骨芽細胞を採取することに成功した。この細胞はin vitroによる骨芽細胞分化誘導ならびに移植実験により高い骨形成能力を有する細胞集団が含まれていることが確認された。また、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ある。

本研究で独自に開発した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,
7. 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
8. E Hjianioniou, M Anayasa, P Nicolaou, I Bantounas, **M Saito**, S Iseki, JB Uney, LA Phylactou, 2007 Twist induces reversal of myotube formation. *Differentiation*, 76(2):182-192
9. N. Yoshiba, K. Yoshiba, 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):133-145
10. 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
11. 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):452-462
12. 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、歯界展望、Impress

13. 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
14. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saito M., Y. Tomooka, T. Tsuji, 2007 The development of a bioengineered organ germ method., Nature Method,4(3):227-230,2007
15. Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M., Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T, Thesleff I. 2007 Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. Differentiation, in press
16. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, Tsubakimoto T, Harada H, Eto K, Noguchi T, Teranaka T: Establishment of Immortalized Dental Follicle Cells for Generating Periodontal Ligament *In Vivo*. Cell and Tissue Research, 327(2):301-311, 2006.
17. Nishida E, Saito M, Yokoi T, Tsubakimoto T, Kosaka K, Aino M, Teranaka T: Establishment of gene expression profiling database from human periodontal ligament. The Bulletin of Kanagawa Dental College, 34(2): 109-111, 2006.
18. Kosaka K, Yokoi T, Saito M, Nishida E, Tsubakimoto T, Aino M, Teranaka T: Establishment of dental follicle cells culture system that generating periodontal ligament in vivo. The Bulletin of Kanagawa Dental College, 34(2): 112-114, 2006.

#### 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ティング・エッジ) 大阪大学出版会 p 2-19
2. 齋藤正寛: 歯小囊細胞の発生機構 (歯の再生, 歯の発生生物学から歯の再生研究

まで). 真興貿易(株)医書出版部, 75-82, 2006.

3. 齋藤正寛: セメント質の発生・再生機構 (歯の再生, 歯の発生生物学から歯の再生研究まで). 真興貿易(株)医書出版部, 200-208, 2006.

#### 学会発表

##### <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
2. 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
3. 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, San Francisco USA
4. M Saito Transcriptome analysis of extracellular matrix genes involved in periodontal ligament development. 9th international conference on tooth morphogenesis and differentiation 2007 September 8, Zurich, Switzerland
5. 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

6. **Saito M**: A Novel Extracellular Matrix, ADAMTSL-4 regulates periodontal ligament development via microfibril assembly. 84<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, Brisbane Convention & Exhibition Centre, June 30, 2006
7. Nishida E, **Saito M**, Sasaki T, Ishikawa S, Noguchi T, Shimizu N and Teranaka T: Transcriptome analysis of extracellular matrix genes regulating periodontal ligament development. 84<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, Brisbane Convention & Exhibition Centre. July 1, 2006
8. Yokoi T, **Saito M**, Noguchi T and Teranaka T. ADAMTSL-4 Regulated Assembly of Oxytalan Fiber during Periodontal Ligament Development. 84th IADR 2006年6月30日 Brisbane, Australia
9. Tsubakimoto T, **Saito M**, Yokoi T, Nishida E, Kousaka K, Aino M and Teranaka T. Establishment of Immortalized Mouse Dental Papilla Cells with Progenitor Property 84th IADR 2006年6月29日 Brisbane, Australia
10. PDL-cells with gene mutation encod Shiga M, **Saito M**, Kosaki K, Kiyono T, Hattori M and Suda N fibrillin1 cause disorganized cell alignment. 2006年6月28日 84th IADR Brisbane, Australia

<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
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は歯周韧带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
14. 齋藤正寛: KK-Periome データベースの構築と歯周組織再生医療の可能性. COE シンポジウム 2006 「歯周組織のバイオロジー—基礎から臨床まで—」, 大阪大学中之島センター・佐治敬三メモリアルホール, 2006 年 10 月 22 日
15. 齋藤正寛: 歯周組織の発生・再生に関わる細胞外マトリックス因子の機能解析. 第 49 回秋季日本歯周病学会学術大会, p.62-63, 大阪国際交流センター, 2006 年 10 月 21 日
16. 齋藤正寛: 歯周靭帯発生に関わる新規 ECM 因子の解析と歯周病再生医療への展開. 第 27 回日本炎症再生学会, p.299, 京王プラザホテル, 2006 年 7 月 11 日
17. 齋藤正寛, 西田英作, 佐々木貴史, 清水信義, 寺中敏夫: 歯周靭帯発生機構に関わる細胞外マトリックス因子の解析と歯周病再生医療の可能性. 第 24 回日本骨代謝学会学術総会, p.74, 東京ファッションタウン, 2006 年 7 月 7 日
18. 西田英作, 齋藤正寛, 横井隆政, 椿本貴教, 高坂一貴, 相野 誠, 野口俊英, 寺中敏夫: ヒト歯根膜 EST database の構築と歯根膜形成過程に関わる遺伝子群の網羅的解析. 第 49 回秋季日本歯周病学会学術大会, p.106, 大阪国際交流センター, 2006 年 10 月 21 日
19. 西田英作, 齋藤正寛, 横井隆政, 椿本貴教, 高坂一貴, 相野 誠, 野口俊英, 寺中敏夫: ヒト歯根膜 EST library の作製とデータベース化. 第 48 回歯科基礎医学学会, p.113, 鶴見大学記念館, 2006 年 9 月 22 日
20. 西田英作, 齋藤正寛, 横井隆政, 椿本貴教, 高坂一貴, 相野 誠, 野口俊英, 寺中敏夫: ヒト歯根膜遺伝子発現プロファ

イリングデータベースの構築と歯根膜マーカー分子の探索. 第124回日本歯科保存学会春季学術大会, p.32, 神奈川県民ホール, 2006年5月25日

21. Kosaka K, Saito M, Yokoi T, Noguchi T, Kiyono T and Teranaka T: Establishment of dental follicle cells culture system that generating periodontal ligament in vivo. 第38回日本結合組織学会学術大会, p.24, 前橋商工会議所会館, 2006年5月11日
22. 高坂 一貴, 齋藤 正寛, 西田 英作, 相野 誠, 米田 俊之: 歯周組織発生過程に発現する新規細胞外マトリックス因子の機能解析. 第5回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会, p.46, 千里ライフサイエンスセンタービル, 2007年3月4日
23. 西田 英作, 齋藤 正寛, 米田 俊之: ヒト歯根膜形成に関わる細胞外マトリックス因子の探索. 第5回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会, p.50, 千里ライフサイエンスセンタービル, 2007年3月4日

#### 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

分担研究者 村上伸也

大阪大学大学院歯学研究科口腔免疫学講座  
歯周病分子病態学・教授

#### 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。そこで本研究ではビーグル犬歯槽骨骨片より骨芽細胞様細胞(Dog, alveolar bone derived osteoblast:

DAOB)を採取し、移植プロトコルを確立することを試みた。また、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を確立するため、蛍光ラベルしたヒト歯槽骨由来骨芽細胞(Human alveolar bone derived osteoblast, HAOB)細胞を用いて骨再生能力を判定する評価系の確立を試みた。

#### B 研究方法

##### 1. イヌ骨芽細胞の採取

ビーグル犬顎骨より外科的に切除された歯槽骨骨片から、既に確立しているHAOB採取プロトコルに従い、イヌ骨芽細胞(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。

##### 2. 歯周病動物モデルの作製

###### (1)ビーグル犬2級根分岐部病変モデルの作製

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(1次手術)。一ヵ月後にリエントリー手術を施行し、シリコンパテを除去後、同部分岐部病変が作成されているのを確認した。その後、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の移植

歯周病動物モデル作成時(一次手術)に外科的に切除された歯槽骨骨片からDAOBを採取し、分離培養した。次にDAOBを以下に記す担体と混和した後に、(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。DAOB移植後、歯肉弁を復位、縫合し手術を

終えた（二次移植）。

### (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。

## 3. HAOB 再生能力の判定

### (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細胞に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

VenusラベルしたHAOB細胞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パーを用いて直径3mmの骨欠損を作製した。次に、venusラベルしたHAOB細胞を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. イヌ顎骨由来骨芽細胞の採取と評価

ビーグル犬歯槽骨骨片より骨芽細胞を採取した結果、HAOBと同様にヒト間葉系細胞専用培地を用いることにより培養可能な骨芽細胞（DAOB）の採取に成功した。DAOBの分化能力をin vitroにて解析した結果、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の発現が<sup>4</sup>DAOBにおいて確認された。以上のことから、DAOBは

いわゆる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。

## 3. 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。

## 4. 動物モデルを用いた HAOB の歯槽骨再生能力の評価

VenusラベルしたHAOB細胞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

イヌ歯槽骨より採取された、DAOBは骨芽細胞のように硬組織形成能を有することが明らかにされた。また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。この結果より骨芽細胞製剤は、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。

しかし、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出来なかったため、顎骨由来間葉系細胞の生体内における骨再生能力を詳細に検討する必要性があると考えられた。そこで、細胞製剤の骨再生能力を判定する実験系を開発する目的に、蛍光ラベルしたHAOBを用いて、マウス頭蓋冠欠損モデルにおける骨再生応力のモニターを試みた。その結果、venusを遺伝子導入することにより、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、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を強く示唆する結果が得られた。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の候補の一つになるものと思われる。

#### 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。またマウス頭蓋冠モデルを用いて骨芽細胞製剤のラベルならびに骨再生能力を判定するプロトコルを確立した。これらの研究成果より、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 F. 研究発表

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: 232-241, 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. Shibutani, 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/asperin 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. *Peridontology* 2000, (in press), 2008
  9. S. Yamada, M. Tomoeda, Y. Ozawa, Y. Terashima, S. Ikegawa, M. Saito, S. Toyosawa, S. Murakami. PLAP-1/aspurin: A novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J. Biol. Chem.* 282 : 23070-23080, 2007
  10. 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
  11. S. Yamada, Y. Ozawa, M. Tomoeda, R. Matoba, K. Matsubara and S. Murakami. Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. *J Dent Res* 85(5):447-451, 2006

## 著書

1. 山田 聡、村上伸也 歯根膜の分子基盤研究「歯周病研究の新展開と治療戦略」炎症と免疫、16: 43-47, 2008
2. 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
3. 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.
4. 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(1), 32-37 2007

## 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

分担研究者 梅澤明弘  
国立成育医療センター研究所 生殖医療部  
部長

## ・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) 口腔外科手術検体、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。口腔外科手術検体にて得られる顎骨は、切断、細分、コラゲナーゼ処理をした後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。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、骨マーカー遺伝子の発現量を測定した。また、Affymetrix社製マイクロアレイを用いた各細胞の網羅的遺伝子発現解析を継続した。また、主任研究者の研究室にて抽出されたRNAを用いた網羅的遺伝子発現解析も行った。

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) 口腔外科手術検体、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

各手術検体の各組織より、間葉系細胞を分離し、培養することが可能となった。これらの細胞は培養初期においては活発に増殖したが、継代を重ねるごとに増殖能力が落ち、最終的には細胞老化に陥ることが確認できた。

### (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、骨分化能を検討した結果、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認められた。

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みられた。さらに、ヒト顎骨由来間葉系細胞の網羅的遺伝子発現データを用い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した。

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、現在、免疫不全マウス (NOG マウス; NOD/Shi-*scid*, IL-2R $\alpha$ <sup>tm1</sup>) 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、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間葉系細胞が培養可能であることが示された。いずれの検体由来細胞においても、継代を重ねるごとに増殖能力が落ち、最終的に細胞老化に陥る現象が認められた。この現象は本研究において用いられる検体由来の初代培養細胞に共通した特性であると考えられる。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ことから、検体由来の初代培養細胞の*in vivo*、*in vitro*における詳細な特性解析が必要である。

現在の間葉系細胞培養では、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使用されており、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。

骨分化能をもつ細胞とそれ以外の細胞を分ける骨分化能判別関数を、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。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。

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、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、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間葉系細胞が培養可能であることが示された。各間葉系細胞の *in vivo*、*in vitro* における骨分化能も確認できた。今後は、引き続きマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、上記の遺伝子発現データを用いた骨分化能判別関数の精度向上と検証に努める。加えて、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、受付番号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
9. 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
10. 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
11. 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
  12. Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A. Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state *ex vivo*. *Int J Hematol.* 86(1):1-4. 2007
  13. 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
  14. 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
  15. 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
  16. Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration.* 27(1):28-36. 2007
  17. 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
  18. 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 endochondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem.* 100(5):1240-54. 2007
  19. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells.* 24(10):2270-8. 2006
  20. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A. Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL) cells and colony-forming units in spleen(CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J. Cellular Physiology* 208:188-194. 2006
  21. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology.* 147(9):4104-11. 2006
- 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
- 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
- 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に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