

背部皮下に移植した。また、培養未使用のベセルをラット頭蓋骨骨膜下に移植した。2-8 週間経過観察したのち、移植物を摘出し病理組織標本を作製した。HE、TRAP、コッサ、ALP 染色を施した。

ii) ヒト骨膜は下顎智歯頬側歯槽骨より採取した。両親媒性ポリマーなど使用せず、ウシ由来 I 型アテロコラーゲンをフィルム上に塗布し、30 分後に水洗により過剰なコラーゲンを除去した。骨膜シートの培養は Medium 199 + 10% FBS で行ない、KE200 にて分化誘導した。ヌードマウスの背部皮下に、骨膜シートの中心部を含む 6mm 四方程式にトリミングした LCL フィルムを移植した。

2) サイトカインによる培養骨膜のプロファイリング (予定です)

上記の方法で採取し培養系に移したヒト骨膜片を直径がある程度の大きさになるまで約 24 日間、通常の増殖培地単独あるいは増殖培地 (12d) → 分化培地 (12d) で培養した。そこで、培地 (FBS: 10% vs. 1%) に Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA: 0, 10, 25, 50 ng/mL) 添加し、さらに 2 日間培養した。培養上清を集め、Bio-Plex や ELISA にて上清に含まれる細胞由来のサイトカインを定量した。一方、細胞状態を把握する目的から、サンプルバッファーでタンパクを抽出し、Western blotting による骨芽

細胞分化マーカータンパクの発現解析に供した。あるいは、RNA 抽出を行ない、同じくマーカータンパクの mRNA 発現解析に供した。また、それと同時に、パラフィン薄切標本を作製し免疫染色も行なった。

C. 研究結果

1) 骨膜シート作製期間の短縮化

i) 通常のディッシュ培養に比べて、増殖速度は低下したが、3 次元高密度培養の様相を呈した重層状態を保ちつつ自発的 ALP 活性の上昇をサポートした。Dexamethasone などの分化誘導因子を添加すると、in vitro での石灰化をさらに促進した。メッシュ表面の微細な石灰化物沈着も顕著であった。この状態で移植すると皮下組織中で類骨を形成した。一方、頭蓋骨骨膜下に移植したベセルには、骨組織が侵入することによって局所的に骨量を増加させた。培養骨膜シートには足場を欠いた状態でも異所性骨形成を誘導できる能力が備わっているが、ベセルとともに移植することによって、その能力や再現性を大きく向上させることができた。

ii) LCL フィルムは、50・ μ m という薄さと光透過性という特性を持っているため、常時顕微鏡下で、細胞の状態を観察できる基材であった。骨膜片の初期接着はディッシュに比較して劣っていたため、コラーゲンやウシ胎児血清 (FBS)

の自然吸着によるコーティングによって改善を図った。コラーゲンコートによって、未処理フィルムでは弱い細胞接着性が解決され、骨膜片からの初期細胞遊走と in vitro 石灰化がサポートされた。4 週間培養した骨膜をマウスに移植したところ、2-8 週間で骨膜シート単体のものと同様以上の類骨形成を認めた。一方、基材の吸収分解過程で新生石灰物が吸収されるという不具合は認められなかった。

2) サイトカインによる培養骨膜のプロファイリング

予備的に実施している Western blotting では、BMP-2/4, Runx-2, Cox-2, osteocalcin と思われるタンパクの発現が認められた。

12/7, 14, 18, 25 に採取する骨膜にて、培養上清のサンプリングを行なう。

骨膜片から遊走した細胞を分散させて継代している。継代数 10 代を超えるころから細胞の肥大化と増殖速度の低下が著名になってきた。現時点で最多 20 代であるが、一応、増殖活性は保っている。それぞれ 10 代ごとにサンプリングして、遺伝子異常の検査に供したいと思う。

D. 考察

1) 骨膜シート作製期間の短縮化

i) ベセル膜は容易に切り出し移植することができるうえに、その 3 次

元高密度培養に適した構造と性質が培養骨膜のベセル膜を介した重層化状態維持に適している。したがって、培養骨膜との組合せで異所性骨誘導能を発現できる。ただし、ePTFE は生体吸収性ではないためそのままの状態での移植医療に移行することの理解を得るのは容易ではない。現在、topography にもとづいた立体構造を有する多孔質 PLA 膜を作製し、実験に供している。コラーゲンコートは施していないが、初期接着はベセル膜とほぼ同等と評価している(年度末までに投稿予定)。

ii) 培養骨膜シートの骨形成能を犠牲にすることなく、培養期間の短縮化と移植時の操作性も向上を可能にした。培養期間を通して細胞観察が可能であることから細胞異常を発見しやすいというメリットもあり、LCL フィルムは自家培養骨膜シート移植による歯周再生治療において、有望な基材となる可能性がある。

2) サイトカインによる培養骨膜のプロファイリング

昨年度行った抗体アレイのデータと合わせて考察すると、IL シリーズ、IGFBP、TGF- β 、TNF- α 、EGF、VEGF、FGF などのサイトカインのほか、osteocalcin や osteopontin や BMP-2/4 などのサイトカインの産生を指標とできそうである。細胞の状態評価については FCM による細胞周

期の変化なども検討する予定ですが、現時点では手が回りません。

E. 結論

1) 骨膜シート作製期間の短縮化

- i) コラーゲンコート ePTFE メッシュでの速やかな初期接着は、採取から培養操作までの操作性を良好にし、作業時間を短縮化できる。
- ii) 顕微鏡下で細胞状態を観察できる基材は、細胞形態にあらわれた異常を発見するのに有用であり、かつ移植操作性の向上に貢献する。

2) サイトカインによる培養骨膜のプロファイリング

骨膜の石灰化機能のモニタリングとして有用であろうと思われるものの、PMA 処理による細胞の形質転換誘導との間で有意な相関性が取れるかどうか、これからのデータで判断したい。

F. 健康危険情報

本実験はヒトへの培養骨膜シートの使用を含んでいない。参考までに、本学歯周科(奥田先生)ならびに口腔外科(永田先生)にて並行して行っている培養骨膜シートの自家移植に関して危害は報告されていない。また、本研究に関与している研究者に関して健康危害は発生していない。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. **Kawase T**, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, **Yoshie H**.

Osteogenic activity of human periosteal sheets cultured on salmon collagen-coated ePTFE meshes. *J Mater Sci Mater Med* DOI:10.1007/s10856-009-3896-9, 2009.

(Acknowledgement に明記あり)

2. Okuda K, Yamamiya K, **Kawase T**, Mizuno H, Ueda M, **Yoshie H**. Treatment of human infrabony periodontal defects by grafting human cultured periosteum sheets combined with platelet-rich plasma and porous hydroxyapatite granules: case series. *J Int Acad Periodontol* 11(3):206-213,2009.
3. **Kawase T**, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Nakata K, **Yoshie H**. Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies. *J Tissue Eng Reg Med* 3:218-229,2009.

2) 国内学会発表

1. 奥田一博、川瀬知之、山中克之、須田洋子、金子 正、小神浩幸、中山 均、永田昌毅、吉江弘正:ポリ乳酸カプロラクトン重合体フィルムのヒト骨膜シート培養・移植への応用、第9回日本再生医療学会(広島大、広島、2010年3月18日-19日)
2. 川瀬知之:培養自家骨膜シートをもちいた歯周組織再生療法に関する基礎的研究、シンポジウム「歯科領域の再生医療」、第9回日本再生医療学会 広島、2010年3月18日-19日

3. 永田昌毅、川瀬知之、吉江弘正、奥田一博、中田 光、高木律男：インプラント症例を対象とした培養自家骨膜による歯槽骨再生、第52回日本歯周病学会秋季学術大会、宮崎、2009年10月11日 *J Jpn Soc Periodontol* 51:105.
4. 永田昌毅、星名秀行、川瀬知之、荒澤 恵、山田一穂、嵐山貴徳、中田 光、高木律男：歯科インプラントを目的とした培養自家骨膜併用による歯槽骨再生、日本形成外科学会関東支部、第80回新潟地方会、新潟、2009年7月13日

3) 国外学会発表

1. Okuda K, Yoshie H, Kawase T, Kogami H, Nakayama H, Nagata M. The human cultured periosteal sheet for periodontal regeneration: A salmon collagen-coated mesh, a functional potent scaffold, to upregulate the osteogenic potential. The 95th Annual Meeting of the Amer Acad Periodontol (Boston, MA, USA, 2009.9.12-15.) *J Periodontol* in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

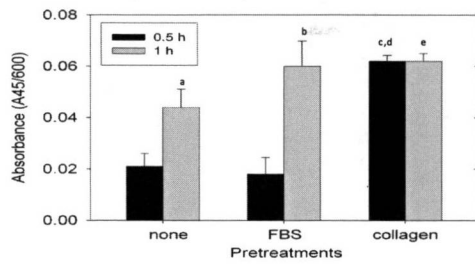
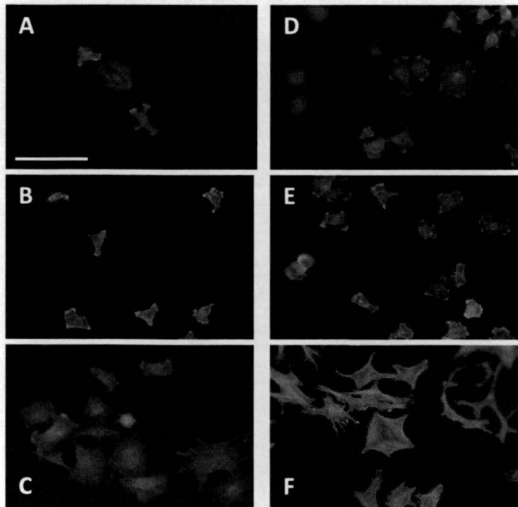
該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし



a $P < 0.01$ vs. 0.5 h
 b $P < 0.001$ vs. 0.5 h
 c $P < 0.001$ vs. none at 0.5 h
 d $P < 0.001$ vs. FBS at 0.5 h
 e $P < 0.05$ vs. none at 1 h

Fig. 2. Kawase et al.

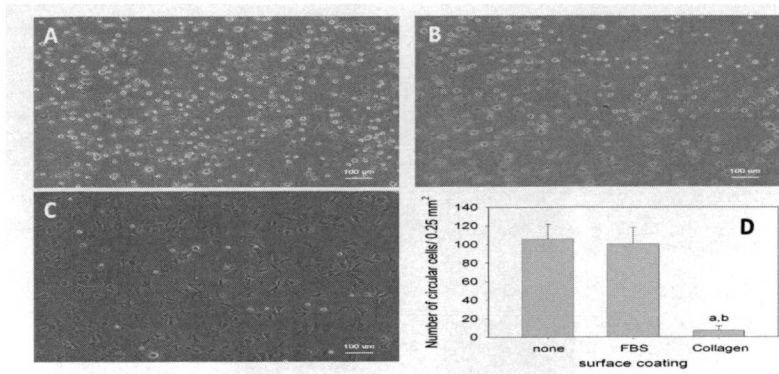


Fig. 3. Kawase et al.

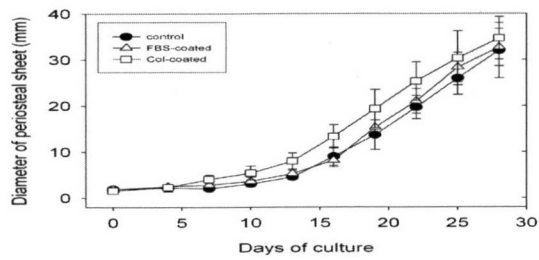


Fig. 4. Kawase et al.

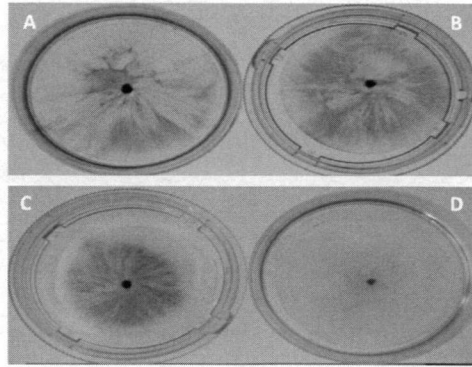


Fig. 5. Kawase et al.

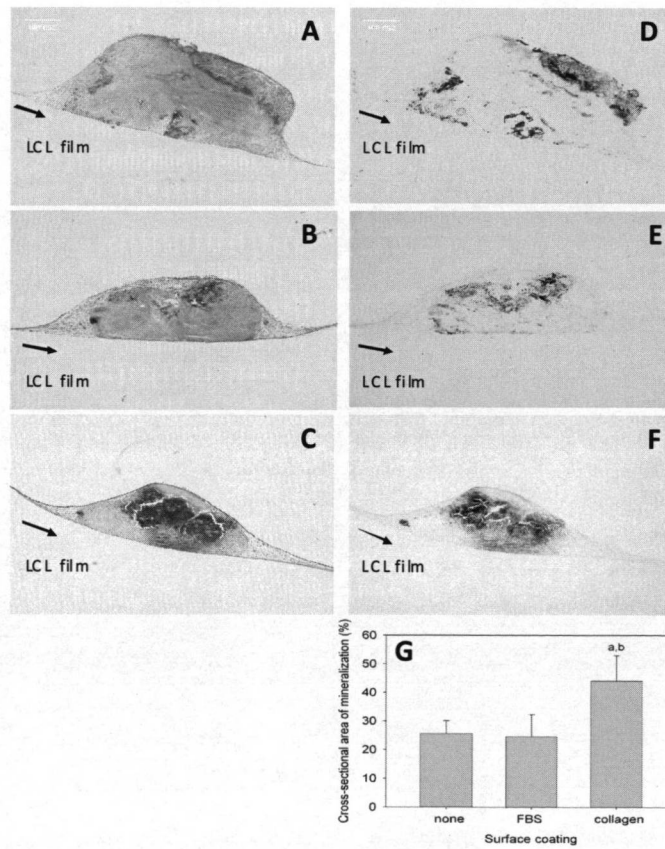


Fig. 6. Kawase et al.

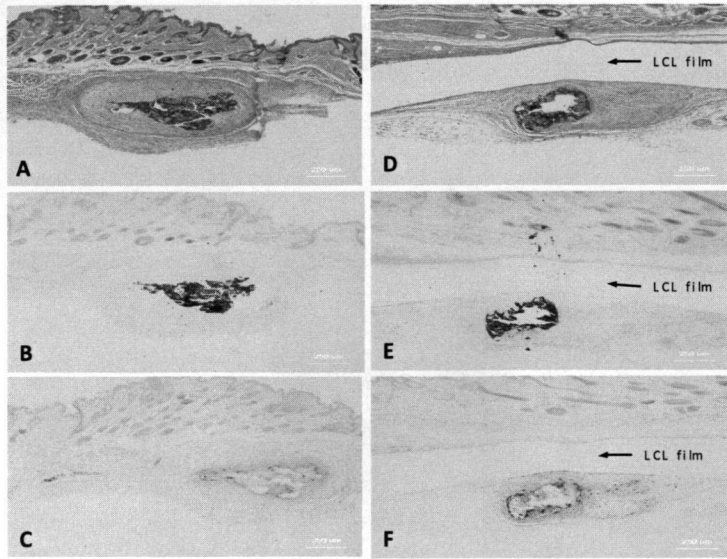


Fig. 7. Kawase et al.

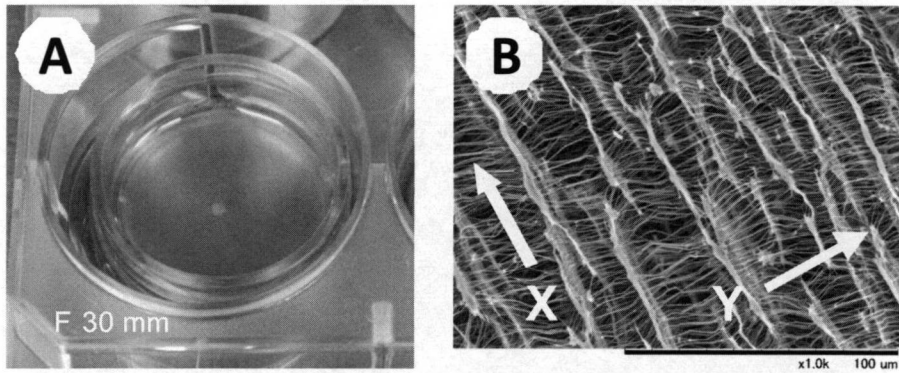
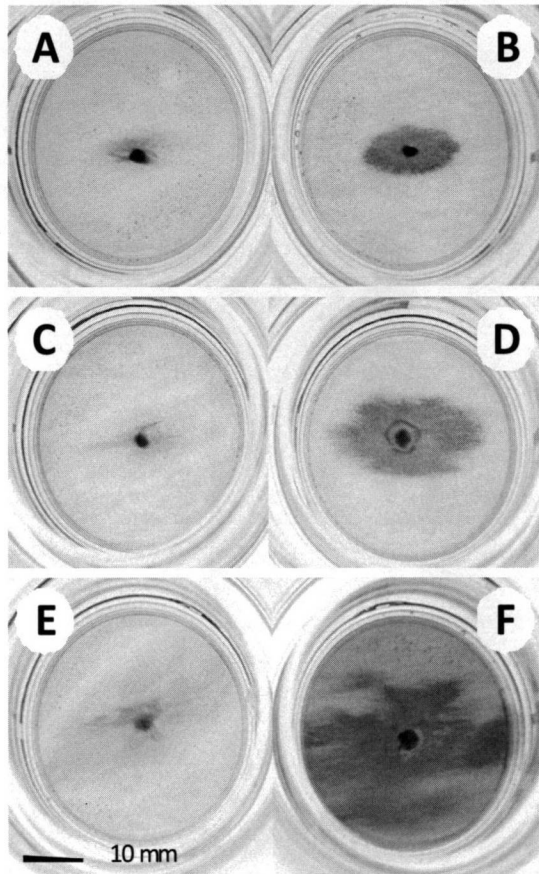


Fig. 1. Kawase et al.



control vs. osteoinduced

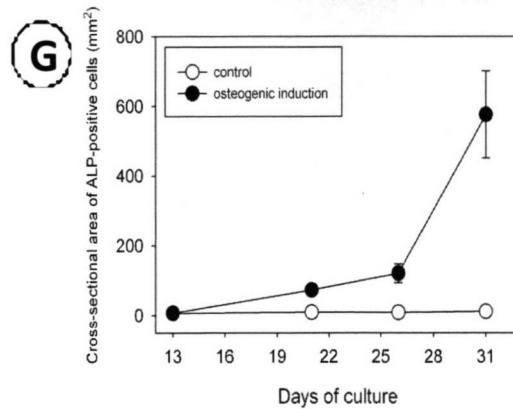


Fig. 2. Kawase et al.

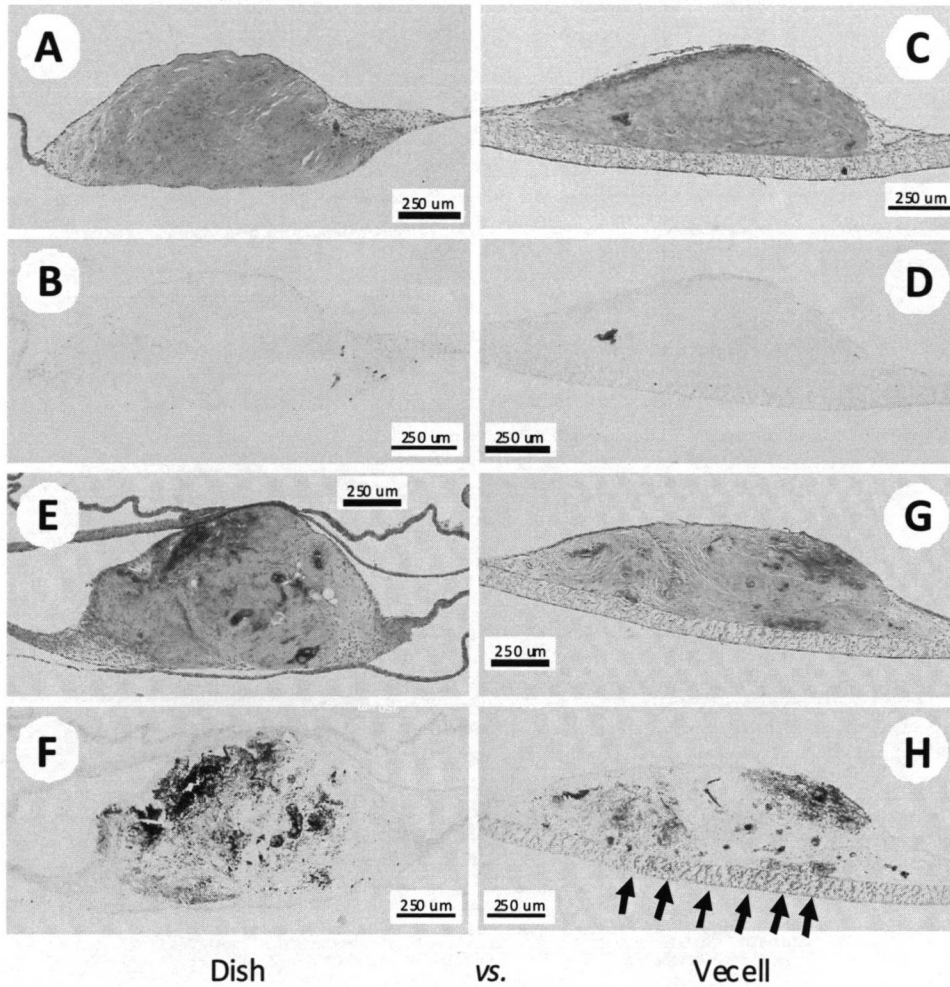
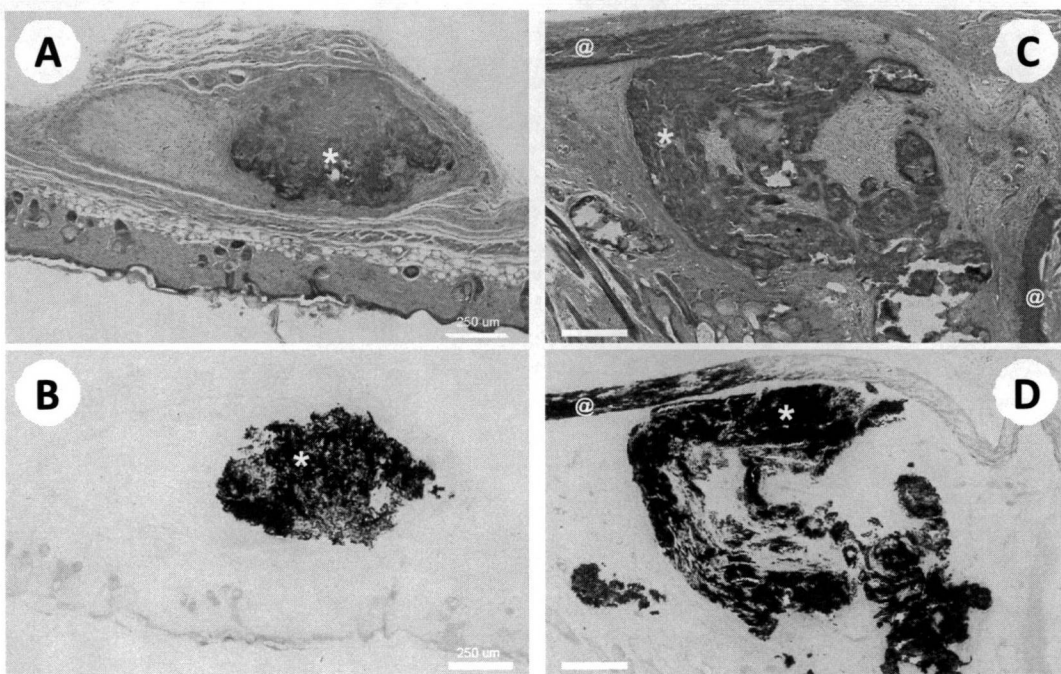


Fig. 3. Kawase et al.



Dish

vs.

Vecell

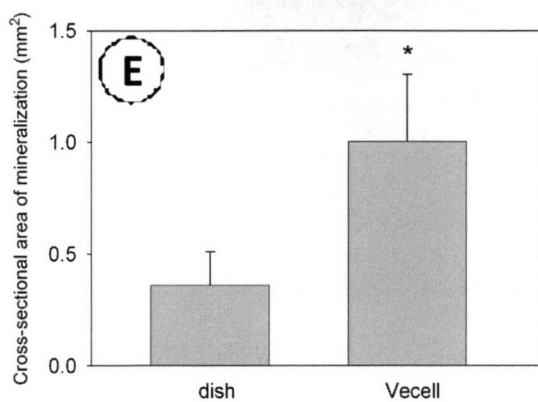


Fig. 4. Kawase et al.

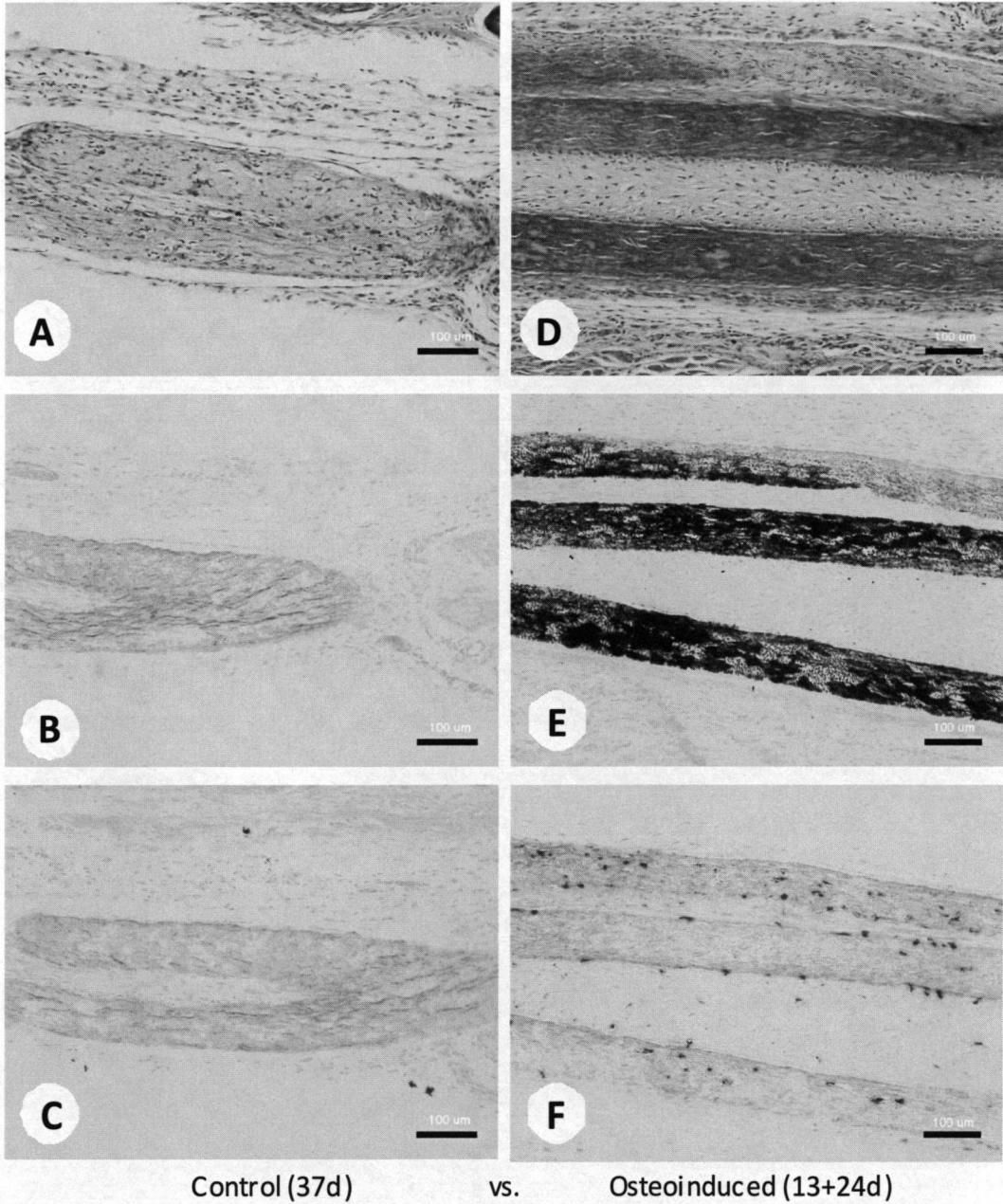


Fig. 5. Kawase et al.

IV 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
加藤俊一	日本移植学会の倫理指針	高橋公太 編集	腎移植のすべて	メジカル ビュ	東京	2009	506-509
中田 光	肺胞蛋白症	高久史麿 尾形悦郎 黒川清 矢崎義雄	新臨床内科学 第9版	医学書院	東京	2009	55-58
中田 光 田澤立之	抗酸菌感染症 結核	小川 聡 後藤 元 三森経世 太田健 三嶋理晃	内科学書 改訂第7版	中山書店	東京	2009	68-69
大橋和政 中田 光	肺胞蛋白症	工藤翔二 中田紘一郎 貫和敏博	呼吸器疾患 最新の治療 2007-2009	南江堂	東京	2009	315-317
Trapnell BC Nakata K Kavuru M	Pulmonary Alveolar Proteinosis Syndrome	Mason R Broaddus	5 and Nadel's Text book of Respi th Edition of Murray ratory Medicine	Bermedica Production , Ltd.	Clumbia MD, USA	in press	

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, <u>Morio T</u> , Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD.	X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options.	Blood.	Epub ahead of print		2010 Feb 19.
Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, hisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, <u>Morio T</u> , Mizutani S.	Autopsic study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD).	Acta Neuroathologica.	In press		2010.
Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, <u>Morio T</u> , Kosaki K, Hara T.	Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism.	Eur J Pediatr.	Epub ahead of print		2010 Jan 6.
Nanki T, Takada K, Komano Y, <u>Morio T</u> , Kanegane H, Nakajima A, Lipsky PE, Miyasaka N.	Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.	Arthritis Res Ther.	11(5)	R149	2009.

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, <u>Morio T</u> , Miyata K, Mochizuki M.	A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior	Br J Ophthalmol.	Epub ahead of print		2009 Sep 3.
Hasegawa D, Kaji M, Takeda H, Kawasaki K, Takahashi H, Ochiai H, <u>Morio T</u> , Omori Y, Yokozaki H, Kosaka Y.	Fatal degeneration of specialized cardiac muscle associated with chronic active Epstein-Barr virus infection.	Pediatr Int.	51	846-8.	2009
Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, <u>Morio T</u> , Shimizu N, Fujimoto J, Fujiw ara S.	Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin.	Immunology	128	405-419.	2009
<u>Morio T</u> , Takahashi N, Watanabe F, Honda F, Sato M, Takagi M, Imadome KI, Miyawaki T, Delia D, Nakamura K, Gatti RA, Mizutani S.	Phenotypic variations between affected siblings with ataxia-telangiectasia: ataxia-telangiectasia in Japan.	Int. J. Hematol.	90	455-642.	2009
soda T, Ford A, Tomizawa D, van Delft F, De Castro DG, Mitsuiki N, Score J, Taki T, Takagi M, <u>Morio T</u> , Saji H, Greaves M, MizutaniS.	Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	106	1788-5.	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, <u>Morio</u> <u>T</u> , Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okimoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T, Nonoyama S.		J. Pediatr.	155	829-833.	2009
Uchisaka N. Takahashi N. Sato M. Kikuchi A. Mochizuki S. Imai K. Nonoyama S. Ohara O. Watanabe F. Mizutani S. Hanada R. <u>Morio T.</u>	Two brothers with ataxia-telangiectasia-like disorder with lung adenocarcinoma.	J. Pediatr.	155	435-438.	2009
Futagami Y, Sugita S, Fujimaki T, Yokoyama T, <u>Morio</u> <u>T</u> , Mochizuki M.	Bilateral anterior granulomatous keratouveitis with sunset glow fundus in a patient with autoimmune polyglandular syndrome.	Ocul Immunol Inflamm.	17	88-90.	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi N. Matsukoto K. Saito H. Nanki T. Miyasaka N. Kobata T. Azuma M. Lee S-K. Mizutani S. Morio T.	Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T-cell populations in ICOS deficient patients.	Immunol.	182	5515-5527.	2009
Yoshida H. Kusuki S. Hashii Y. Ohta H. Morio T. Ozono K.	<i>Ex vivo</i> -expanded donor CD4 T lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient Graft-versus-Tumor effect.	<i>Pediatr Blood Cancer</i>	52	895-897.	2009
Nagasawa M., Ogawa K., Nagata K., Shimizu N.	Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm.	J Haematol	Epub ahead of print		2009 Nov 13
Yajima M, Imadome KI, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Yamamoto N, Fujiwara S.	T Cell-Mediated Control of Epstein-Barr Virus Infection in Humanized Mice.	J Infect Dis.	Epub ahead of print		2009 Oct 15.
Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H.	Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection.	J Gen Virol.	Epub ahead of print		2009 Sep 30.
Moriai S, Takahara M, Ogino T, Nagato T, Kishibe K, Ishii H, Katayama A, Shimizu N, Harabuchi Y.	Production of Interferon- γ -Inducible Protein-10 and Its Role as an Autocrine Invasion Factor in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cells.	Clin Cancer Res.	15(22)	6771-6779.	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo Y-M, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, <u>Shimizu N</u> , Ichinohasama R, Sawada K.	Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/ leukemia.	Blood	114	3265-3275.	2009
Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri Y, Okita H, Morio T, <u>Shimizu N</u> , Fujimoto J, Fujiwara S.	Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin.	Immunology	128	405-419.	2009
Imadome K, <u>Shimizu N</u> , Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S.	CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma- derived human epithelial cells.	Microbes Infect	11(3)	429-433.	2009
Ono Y, Terashima K, Liu A, Yokoyama M, Yokoshima K, Mizukami M, Watanabe K, Mochimaru Y, Furusaka T, <u>Shimizu N</u> , Yamamoto N, Ishiwata T, Sugisaki Y, Yagi T, Naito Z.	Follicular dendritic cell sarcoma with microtubuloreticular structure and virus-like particle production in vitro.	Pathol.Int.	59	332-344.	2009