

厚生労働科学研究費補助金(長寿総合科学研究事業)
(総括)研究報告書

ヒト脂肪組織由来幹細胞の硬組織形成能力の解析に関する研究

分担研究者 齋藤正寛
東京理科大学 基礎工学部 生物工学科
准教授

研究要旨 「歯科再生医療拠点を活用した次世代型歯周組織再生療法」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脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) 製剤の骨再生能力判定試験の確立を試みた。ADSC 細胞を、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 ADSC 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、ADSC 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、ADSC 製剤の移植方法が不適切であったため骨再生能が低下した可能性が考えられた。今後は ADSC 細胞の骨形成能力を損なわずに移植出来る足場製剤を開発する必要性が考えられた。

A. 研究目的

本研究では重度歯周炎患者を対象にした次世代の歯周組織再生療法を樹立するために、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞(ADSC)と至適足場材の移入による新規歯周組織再生療法の確立を目指している。そこで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、ビーグル犬を用いた評価系の確立以外に、ヒト由来 ADSC の有する骨再生能力を判定する必要がある。そこで免疫不全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。具体的にはマウス高分化型骨芽細胞である KUSA 細胞と ADSC を用いて、骨再生能力の比較検討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)細胞の足場製剤への付着

ADSC を 80%コンフルエントになる培養を行い、

PGLA/コラーゲンシートへ 1×10^7 cells を播種し、6 時間培養した後に、裏面にも同様に細胞の播種を行った。コントロールとして KUSA 細胞を用いて細胞播種を行った。

(2)頭蓋冠欠損モデルを用いた移植実験

ADSC 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、ADSC あるいは Kusa 細胞を PGLA/コラーゲンシートの上で培養を行い、この複合体を欠損部位に播種した。一ヶ月以降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

移植したマウスを μ CT による X 線解析にて骨形成能力を解析した後に、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、東京理科大学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. 動物モデルを用いた ADSC の歯槽骨再生能力の評価

KUSA 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。骨再生能力を μ CT で判定した結果、移植後二週間で骨再生が誘導され、4 週間後で完全に骨組織を再生させる事が判明した。一方 ADSC を移植した群では移植後 1 カ月では骨再生は観察されないが、2 ヶ月で骨欠損部位の境界面で新生骨の形成が観察された。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

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。ADSCの骨再生能力を検証するためマウス頭蓋冠欠損モデルを用いた移植実験を試みた。その結果、骨再生時におけるADSCの骨再生能をモニターできることが判明した。しかしPGLA/コラーゲンシートに付着させるだけではADSC細胞の骨芽細胞分化能力を誘導できないため、欠損部に十分な骨再生を誘導することが出来なかった。またADSCの骨再生能力がKUSA細胞と比較して低かったことから、今後は、ADSCの骨再生医療に有効な骨芽細胞分化誘導ならびに移植技術の開発が必要である。また本実験において、マウス頭蓋冠骨欠損モデルはヒト細胞製剤の骨再生能力の判定に適していることが示唆された。今後の課題として本モデルを用いてADSCの骨再生に適した足場製剤を開発する必要性が考えられた。

齋藤らはヒト顎骨由来細胞を用いてマウス頭蓋冠欠損モデルの再生に成功している。従って、同モデルを用いれば個々の患者由来の

ADSCの骨再生能力を比較検討にも有効になることから、骨再生に有用なADSCの選別に有用な評価系になる。従って本研究により、今後ADSCを用いた骨再生医療細胞治療のリスクの大幅な軽減に貢献する事が期待される。

主任研究者の持つサンプルを齋藤らが解析し、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

マウス頭蓋冠モデルを用いてADSCの骨再生能力を判定するプロトコール確立を試みた。ADSCの有する骨再生能力に疑問は残るものの、本実験系は「歯科再生医療拠点を活用した次世代型歯周組織再生療法」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 齋藤正寛、池田悦子、中尾一久、辻 孝、2010 歯の再生医療の最前線「再生歯による歯欠損部の機能的な再生」歯界展望 Vol.115 No.1 9-19

原著論文

1. A. Saito, S. Hino, T. Murakami, S. Kanemoto, S. Kondo, M. Saito, R. Nishimura, T. Yoneda, T. Furuichi, S. Ikegawa, M. Ikawa, M. Okabe, K. Imaizumi.

2. Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. 2009, Nat Cell Biol., 11(10):1197-1204.
3. T. Murakami, A. Saito, S. Hino, S. Kondo, S. Kanemoto, K. Chihara, H. Sekiya, K. Tsumagari, K. Ochiai, K. Yoshinaga, **M. Saito**, R. Nishimura, T. Yoneda, I. Kou, T. Furuichi, S. Ikegawa, M. Ikawa, M. Okabe, A. Wanaka, K. Imaizumi. Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. 2009, Nat Cell Biol.,11(10):1205-1211.
4. **M. Saito**, E. Nishida, T. Sasaki, T. Yoneda and N. Shimizu. The KK-Periome database for transcripts of periodontal ligament development. J Exp Zoology B Mol Dev Evol, 2009, 312B:495-502

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

歯周組織再生療法の評価法に関する研究、ヒト脂肪組織由来幹細胞を
歯周組織細胞へ分化誘導する因子の探索

研究分担者 松下 健二 所属 国立長寿医療センター研究所 職名 部長

研究要旨

自分の歯を温存し、永く自分の歯で食べられることは、健康寿命の延伸のために必須であり、「すべての高齢者が家族と社会のつながりの中で生涯に渡り生活を楽しむことのできる社会の構築」（「新成長戦略」）のための基盤となる。本研究では、脂肪組織由来幹細胞による歯周組織再生療法の安全性、安定性を評価するために必要な事柄に関する情報収集とそれを実証するための試験の準備活動を行った。また、自分の歯を残すことの意義について、認知機能との関連性について検討した。その結果、高齢者の残存歯数と認知機能をはじめとした全身の健康状態との間に有意な相関があることが明らかになった。

A. 研究目的

歯周組織の再生医療の安全性と安定性を評価するための試験に関して、情報を収集し、必要な研究項目および設備等について検証するとともに、それに基づいて安全性試験を実施する。また、歯周組織を再生し、歯を延命することの妥当性に関して、多角的に検証する。本年度は、安全性試験に関する情報収集を行う。加えて、歯の延命と全身の健康との関連性について検討する。

（倫理面への配慮）

今回、再検証を行なったデータは高知医科大学医学部および兵庫県立大学の倫理委員会においてそれぞれ承認された実験計画をもとに行われた疫学研究のデータある。また、本研究データ取得に当たっては、被験者すべてインフォームドコンセントが得られている。

B. 研究方法

独立行政法人医薬品医療機器総合機構（Pmda）の薬事講習会等に参加するとともに、前臨床試験受託会社等と意見交換を行い、必要な情報を収集した。また、高知県香北町において1991年から2001年にかけて行われた高齢者の長期縦断疫学調査のデータを詳細に解析し、天然歯の残存歯数と認知機能との関連性について検討した。さらに、2006年度から2008年度にかけて兵庫県明石市で行われた高齢者の疫学調査のデータをもとに、高齢者の歯の状態と全身状態の関連性について検討した。

C. 研究結果

独立行政法人医薬品医療機器総合機構（Pmda）において開催された「再生医療/細胞・組織加工製品実用化のための薬事講習会」（2009年7月3日、2009年8月20日）に参加し、安全性試験に関する情報収集を行った。また、前臨床試験の受託会社である株式会社新日本科学の担当者とも意見交換を行った。その結果、幹細胞の安全性試験に関しても、製剤と同様の試験を行う必要があるが、実施例が少ないこと、またソースとなる細胞が多様であることなどから、その都度必要事項を協議する必要がある。

あることが明らかになった。また、GMP 準拠の施設において行われる必要があり、その整備も事前に必要であることが確認できた。高知県香北町の調査結果から、高齢者の残存歯の有無は高齢者の空間認知機能および運動性認知機能と相関があることが明らかになった。また、兵庫県明石市の調査結果から、残存歯数と全身の健康状態とは有意に相関することが明らかになった。

D. 考察

歯周組織再生医療の実用化のためには、その有用性はもとよりその安全性と安定性が実証されなければならない。そのために必要な情報を収集することができた。今後、この事業を薦めるにあたってその方向性を明確していかなければならないことが明らかになった、すなわち、臨床研究を行ない、その成果を行動先進医療等の新しい治療法の開発を行なうのか、あるいは細胞製剤としての開発を目指すのか、を明確にしていかなければならない。それによって、必要とされる試験項目等が違ってくる。また、その実施に当たっては GLP と GMP の整備が急務であることも明らかになった。そこで、来年度以降、その整備を迅速に進め、実際の安全性試験を行なう予定にしている。また、高知県で行なわれた長期縦断疫学調査の解析結果から、残存歯数と認知機能が正の相関関係を示すことが明らかになった。また、その相関関係は各種血液マーカーとのそれよりも有意に高かったことから、歯周病やう蝕を克服し歯を残すことが認知機能の維持に重要である可能性が示された。また、残存歯数が認知機能を推測するための指標として有用である可能性を考えられた。

E. 結論

歯周組織の再生医療の安全性試験に関して、今後の実施に向けて必要な事項が明確になった。また、歯周組織を温存し歯を延命することは、認知機能を含めた全身の健康維持に重要である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 今井剛、西永正典、松下健二：高齢者の残存歯数と認知機能との関連性. 鹿児島大学医学雑誌、61(3):47-51, 2010.
2. 杉浦進介、江口傑徳、小松寿明、松下健二：ヒストンアセチル化制御薬を用いた HMGB1 の放出制御 エンドトキシン研究 12:58-60, 2009.
3. 松下健二：血管障害を基盤とした歯周病と糖尿病の関連性. 感染・炎症・免疫 39(3):92-97, 2009.
4. 松下健二：抗 Xa 薬作用：抗炎症作用とそのメカニズム. 血栓と循環 17:17-22, 2009.
5. 松下健二：未来歯科医学に向けて. 歯界展望, 114:781, 2009.
6. Meng X, Kawahara KI, Matsushita K, Nawa Y, Shrestha B, Kikuchi K, Sameshima H, Hashiguchi T, Maruyama I: Attenuation of LPS-induced iNOS expression by 1,5-anhydro-D-fructose. *Biochem Biophys Res Commun* 387:42-46, 2009.
7. Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M: Matrix Metalloproteinase-3 Accelerates Wound Healing Following Dental Pulp Injury. *Am J Pathol* 175:1905-1914, 2009.
8. Inomata M, Ishihara Y, Matsuyama T, Imamura T, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K: Degradation of vascular endothelial thrombomodulin by arginine and lysine-specific cysteine proteases from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 80:1511-1517, 2009.
9. Inomata M, Into T, Nakashima M, Noguchi T, Matsushita K: IL-4 alters expression patterns of storage components of vascular endothelial cell-specific granules through STAT6-and SOCS-1-dependent mechanisms. *Mol Immunol* 46:2080-2089, 2009.
10. [§]Jeong Y, Chaupin DF, [§]Matsushita K, Yamakuchi M, Cameron S, Morell CN,

- Lowenstein CJ: Aldosterone activates endothelial exocytosis. Proc Natl Acad Sci USA 106:3782-3787, 2009.
11. Iohara K, Zheng L, Ito M, Ishizaka R, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M: Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. Regen Med 4:377-385, 2009.
2. 学会発表
 1. 松下健二：高齢化社会における歯学の使命と課題 -老年期、衰退期を想定した歯科医療・医学とQOL-. DENTISTRY, QUO VADIS?-フロネシスに基づいて- 2009年12月5日, 東京
 2. 松下健二：血管を健康に保つエイジングケアのすすめ 平成21年度ホクト生物科学振興財団講演会 2009年11月25日, 長野
 3. 松下健二：血管を健康に保つエイジングケアのすすめ 健康長寿の原点は血管から 第13回生活習慣病対策研究会市民講座 2009年11月21日, 大阪
 4. Matsushita K: Vascular Biology in Oral Diseases. CVRI Special Seminar in University of Rochester, Oct 5. 2009, Rochester NY, USA.
 5. 松下健二：エキソサイトーシス制御を応用した新しい血管病治療の戦略 日本杜仲研究会第4回定期大会 2009年8月1日, 大阪
 6. Matsushita K: A Step for Creation of Future Dental Science in NCGG. 1st Asian International Seminar for Geriatrics and Gerontology -Active Health Promotion in the Aged Society-. July 22, 2009, Obu.
 7. 松下健二：血管を健康に保つアンチエイジングのすすめ-歯周病は血管病である-
 - 岐阜県保険医協会歯科研究会 2009年5月24日, 岐阜
 8. 松下健二：“よく老いる”ための血管生物学のすすめ -血管病としての歯周病とその制御- 第42回新潟歯学会総会特別講演 2009年4月18日, 新潟市
 9. 松下健二：健やかに老いるための歯周病ケアのすすめ. 公開市民講座"聞いて得する健康講座"2009年3月15日, 明石市
 10. 松下健二：歯周病のサイエンス 医療圏合同研修会 2009年3月12日, 名古屋市
 11. 松下健二：よく老いるための血管生物学のすすめ -歯周病は血管病である-北海道医療大学個体差研セミナー. 2009年1月8日, 北海道
 12. Matsushita K: Prevention of Vascular diseases for Aging Well - Periodontal Disease is a Vascular Disease -. The International Joint Symposium on "Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration" and "Oral Health Science", January 6, 2009. Fukuoka, Japan,
 13. 坂下玲子、桑原未代子、松下健二、佐藤拓一、安彦友希、三重幸恵、井上昌一：高齢者の様々な口腔保健行動が口腔状態に及ぼす影響. 第58回日本口腔衛生学会・総会 2009年10月10日, 岐阜
 14. 小松寿明、江口傑徳、杉浦進介、猪俣恵、古市保志、松下健二：E-selectinの新機能：感染の制御 日本歯科保存学会 2009年度春季学術大会 2009年6月11日, 札幌
 15. 位田毅彦, 二ノ宮真之, 額額 守, 松下健二, 丸山征郎：たまねぎ外皮抽出物の調製とその抗動脈硬化・抗血栓作用 第63

回日本栄養・食糧学会大会 2009年5月
20日, 長崎

16. 猪俣 恵, 引頭 毅, 石原 裕一, 松下 健二,
野口 俊英: Th2由来サイトカインは
STAT6を介して血管内皮細胞特異的な分
泌顆粒の構成因子の発現量を変化させる
第52回日本歯周病学会春季学術大会
2009年5月15日, 岡山
17. 杉浦 進介, 江口 傑徳, 猪俣 恵, 小松 寿
明, 野口 俊英, 松下 健二: 新規炎症性
サイトカインHMGB1のアセチル化制御
薬による放出制御 第52回日本歯周病
学会春季学術大会 2009年5月15日, 岡山
18. Jeong Y, Chaupin DF, Matsushita K,
Yamakuchi M, Cameron S, Morell CN,
Lowenstein CJ: Aldosterone activates
endothelial exocytosis. The ATVB 2009
Annual Conference, April 29, 2009,
Washington DC, USA.
19. Abiko Y, Sato T, Matsushita K, Sakashita R,
Takahashi N: Porphyromonas gingivalis is
widely distributed in subgingival plaque
biofilm of elderly people. The 3rd
International Symposium for Interface Oral
Health Science. Jan 15, 2009, Sendai,
Miyagi.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

ヒト脂肪組織由来細胞の分化能と安全性に関する解析

分担研究者 阿久津英憲 (独法) 国立成育医療研究センター研究所生殖・細胞医療研究部
室長

研究協力者 牧野初音 (独法) 国立成育医療研究センター研究所生殖・細胞医療研究部
研究員

研究要旨：本研究班の目的は次世代の歯周組織再生療法を樹立することであり、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞 (ADSCs) と指摘足場材の移入による新規歯周組織再生療法の確立を目指している。ヒト脂肪組織由来細胞の幹細胞特性を解析し安全な細胞治療へ科学的なエビデンスを与えると同時に、体外培養系における増殖能とゲノムの安定性に及ぼす影響を解析する。ヒト脂肪組織由来細胞の特性と培養維持における安全性に関して明確なエビデンスを抽出し安心、安全な再生療法へ寄与することを目的とする。

A. 研究目的

ヒト脂肪組織から間葉系幹細胞の樹立が報告されている。脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞 (ADSCs) は、患者自身の体表に近い皮下組織から比較的安全に採取できる可能性が高く、細胞治療の自家 (あるいは他家) 移植細胞ツールとして非常に期待されている。より明確な ADSCs の特性を得て安心で安全な再生療法のツールとすることを目的にヒト脂肪組織由来細胞の特性を解析するとともに体外培養環境下での細胞の安定性を評価していく。

B. 研究方法

分担研究者らは国立成育医療センター・倫理委員会 (受付番号 25, 26, 27, 49, 55, 全て平成 15 年、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) にて、承認を受けたヒト組織 (成育バイオリソース：臍帯、羊膜、胎盤、子宮内膜、指、眼球、軟骨等) の間葉系細胞を単離、培養を行っている。それらの遺伝子発現プロファイリングなど細胞の規格化に関する研究成果の蓄積は既に行われ、世界的に見ても希少な小児や周産期組織に由来する膨大な質の高い細胞ライブラリーが“成育バイオリソース”として整備されており、極めて重要なバイオリソースを有している。

1. ヒト脂肪組織由来細胞の樹立

当センターでは、倫理的手続きを経たヒト細胞リソースを保有しており、若年者の脂肪組織等に由来した細胞を得られる。得られた組織を解剖学的及び組織学的に選択採取し各組織で無菌的に細断処置し初期培地 (10%FBS in DMEM) で 37°C, 5% CO₂ in air 環境下で培養を行う。組織選択及び安定的な初期培養設定を構築していく。

ヒト細胞に対する倫理面での配慮
国立成育医療センター研究所においては、ヒト細胞に関し、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。

国立成育医療センター倫理審査委員会：
<http://www.ncchd.go.jp/rinri/rinri.htm>

C. 結果

発生学的にみて脂肪組織は中胚葉系組織が由来とされている。中胚葉は原腸形成期に

内胚葉と外胚葉の中間層組織として形成されてくる。原始中胚葉は沿軸(paraxial), 中間(intermediate), および側板(lateral plate)中胚葉に分化し、初期の胚性中胚葉は心筋や骨格筋等の筋組織、結合組織、血液、血管やリンパ組織など分化産生する。沿軸中胚葉からは骨・軟骨、骨格筋、真皮や皮下組織等が分化してくる。中間中胚葉からは尿生殖器系組織の一部が分化し、側板中胚葉からは心膜、胸膜や腹膜組織が分化する。胚性幹(ES)細胞からは神経堤細胞を介して脂肪細胞が分化するという報告もある。神経堤組織は元来中胚葉系の神経管側壁組織からなるとされ、更に神経堤細胞の *in vivo* における追跡研究では唾液腺や耳組織周囲の脂肪組織へ分化しているとの報告もある。発生学的にみて脂肪組織には間葉系由来の幹細胞を含むと強く示唆される。そして、Gomillion and Burgにより脂肪組織由来細胞が間葉系幹細胞のポテンシャルを持つことが報告された。しかし、ADSCsの幹細胞特性に関してその全貌が明かされたわけではなく、特に細胞治療ツールとして応用する場合培養維持する過程での細胞性質がどのように変化するか早急にその知見を獲得する必要がある。

1. ヒト脂肪組織由来細胞の樹立

先天性異常の多指症の治療により採取可能な脂肪組織から前駆細胞あるいは幹細胞株を樹立し得た。安定的に若年者の脂肪組織に由来した細胞を得られる可能性が示唆された。更に、リンパ管腫組織より樹立し得た初代細胞株が脂肪細胞分化能を有していることが確認できた。細胞株の分子レベルでの特性解析を主任研究者である村上らと協力し網羅的な遺伝子発現解析を行っており、今後はパイオインフォマティクス解析を行いADSCsの分子レベルでの規格化を行う。ADSCsは増殖性から同種移植用の細胞ソースで非常に重要であることから更なる開発研究を進め、安全、安心な再生医療を目指し本研究を進めていく。

D. 結論

ADSCsの幹細胞特性を詳細に解析するこ

とは細胞治療ツールとするために早急に行う必要がある。今後は、移植に必要な細胞数や性質を保持する細胞を得るために安定的な培養環境を整備し、ヒト脂肪組織由来幹細胞の開発研究を展開していく。

E. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

F. 研究発表

1. 著書

- 1) Mhendra Rao, (訳) 三浦巧, 阿久津英憲: 「アメリカにおける細胞治療システムの課題」*医学のあゆみ*, 229(9):679-680, 2009.
- 2) 阿久津英憲, 梅澤明弘: 第5章 細胞周辺環境のための培養技術 6. フィーダーレイヤー, 遺伝子医学MOOK別冊 ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術, 田畑泰彦(編集) *メディカルドウ*, 354-357, 2009.
- 3) 阿久津英憲, 梅澤明弘: 第3章 病態解明 1. ES細胞の病態解明への応用, 幹細胞の分化誘導と応用-ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線-, エヌ・ティー・エス, 413-423, 2009.

2. 論文発表

- 1) Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res*. 2009; 315(16):2727-2740.
- 2) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet*. 2009; 19(3):480-493.
- 3) Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient

reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells*. 2009; 14(12):1395-404.

- 4) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, **Akutsu H**, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(5):491-503.
- 5) **Akutsu H**, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*. 2009; 78(2-3):137-42.

3.学会発表

- 1) **阿久津英憲**:「ヒト iPS 細胞遺伝子発現動態の多様性」第 8 回日本再生医療学会総会シンポジウム, 3 月 5 日~6 日, 2009.
- 2) **阿久津英憲**:「難治性疾患克服に向けたヒト iPS 細胞の可能性」日本人類遺伝学会第 54 回大会 ワークショップ 4, 9 月 23~26 日, 2009.
- 3) **阿久津英憲**:「Human Embryonic stem cells and iPS Cells: Potential tool for Low

temperature medical experiments」第 36 回

日本低温医学会総会・学術集会シンポジ

ウム 2, 11 月 27~29 日, 2009.

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

Ⅲ. 研究成果に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
村上伸也	細胞増殖因子 進歩する歯周組織再生治療の分類と臨床(編集：和泉雄一)	歯科医療	2009年春号 Vol. 23, No. 2	24-28	2009
Kao RT, Murakami S, Beirne OR	The use of Biologic Mediators and Tissue Engineering in Dentistry	Periodontology 2000	50	127-153	2009
Yanagita M, Kobayashi R, Murakami S	Nicotine can skew the characterization of the macrophage type-1 (MU1) phenotype differentiated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to the MU2 p	Biochem. Biophys. Res. Commun	388	91-95	2009
Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, Anzai J, Takedachi M, Yanagita M, Hashikawa T, Yamada S, Murakami S	Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells	J Endod	35	1529-1535	2009
Hoashi T, Matsumiya G, Miyagawa S, Ichikawa H, Ueno T, Ono M, Saito A, Shimizu T, Okano T, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y	Skeletal myoblast sheet transplantation improves the diastolic function of a pressure-overloaded right heart	J Thorac Cardiovasc Surg	138(2)	460-467	2009

Komoda H, Okura H, Lee CM, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Ichinose A, Murakami S, Sawa Y, Matsuyama A	Reduction of N-glycolylneuraminic acid xenoantigen on human adipose tissue-derived stromal cells/mesenchymal stem cells leads to safer and more useful cell sources for various stem cell therapies	Tissue Eng Part A	16(4)	1143-1155	2009
Kitabayashi K, Siltanen A, Pätälä T, Mahar MA, Tikkanen I, Koponen J, Ono M, Sawa Y, Kankuri E, Harjula A	Bcl-2 Expression Enhances Myoblast Sheet Transplantation Therapy for Acute Myocardial Infarction	Cell Transplant		1-41	2010
Hata H, Bär A, Dorfman S, Vukadinovic Z, Sawa Y, Haverich A, Hilfiker A	Engineering a novel three-dimensional contractile myocardial patch with cell sheets and decellularised matrix	Eur J Cardiothorac Surg		1-6	2010
Nakano K, Sugiyasu K, Daimon T, Yoshikawa H, Myoui A	Synthetic alginate is a carrier of OP-1 for bone induction	Clinical Orthopaedics and Related Research	467	3149-3155	2009
Hayashi H, Fujimaki C, Daimon T, Tsuboi S, Matsuyama T, Itoh K	Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes as a possible marker for predicting the outcome of methotrexate therapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis	Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics	34	355-361	2009
Saito M, Nishida E, Sasaki T, Yoneda T, Shimizu N	The KK-Periome database for transcripts of periodontal ligament development	J Exp Zoology B Mol Dev Evol	312B	495-502	2009

Saito A, Hino S, Murakami T, Kanemoto S, Kondo S, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Imaizumi K	Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis	Nat Cell Biol	11(10)	1197-1204	2009
Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, Sekiya H, Tsumagari K, Ochiai K, Yoshinaga K, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Kou I, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A, Imaizumi K	Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation	Nat Cell Biol	11(10)	1205-1211	2009
松下健二	抗炎症作用とそのメカニズム	血栓と循環	17	17-22	2009
松下健二	血管障害を基盤とした歯周病と糖尿病の関連性	感染・炎症・免疫	39(3)	92-97	2009
松下健二	未来歯科医学に向けて	歯界展望	114	781	2009
杉浦進介、江口傑徳、小松寿明、松下健二	ヒストンアセチル化制御薬を用いたHMGB1の放出制御	エンドトキシン研究	12	58-60	2009
今井剛、西永正典、松下健二	高齢者の残存歯数と認知機能との関連性	鹿児島大学医学雑誌	61(3)	47-51	2010
Meng X, Kawahara KI, Matsushita K, Nawa Y, Shrestha B, Kikuchi K, Sameshima H, Hashiguchi T, Maruyama I	Attenuation of LPS-induced iNOS expression by 1,5-anhydro-D-fructose	Biochem Biophys Res Commun	387	42-46	2009

Inomata M, Ishihara Y, Matsuyama T, Imamura T, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K	Degradation of Vascular Endothelial Thrombomodulin by Arginine- and Lysine-Specific Cysteine Proteases From Porphyromonas gingivalis	J Periodontol	80	1511-1517	2009
Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M	Matrix Metalloproteinase-3 Accelerates Wound Healing following Dental Pulp Injury	Am J Pathol	175	1905-1914	2009
Inomata M, Into T, Nakashima M, Noguchi T, Matsushita K	IL-4 alters expression patterns of storage components of vascular endothelial cell-specific granules through STAT6- and SOCS-1-dependent mechanisms	Mol Immunol	46	2080-2089	2009
Iohara K, Zheng L, Ito M, Ishizaka R, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M	Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31-/CD146- side population cells from a canine tooth	Regen Med	4	377-385	2009
阿久津英憲、梅澤 明弘	ES細胞の病態解明への応用			413-423	2009
阿久津英憲、梅澤 明弘	細胞周辺環境のための培養 技術 フィーダーレイヤー	遺伝子医学MOOK 別冊 ますます 重要になる細胞 周辺環境（細胞 ニッチ）の最新 科学技術		354-357	2009
Mhendra Rao、 （訳）三浦巧、阿 久津英憲	米国における細胞治療シス テムの課題	医学のあゆみ	229(9)	679-680	2009

Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A	Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS.	Exp Cell Res	315(16)	2727-2740	2009
Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A	Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development	Hum Mol Genet	19(3)	480-493	2009
Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T	Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells	Genes Cells	14(12)	1395-404	2009
Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K	A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog	Cell Stem Cell	5(5)	491-503	2009

Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A	Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9	Differentiation	78(2-3)	137-42	2009
--	--	-----------------	---------	--------	------

IV. 研究成果の刊行物・別冊



4) 細胞増殖因子

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 村上 伸也
歯周病分子病理学・歯周病診断制御学

はじめに

細胞増殖因子とは、我々の生体を構成している細胞が分泌するタンパク質（ペプチド）の一種で、周囲の細胞間とのコミュニケーションに重要な役割を果たしている。細胞増殖因子の種類・その作用は実に多様であり、その名の通り各種の細胞の増殖を促進するのみならず、中には、炎症反応、創傷治癒、あるいは骨のリモデリング等に深く関与するものも存在している。遺伝子工学の進歩により、これら細胞増殖因子を大量生産することが可能となってきた背景から、治療薬として細胞増殖因子が用いられるようになってきている。

歯周組織再生治療の分野においても、歯周組織欠

損部への歯根膜細胞を初めとする各種細胞群の遊走や、同欠損部におけるそれら細胞の増殖、およびセメント芽細胞・骨芽細胞等への部位特異的な分化を、ある種の細胞増殖因子を局所投与することにより活性化し、歯周組織再生を積極的に促進しようとする新たな治療法の確立が試みられている（図1、表1）。

本項では、米国での臨床応用が始まった血小板由来増殖因子（platelet-derived growth factor: PDGF）と、日本国内での臨床試験が進められている塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor: bFGF; FGF-2）という、ヒトへの有効性の検討がなされている2つの細胞増殖因子を中心に紹介し、細胞増殖因子を用いた歯周組織再生治療の将来を展望させていただく。

表1 細胞増殖因子による歯周組織再生誘導

1. PDGF-BB + IGF-1
(platelet-derived growth factor) (insulin-like growth factor-1)
2. BMP-2
(bone morphogenetic protein-2)
3. TGF- β
(transforming growth factor- β)
4. OP-1 (BMP-7)
(osteogenic protein-1)
5. BDNF
(brain-derived neurotrophic factor)
6. PDGF-BB + β -TCP (GEM21S[®])
(platelet-derived growth factor) (β -tricalcium phosphate)
7. FGF-2 (bFGF)
(basic fibroblast growth factor)

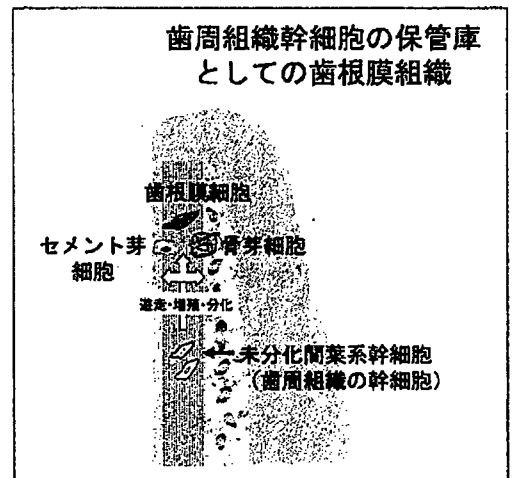


図1 「歯周組織幹細胞」としての未分化間葉系幹細胞を保管する歯根膜組織の概念図
歯根膜中に存在する未分化間葉系幹細胞（歯周組織幹細胞）を歯周組織欠損部へ遊走させ、増殖を促進し、歯根膜細胞・骨芽細胞・セメント芽細胞への分化を誘導することにより歯周組織再生が誘導される。

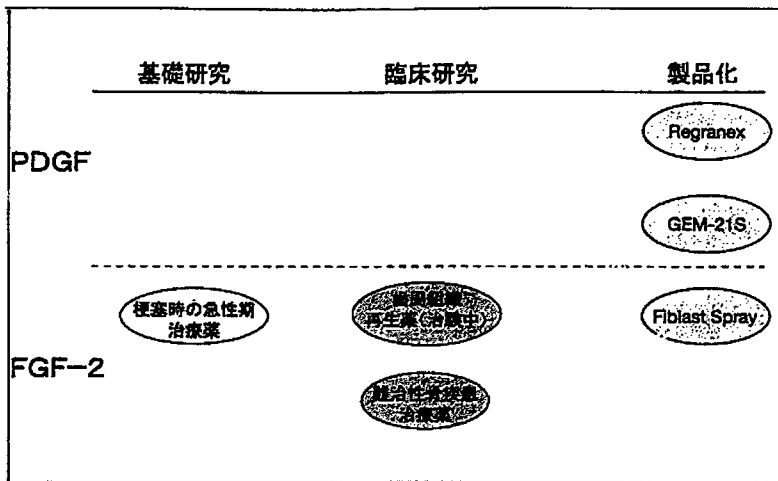


図2 PDGF, FGF-2を用いた製剤の開発現状

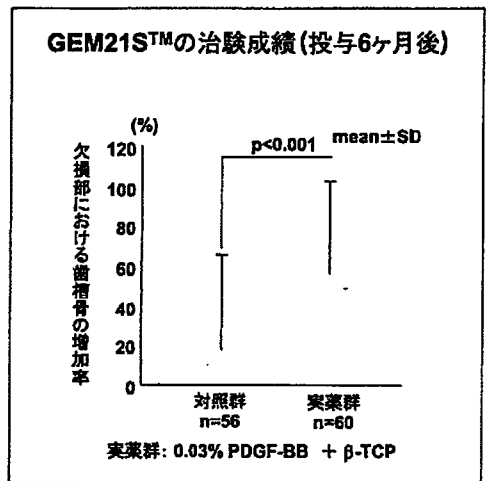


図3 PDGF-BB + β-TCP 投与によりレントゲンの確認された%歯槽骨再生量(文献4より改変)

1. PDGF を用いた歯周組織再生治療

PDGF は、その名の通り血小板中に存在し、主として間葉系細胞の遊走・増殖を促進する細胞増殖因子として1979年に報告されている。その後の研究でマクロファージ、平滑筋細胞、内皮細胞、線維芽細胞等、種々の細胞からも分泌されることが明らかにされ(一般的に、一つの細胞増殖因子は多種類の細胞から分泌される)、現在では、発生過程、恒常性維持、創傷治癒過程、各種疾患の病態形成等にかかわる細胞増殖因子として知られている。PDGF は A 鎖、B 鎖とよばれる 2 種類のタンパクが 2 量体を形成して存在しており、その組み合わせにより 3 種のアイソフォーム -AA, -AB, -BB が確認されている。治療薬としての検討例としては、PDGF-BB が糖尿病性の足部潰瘍治療薬 (Regranex[®]) として米国・欧州等にて臨床応用がなされている(図2)。

PDGF の歯周組織再生誘導薬としての有効性を検討した初期の研究においては、PDGF-BB とインスリン様増殖因子-1 (Insulin like growth factor-1: IGF-1) の合剤として、その有効性が検討されている。0.15mg/ml の PDGF-BB と IGF-1 の合剤を用いたヒトへの臨床試験(2施設二重盲検臨床治験)

が行われ、同合剤の投与により統計学的に有意な歯槽骨再生量が得られたと報告されている¹⁾。また、PDGF-BB の培養ヒト歯根膜細胞 (HPDL) に対する作用が *in vitro* にて検討されており、PDGF-BB は HPDL の増殖・コラーゲン産生を促進することが明らかにされている^{2,3)}。

上記の研究成果以降、PDGF-BB と IGF-1 の合剤を用いたヒトでの歯周組織再生誘導効果の検討に関する報告は途絶えることになったが、その後、歯周組織再生における PDGF-BB と骨伝導性の足場材である β-tricalcium phosphate (β-TCP) の併用効果が、11 の施設が参加した無作為比較対照試験により検討されることとなった⁴⁾。計180名の歯周病患者を (1) β-TCP + 0.3 mg/ml PDGF-BB、(2) β-TCP + 1.0 mg/ml PDGF-BB、(3) β-TCP のみ、の 3 群に無作為に割り付け、6 ヶ月後に臨床的付着レベル (CAL) の獲得量の評価と、レントゲンの結果を基にした歯槽骨再生量の評価が行われた。その結果、CAL に関しては群間の有意差を認めなかったものの、レントゲンの歯槽骨再生量においては (1) > (2) > (3) の順で統計学的に有意な差が認められたと報告されている(図3)。その後、[β-TCP + 0.3 mg/ml PDGF-BB] の組み合わせは、歯周組織再生