

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

（分担）研究報告書

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

国立長寿医療センター研究所

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、高齢者における歯周組織の健康維持の重要性とその意義を明らかにすることを目的として、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関係が認められ、歯周組織を健全に保ち、自分の歯を温存することが健康寿命の延伸に寄与することが明らかになった。

A. 研究目的

一般的に口腔内の治療・予防は、病院で受けるという意識が強く、地域と連携し医療チームが関わることは少ない。特に、地域社会におけるチーム医療は、地域住民との継続的な連携するとともに、住民一人一人が抱えている問題を総合的にサポートしていくプロセスが求められる。さらに、質の高いコミュニティーチーム医療を提供するためには、地域住民のニーズを把握し、地域の生活者の視点に立った取り組みが必要である。本研究の目的は、口腔セルフケア能力の向上であり、口腔健康行動が生涯にわたって維持できるよう、地域の生活者の視点に立った環境づくりがねらいである。

B. 研究方法

兵庫県内の4地区（A地区、B地区、C地区、D地区）の計152名の高齢者（男性：

23名、女性：129名）を対象に、①QOL（全身SF-8、口腔GOHAI）、②属性、既往、現疾患、生活、口腔健康習慣、③心理検査（POMS）、④認知機能検査（MMSE-J）、⑤口腔健診（歯科疾患、口腔細菌検査）、⑥口腔機能の調査を行う。次いで、その調査結果をもとにして、個別指導の方針を決定した。さらに、それをもとに口腔健康維持に関する講義とともに、個別指導、グループ指導を3ヶ月間おこなった。3ヶ月後、6ヶ月後、および8ヶ月後、先の検査項目について再調査を行い、介入前後における変化を検討した。

（倫理面への配慮）

今回、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。

C. 研究結果

口腔の健康度に関しては、4地区すべての住民における3ヶ月後検診時の結果、一部のパラメータにおいて改善が認められた。特に、処置歯数の増加とともに、歯石の減少、歯周病の低下が認められた。加えて、セルフケア行動の改善も見受けられ、一日の口腔清掃回数増加とデンタルフロス使用頻度の増加が認められた。さらに、介入終了時に認知機能（MMSE）の改善とともに、心理状態の変化も顕著に認められた。口腔の健康度の改善は、介入終了3ヶ月後および8ヶ月後にも認められ、口腔ケアに対する住民の意識向上とセルフケア行動が維持されていることが明らかになった。一方、認知機能に関しては、介入3ヶ月後および8ヶ月後にはベースラインに戻る傾向がみられた。

D. 考察

今回の小規模コミュニティにおける口腔健康指導の結果、口腔の健康改善のみならず、認知機能や心理にも短期間で改善が認められることが明らかになった。テーラーメイドのきめ細かい指導が、個々のモチベーションを効果的に高めることができた可能性がある。加えて、参加者がお互いにコミュニケーションをとりながら助け合うこと、また切磋琢磨することが認知機能の改善にもつながった可能性が考えられた。また、セルフケア行動の改善が継続していたことから、本プログラムによりセルフマネジメント力が育成されたと考えられる。一方、認知機能についてはその効果が継続しないことが示唆された。一時的な認知機能の改善には、本プログラムにより、地域の人々が集まりコミュニケーションを図

れたことが大きかった可能性がある。

E. 結論

今回の小規模コミュニティにおける口腔健康指導の結果、口腔の健康改善のみならず、認知機能や心理にも短期間で改善が認められることが明らかになった。テーラーメイドのきめ細かい指導が、個々のモチベーションを効果的に高めることができた可能性がある。加えて、参加者がお互いにコミュニケーションをとりながら助け合うこと、また切磋琢磨することが認知機能の改善にもつながった可能性が考えられた。また、セルフケア行動の改善が継続していたことから、本プログラムによりセルフマネジメント力が育成されたと考えられる。一方、認知機能についてはその効果が継続しないことが示唆された。一時的な認知機能の改善には、本プログラムにより、地域の人々が集まりコミュニケーションを図れたことが大きかった可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 松下健二：歯周病と炎症 The bone 25:415-420, 2011.
2. 杉浦進介, 石原裕一, 小松寿明, 萩原真, 水谷大樹, 加藤佳子, 野口俊英, 松下健二：バルプロ酸はHMGB1の能動放出を誘導して、エンドトキシンショックに対する感受性を高める エンドトキシン研究 14 57-60, 2011.
3. Tanigawa N, Takeda Y, Sunghwa F, Ninomiya M, Hagiwara M, Koketsu M,

- Matsushita K: Morroniside derivative regulates E-selectin expression in human endothelial cells. *Interface Oral Health Science* 2011, 161-163, 2012.
4. Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Kato Y, Mizutani H, Kawahara K, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K: Valproic acid increases susceptibility to endotoxin shock through enhanced release of HMGB1. *Shock* 36:494-500, 2011
 5. Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M: Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with SDF-1. *Tissue Eng Part A* 17: 1911-1920, 2011.
 6. Sugiyama M, Iohara K, Wakita H, Hattori H, Ueda M, Matsushita K, Nakashima M: Dental Pulp Derived CD31-/CD146- Side Population Stem/Progenitor Cells Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Tissue Engineering* 17:1303-1311, 2011.
 7. Kanno Y, Ishisaki A, Nakajima K, Nishihara T, Toyoshima T, Okada K, Ueshima S, Matsushita K, Matsuo O, Matsuno H: Plasminogen/plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function. *J Biol Chem*, 286:8952-8960, 2011.
- ンによるヒト歯肉上皮細胞のアレルギ一誘導性サイトカインの発現機構 第17回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2011/12/10, 西宮
2. 萩原真, 杉浦進介, 小松寿明, 加藤佳子, 多田浩之, 磯田竜太郎, 石田直之, 小林かおる, 谷川順美, 松下健二: Rab5 と vinculin 依存的なエンドサイトーシスの解析 第34回日本分子生物学会年会 2011/12/10, 横浜
 3. 松下健二: 老年期、衰退期を想定した歯科医学・医療と QOL 第12回抗加齢歯科医学研究会 2011/7/18, 東京
 4. 加藤佳子, 杉浦進介, 小松寿明, 石原 裕一, 野口 俊英, 松下健二: 「歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の歯肉上皮細胞への侵入機構の解明」第54回春季日本歯周病学会学術大会 2011/5/27, 福岡
 5. 萩原真, 小松寿明, 杉浦進介, 加藤佳子, 谷川順美, 松下健二: 「エンドサイトーシスが関与する誤嚥性肺炎の発症機序に関する研究」第65回日本栄養・食糧学会大会 2011/5/14, 東京
 6. Sakashita R, Watanabe K, Hamada M, Matsushita K, Nishitani M, Nishihira T: A MULTIDISCIPLINARY COMMUNITY CARE PROGRAM FOCUSING ON ORAL HEALTH. The International Council of Nurses (ICN) 2011, May 5, 2011, Malta.

2. 学会発表

1. 多田浩之, 島内英俊, 松下健二: *Porphyromonas gingivalis* ジンジパイ

H. 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

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（分担）研究報告書

ヒト脂肪組織由来細胞の分化能と安全性に関する解析

研究分担者 阿久津英憲
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ともに、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 の特性を得て安心して安全な細胞治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。ADSCs の特性評価としての網羅的遺伝子発現解析と分化多能性について検討を行う。

B. 研究方法

分担研究者らは国立成育医療研究センター・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。

ADSCs を供給する組織として、手術検体皮下組織（若年：脂肪）から細胞株を樹立し、継代初期のサンプルで網羅的遺伝子発現解析を行った。

分化多能性を解析するために、骨分化、軟骨分化、脂肪分化について既存の分化方法に則り、分化誘導を行った。使用したキットは Lonza 社のプレートキットを用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立成育医療研究センター・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、承認を受けた試料を用いて行った。

C. 研究結果

網羅的遺伝子発現解析の結果、幼弱な組織から樹立した皮下組織由来 ADSCs は、成人組織由来 ADSCs と非常に近似した位置にクラスター化された。今回のサンプルは、継代数 (P3~P6) の影響も検討したが、継代数より由来組織により優性的にクラスター化されていた。

分化誘導試験では、各種キットを用い培養を行い、各組織特異的マーカー染色と細胞形態像により検討を行った。骨芽細胞分化 (アルカリフォスファターゼ染色)、軟骨分化 (ヘマトキシリン・エオジン染色)、脂肪分化 (オイルレッド O 染色) のいずれでも分化が認められた。

D. 考察

幼弱な組織から樹立した皮下組織由来 ADSCs は、成人組織由来 ADSCs と非常にた位置にクラスター化され、類似した特性を有していると推測された。そして、今回のサンプルに関して、継代数の影響も検討したが、継代数より由来組織により優性的にクラスター化され、由来組織の影響が長期間に渡り保持される可能性が示唆された。また、各種キットを用いた分化誘導試験で、皮下組織由来 ADSCs に骨芽細胞分化、軟骨分化、脂肪分化のいずれの分化も認められたことから、多彩な組織への分化能を示すことが示唆された。

E. 結論

幹細胞から目的の細胞を得るために誘導操作工程を付加した場合の検証も考慮する必要性があるが、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。ADSCs は、その幹細胞特性よ

り他家移植ソースとしても有望である。今回は、若年組織より樹立した ADSCs は細胞増殖性も高く、多分化能も保持していた。既存の成人組織由来 ADSCs との比較では、近似した位置にクラスター化が認められた。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、安全、安心な再生医療を目指し培養工程での幹細胞性質安定性評価は極めて重要である。今後も、培養工程と幹細胞性質を多角的に検証していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, **Akutsu H**, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet.* 2011; 7(5):e1002085.
2. Nishi M, **Akutsu H**, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 2011; 286(13):11593-11603.
3. Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, **Akutsu H**, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells.* 2011;16(1):1-11.

4. Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, **Akutsu H**. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2012;3(2):8.

2. 学会発表

1. **H Akutsu**. “Development of xeno-free culture systems of human embryonic stem cells for cell therapy”, JST/CIRM Worksho “Early translational research on stem cells”, Kobe, 16th May, 2011
2. **阿久津英憲**:「エピゲノムの基礎知識」エピゲノムワークショップ（座長；河野友宏、阿久津英憲）第52回日本哺乳動物卵子学会，大田原，5月21日，2011年
3. **阿久津英憲**:「特別講演 再生医療を見すえたヒト ES 細胞の樹立」日本組織培養学会 第84回大会，東京，5月28日，2011年
4. **H Akutsu**. “Human ES cell and iPS cell derivation: Clinical application and biological characterization”, 16th World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, 13th Sep, 2011.
5. **阿久津英憲**:「新たなヒト胚作製技術の報告（米国）について」第64回生命倫理専門調査会，中央合同庁舎第4号館第2特別会議室，1月17日，2012年
6. **阿久津英憲**:「臨床応用を目指すヒト ES 細胞研究の現状」第15回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会，厚生労働省 17階 専用第18-20会議室，1月25日，2012年

7. **阿久津英憲**:「新たなヒト胚作成技術について～SCNT法による3倍体ES細胞論文の背景～」科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会 特定胚及びヒトES細胞等研究専門委員会(第80回)，文部科学省16階 特別会議室，1月25日，2012年
8. **阿久津英憲**:「ヒトES細胞の臨床応用へ向けた取り組み」バイオロジクスフォーラム第9回学術集会，東京 タワーホール船堀，2月22日，2012年
9. **阿久津英憲**:「ヒトES細胞の臨床応用へ向けた取り組み」バイオロジクスフォーラム第9回学術集会，東京 タワーホール船堀，2月22日，2012年

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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
Murakami S.	Periodontal regeneration by FGF-2: Present status and future outlook.	PM Bartold, LJ Jin	Multi-Disciplinary Management of Periodontal Disease	Asian Pacific Society of Periodontology	Hong Kong	2012	1-9
杉浦進介, 石原裕一, 小松寿明, 萩原真, 水谷大樹, 加藤佳子, 野口俊英, 松下健二	バルプロ酸はHMGB1の能動放出を誘導して、エンドトキシンショックに対する感受性を高める	福井博、谷徹、嶋田紘	エンドトキシン 研究14	日本エンドトキシン・自然免疫研究会	滋賀	2011	57-60
Tanigawa N, Takeda Y, Sunghwa F, Ninomiya M, Hagiwara M, Koketsu M, Matsushita K	Morroniside derivative regulates E-selectin expression in human endothelial cells.	Sasaki K et al.	Interface Oral Health Science 2011	Springer Japan	Tokyo	2012	161-163
Nishihira T, Nishitani M, Sato T, Abiko Y, Matsushita K , Hamada M, Sakashita R	Community Oral Health promotion program fostering self-management for elderly people.	Sasaki K et al.	Interface Oral Health Science 2011	Springer Japan	Tokyo	2012	317-319

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murakami S, Yamada S, Nozaki T, and Kitamura M.	Fibroblast Growth Factor-2 Stimulates Periodontal Tissue Regeneration.	Clinical Advances in Periodontics	1 (2)	95-99	2012
北村正博 , 古市保志, 藤井健男, 川浪雅光, 國松和司, 島内英俊, 山田了, 小方頼昌, 和泉雄一, 伊藤公一, 中川種昭, 新井高, 山崎和久, 吉江弘正, 野口俊英, 渋谷俊昭, 高柴正悟, 栗原英見, 永田俊彦, 横田誠, 前田勝正, 廣藤卓雄, 坂上竜資, 原宜興, 野口和行, 小笠原健文, 村上伸也 .	歯周炎罹患歯に対するFGF-2投与の長期的効果および安全性の検討	日歯周誌	54(1)	38-45	2012
Yanagita M, Kojima Y, Mori K, Yamada S and Murakami S.	Osteoinductive and anti-inflammatory effect of royal jelly on periodontal ligament cells.	<i>Biomedical Research</i>	32(4)	285-291	2011
Kashiwagi Y, Yanagita M, Kojima Y, Shimabukuro Y, Murakami S.	Nicotine up-regulates IL-8 expression in human gingival epithelial cells following stimulation with IL-1 β or P. gingivalis lipopolysaccharide via nicotinic acetylcholine receptor signalling.	<i>Archives of Oral Biology</i>	57(5)	483-490	2011
Yanagita M, Kobayashi R, Kojima Y, Mori K, Murakami S.	Nicotine modulates the immunological function of dendritic cells through peroxisome proliferator-activated receptor- γ upregulation.	<i>Cellular Immunology</i>	274(1-2)	26-33	2012
Iwayama T, Yanagita M, Mori K, Sawada K, Ozasa M, Kubota M, Miki K, Kojima Y, Takedachi M, Kitamura M, Shimabukuro Y, Hashikawa T, Murakami S.	Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells.	<i>J Periodont Res</i>	47	In press	2012

Yanagita M, Hirano H, Kobashi M, Nozaki T, Yamada S, Kitamura M and Murakami S.	Periodontal disease in a patient with Prader-Willi syndrome: a case report	<i>Journal of Medical Case Reports</i>	5	329-333	2011
柳田学、森健太、 村上伸也	ニコチンによる樹状細胞の機能修飾	臨床免疫・アレルギー科	57(3)	249-253	2012
北村正博、村上伸也	「糖尿病と歯周治療ガイドライン」の概要とその活用法.	日本歯科医師会雑誌	64(5)	6-18	2011
北村正博、村上伸也	糖尿病と歯周病	内分泌・糖尿病・代謝内科	33(1)	28-36	2011
北村正博、村上伸也	歯周病の病態と成因	THE BONE	25(4)	61-66	2011
Takedachi M, Oohara H, Smith BJ, Iyama M, Kobashi M, Maeda K, Long CL, Humphrey MB, Stocker BJ, Toyosawa S, Thompson LF and Murakami S.	CD73-Generated Adenosine Promotes Osteoblast Differentiation.	<i>J Cell Physiol</i>	227	2622-2631	2012
竹立匡秀、村上伸也	歯周組織再生療法の最前線～FGF-2とテリパラチド～	CLINICAL CALCIUM	22(1)	99-104	2012
Yang J, Li M, Kamai N, Alev C, Kwon SM, Kawamoto A, Akimaru H, Masuda H, Sawa Y and Asahara T.	CD34+ Cells Represent Highly Functional Endothelial Progenitor Cells in Murine Bone Marrow.	PLoS ONE	6(5)	Epub e20219	2011
Fujita T, Sakaguchi T, Miyagawa S, Saito A, Sekiyama N, Izutani H and Sawa Y.	Clinical impact of combined transplantation of autologous skeletal myoblasts and bone marrow mononuclear cells in patients with severely deteriorated ischemic cardiomyopathy.	Surg Today	41(8)	1029-1036	2011

Shudo Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Shimizu T, Okano T and Sawa Y.	Novel regenerative therapy using cell-sheet covered with omentum flap delivers a huge number of cells in a porcine myocardial infarction model.	J Thorac Cardiovasc Surg.	142(5)	1188-1196	2011
Imanishi Y, Miyagawa S, Maeda N, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, Daimon T , Hirata A, Shimizu T, Okano T, Shimomura I and Sawa Y.	Induced adipocyte cell-sheet ameliorates cardiac dysfunction in a mouse myocardial infarction model: a novel drug delivery system for heart failure.	Circulation	124(11 Suppl 1)	S10-17	2011
Machida T, Tanemura M, Ohmura Y, Tanida T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Ito T, Nagano H, Mori M, Doki Y and Sawa Y.	Significant Improvement in Islet Yield and Survival with Modified ET-Kyoto Solution.	Cell Transplantation	Apr2	Epub	2012
Sawa Y , Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, Shimizu T and Okano T.	Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case.	Surg Today	42(2)	181-184	2012
Kino-oka M, Ngoto TX, Nagamori E, Takezawa Y, Miyake Y, Sawa Y , Saito A, Shimizu T, Okano T, and Taya M	Evaluation of vertical cell fluidity in a multilayered sheet of skeletal myoblasts.	J Biosci Bioeng.	113(1)	128-131	2011
M. Arakaki, M. Ishikawa, T. Nakamura, T. Iwamoto, A. Yamada, E. Fukumoto, M. Saito , K. Otsu, H. Harada, Y. Yamada, and S. Fukumoto	Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation.	J Biol Chem. Mar	23; 287(13)	10590-601	2012

M.Saito , T.Tsuji,	Extracellular matrix administration as a potential therapeutic strategy for periodontal ligament regeneration.	Expert Opin Biol Ther, Mar	12(3)	299-309	2012
M. Saito , M. Kurokawa, M. Oda, M. Oshima, K. Tsutsui, K. Kosaka, K. Nakao, M. Ogawa, R. Manabe, N. Suda, G. Ganjargal, Y. Hada, T. Noguchi, T. Teranaka, K. Sekiguchi, T. Yoneda and T. Tsuji	ADAMTSL6 β rescues fibrillin-1 microfibril disorder in Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly.	J Biol Chem	4; 286(44)	38602-613	2011
M. Oshima, M. Mizuno, A. Imamura, M. Ogawa, M. Yasukawa, H. Yamazaki, R. Morita, E. Ikeda, K. Nakao, T. Takanoto-Yamamoto, S. Kasugai, M. Saito and T. Tsuji.	Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy.	<i>PLoS ONE</i>	6(7)	e21531	2011
N. Kanamura, T. Amemiya, T. Yamamoto, K. Mishima, M. Saito , T. Tsuji, T. Nakamura.	Dental Regenerative Therapy using Oral Tissue	Anti-Aging Medicine	9(1)	14-23	2012
齋藤正寛 、 辻 孝	<総説>マルファン症候群における歯根膜創傷治癒不全の回復機構	clinical calcium	22(1)	35-42	2012
齋藤正寛 、 辻 孝	<総説>蘇る臓器,再生医療の実現化への挑戦	科学フォーラム2011年6月号(東京理科大学)	28(6)	34-35	2011
大島正充、 齋藤正寛 、 辻 孝	次世代の歯科治療システムとしての歯科再生治療～組織修復再生治療と臓器置換再生治療としての歯の再生～	日本歯科医師会雑誌	64(5)	23-34	2011

<u>松下健二</u>	歯周病と炎症	The bone	25	415-420	2011
Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Kato Y, Mizutani H, Kawahara K, Maruyama I, Noguchi T, <u>Matsushita K</u>	Valproic acid increases susceptibility to endotoxin shock through enhanced release of HMGB1.	Shock	36	494-500	2011
Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, <u>Matsushita K</u> , Nakamura H, Nakashima M	Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with SDF-1.	Tissue Eng Part A	17	1911-1920	2011
Sugiyama M, Iohara K, Wakita H, Hattori H, Ueda M, <u>Matsushita K</u> , Nakashima M	Dental Pulp Derived CD31-/CD146- Side Population Stem/Progenitor Cells Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats.	Tissue Eng Part A	17	1303-1311	2011
Kanno Y, Ishizaki A, Nakajima K, Nishihara T, Toyoshima T, Okada K, Ueshima S, <u>Matsushita K</u> , Matsuo O, Matsuno H	Plasminogen/plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function.	J Biol Chem,	286	8952-8960	2011
Komatsu T, Nagano K, Sugiura S, Hagiwara M, Tanigawa N, Abiko Y, Yoshimura F, Furuichi Y, and <u>Matsushita K</u>	E-selectin Mediates Porphyromonas gingivalis Adherence to Human Endothelial Cells.	Infect Immun		in press	2012

Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H , Umezawa A.	DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time.	<i>PLoS Genet.</i>	7	e1002085	2011
Nishi M, Akutsu H , Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A.	A distinct role for Pim1 in the induction and maintenance of pluripotency.	<i>J Biol Chem.</i>	286	11593-11603	2011
Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H , Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A.	Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells.	<i>Genes Cells.</i>	16	1-11	2011
Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H	Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells.	<i>Stem Cell Res</i>	3	e1308	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Chapter 15

Periodontal regeneration by FGF-2: Present status and future outlook

S. Murakami

Department of Periodontology, Graduate School of Dentistry, Osaka University, Japan.

Introduction

At present a variety of regenerative therapies are available in the field of periodontal therapy, such as bone grafts, guided tissue regeneration (GTR) and application of enamel matrix derivatives, all of which have achieved a measure of success. However, a number of issues with these techniques remain to be solved, including technique sensitivity, limitation of indications, predictability, and the longevity of outcomes.

In the 1990s, Langer and Vacanti (1993) developed the concept of tissue engineering, consisting three key elements: signaling molecules, scaffolds and stem cells (Figure 1). They proposed that the active introduction of one or more of the triad enables the induction of desirable tissue regeneration. In relation to periodontal regenerative therapy, the use of somatic tissue stem cells and/or progenitor cells within periodontal ligaments to act as “stem cells” has been demonstrated (Seo *et al* 2004). In order to enhance the outcomes of tissue regenerative therapy, it is crucial to stimulate the biological activities of these cells, and a physiologically efficient method for doing so is through the use of cytokines or growth factors. The ability of various recombinant cytokines to enhance periodontal tissue regeneration has been investigated in

preclinical and clinical studies (Table 1). This chapter reviews the potential use of basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) to promote periodontal tissue regeneration, with a discussion of the current status and prospects of FGF-2 therapy.

In vivo analyses of effects of FGF-2 on periodontal regeneration

Fibroblast growth factor (FGF) was discovered in 1974 as a protein from bovine pituitary glands that strongly induces proliferative activity in fibroblasts (Gospodarowicz 1974). In 1984, two distinct proteins with different isoelectric points were fractionated from the pituitary extract using acidic and basic pHs, which became known as acidic FGF (aFGF, FGF-1) and basic FGF (bFGF, FGF-2), respectively (Bohlen *et al* 1984, Thomas *et al* 1984). A year later the entire amino acid sequence of bovine FGF-2 was determined, and the cDNA of human FGF-2 was cloned in 1986 (Abraham *et al* 1986, Esch *et al* 1985). FGF-2 has received particular attention in the field of regenerative therapy, as it stimulates various stem cells to proliferate while maintaining their multipotency, and is a strong inducer of angiogenesis.

In order to evaluate the effectiveness of

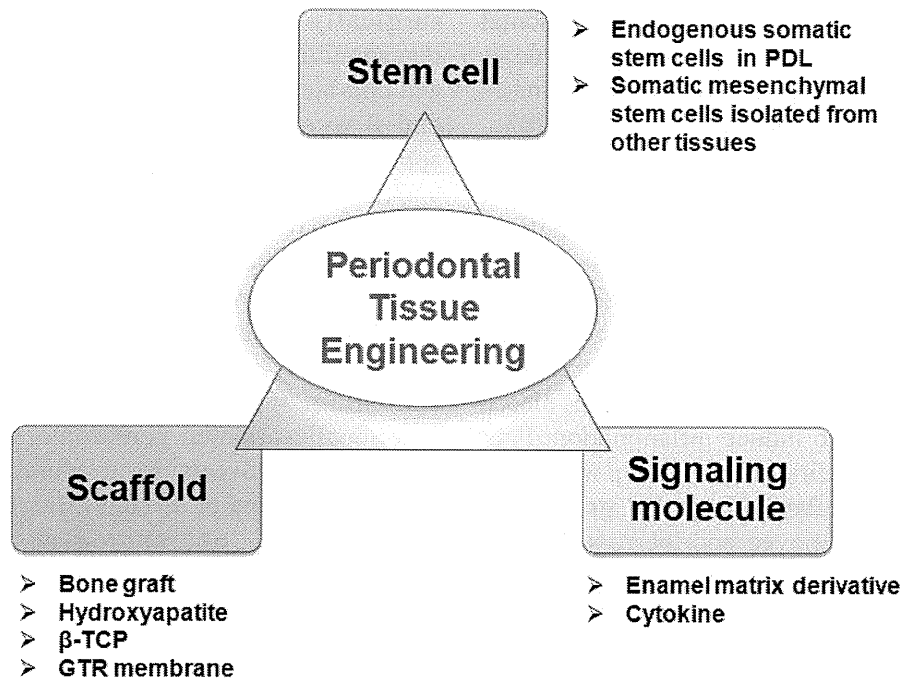


Figure 1. Triad of periodontal tissue engineering. The concept of tissue engineering consists of stem cells, a signaling molecule and a scaffold. In the case of periodontal tissue engineering, the above-indicated stem cells, signaling molecules and scaffold materials have been examined pre-clinically, with some having already been introduced into clinics.

1. PDGF-BB (platelet-derived growth factor) plus IGF-I (insulin-like growth factor-I)
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. FGF-2 (bFGF) (basic fibroblast growth factor)
7. PDGF-BB (platelet-derived growth factor) plus β -TCP (GEM21S™) (β -tricalcium phosphate)
8. GDF-5 (growth and differentiation factor-5)

Table 1. Periodontal regeneration by recombinant cytokines

applying topical FGF-2 to induce periodontal tissue regeneration, a series of animal studies using beagle dogs and non-human primates was performed (Murakami *et al* 2003c, Takayama *et al* 2001c). The mandibular molars of beagle dogs, and the first and second molars of non-human primates, were utilized for experimentation. After elevation of mucoperiosteal flaps, class II furcation defects were surgically created and the exposed cementum removed by curettage, before vinyl polysiloxane impression material was placed in the defects to induce inflammation. Four weeks after the first surgery, a flap was raised to expose the inflamed furcation, granulation tissues were removed and the root surfaces curetted. A small round bur was used to make a horizontal groove on each root in order to indicate the base of the defect. Furcation defects were filled with a gelatinous carrier without or with FGF-2 and the wound was

surgically closed. Periodontal tissue regeneration at the test sites of beagle dogs and non-human primates was examined at 6 and 8 weeks respectively, after FGF-2 application to the defects.

As shown in Tables 2 and 3, topical application of FGF-2 significantly stimulated periodontal regeneration in both the beagle and the non-human primate models when compared to control sites (Figure 2). Histological observation revealed new cementum with Sharpey's fibers, new functionally-oriented periodontal ligament fibers and new alveolar bone (Murakami *et al* 2003a, Takayama *et al* 2001). Interestingly, enhancement of angiogenesis and regeneration of peripheral nerve fibers at the FGF-2-treated sites were also observed one week after FGF-2 application (Murakami 2011a).

More importantly, no epithelial

	Control site (n=6)	0.1% FGF-2-applied site (n=6)
NBF (%)	35.4 ± 8.9	83.6 ± 14.3*
NTBF (%)	16.6 ± 6.2	44.1 ± 9.5*
NCF (%)	37.2 ± 15.1	97.0 ± 7.5*

*: $p < 0.01$, Control site - gelatinous carrier alone was applied.

Table 2. Efficacy of FGF-2 for periodontal tissue regeneration in animal models - Furcation class II model in beagle dogs (6-week follow up) (modified from Murakami *et al* 2003)

	Control site (n=6)	0.4% FGF-2-applied site (n=6)
NBF (%)	54.3 ± 8.0	71.3 ± 13.5*
NTBF (%)	31.6 ± 3.5	48.7 ± 8.9**
NCF (%)	38.8 ± 8.6	72.2 ± 14.4**

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Control site - gelatinous carrier alone was applied.

Table 3. Efficacy of FGF-2 for periodontal tissue regeneration in animal models - Furcation class II model in non-human primates (8-week follow up) (modified from Takayama *et al* 2001)

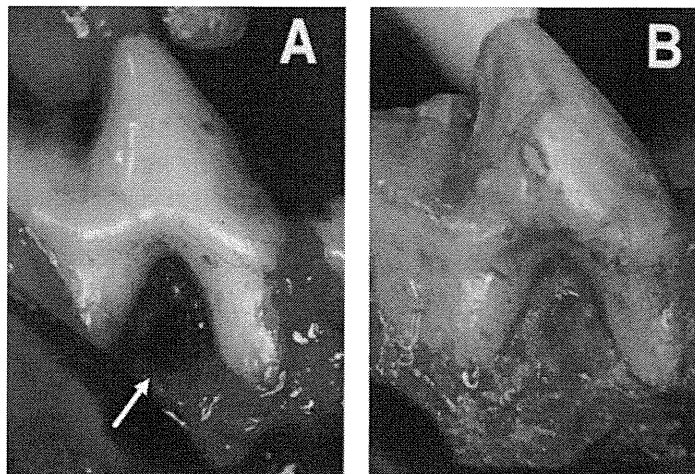


Figure 2. Periodontal tissue regeneration by FGF-2 (furcation class II beagle model). FGF-2 (0.1%) plus gelatinous carrier was topically applied to surgically-created class II furcation defects in the mandibular molars of beagle dogs. Representative images at (A) baseline and (B) 6 weeks after FGF-2 application are shown. Arrow indicates furcation. (from Murakami *et al* 2003)

downgrowth, ankylosis or root resorption was observed at the FGF-2 sites in any of the *in vivo* experiments, nor was any severe gingival inflammation or swelling observed at any of the sites examined throughout the experimental periods.

***In vitro* analyses of effects of FGF-2**

It has already been demonstrated that FGF-2 promotes proliferation of fibroblasts and osteoblasts, and enhances angiogenesis. These activities are crucial in the process of periodontal tissue regeneration. However, periodontal ligament (PDL) cells also play an important role during periodontal tissue regeneration (Seo *et al* 2004, Lekic *et al* 2001, Murakami *et al* 2003b, Shimono *et al* 2003). To reveal the molecular and cellular mechanisms by which FGF-2 enhances periodontal tissue regeneration, a series of *in vitro* experiments using PDL cells were carried out.

RT-PCR experiments demonstrated that PDL cells express FGF receptor (FGFR) 1 and FGFR2 mRNA (Takayama *et al* 2002), and

in vitro experiments revealed that FGF-2 regulates the proliferation, differentiation, migration and extracellular matrix (ECM) production of PDL cells (Takayama *et al* 1997, Shimabukuro *et al* 2005, Shimabukuro *et al* 2008, Shimabukuro *et al* 2010, Terashima *et al* 2008). FGF-2 also enhances the proliferative responses of PDL cells, and does so *via* the extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 signaling pathway, an important second messenger system downstream of FGFRs. Interestingly it was found that FGF-2 significantly decreased both ALPase activity and the formation of calcified nodules in PDL cells in a dose-dependent manner. However, the suppressive effect of FGF-2 on PDL cell differentiation into hard-tissue-forming cells such as osteoblasts and cementoblasts was reversible. Thus, when FGF-2-stimulated PDL cells were re-cultured in the absence of FGF-2, calcified nodule formation resumed. By temporarily inhibiting the differentiation of PDL cells, FGF-2 facilitates their proliferation while maintaining their multipotency, but once the influence of FGF-2 is biologically diminished immature PDL cells begin to