

201106001B (1/2)

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

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開発

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書
(1 / 2 冊)

研究代表者 村上 伸也

平成 24 (2012) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

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開発

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書
(1 / 2 冊)

研究代表者 村上 伸也

平成 24 (2012) 年 5 月

目次

I. 総合研究報告	1
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開発	2
村上伸也	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
III. 研究成果の刊行物・別刷	56
IV. 参考資料	1032

I. 総合研究報告

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開究

村上 伸也

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（総合）研究報告書

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開発

研究代表者 村上 伸也
大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子免疫制御学講座・教授

研究要旨 重度歯周炎患者に対する新規歯周組織再生療法を樹立する目的で、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞(ADSC)を用いた新規歯周組織再生療法の確立を目指した。すなわち、ヒトADSCの *in vitro* 解析とビーグル犬重度歯周病モデルを用いてADSCと併用する適切な足場材を決定するとともに、その足場材とADSCの併用時の歯周組織再生誘導効果と安全性を検討した。そして、重度歯周炎患者を対象とした臨床研究の実施に向け、ボランティアから提供された脂肪組織からADSCの分離し、ADSC含有移植材を調整するまでの一連の過程をシミュレーションした。その結果、ボルヒール●を足場材としたADSC含有移植材の歯周組織再生誘導効果がビーグル犬モデルで確認でき、その移植材を用いた新規歯周組織再生療法の臨床研究を実施する体制の整備が完了した。

研究分担者
澤 芳樹

大阪大学大学院医学系研究科
外科学講座心臓血管外科学
教授

李 千萬

大阪大学大学院医学系研究科
医療経済産業政策学講座
特任准教授

北村 正博

大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子免疫制御学講座
准教授

山田 聡

大阪大学歯学部附属病院
口腔治療・歯周科
講師

竹立 匡秀

大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子免疫制御学講座
助教

橋川 智子

医療法人松徳会橋川デンタルクリニック
院長

大門 貴志

兵庫医科大学医学部数学教室
講師

A. 研究目的

歯周病は、成人が歯を喪失する第一の原因である。しかしながら、歯周病により失われた歯周組織は通常の治療では再生しないことから、「口と歯」が支えるQOLを維持・増進するためには、重度歯周病に対応できる新規歯周組織再生療法の開発が急務である。本研究は、平成20年度再生医療推進基盤整備事業の支援により大阪大学歯学部附属病院内に設

置されたセルプロセッシング・アイソレータ (CPI) を活用し、“口と歯の機能”を脅かす重度歯周炎に対応できる脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞 (ADSC) と足場材料を組み合わせた新規歯周組織再生療法の樹立を目指すものである。

B. 研究方法

1. ヒト ADSC における細胞表面抗原の発現解析

フローサイトメトリー (FACS) を用いて、ヒト ADSC における各種細胞表面抗原 (間葉系幹細胞マーカー: CD44、CD73、CD105、CD166、SSEA4、STRO-1、造血幹細胞マーカー: CD133、血球系マーカー: CD34、CD45) の発現を解析した。

2. ヒト ADSC の硬組織形成細胞への分化能の解析

ADSC を 24 well plate に播種 (6.0×10^4 /well) し、石灰化誘導培地 (デキサメタゾン含有の、10mM β -グリセロリン酸、50 μ g/ml アスコルビン酸、10%FCS 添加 D-MEM) にて長期培養を行った際のアルカリフォスファターゼ活性 (ALPase 活性) を経時的に測定するとともに、石灰化ノジュール形成をアリザリン染色を用いて解析した。また、石灰化誘導培地を用いたヒト ADSC の硬組織形成細胞への分化誘導過程において、硬組織形成のマスター遺伝子である *RUNX-2* および歯根膜の特異的マーカーである *PLAP-1* の発現を Real time PCR 法にて経時的に解析した。

3. ヒト ADSC の細胞増殖能および長期培養による染色体異常の解析

ヒト ADSC の増殖能は、ヒト ADSC の継代培養を繰り返し、Population doubling 法により評価した。そして、ヒト ADSC を増殖能が消

失するまで継代を続けた後、G-band 法および SKY 法にて染色体検査を行った。

4. ビーグル犬脂肪組織からの ADSC の単離

ビーグル犬にペントバルビタールの静脈内投与による全身麻酔を施し、腹部大網より脂肪組織を採取し、細断後、コラゲナーゼ処理 (1時間) を行った。そして、ficoll を用いた比重遠心により赤血球を除去し得られた細胞を培養プレートに播種し、プレートに付着した細胞 (ADSC) を単離し 3 代継代して凍結保存した。

5. ビーグル犬の歯周組織欠損モデルを用いた ADSC と併用する足場材の検討

整形外科領域で広く使用されている骨補填剤である多孔性リン酸三カルシウム (β -tricalcium phosphate; β -TCP) と、これまでに我々が塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; FGF-2) を用いた歯周組織再生実験において足場材としての使用実績を有するフィブリンゲルを ADSC と併用する足場材の候補として、ビーグル犬の歯周組織欠損モデルを用いて、ADSC と併用する足場材としての有用性を検討した。すなわち、ビーグル犬の下顎左右側第 4 前臼歯を抜去し、約 3 ヶ月経過した治癒後に、下顎左右側第 1 後臼歯近心部に頬舌径 3 mm、近遠心径 5 mm、深さ 4 mm の 2 壁性歯周組織欠損を作成した。そして、一側を試験側として ADSC を含有した β -TCP あるいはフィブリンゲルを、他側は対照側として β -TCP あるいはフィブリンゲルを単独で欠損部に投与した。そしてその後、試験側と対照側の歯周組織欠損部の治癒状態を経時的に観察した。なお、 β -TCP は気孔率 75% のブロック体を使用し、ADSC と併用する場合は陰圧下で ADSC をブロックに吸引・封入

した。また、フィブリンゲルはヒト血漿由来フィブリノゲンとヒト血漿由来トロンビンを混和したものを使用し、ADSC含有フィブリンゲルは、ヒト血漿由来フィブリノゲンにADSCを添加し、ヒト血漿由来トロンビンと混合した後、37℃にて30分間培養することにより作製した。

6. ボルヒール®の歯周外科処置後の創傷治癒に及ぼす影響の検討

人への臨床応用が認められている唯一のフィブリン製剤であるボルヒール®の歯周外科処置後の創傷治癒に及ぼす影響をビーグル犬歯周組織欠損モデルを用いて検討した。すなわち、6頭のビーグル犬の下顎第4前臼歯を抜去し治癒後に、第1後臼歯の近心部と第3前臼歯遠心部に、それぞれ頬舌径3mm、近遠心径4mm、深さ3mmおよび頬舌径2mm、近遠心径4mm、深さ3mmの3壁性歯周組織欠損を作成した。そして、欠損部にフィブリノゲン液(A液)とトロンビン(B液)を等量混合し作成したボルヒール®を投与し、術後の治癒状態を観察した。その後、3頭はボルヒール®投与1週後に、残りの3頭は投与4週後に屠殺し下顎骨を採取した。そして、採取した下顎骨を4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて浸漬固定を行い、10%ギ酸クエン酸ナトリウムにて脱灰の後、凍結切片法により欠損部を含む組織切片を作製した。そして、ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色を行い、歯周外科処置後の創傷治癒過程に及ぼすボルヒール®の影響を組織学的に評価した。

7. ADSCと併用する足場材として用いる場合のボルヒール®の調整法の検討

ボルヒール®は、フィブリノゲン液(A液)とトロンビン(B液)を等量混合して生体組

織の接着に使用する。しかしながら、生体組織接着剤として開発されたボルヒール®は、歯周組織再生用の足場材としては固く賦形性に乏しい。そこで、ボルヒール®のA液とB液を様々な量のリン酸緩衝液(PBS)で希釈し、その後、A液とB液を混合し、ボルヒール®希釈倍率と硬化状態や硬化時間との関連性を検討して、歯周組織欠損部に用いる足場材に適したボルヒール®の調整法を検討した。

8. ADSC含有移植材と対照移植材の作製法

ビーグル犬の脂肪組織から単離され凍結保存しておいたADSCを解凍・培養し、混和後のADSC濃度が 4.2×10^7 cells/mLとなるようにPBSで調整した細胞懸濁液とボルヒール®のフィブリノゲン液(A液)あるいはトロンビン(B液)を、5:1の割合で混和した。そして、調整したADSC含有PBS希釈A液とADSC含有PBS希釈B液を1:1の割合で80 μ Lずつ混合し、37℃にて30分間インキュベートして硬化させADSC含有移植材(6.7×10^6 cells/160 μ L)を作製した。また、ADSC細胞懸濁液の代わりに、PBSとA液あるいはB液を5:1の割合で混和し、その後同様に、等量を混合し硬化させたものを対照移植材とした。なお、ADSC含有移植材と対照移植材はビーグル犬の歯周組織欠損に移植する直前に調整した。

9. ビーグル犬の実験的歯周病モデルを用いたADSC含有移植材の歯周組織再生誘導効果の検討

(2壁性歯周組織欠損モデル)

通法に従い、6頭のビーグル犬の下顎左右側第4前臼歯を抜去し、約3ヶ月間の治癒期間を経た後に、下顎両側第1後臼歯近心部に頬舌径3mm、近遠心径5mm、深さ4mmの2壁性歯周組織欠損を作製した。作製した歯周組

織欠損の一侧は試験側としてボルヒール●を足場材とした ADSC 含有移植材を、他側にはボルヒール●のみを含む対照移植材を投与した。その後、試験側と対照側の歯周組織欠損部の治癒状態を経時的に観察し、投与6週後に屠殺し下顎骨を採取した。そして、歯周組織欠損部の軟 X-ray 写真撮影およびマイクロ CT 断層撮影を行った後、組織標本を作製して組織学的解析を実施した。

(2級根分岐部モデル)

同様に6頭のビーグル犬の下顎左右側第3、4前臼歯の頰側根分岐部に歯軸方向径(垂直径)4mm、深さ(水平径)3mmの2級根分岐部病変相当の歯周組織欠損を作製し、作製した歯周組織欠損にパテタイプのシリコン印象材を転入し歯肉弁を縫合した。そして、4週間後、作製した歯周組織欠損の一侧を試験側、他側を対照側として、前記の2壁性歯周組織欠損モデルと同様にそれぞれ ADSC 含有移植材および対照移植材を投与した。その後、被験部位の治癒状態を経時的に観察し、投与6週後に屠殺し、同様の X 線および組織学的解析を実施した。

10. ビーグル犬歯周病モデルを用いた ADSC 含有移植材と FGF-2 との併用による歯周組織再生誘導効果の探索的検討

ビーグル犬の下顎両側第1後臼歯近心部に前記と同様に2壁性歯周組織欠損を作成した。そして、作製した歯周組織欠損の一侧は試験側として ADSC 含有移植材と 0.3%FGF-2 含有ハイドロキシプロピルセルロース(HPC)溶液を、他側(対照側)には ADSC 含有移植材のみを投与した。その後、試験側と対照側の歯周組織欠損部の治癒状態を経時的に観察するとともに、投与6週後に屠殺し被験部位のマイクロ CT 断層撮影による X 線的解析を実施した。

11. 軟 X-ray 写真撮影およびその解析

採取した下顎骨の歯周組織欠損部の軟 X-ray 写真撮影を行い、新生骨塩量の計測を行った。

12. マイクロ CT 断層撮影およびその解析

採取した下顎骨をマイクロ CT にて断層撮影を行い、専用ソフトを用いて新生骨体積等の画像解析を行った。

13. 組織標本作製および組織学的解析

採取した下顎骨を4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて浸漬固定を行い、10%ギ酸クエン酸ナトリウムにて脱灰の後、凍結切片法により欠損部を含む組織切片を作製した。そして、ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色を行い、試験側と対照側の新生骨、新生セメント質、新生歯根膜を観察・比較し、ADSC 含有移植材の歯周組織再生能を評価した。

14. セルプロセッシング・アイソレータ(CPI)

ヒト脂肪組織から ADSC を単離・培養し足場材(ボルヒール®)とともに ADSC 含有移植材を作製するまでの一連の過程は閉鎖的に細胞培養が可能なセルプロセッシング・アイソレータ(AIS-H1400A)を用いて実施した。そして、この CPI には、CO₂インキュベーター(MCO-5AC(IS))、フリーザー付薬用保冷庫(MPR-214F、MPR-414F)、超低温フリーザー(MDF-33V)、液体窒素保存容器(MVE-815)およびパーティクルセンサ(KR-03)が付属し、多点環境モニタリングシステム(KF-02B)を用いてシステム全体のモニターと制御を行った。

15. CPI の稼働性能適格性確認(バリデーション)と洗浄・殺菌操作(サニテーション)

アイソレータ室、CPI、CPI 付属機器およびモニタリングシステムの稼働性能適格性確認および洗浄・殺菌操作は、バイオメディカ・ソリューション株式会社に依頼し実施した。

16. ADSC 含有移植材作製の工程管理システムの構築

採取された脂肪組織から ADSC を単離し、ボルヒール®との複合体 (ADSC 含有移植材) が作製されるまでの全工程について、検体、試薬、消耗品が管理される GMP (Good Manufacturing Practice) 基準に準拠したシステムを構築した。

17. ADSC 含有移植材作製のコールドラン

大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院倫理委員会の承認を得た後、ボランティアの脂肪組織から ADSC を単離・培養しボルヒール®と共に ADSC 含有移植材を作製するまでの一連の過程をシミュレーションした。すなわち、ボランティアの自己血採取を行い細胞培養に用いる血清を分離した。その後、歯学部附属病院近未来歯科医療センターにて腹部より皮下脂肪組織を 30mL 採取し、同センター内に設置した CPI 内にて ADSC を単離し継代培養を行い、間葉系幹細胞の細胞表面マーカーである CD105、CD73、CD166、CD44 および CD45 の発現を FACS にて確認後、凍結保存した。その後、凍結した細胞を融解し、再び培養を開始した。そして、継代培養を行い、必要細胞数に達した後に上記の間葉系幹細胞の細胞表面マーカーの発現を同様に確認し、前記の調整法に従いボルヒール®と混和し ADSC 含有移植材を作製した。

18. 臨床試験の有効性を適切に評価するための目標被験者数設計とその性能のシミュレーションによる評価

本研究では、歯周治療の複数の有効性評価

項目のうち、特に重要な 3 つの評価項目 (新生歯槽骨の増加の有無、臨床的アタッチメントの獲得の有無、プロービングデプスの改善の有無) を俎上に挙げ、そのうちの少なくとも一つに関して統計的有意性が得られる場合を成功とする被験者数設計の方法論を以下の手順で開発した。

①帰無仮説 (標準治療で期待される有効性、言い換えれば、当該試験の被験治療で少なくとも期待される有効性) の設定: 項目 1 で絞り込んだ評価項目に対して帰無仮説を設定する: ここでは、H0A「全例のうち、新生歯槽骨が増加する被験者の占める真の割合=0.05」、H0B「全例のうち、臨床的アタッチメントを獲得する被験者の占める割合=0.05」、H0C「全例のうち、プロービングデプスが改善する被験者の占める真の割合=0.05」と設定した。

②対立仮説 (当該試験の被験治療で期待される有効性) の設定: H1A「全例のうち、新生歯槽骨が増加する被験者の占める真の割合」、H1B「全例のうち、臨床的アタッチメントを獲得する被験者の占める割合」、H1C「全例のうち、プロービングデプスが改善する被験者の占める真の割合」が、0、1、0.2、...、1.0 (0.1 刻みずつ) となる場合のすべての組み合わせを検討した。

③有意水準および多重性の調整方法の設定: 有効性評価項目が複数存在するため、検定を複数回実施することになるため、多重性の問題が生じる。多重性の調整方法は多種多様であるが、少なくとも Bonferroni 法では保守的すぎ、必要な被験者数は増大することが危惧される。そのため、本研究では、閉検定手順の代表的方法である Holm 法を用いた。

④「有効 (効果あり)」の判定方法: 三つの帰無仮説についての有意性検定に対する片側

p 値を Holm の方法で調整し、そのうちのいずれかが有意水準 0.05 よりも小さくなったときを被験治療が有効 (効果あり) と判定した。⑤検討する被験者数とシミュレーションの設定：検討する被験者数は 5、10、15、20、25 例とし、①および②で示した帰無仮説および対立仮説に基づいて 10000 試験分の 2 項乱数を生成し、④で「有効 (効果あり)」と判定した回数の占める割合 (検出力) を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究で実施した動物実験に関しては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号) および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第 88 号) 等で示された動物実験等の実施に関する基本指針に準拠し、大阪大学大学院歯学研究科の動物実験委員会の承認を得て行った。また、本研究で行ったヒト由来細胞および実験動物を用いた研究は、機関の外部委員を含めた大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院倫理審査委員会において、生命倫理および安全管理に関して厳重に審査を受け、倫理委員会の承認かつ実施施設の長 (大阪大学歯学部附属病院病院長) の許可を得て、全ての研究を遂行した。さらに本研究は、ヒト体性幹細胞である ADSC を用いた臨床研究を最終目標としていることから、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成 22 年厚生労働省告示 380 号) に従った研究プロトコルを作製し、大阪大学医学部附属病院および歯学部附属病院における倫理委員会の審議を経て後、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」の審査を受け、厚生労働大臣から実施の許可を得た (厚生労働省医政 0822 第 6 号、

平成 23 年 8 月 22 日)。そして、それを受け、平成 23 年 11 月 8 日に大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院より研究許可を受けた。また、ボランティアの脂肪組織から ADSC を単離し ADSC 含有移植材を作製するまでの一連の過程をシミュレーションするコールドランに関しても、大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院倫理委員会の承認を得て実施した。そして、最終年度に実施した研究結果から、厚生労働大臣、大阪大学大学院歯学研究科および歯学部附属病院から研究許可を得た研究計画の一部に変更が必要となった。そのため、平成 24 年 4 月 12 日に大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院倫理委員会の審議を経て承認を得た後、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に研究計画の変更に関する審査申請を行った。

C. 研究結果

1. ヒト ADSC における細胞表面抗原の発現解析

継代 4 代目のヒト ADSC における細胞表面抗原の発現についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った。その結果、間葉系幹細胞マーカーである CD44、CD73、CD105、CD166、SSEA4 の発現が認められた。また、造血幹細胞マーカーである CD133、間葉系幹細胞マーカーの一つである STRO-1、血球系マーカーの CD34、CD45 の発現は認められなかった。

2. ヒト ADSC の硬組織形成細胞への分化能の解析

ヒト ADSC の硬組織形成細胞への分化能を検討するために、ヒト ADSC を石灰化誘導培地にて長期培養を行い、培養後 0、7、14、21、28 日目に、硬組織形成細胞関連遺伝子の発現、

ALPase 活性および石灰化ノジュール形成について解析した。その結果、硬組織形成のマスター遺伝子である *RUNX-2* の発現は経時的に上昇することが明らかとなった。また、歯根膜特異的のマーカである *PLAP-1* においても経時的な発現上昇が認められ、ADSC が歯根膜細胞および硬組織形成細胞への分化能を有することが示唆された。ALPase 活性は石灰化誘導開始直後から増加し、培養 14 日目をピークに高い ALPase 活性が認められ、その後徐々に減少した。石灰化ノジュール形成は ALPase 活性がピークを迎えた培養 14 日以降に、アリザリンレッド染色陽性の石灰化ノジュール形成が認められるようになり、培養 28 日目には強いアリザリン陽性像が確認された。

3. ヒト ADSC の細胞増殖能および長期培養による安全性の検討

ヒト ADSC の増殖能は、ヒト ADSC の継代培養を繰り返し、Population doubling 法により評価した。その結果、ヒト ADSC の継代を繰り返した際、継代 8 代目まで ADSC は高い増殖能を示し、さらに継代培養を続けたとき継代 14 代目まで増殖可能であることが明らかとなった。

ヒト ADSC の長期培養における染色体異常の有無を確認するために、継代 4 代目および継代 14 代目のヒト ADSC の染色体数および構造異常を G-band 法にて検討した。その結果、継代 4 代目および継代 14 代目の各細胞において染色体数の異常や染色体間での転座や欠失などの構造異常は認められなかった。さらに、G-band 法では同定不可能な微細な異常を検出するため SKY 法を用いて検討を行った結果、転座などの染色体異常が生じた時に認める色の混在などは認められず、継代 4 代目および継代 14 代目の染色体に異常は認められな

った。

4. ADSC と併用する足場材の選定

β -TCP のブロック体とフィブリンゲルの ADSC と併用する足場材としての有用性を、ビーグル犬の下顎第 1 後臼歯近心部に作製した 2 壁性歯周組織欠損モデルを用いて検討した。その結果、ビーグル犬の 2 壁性歯周組織欠損に β -TCP を投与した部位では、ADSC の含有に関わらず、歯肉が陥凹した状態で治癒するケースが多かった。一方、フィブリンゲルあるいは ADSC 含有フィブリンゲルを投与した部位では、術後 1 週間程度は通常の歯周外科処置を実施した場合と同程度の炎症反応を認めたが、治癒後は歯肉退縮等の異常所見は認められなかった。

5. ボルヒール®の歯周外科処置後の創傷治癒に及ぼす影響

ビーグル犬 3 壁性歯周組織欠損モデルを用いてヒトフィブリン製剤であるボルヒール®の歯周外科処置後の創傷治癒過程に及ぼす影響を臨床的および組織学的に検討した。その結果、ボルヒール®投与 4 週間までに、投与部位に臨床的に異常な治癒所見は観察されなかった。また、組織学的な検索結果では、ボルヒール®投与 1 週間後には、すべての症例でボルヒール®の残存が認められたが、投与 4 週間後にはすべての症例でボルヒール®は消失し、6 例中 4 例において欠損部の歯槽骨の回復が認められた。

6. ADSC と併用する足場材として用いる場合のボルヒール®の調整法と ADSC 含有移植材の作製

ボルヒール®の A 液と B 液を PBS で希釈し ADSC と混合したところ、希釈倍率に比例しての硬度が減少し賦形性が向上したが、希釈倍率が 6 倍を超えると十分硬化しないことが明

らかとなった。そして、ボルヒール®の A 液と B 液を ADSC の PBS 懸濁液でそれぞれ 6 倍に希釈することにより、足場材として賦形性やスペースメーカー機能を保持したまま足場材中の ADSC 数を増加させることが可能であることが明らかとなった。以上の結果から、上記の方法でボルヒール®と ADSC を混和して作製した製剤を ADSC 含有移植材とした。

7. ビーグル犬の実験的歯周病モデルを用いた ADSC 含有移植材の歯周組織再生誘導効果の検討

(2 壁性歯周組織欠損モデル)

ビーグル犬の下顎第 1 後臼歯近心部に実験的 2 壁性歯周組織欠損モデルを作製し、ボルヒール®を足場材とした ADSC 含有移植材の歯周組織再生誘導効果を検討した。その結果、マイクロ CT 断層撮影による解析で、投与 6 週後の 3 次元構築像において、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）は、足場材であるボルヒール®を投与した部位（対照側）に比べて作製した骨欠損範囲に有意に多い骨新生が認められた。そして、投与 6 週後のソフト X-ray 写真による解析でも、ADSC 含有移植材を投与した試験側は、対照側に比べて新生骨塩量が多い傾向が認められた。ADSC 含有移植材の歯周組織再生効果の組織学的検討でも、ADSC 含有移植材を投与した試験側では、対照側に比べセメント質の歯冠方向への新生が多く観察された。そして、歯周組織欠損部における骨新生も試験側に多く観察され、足場材であるボルヒール®を単独で投与した対照側では、欠損部の新生骨の添加はわずかにとどまっていることが多かった。また、本モデルで、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）において、異常な治癒所見は認められなかった。

(2 級根分岐病変部モデル)

ビーグル犬の下顎左右側第 3、4 前臼歯の頰側根分岐部に 2 級根分岐部歯周組織欠損モデルを作製し、ボルヒール®を足場材とした ADSC 含有移植材の歯周組織再生誘導効果を検討した。その結果、マイクロ CT 断層撮影による解析では投与 6 週後の 3 次元構築像において、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）は、足場材であるボルヒール®を投与した部位（対照側）に比べて作製した骨欠損部に有意に多い骨新生が認められた。そして、歯周組織再生効果の組織学的検討においても、ADSC 含有移植材を投与した試験側では、対照側に比べ有意なセメント質の歯冠方向への新生が観察された。また、本モデルにおいても、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）に異常な治癒所見を認めなかった。

8. ビーグル犬歯周病モデルを用いた ADSC 含有移植材と FGF-2 との併用による歯周組織再生誘導効果の探索的検討

ビーグル犬の 2 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、ADSC 含有移植材と 0.3%FGF-2 含有 HPC 溶液を同時に投与した試験側は、ADSC 含有移植材を単独で投与した対照側に比べ、歯周組織欠損部に著明な骨新生がマイクロ CT 撮影により観察された。また、ADSC 含有移植材と FGF-2 を併用した試験側には、対照側と同様に異常な治癒所見は投与 6 週間まで観察されなかった。

9. 臨床試験の有効性を適切に評価するための目標被験者数設計とその性能のシミュレーションによる評価

被験者数が 5, 10, 15, 20, 25 例の場合をシミュレーションして検討した結果、帰無仮説で設定した H_{0A} 「全例のうち、新生歯槽骨が増加する被験者の占める真の割合=0.05」、 H_{0B}

「全例のうち、臨床的アタッチメントを獲得する被験者の占める割合=0.05」、 H_{0c} 「全例のうち、プロービングデプスが改善する被験者の占める真の割合=0.05」と、対立仮説（当該試験の被験治療で期待される有効性）の設定： H_{1A} 「全例のうち、新生歯槽骨が増加する被験者の占める真の割合」、 H_{1B} 「全例のうち、臨床的アタッチメントを獲得する被験者の占める割合」、 H_{1c} 「全例のうち、プロービングデプスが改善する被験者の占める真の割合」の差が大きくなるほど、また、被験者数が大きくなるほど、検出力は増加した。

また、有効（効果あり）の判定方法として、複数の評価項目を許容し、いずれかの項目で統計的な有意性を主張できるようなデザインを規定すると、帰無仮説と対立仮説の差がそれほど小さくなくても、5~25例の小規模な試験でも相応の検出力が確保できることが示唆された。

10. ADSC 含有移植材作製のコールドラン

ボランティアから皮下脂肪組織を採取し、CPI 内にて ADSC を単離、培養し、試験物（ADSC 含有移植材）作製までの過程について 2 回コールドランを実施した。

（第 1 回コールドラン）

ボランティア A は 52 歳女性で、平成 23 年 11 月 10 日に自己血採取を行い、細胞培養に用いる血清を分離した。同 11 月 16 日に歯学部附属病院近未来歯科医療センターにて腹部より皮下脂肪組織を 30mL 採取し、同センター内に設置した CPI 内にて ADSC を単離、培養を開始した。培養開始から 7 日後（同 11 月 23 日）に継代培養を行い、2 日後（同 11 月 25 日）の FACS 解析にて 95%以上の細胞が $CD105^+$ $CD73^+$ $CD166^+$ $CD44^+$ $CD45^-$ であることが確認されたことから、細胞を凍結保存した。その後、

11 月 29 日に凍結した細胞を融解し、再び培養を開始した。その際の生細胞率は 98.4%であった。再培養 3 日後（同 12 月 2 日）、6 日後（同 12 月 5 日）にそれぞれ継代培養を行い、再培養開始から 9 日後（同 12 月 8 日）に凍結前と同様の細胞表面マーカーの発現を確認した。そして、前記の調整法に従いボルヒール®と混和することにより ADSC 含有移植材を作製した。

（第 2 回コールドラン）

ボランティア B は 50 歳女性で、平成 24 年 3 月 5 日に自己血、同 3 月 14 日に腹部より皮下脂肪組織を 30mL 採取した。そして、第 1 回コールドラン同様、FACS にて表面抗原の発現を確認し、3 月 25 日に細胞を凍結した。4 月 17 日に凍結細胞を融解し継代培養を行い、凍結前と同様の表面抗原の発現確認を行った後 ADSC 含有移植材を作製した。

11. CPI の稼働性能適格性確認（バリデーション）と洗浄・殺菌操作（サニテーション）の実施

平成 24 年 2 月 24 日および 3 月 2 日に、アイソレータ室、CPI、CPI 付属機器およびモニタリングシステムのバリデーションがバイオメディカ・ソリューション株式会社により実施され、対象となったすべての設備が基準を満たしていることが確認された（参考資料参照）。また、同年 3 月 1 日および 3 月 2 日、同社によって施設のサニテーションが行われ、続いて環境評価が行われた。施設の清浄化は目視によって良好と判定され、その後行われた環境評価において適用基準に準拠していることが確認された。

12. ADSC 含有移植材作製の工程管理システムの構築

脂肪組織から ADSC を単離し ADSC 含有移植

材が作製されるまでの全工程で、CPIに搬入される検体、試薬、消耗品に二次元ラベルを発行・貼付し、CPI内で作製される中間品はICタグにて管理することで、GMP基準に準拠した試験物（ADSC含有移植材）作製のためのシステムとした。本システムは、上記コールドラン等にて検証するとともに修正を行った。

13. 研究計画の変更申請

平成23年度に実施した動物モデルを用いたADSC含有移植材の歯周組織再生効果の検討とボランティアの脂肪組織からADSC含有移植材を作製したコールドランの結果から、厚生労働大臣から実施許可（厚生労働省医政0822第6号、平成23年8月22日）を得ている本研究の研究計画の一部に変更が必要となった。そのため、平成24年4月12日に大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院倫理委員会の審議を経て承認を得た後、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に研究計画の変更に関する審査申請を行った。

D. 考察

歯周組織再生療法の最終的な目標は、歯周病により失われた歯周組織の解剖学的構造と機能を健全な状態に再構築することである。しかしながら、現在行われている歯周組織再生誘導法（GTR法）やエナメルマトリックスタンパクを用いた歯周組織再生療法では、十分な歯周組織再生効果を期待できる適応症には限界があり、重度の歯周組織破壊には対応できない。そのため、新たな試みとして、“サイトカイン療法”や骨髄由来幹細胞などを用いた“細胞治療”による歯周組織再生誘導の可能性が検討されている。本研究では、歯周組織再生療法に用いる幹細胞としてADSCを

利用した新規歯周組織再生療法の開発に平成21年度から取り組んできた。

そこで本研究では、まず、幹細胞移植による歯周組織再生療法を実施するための新たな細胞源としてのADSCの有用性を*in vitro*にて検討を行った。その結果、ADSCを石灰化誘導培地中にて硬組織形成細胞へと分化誘導したところ、硬組織形成細胞への分化に関するマスター遺伝子である*RUNX-2*の経時的な発現上昇に加えて、歯根膜特異的遺伝子である*PLAP-1*の発現上昇も明らかとなった。さらに培養14日目をピークにALPase活性の増加を認め、同培養14日目以降には著明な石灰化ノジュール形成が確認された。以上のことから、ADSCは骨芽細胞やセメント芽細胞等の硬組織形成能のみならず歯根膜細胞への分化能を有することが示唆され、ADSCが歯周組織再生療法用の幹細胞の一つとして活用し得ることが明らかとなった。

ヒト体性幹細胞は寿命が限定されていることがいくつかの報告により示されている。すなわち、幹細胞は細胞周期制御因子やテロメアの短縮による細胞老化が生じ増殖停止に至ると考えられており、培養後期においては染色体異常が生じることや長期培養により形質転換が起こるといった報告もある。一方で、通法の培養期間での形質転換の可能性を否定する報告もなされている。本研究では、ADSCの長期培養により、継代14代目において細胞の増殖停止が明らかとなった。培養初期に当たる継代4代目と培養後期にあたる継代14代目のADSCにおいて、カリオタイプを比較した結果、継代を重ねても染色体には異常は認められなかった。また、ビーグル犬を用いたADSCの移植実験においても、全てのADSC移植部位で組織の腫瘍化等の異常所見は観察されな

ったことを含め、現時点ではヒト ADSC の移植に関しては、安全性に問題点は確認されていない。しかしながら、体性幹細胞の *in vitro* における培養過程において染色体異常の報告が存在する限り、今後も移植に使用する ADSC の継代数や培養条件には細心の注意が必要である。現状では、体性幹細胞の安全性についての見解は未だ統一を見ていないことから、今後も継続して検討していく必要のある課題であると考えられる。

細胞移植に際しての足場材としては、 β -TCP、ハイドロキシアパタイト、乳酸グリコール酸共重合体 (Poly lactic-co-glycolic acid: PLGA)、フィブリンなど、いくつかの候補材料があげられる。ハイドロキシアパタイトが生体内で吸収・置換されることがないのに対して、整伝導能を有し骨補填剤として整形外科領域で広く使用されている β -TCP は、投与後、時間の経過とともに生体内で骨に置換される。また、フィブリンは生体における創傷治癒の過程において治癒に必要な細胞の増殖や遊走のための足場となった後、線維素溶解系により分解、吸収されることがよく知られている。歯肉や歯根膜といった軟組織とセメント質や歯槽骨といった硬組織が複雑な立体構造を示す歯周組織の再生に用いる足場材は、適度な賦形性とスペースメイキングに必要な強度を有し、 β -TCP やフィブリンのように生体内の生理的環境で吸収され、本来の組織に置換されることが望ましい。このような理由で、 β -TCP やフィブリンゲルを FGF-2 を用いた歯周組織再生実験の足場材として我々もこれまで使用してきた実績がある。そこで、本研究でも、ADSC と併用する足場材の候補に β -TCP のブロック体とフィブリンゲルを選択し、ビーグル犬の歯周組織欠損モデル

を用いて、ADSC と併用する足場材としての有用性を検討した。その結果、 β -TCP を投与した部位では、ADSC の含有に関わらず、歯肉が陥凹した状態で治癒するが多かった。そして、この経過を詳細に観察すると、投与 1 週間程度で欠損部を被覆する歯肉が白濁し、その後、歯肉が陥凹することから、 β -TCP のブロック体を投与した部位では血行障害により歯肉が壊死して、ブロック体が脱落するのではないかと推察された。一方、フィブリンゲルあるいは ADSC 含有フィブリンゲルを投与した部位では、術後の治癒に異常所見が認められなかったことから、フィブリンゲルが ADSC と併用する足場材としての有用であると考えられた。

このように、フィブリンゲルが ADSC と併用する足場材としての有用であると考えられたため、歯周炎患者を対象とした臨床研究での使用を考慮し、人への臨床応用が認められている唯一のフィブリン製剤であるボルヒール®の ADSC と併用する足場材としての安全性および調整法を検討した。国内献血由来の生体組織接着剤として開発されたボルヒール®は、フィブリノゲン、血液凝固第 XIII 因子、トロンビン、塩化カルシウム水和物およびアプロチニンの 5 つの成分から構成され、血液凝固の最終段階で形成されるフィブリンの作用を利用して組織の接着・閉鎖を行うものである。ボルヒール®の原材料は国内の健康な献血者の血漿が使用され、HBs 抗原、抗 HCV 抗体、抗 HIV-1 抗体、抗 HIV-2 抗体および抗 HTLV-I 抗体陰性で、かつ ALT (GPT) 値でスクリーニングを実施されている。そして、プールした試験血漿についても、HIV、HBV および HCV について核酸増幅検査を実施し、適合した血漿が製造に使用されている。さらに、混入の可能

性のある HIV、サイトメガロウイルス等は製造過程の乾燥加熱処理により不活化される事が確認され、ウイルス等の感染性を完全には否定できないものの、その可能性が現時点では最小限に押さえられていることから、人への臨床応用が認められている。

本研究では、ボルヒール®の歯周組織欠損部への投与の安全性をビーグル犬歯周組織欠損モデルを用いて検討した。その結果、歯周組織欠損部へのボルヒール®を投与により、投与部位に異常な治癒所見は臨床的にも組織学的にも観察されず、歯周組織欠損部へのボルヒール®投与の安全性が明らかとなった。

通常、ボルヒール®は、フィブリノゲン凍結乾燥粉末（バイアル 1）とフィブリノゲン溶解液（バイアル 2）を混和し、激しく震盪・攪拌し溶解して作成したフィブリノゲン液（A 液）と、トロンビン凍結乾燥粉末（バイアル 3）をトロンビン溶解液（バイアル 4）で溶解し調整したトロンビン（B 液）を等容混合して生体組織の接着に使用する。しかしながら、生体組織接着剤として開発されたボルヒール®は、足場材としては賦形性に乏しく、混入できる ADSC 数も制限される。また、ADSC による歯周組織再生量は歯周組織欠損部に投与する ADSC 数に依存すると考えられることから、混合できる ADSC 量を増やし、かつ足場材として適度の賦形性と強度を保持するボルヒール®の A 液と B 液の希釈倍率を検討した。その結果、ボルヒール®の A 液と B 液をそれぞれ 6 倍希釈し混合した場合に、足場材として賦形性やスペースメーカー機能を保持したまま ADSC 含有移植材中の ADSC 濃度を 4.2×10^7 cells/mL まで増加させることが可能となった。

本研究では、ボルヒール®を足場材とした

ADSC 含有移植材の歯周組織再生に関する有効性と安全性を明らかにするため、ビーグル犬の実験的 2 壁性骨欠損および 2 級根分岐部病変モデルを作製し、各歯周組織欠損部にボルヒール®を足場材とした ADSC 含有移植材を投与しその歯周組織再生効果と安全性を検討した。その結果、両モデルとも、マイクロ CT 断層撮影による解析では投与 6 週後の 3 次元構築像において、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）は、足場材であるボルヒール®を投与した部位（対照側）に比べて有意に多い骨新生を示した。そして、ADSC 含有移植材の歯周組織再生効果の組織学的検討でも、ADSC 含有移植材を投与した試験側では、対照側に比べセメント質の歯冠方向への新生と骨新生が多く観察された。一方、足場材であるボルヒール®を単独で投与した対照側では、欠損部の新生セメント質や新生骨の添加はわずかにとどまっていることが多かった。また、これらのビーグル犬の歯周組織欠損モデルにおいて、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）において異常な治癒所見は認められなかった。以上のことから、ボルヒール®を足場材とした ADSC 含有移植材の歯周組織再生に関する有効性と安全性がビーグル犬歯周組織欠損モデルにおいて確認されたと言える。

本研究の最終目標は、歯周炎患者を対象とした ADSC を用いた新規歯周組織再生療法の臨床研究の実施である。そのため、臨床研究を円滑に遂行するため、これまでに 2 人のボランティアから皮下脂肪組織を採取し、CPI 内にて ADSC を単離し、自己血清添加下で培養した後、ADSC 含有移植材を作製するまでの過程を実際にシミュレーションするコールドランを実施した。その結果、脂肪組織から単離・培養した ADSC が、間葉系幹細胞に特徴的な細

胞表面マーカー (CD105⁺ CD73⁺ CD166⁺ CD44⁺ CD45⁻)を示したことから、単離された ADSC は間葉系幹細胞の特徴を有していることが確認された。また、凍結保存、融解後の生細胞率も 95%以上と高く、継代培養を行っても凍結前と同様の間葉系幹細胞に特徴的な細胞表面マーカーの発現が確認された。そして、ADSC とボルヒール®を混和することにより目的とする ADSC 含有移植材を作製できたことから、安定的に歯周炎患者の脂肪組織から ADSC 含有移植材が提供できることが確認された。一方、脂肪採取から ADSC 含有移植材の作製まで概ね 3 週間程度の期間が必要であることが明らかとなり、重度歯周炎患者に ADSC を用いた新規歯周組織再生療法を適応する場合のタイムスケジュールの作成に、この ADSC 含有移植材作製期間を考慮する必要があることが明らかとなった。また、体重が 50kg 未満の場合、自己血採血量が 200ml に制限されるため、ADSC の継代培養の回数や量に注意を払う必要があることも明らかとなった。

歯周炎患者に ADSC 含有移植材を適応する場合、ADSC 含有移植材は薬事法に基づいて厚生労働大臣が定めた医薬品等の品質管理基準 (GMP 基準) に準拠して作製する必要がある。そのため、本研究では、歯周炎患者の脂肪組織から ADSC を単離し ADSC 含有移植材が作製されるまでの全工程で、CPI に搬入される検体、試薬、消耗品に二次元ラベルを発行・貼付し、CPI 内で作製される中間品は IC タグにて管理することで、GMP 基準に準拠した ADSC 含有移植材作製システムを構築することができた。

本研究は歯周組織再生研究分野で、新たな「細胞治療」の臨床研究の実施を目指したものである。そのため、昨年度に「ヒト幹細胞

を用いる臨床研究に関する審査委員会」に臨床研究申請を行い、本年度、厚生労働大臣から実施許可 (厚生労働省医政 0822 第 6 号、平成 23 年 8 月 22 日) を得ている。しかしながら、平成 23 年度に実施した動物モデルを用いた ADSC 含有移植材の歯周組織再生効果の検討とボランティアの脂肪組織から ADSC 含有移植材を作製したコールドランの結果から、使用する ADSC の細胞数や ADSC 含有移植材の作製手順等に一部変更が必要となった。そのため、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に研究計画の変更の審議申請を現在行っている。また、アイソレータ室、CPI、CPI 付属機器およびモニタリングシステムの稼働性能適格性確認および洗浄・殺菌操作は終了し、臨床研究を実施する上での設備面の準備はすでに完了している。今後、研究計画の変更許可を受け次第、重度歯周炎患者を対象とし臨床研究を実施する予定である。

本研究では、ADSC を用いた歯周組織再生療法の適応拡大を目指し、ビーグル犬の歯周病モデルを用いて、ADSC 含有移植材と FGF-2 との併用による歯周組織再生誘導効果を探索的に検討した。その結果、ADSC 含有移植材と 0.3%FGF-2 含有 HPC 溶液との併用により、ADSC 含有移植材単独投与に比べ、著明な骨新生が歯周組織欠損部に観察された。このことは、ADSC と様々なシグナル分子を組み合わせたことにより、さらに広範囲に及ぶ重度歯周組織欠損部において組織再生を誘導できる可能性を示唆するものである。今後、FGF-2 や血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) といったシグナル分子と本研究で構築した ADSC 含有移植材を効率的に融合することが可能になれば、さらに適応範囲が広く有効な Periodontal tissue engineering が創生されるものと期待される。

E. 結論

1. ヒト ADSC には CD44、CD73、CD105、CD166、SSEA4 の発現を認め、CD133、STRO-1、CD34、CD45 の発現は認めなかった。
2. ヒト ADSC を硬組織形成細胞へと分化誘導した結果、*RUNX-2* および *PLAP-1* の発現が経時的に増加したことから、ADSC は骨芽細胞や歯根膜細胞などの硬組織形成細胞への分化能を有することが明らかとなった。
3. ヒト ADSC を硬組織形成細胞へと分化誘導すると、ALPase 活性の上昇と著明な石灰化ノジュール形成が認められ、ADSC の高組織形性能が確認された。
4. ヒト ADSC は継代 8 代目まで高い増殖能を示し、継代 14 代目まで培養可能であった。
5. ヒト ADSC は継代 14 代目においても染色体に異常は認めなかった。
6. ADSC 含有フィブリンゲルを投与した部位では、術後の治癒に異常所見が認められなかったことから、フィブリンゲルが ADSC と併用する足場材としての有用であると考えられた。
7. ビーグル犬歯周組織欠損モデルにおいて、歯周組織欠損部へのボルヒール®投与により、臨床的にも組織学的にも異常な治癒所見は観察されなかったことから、歯周組織欠損部へのボルヒール®投与の安全性が明らかとなった。
8. ボルヒール®の A 液と B 液をそれぞれ 6 倍希釈し混合した場合に、足場材として適度な賦形性やスペースメイキング機能を保持したまま含有 ADSC 数の増加が可能であることが明らかとなった。
9. ビーグル犬の実験的 2 壁性歯周組織欠損

モデルにボルヒール®を足場材とした ADSC 含有移植材を投与したところ、対照側に比べて有意に多い骨新生が認められた。

10. ビーグル犬の実験的 2 級根分岐部病変モデルに ADSC 含有移植材を投与したところ、対照側に比べて有意に多い骨新生とセメント質の歯冠方向への新生が認められた。
11. ビーグル犬の 2 壁性歯周組織欠損および 2 級根分岐部病変モデルでは、ADSC 含有移植材を投与した部位において異常な治癒所見は認めなかった。
12. ボランティアから皮下脂肪組織を採取し、CPI 内にて ADSC 含有移植材を作製するコールドランを実施した結果、脂肪組織から ADSC 含有移植材を安定的に提供できることが確認された。
13. 臨床研究の実施に際し、研究計画の一部に変更が必要となったため、現在「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に研究計画の変更申請を行っている。

以上の結果より、重度歯周炎患者を対象に ADSC を用いた新規歯周組織再生療法に関する臨床研究を実施する準備は完了した。今後、研究計画の変更許可を受け次第、重度歯周炎患者を対象とし臨床研究を実施する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **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) 季刊・歯科医療、第一歯科出版、24-28、

- 2009.
2. RT. Kao, **S. Murakami**, OR. Beirne. The use of Biologic Mediators and Tissue Engineering in Dentistry Peridontology 2000, 50:127-153, 2009.
 3. M. Yanagita, R. Kobayashi, **S. Murakami** Nicotine can skew the characterization of the macrophage type-1 (MU1) phenotype differentiated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to the MU2 phenotype Biochem. Biophys. Res. Commun, 388: 91-95, 2009.
 4. Y. Shimabukuro, M. Ueda, M. Ozasa, J. Anzai, M. Takedachi, Manabu Yanagita, **T. Hashikawa, S. Yamada, S. Murakami.** Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells. J Endod, 35: 1529-1535, 2009.
 5. 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*, 138:460-467, 2009.
 6. Nanno K, Sugiyasu K, **Daimon T,** Yoshikawa H and Myoui A. Synthetic alginate is a carrier of OP-1 for bone induction. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 467(12), 3149-3155, 2009.
 7. Hayashi H, Fujimaki C, **Daimon T,** Tsuboi S, Matsuyama T and 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.
 8. **Murakami S.** Periodontal Tissue Regeneration by signalling molecule(s)- What role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy?, *Periodontology* 2000, 56: 188-208, 2010.
 9. **Kitamura M,** Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofujii T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Kido J, Nagata T, Kurihara H, Takashiba S, Shibutani T, Fukuda M, Noguchi T, Yamazaki K, Yoshie H, Ioroi K, Arai T, Nakagawa T, Ito K, Oda S, Izumi Y, Ogata Y, Yamada S, Shimauchi H, Kunimatsu K, Kawanami M, Fujii T, Furuichi Y, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Omae M, **Yamada S, Watanuki M, Murakami S.** FGF-2 stimulates periodontal regeneration: Results of a multi-center randomized clinical trial *J Dent Res*, 90(1): 35-40, 2011.
 10. Komoda H, Okura H, **C.M. Lee,** 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., 16(4): 1143-1155, 2010.
11. Yanagita M, Kojima Y, Kawahara T, Kajikawa T, Oohara H, Takedachi M, **Yamada S**, **Murakami S**. Suppressive effects of nicotine on the cytodifferentiation of murine periodontal ligament cells. *Oral Diseases*, 16: 812-817, 2010.
 12. Fujihara C, **Yamada S**, Ozaki N, Takeshita N, Kawaki H, Takano-Yamamoto T, **Murakami S**. Role of Mechanical stress-induced glutamate signaling-associated molecules in cytodifferentiation of periodontal ligament cells. *J Biol Chem*, 285(36):28286-28297, 2010
 13. Shimabukuro Y, Terashima H, Takedachi M, Maeda K, Nakamura T, Sawada K, Kobashi M, Awata T, Oohara H, Kawahara T, Iwayama T, **Hashikawa T**, Yanagita M, **Yamada S**, **Murakami S**. Fibroblast growth factor-2 stimulates directed migration of periodontal ligament cells via PI3/Akt signaling and CD44/hyaluronan interaction. *cells. J. Cell. Physiol*, 226: 809-821, 2010
 14. Anzai J, **Kitamura M**, Nozaki T, Nagayasu T, Terashima A, Asano T, **Murakami S**. Effects of concomitant use of fibroblast growth factor (FGF)-2 with beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on the beagle dog 1-wall periodontal defect model. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 403: 345-350, 2010.
 15. 手良向聡・**大門貴志**. FDA「医療機器の臨床試験における Bayes 流統計学の利用に関するガイドンス」について (解説). *臨床評価* 38(2), 327-334, 2010.
 16. **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, 2011.
 17. Yanagita M, Kojima Y, Mori K, Yamada S and **Murakami S**. Osteoinductive and anti-inflammatory effect of royal jelly on periodontal ligament cells. *Biomedical Research* 32(4): 285-291, 2011.
 18. 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. *Archives of Oral Biology* 57(5): 483-490, 2011.
 19. 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. *Cellular Immunology* 274(1-2): 26-33, 2012.
 20. 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**.