

- Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 47, in press, 2012.
21. Yanagita M, Hirano H, Kobashi M, Nozaki T, **Yanada S**, **Kitamura M** and **Murakami S**. Periodontal disease in a patient with Prader-Willi syndrome: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 5: 329-333, 2011.
 22. Takedachi M, Oohara H, Smith BJ, Iyama M, Kobashi M, Maeda K, Long CL, Humphrey MB, Stoecker BJ, Toyosawa S, Thompson LF and **Murakami S**. CD73-Generated Adenosine Promotes Osteoblast Differentiation. *J Cell Physiol* 227: 2622-2631, 2012.
 23. **Murakami S**. Periodontal regeneration by FGF-2: Present status and future outlook. PM Bartold, LJ Jin, Multi-Disciplinary Management of Periodontal Disease, 2012 Asian Pacific Society of Periodontology, Hong Kong, 1-9, 2012.
 24. Yang J, Ii M, Kamei N, Alev C, Kwon SM, Kawamoto A, Akimaru H, Masuda H, **Sawa Y**, Asahara T. CD34+ Cells Represent Highly Functional Endothelial Progenitor Cells in Murine Bone Marrow. *PLoS ONE* 6(5): e20219, 2011.
 25. Fujita T, Sakaguchi T, Miyagawa S, Saito A, Sekiya 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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 Transplant* Apr2: Epub, 2012
 29. **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.
 30. Kino-oka M, Ngo 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.

2. 学会発表

1. M. Ozasa, **T. Hashikawa**, Y. Shimabukuro, T. Iwayama, H. Komoda, A. Matsuyama, **Y. Sawa** and **S. Murakami**: Enhanced Periodontal Regeneration by Transplantation of Adipose Tissue-derived Stem Cells. 87th General Session of the International Association for Dental Research. Apr. 3, 2009. Miami, Florida, USA
2. **S. Yanada**, T. Tauchi, C. Fujihara, T. Kajikawa, Y. Ozawa, **M. Kitamura** and **S. Murakami**: Periodontal Ligament-specific Periostin Positively Regulates Mineralization of Periodontal Ligament Cells. 87th General Session of the International Association for Dental Research. Apr. 1, 2009. Miami, Florida, USA
3. **村上伸也**: 歯周組織再生療法の近未来を展望する. 第47回日本小児歯科学会大会. 平成21年5月15日、大阪
4. 岩山智明、**橋川智子**、島袋善夫、菱川 祥郎、小笹匡雄、柴田恭子、安孫子宜光、**村上伸也**: ヒト血清を用いた脂肪組織由来間葉系幹細胞の硬組織分化能の解析. 第52回春季日本歯周病学会学術大会. 平成21年5月16日、岡山
5. T. Iwayama, **T. Hashikawa**, Y. Shimabukuro, Y. Ozasa, Y. Shibata, Y. Abiko, H. Komoda, A. Matsuyama, **Y. Sawa**, **S. Murakami**: Possible Application of Adipose Tissue-derived Stem Cells for Periodontal Regenerative Cell Therapy. The 9th World Congress on Inflammation. Jul. 8, 2009. Tokyo, Japan
6. **村上伸也**: 歯周組織再生療法の現状と未来. 第27回日本骨代謝学会学術集会. 平成21年7月23日、大阪
7. **S. Murakami**: Periodontal Tissue Regeneration using FGF-2. Chinese Society of Periodontology. Aug. 20, 2009. Nanning, China
8. **村上伸也**: 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を用いた新規歯周組織再生療法の確立. 第27回日本ヒト細胞学会学術集会. 平成21年8月22日、東京
9. **T. Hashikawa**, M. Ozasa, T. Iwayama, J. Anzai, Y. Shimabukuro, **S. Murakami**: Periodontal Regeneration by Transplantation of Human Adipose Tissue Derived Stem Cells. 8th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting. Aug. 29, 2009. Singapore
10. **Daimon, T.**, Zohar, S, and O'Quigley, J, Prior-adaptive continual reassessment method in dose-finding studies. Proceedings of the 30th Annual Conference of the International Society for Clinical Biostatistics, 70, Prague, Czech Republic, August 23-27, 2009.
11. **Daimon, T.**, Zohar, S., and O'Quigley, J. Prior-adaptive continual reassessment method in dose-finding

- studies. Proceedings of the 6th International Meeting of Statistical Methods in Biopharmacy, Paris, France, September 21-22, 2009.
12. Nakagaki, S., Tsuji, D., **Daimon, T.**, Ikematsu Y., Maeda, M., Kimura, M., Furuta, M., Takagi, M., Hiroyoshi, M., and KIM, Y-I. A double-blind randomized controlled trial comparing 3 mg and 1 mg of Granisetron for the control of chemotherapy-induced acute emesis. Proceedings of The Joint 15th Congress of the European Cancer Organisation (ECCO15) and 34th Congress of the European Society for Medical Oncology (ESMO34), P-3080 (European Journal of Cancer Supplements, 7(2), September 2009, p.198), Berlin, German, September 20-24, 2009.
 13. Takano, H., Hiramatsu, M., Horiguchi, K., Torikai, K., Watanabe, K., Ishida, M., Nakamura, T., **Daimon, T.** Is tricuspid annular dilatation a reliable indicator for tricuspid valve surgery in patients undergoing mitral valve surgery? Proceedings of the 23rd Annual Meeting of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, Vienna, Austria, October 17-21, 2009.
 14. 辻大樹・中垣繁・**大門貴志**・池松禎人・前田賢人・木村正幸・古田隆久・高木正和・廣吉基己・金 容彦 (2009). がん化学療法による急性悪心嘔吐に対するグラニセトロン 3mg と 1mg のランダム化比較試験. 日本癌治療学会第 47 回学術集会, 平成 21 年 10 月 22-24 日, 横浜.
 15. 岩山智明、**橋川智子**、島袋善夫、小笹匡雄、**村上伸也**、柴田恭子、安孫子宣光: 脂肪組織由来間葉系幹細胞の分化能および安全性に関する解析. 第 131 回日本歯科保存学会秋季学会. 平成 21 年 10 月 29 日、仙台
 16. 辻大樹・中垣繁・**大門貴志**・池松禎人・前田賢人・木村正幸・古田隆久・高木正和・廣吉基己・金 容彦 (2009). がん化学療法による急性悪心・嘔吐に対するグラニセトロン 3mg と 1mg のランダム化二重盲検比較試験. 日本肺癌学会第 50 回総会, 平成 21 年 11 月 12-13 日, 東京.
 17. **橋川智子**、小笹匡雄、岩山智明、**北村正博**、島袋善夫、松山晃文、菰田 弘、**李千萬**、**澤 芳樹**、**村上伸也**: 脂肪組織由来幹細胞移植による歯周組織再生誘導の解析. 第 9 回日本再生医療学会総会. 平成 22 年 3 月 18 日
 18. **村上伸也**: (特別講演) FGF-2 による歯周組織再生 -現状と将来展望- 第 8 回歯科骨粗鬆症研究会、平成 22 年年 4 月 4 日、東京
 19. 岩山 智明、**橋川 智子**、**北村 正博**、島袋 善夫、**村上 伸也**: 歯肉線維芽細胞におけるアディポネクチン受容体 1 を介した炎症制御、第 53 回春季日本歯周病学会学術大会、平成 22 年 5 月 14 日、盛岡
 20. **村上伸也** (特別講演)、歯周組織再生療法の未来を探る、日本矯正歯科協会学術大会、平成 22 年 6 月 26 日、東京
 21. **Murakami S**: (シンポジウム) Periodontal regeneration by FGF-2. , Joint Symposium of University

- Leeds and Osaka University, July 5, 2010, Leeds, UK.
22. **村上伸也**：（シンポジウム）歯周組織再生療法の現状と未来。第27回日本骨代謝学会学術集会。平成22年7月23日、大阪
 23. **Hashikawa T**, Ozasa M, Iwayama T, Anzai J, Shimabukuro Y, **Kitamura M**, Matsuyama A, **Lee C**, **Sawa Y** and **Murakami S**: Possible application of human adipose tissue derived stem cells for periodontal regeneration. ISSCR 8th Annual Meeting, June 17, 2010, San Francisco, USA.
 24. Iwayama T, **Hashikawa T**, Shimabukuro Y, Ozasa M, Lee C, Matsuyama A, **Sawa Y**, **Murakami S** : Adipose tissue-derived stem cells for periodontal regenerative cell therapy. 88th International Association of Dental Research. July 15, 2010, Barcelona, Spain.
 25. 河原 貴展, 山下 元三, 橋本 悠平, 梶川 哲宏, 中村 友美, 前田 憲一郎, **山田 聡**, **北村 正博**, **村上 伸也** : 歯根膜細胞において FGF-2 は MAPK 依存性に BMP シグナルを抑制する 第53回秋季日本歯周病学会学術大会、平成22年9月19日、高松
 26. **Murakami S** : (特別講演) Periodontal tissue regeneration by basic fibroblast growth factor (FGF-2). 第12回台湾歯周病学会, 2010年10月16日, 高雄 (台湾)
 27. **村上伸也** : (特別講演) 歯周治療の近未来 -その理論と臨床- 第62回近畿北陸地区歯科医学大会、平成22年11月7日、大阪
 28. **Hashikawa T**, Ozasa M, Iwayama T, Anzai J, Shimabukuro Y, **Murakami S**: Periodontal regeneration by transplantation of human adipose tissue derived stem cells. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, November 1, 2010, Honolulu, USA.
 29. **S. Murakami** (シンポジウム)、Periodontal tissue engineering by FGF-2, 2nd World Wide University Network Symposium, 2011年7月25日, Leeds, UK
 30. 大原 廣之、**竹立 匡秀**、伊山 舜吉、**村上 伸也** : CD73 (ecto-5'-nucleotidase) による, アデノシン受容体活性化制御が骨芽細胞分化に及ぼす影響、第29回日本骨代謝学会学術集会、平成23年7月29日、大阪
 31. **S. Murakami** (招待講演), FGF-2 stimulates periodontal regeneration, Research Day of Otago University, 2011年8月11日、Dunedin, New Zealand
 32. **S. Murakami** (招待講演), Periodontal regeneration by FGF-2: present status and future outlook, 9th General session of Asian Pacific Society of Periodontology (APSP), 2011年9月10日、Hong Kong
 33. **村上伸也** (特別講演), 歯周治療における細胞治療の標準化にむけて, 第54回日本歯周病学会秋季学術大会、平成23年9月24日、下関、山口
 34. **村上伸也** (シンポジウム), 脂肪組織由

- | | |
|---|--|
| <p>来幹細胞を応用した歯周組織再生療法の可能性と将来展望, 第 53 回歯科基礎医学学会学術大会、平成 23 年 10 月 2 日、岐阜</p> <p>35. 竹立 匡秀、沢田 啓吾、小笹 匡雄、岩山 智明、野崎 剛徳、市川 朋生、前田 憲一郎、田内 拓史、三木 康史、大原 廣之、伊山 舜吉、安齋 純、永安 利江、寺嶋 昭夫、李 千萬、澤 芳樹、北村 正博、村上 伸也：脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生誘導療法の確立、第 59 回国際歯科研究学会日本部会、平成 23 年 10 月 8 日、広島</p> <p>36. 竹立匡秀：(招待講演)脂肪組織由来間葉系幹細胞移植による歯周組織再生療法の開発、大阪大学歯学部創立 60 周年記念オープンフェスタ in Suita 2011 年 10 月 16 日、大阪</p> <p>37. 村上伸也 (シンポジウム)、歯周組織再生療法の現状と未来、第 70 回日本矯正歯科学会大会、平成 23 年 10 月 18 日、名古屋</p> <p>38. 沢田啓吾、竹立匡秀、小笹匡雄、岩山智明、野崎剛徳、市川朋生、前田憲一郎、田内拓史、三木康史、大原廣之、伊山舜吉、安齋 純、北村正博、村上伸也：実験的歯周病モデルを用いた脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生、第 135 回秋季保存学会、平成 23 年 10 月 21 日、大阪</p> <p>39. 竹立匡秀：(招待講演)アデノシンによる骨芽細胞分化制御機構、第 113 回大阪大学歯学会例会、2012 年 1 月 12 日、大阪</p> | <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|---|--|

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

研究分担者

齋藤 正寛
東京理科大学 基礎工学部
生物工学科
准教授

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。一ヵ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) ADSC の scaffold への接着

増殖期の ADSC を 1×10^6 cells の細胞濃度でコラーゲングル (高研) 内あるいは PGLA/コラーゲンシートに播種し、24 時間後に細胞接着確認に移植実験に使用した。またヒトフィブリン製剤であるボルヒール (アステラス製薬) に関しては、同じく 1×10^6 cells の ADSC を移植直前に懸濁し、フィブリンゲル化した後に、移植実験に使用した。

(4) ADSC の scaffold 上での分化誘導

増殖期の ADSC を 1×10^6 cells の細胞濃度でコラーゲングル (高研) 内あるいは PGLA/コラーゲンシートに播種し、24 時間後に細胞接着確認に移植実験に使用した。その後、100nM dexamethasone, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate にて 10 日間培養した後、マウス頭蓋冠モデルにて移植を行った。

(5) 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。

2. 動物モデルを用いた ADSC の骨再生能力の評価

a. μ CT および組織解析の結果

各種 scaffold で培養した ADSC 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。ADSC 移植による骨再生能力をマイクロ CT で判定した結果、ボルヒールを用いた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。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。

b. 移植部位における ADSC の骨再生能力の評価

ボルヒール/ADSC 移植片を HE 染色にて解析した結果、骨組織形成が観察された。また抗ヒトビメンチン抗体を用いた免疫染色の結果より、ADSC により再生された骨組織は、レシピエントの骨組織と連続していることが観察された。

果より、ADSC により再生された骨組織は、レシピエントの骨組織と連続していることが観察された。

3. 骨芽細胞分化誘導を行った ADSC の骨再生能力の評価

a. μ CT および組織解析の結果

PGLA/コラーゲンシート上で骨芽細胞分化誘導培地にて培養した ADSC 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。移植後二ヶ月に ADSC 移植による骨再生能力を μ CT で判定した結果、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ものの、骨芽細胞分化誘導を行っていない群と差は認められなかった。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。

b. 移植部位における ADSC の骨再生能力の評価

PGLA/コラーゲンシート+骨芽細胞分化誘導培地/ADSC 移植片を HE 染色にて解析した結果、骨組織形成が観察された。また抗ヒトビメンチン抗体を用いた免疫染色の結果より、ADSC により再生された骨組織は、レシピエントの骨組織と連続していることが観察された。

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、PGLA/コラーゲンシートと KUSA 細胞を用いて骨再生能をモニターできることが判明した。

本マウス頭蓋冠欠損モデルにボルヒール/ADSC を移植することにより、骨再生を誘導出来る事が判明した。しかし ADSC の骨再生能力を十分に発揮することは出来ず、欠損部に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、ADSC の骨再生能力を誘導出来る 3 次元培養技術あるいは新たな scaffold の選択の必要性が考えられた。そのため、本マウス頭蓋冠欠損モデルに PGLA/コラーゲンシート + 骨芽細胞分化誘導培地で ADSC を播種した場合、異種動物を用いたモデルにおいて骨再生を誘導出来る事が判明した。しかし ADSC の骨再生能力を十分に発揮することは出来ず、欠損部に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、ADSC の骨再生能力を誘導出来るための、細胞外環境の調整するための新たな分化誘導因子ならびに scaffold の選択の必要性が考えられた。

本実験において、ADSC の骨再生能力を十分に検討することは出来なかったが PGLA/コラーゲンシートと骨芽細胞分化誘導培地の組み合わせが ADSC 移植用の足場として適性を示唆する結果を得た。従って同生体材料と培養技術の組み合わせが、ADSC の骨再生能力の判定に有用な生体材料候補の一つになると思われる。

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ル確立を試みた。ボルヒールあるいは PGLA/コラーゲンシート + 骨芽細胞分化誘導培地による ADSC の移植技術は、「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開発」の評価系に適していることが確認された。

F. 研究発表

(論文発表)

1. **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.
2. **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.
3. 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 年 8 月 10 日.
4. **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.
5. M. Arakaki, M. Ishikawa², 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
6. **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
7. **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.* 2011 4;286(44):38602-38613.
8. M. Oshima, M. Mizuno, A. Imamura, M. Ogawa, M. Yasukawa, H. Yamazaki, R. Morita, E. Ikeda, K. Nakao, T. Takano-Yamamoto, S. Kasugai, **M. Saito** and T. Tsuji. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE*, 2011.
 9. Dental Regenerative Therapy using Oral Tissues. N. Kanamura, T. Amemiya, T. Yamamoto, K. Mishima, **M. Saito**, T. Tsuji, T. Nakamura *ANTO Anti-Aging Medicine* 9 (1) : 14-23, 2012
 10. **M.Saito**, T. Tsuji “Tooth regeneration therapy” as a next generation of regenerative medicine. 2010, Quint. International., in press
 11. G.Ganburged ,N. Suda, **M.Saito**, Y.Yamazaki, K.Isokawa, K.Moriyama. Dilated capillaries, disorganized collagen fibers and differential gene expression in periodontal ligaments of hypomorphic fibrillin-1 mice. 2010, *Cell Tissue Res*, Sep;341(3):381-95.
 12. 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. Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. 2009, *Nat Cell Biol.*, 11(10):1197-1204.
 13. 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.
 14. **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

G. 知的財産権の取得状況 (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

研究分担者

松下 健二
国立長寿医療センター研究所
部長

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。

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、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

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」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。さらに、兵庫県での調査の結果、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の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

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。

今回、兵庫県で行なわれた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

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。また、コミュニティにおける口腔の健康指導は、セルフケア意識を高め、口腔健康行動を向上するとともに、個々の全身の健康管理向上につながることを示唆された。

F. 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.
8. 松下健二：口腔のアンチエイジングとリハビリテーション *Monthly Book Medical Rehabilitation* 124: 127-134, 2010.
9. 松下健二：高齢化社会の中でインプラントをどう考えるか？ *歯界展望* 116(5): 2010-2011, 2010.
10. 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 *肥満と糖尿病* 9(5): 729-731, 2010.
11. 今井剛、西永正典、中村知子、奥宮清人、松林公蔵、土居義典、松下健二：高齢者住民における保有歯数と認知機能. *愛院大歯誌* 48:59-66, 2010.
12. 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.
13. 松下健二：高齢者の口腔・歯科疾患と免疫能 高齢者の口腔機能とケア *Advances in Aging and Health Research* 2009 財団法人長寿科学振興財団, p79-87, 2010.
14. Abiko Y, Sato T, Matsushita K, Sakashita R, Takahashi N: Porphyromonas gingivalis is widely distributed in subgingival plaque biofilm of elderly subjects, Ed. Sasano T, Suzuki O in: *Interface Oral Health Science* 2009 3:240-242, 2010.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 松下健二：未来歯科医学に向けて. *歯界展望*, 114:781, 2009.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. [§]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.
25. 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. 多田浩之、島内英俊、松下健二 :
Porphyromonas gingivalis ジンジパインによるヒト歯肉上皮細胞のアレルギー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.
7. 松下健二 : オーラルヘルスプロモーションのこれから - 口腔健康行動におけるコミュニケーションチーム医療 - 日本健康心理学会 第23回大会シンポジウム 2010年9月11日, 千葉
8. 松下健二 : NOと歯周病 第3回東京アンチエイジングアカデミー 2010年6月5日, 東京
9. 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
10. 松下健二 : 凝固第 Xa 因子の病態への関与とその制御 - 基礎研究者の立場から - 第3回 Bayer Thrombosis Seminar 「血栓形成と凝固第 Xa 因子」 2010年4月22日, 鹿児島
11. 杉浦進介, 石原裕一, 小松寿明, 萩原真, 谷川順美, 水谷大樹, 加藤佳子, 江口傑

- 徳, 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 第16回に本エンドトキシン・自然免疫研究会 2010年11月13日、奈良
12. 今林貴代美、庵原耕一郎、石坂亮、江波久哲、松下健二、中村洋、中島美砂子: 歯髄幹細胞を用いた抜髄後歯髄再生のタンパク化学的解析による証明 第132回日本歯科保存学会春季学術大会 2010年6月5日、熊本
 13. 庵原耕一郎、石坂亮、今林貴代美、江場久哲、松下健二、中村洋、中島美砂子: 歯髄CD105 陽性細胞を用いた抜髄後歯髄再生法の確立 第132回日本歯科保存学会春季学術大会 2010年6月5日、熊本
 14. 江場久哲、中島美砂子、庵原耕一郎、松下健二、中田和彦、中村洋: MMP-3 はイヌ一部 性歯髄炎モデルにおいて歯髄治癒を促進する 第132回日本歯科保存学会春季学術大会 2010年6月5日、熊本
 15. 杉浦進介、江口傑徳、萩原真、小松寿明、谷川順美、野口俊英、松下健二: バルプロ酸 (VPA)は ERK 1/2 の活性化を介して High Mobility Group Box 1(HMGB1) の産生を誘導する 第33回日本血栓止血学会学術集会 2010年4月24日、鹿児島
 16. Matsushita K, Morrell CN, Mason, EL O'Rourke B, Champion HC, and Lowenstein CJ: Angiotensin II Activates Endothelial Exocytosis by Stimulating Superoxide Production 第33回日本血栓止血学会学術集会 2010年4月24日、鹿児島
 17. 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
 18. Komatsu T, Nagano K, Sugiura S, Hagiwara M, Tanigawa N, Eguchi T, Yoshimura F, Furuichi Y, Matsushita K: E-selectin mediates *Porphyromonas gingivalis* adherence to endothelial cells. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology. Oct 31, 2010, Honolulu, HI, USA.
 19. Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Eguchi T, Mizutani H, Matsushita K, Noguchi T: Valproic acid enhances innate immune response to LPS by HMGB1 release. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology. Oct 31, 2010, Honolulu, HI, USA.
 20. Komatsu T, Nagano K, Sugiura S, Hagiwara M, Tanigawa N, Eguchi T, Yoshimura F, Furuichi Y and Matsushita K: E-selectin mediates *Porphyromonas gingivalis* adherence to endothelial cells. 第8回血液・血管オルビス 2010年8月21日 東京
 21. Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Mizutani H, Eguchi T, Kawahara K, Maruyama I, Noguchi T and Matsushita K: Valproic acid enhanced innate immune response induced by LPS through stimulating

- active release of HMGB1. 第8回血液・血管オルビス 2010年8月21日 東京
22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. Matsushita K: Vascular Biology in Oral Diseases. CVRI Special Seminar in University of Rochester, Oct 5, 2009, Rochester NY, USA.
 26. 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
 27. 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.
 28. 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
 29. 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
 30. 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
 31. 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
 32. 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
 33. 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,
 34. 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
 35. 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
 36. 位田毅彦, 二ノ宮真之, 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
37. 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
38. 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
39. 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.
40. 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. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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
再生医療センター
生殖・細胞医療研究部
室長

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。

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て、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。

2. ヒト脂肪組織由来細胞のゲノム解析
ヒトから採取された細胞又はそれより由来する細胞で多分化能と自己複製能力を有する細胞である造血系幹細胞や間葉系幹細胞などの組織幹細胞は移植のために絶対的な細胞数の確保が必要である。そのため培養工程が長期

にわたるケースがありえるが、細胞移植効果の有効性が担保されるには培養工程での幹細胞形質転換がない性質が保持されていることを検証する必要がある。幹細胞ゲノム解析として染色体核型解析が行われてきたが、そのゲノム解析解像度は 5-10Mb 程度であり、一方より微細な領域のコピー数変化も検出できる DNA マイクロアレイを用いたアレイ CGH 解析が開発され、10-100kb レベルのゲノム変化を検出可能である。ADSCs を培養過程で継時的なサンプル抽出ポイントを設定し、Agilent 社製の Human Genome CGH マイクロアレイ 1x244K

を用いてゲノムコピー数変化を解析した。

3. ヒト脂肪組織由来細胞遺伝子発現解析と分化能試験

種々の ADSCs に対して、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)

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。

2. ヒト脂肪組織由来細胞のゲノム解析

ADSCs の培養サンプルを Agilent 社製の Human Genome CGH マイクロアレイ 1x244K を用いてハイブリダイゼーションを行い、データの解析は Agilent 社製の Genomic Workbench ver. 5.0.14 にて行った。コピー数変化 (Aberration) 領域内に 3 つ以上のプローブを持つものを Aberration として検出することとし、Log2Ratio が 0.3219 (1.25 倍) よりも絶対値が大きいものを Aberration と判定した。

ADSCs の通常の培養では、培養前のサンプル (D0) と培養 7 日目 (D7)、14 日目 (D14) そして 21 日目 (D21) の 3 ポイントでもコピー

数変化領域は検出されなかった。

3. ヒト脂肪組織由来細胞遺伝子発現解析と分化能試験

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、各組織特異的の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

ADSCs の長期 (21 日間) 培養工程でゲノムコピー数変化領域は検出されなかったことから、ADSCs の継続的な培養過程においても、その幹細胞ゲノムに安定的であることが示唆され、ADSCs 製剤の品質が担保されていることが明らかとなった。また、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、骨芽細胞分化、軟骨分化および脂肪分化が認められたことから、多種組織の再生の幹細胞ソースとして有望であることが示唆された。

E. 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。ADSCs 培養工程で長期 (21 日間) 渡る継続的な培養でもゲノムコピー数変化領域は検出されなかった。安定的に安全に品質が担保されていることが判明した。本研究班で行っている ADSCs 培養が幹細胞ゲノムに安定的であることが示唆された。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. 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) **メディカルドゥ**, 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.
- 6) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, **Akutsu H**, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient Generation of Hepatoblasts From Human ES Cells and iPS Cells by Transient Overexpression of Homeobox Gene HEX. *Mol Ther.* 2011; 19(2): 400-407.
- 7) Chowdhury MM, Katsuda T, Montagne K, Kimura H, Kojima N, **Akutsu H**, Ochiya T, Fujii T, Sakai Y. Enhanced effects of secreted soluble factor preserve better pluripotent state of embryonic stem cell culture in a membrane-based compartmentalized micro-bioreactor. *Biomed Microdevices.* 2010; 12(6):1097-1105.
- 8) Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, **Akutsu H**, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 401(3):480-486.
- 9) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, **Akutsu H**, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One.* 2010; 5(9): e13017

- 10) Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, **Akutsu H**, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. **Biotechnol Bioeng**. 2010; 106(6): 860-870.
- 11) Stadtfeld M, Apostolou E, **Akutsu H**, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. **Nature**. 2010; 465(7295):175-181.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
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.
- 4) **H Akutsu**. “Xeno-Free Growth and Expansion of Human Pluripotent Stem Cells”, Commercial Tutorial Directory; ISSCR 8th annual meeting, San Francisco, CA USA. 18th Jun, 2010.
- 5) **阿久津英憲** : 「臨床グレード幹細胞樹立の試み」 第28回日本ヒト細胞学会学術集会シンポジウム, つくば市, 8月23日, 2010年.
- 6) **H Akutsu**. “xeno-free growth and expansion of human pluripotent stem cells”, Symposium 7; The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Sapporo, 1st-4th Sep, 2010.
- 7) **阿久津英憲** : 「網羅的発現解析から見出したES細胞とiPS細胞の相関性と研究者」 第28回JMACワーキンググループ会議, 東京, 9月22日, 2010年.
- 8) **阿久津英憲** : 「臨床応用に使える、ヒトES細胞とヒトiPS細胞とは何か？」 BTJプロフェッショナルセミナー iPS細胞/ヒトES細胞臨床研究の落とし穴、次世代の医療に必要な技術突破, 東京, 12月21日, 2010年.
- 9) **阿久津英憲** : 「ヒトES細胞の臨床応用を可能にする技術開発と課題」 再生医療の実現化プログラム関連事業・公開ワークショップ ヒト多能性幹細胞の医療応用と輪唱研究指針の改訂—研究開発と規制のシンクロニーを目指して—, 神戸, 2月17日, 2011年.
- 10) **H Akutsu**. “Development of xeno-free culture systems of human embryonic stem cells for cell therapy”, JST/CIRM Workshop “Early translational research on stem cells”, Kobe, 16th May, 2011.
- 11) **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