

201432001A

厚生労働科学研究委託費  
再生医療実用化研究事業

(委託業務題目)

# 歯科再生医療拠点を活用した 歯周組織再生療法の確立

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 村上 伸也

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究委託費  
再生医療実用化研究事業

(委託業務題目)

# 歯科再生医療拠点を活用した 歯周組織再生療法の確立

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 村上 伸也

平成27(2015)年3月

# 目 次

I. 委託業務成果報告（総括） .....	1
歯科再生医療拠点を活用した歯周組織再生療法の確立 .....	2
村上伸也	
(参考資料)	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 臨床研究の評価と先進医療開発への準備 .....	88
梅澤明弘	
2. ブタ脂肪組織由来幹細胞（ADSC）の採取と製剤化を試み .....	90
齋藤正寛	
3. 再生医療にかかる規制の現状 .....	94
大倉華雪	
III. 学会等発表実績 .....	103
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	109

# I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

歯科再生医療拠点を活用した歯周組織再生療法の確立

業務主任者 村上伸也 大阪大学大学院歯学研究科 教授

研究要旨 本研究では、平成 23 年 8 月に厚生労働大臣より実施許可を受けたヒト幹細胞臨床研究「自己脂肪組織由来幹細胞（ADSC）を用いた新しい歯周組織再生療法開発」を遂行し、その安全性・有効性（適応症例の判断を含む）を慎重に評価し、先進医療開発につなげることを目的とした。平成 26 年度は、ADSC の培養方法について検討し、安定的に必要な細胞数まで ADSC を増殖させる方法を確立し、プロトコールの変更を申請、承認を得た（平成 26 年 7 月 31 日）。直ちに工程管理システムを修正の後、1 名の被験者から臨床研究への参加同意を取得し登録した。同患者より皮下脂肪組織を採取し、大阪大学歯学部附属病院内の細胞加工施設内にて ADSC を単離、培養した後、フィブリンゲルとの複合体を作製し、同複合体を被験者の歯周組織欠損部に自己移植した。平成 27 年 2 月末現在、移植 4 週後の観察までが完了し、全身所見、口腔内所見のいずれにおいても細胞移植に関連したと考えられる有害事象は発生していない。

研究分担者

澤 芳樹

大阪大学大学院医学系研究科  
教授

李 千萬

大阪大学大学院医学部附属病院  
特任准教授

北村 正博

大阪大学大学院歯学研究科  
准教授

山田 聡

大阪大学歯学部附属病院  
講師

野崎 剛徳

大阪大学大学院歯学研究科  
助教

北垣次郎太

大阪大学歯学部附属病院  
助教

竹立 匡秀

大阪大学大学院歯学研究科  
助教

早川 堯夫

近畿大学薬学総合研究所  
特任教授

山本 紘司

大阪大学医学部附属病院  
特任講師

A. 研究目的

我国において、歯周病は成人の約 80%が罹患し、歯を喪失する第一の原因となっている。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、平成23年8月に厚生労働大臣より実施許可を受けたヒト幹細胞臨床研究「自己脂肪組織由来幹細胞（ADSC）を用いた新しい歯周組織再生療法開発」を遂行し、その安全性・有効性（適応症例の判断を含む）を慎重に評価し、新規歯周組織再生療法の開発を目指すものである。

我々はこれまでに、採取に関して患者への負担がより少なく、安全性も高いと考えられるADSCに着目し、同細胞移植による歯周組織再生効果を検討してきた。平成21～23年度厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）の支援を受け、ADSC移植による歯周組織再生効果を前臨床研究にて明らかとした。さらに新規歯周組織再生療法の開発を推進し、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に基づく臨床研究として実施許可を受け、研究を開始した。しかしながら、平成25～26年度に実施した2例の臨床研究の結果、ADSCを培養する際に用いる血清が、被験者由来自己血清では、ADSCが十分に増殖しない場合があることが明らかとなった。そこで本年度は、まず安定的に試験物を作製するためのプロトコルを確立した後、ADSCを用いた新規歯周組織再生療法の臨床研究を適切に遂行して症例を集積し、同療法の安全性、有効性を評価し、臨床におけるPOCを獲得することを目標とした。加えてADSCの歯周組織再生効果を増強させる方法の探索を目指し、ADSC移植による歯周組織再生過程における分子機序のさらなる解明を試みた。一方で、ADSCを用いた新規歯周組織再生療法の普及

を目指し、東北大学病院への技術移転を行うための準備を開始した。

## B. 研究方法

### 1. ADSC培養方法の改良

前述のように、ADSCを培養する際に被験者由来自己血清では、プロトコルに定められた移植に必要な細胞数までADSCが増殖しない場合があることが明らかとなった。そこで、安定的に試験物を作製するためのプロトコルの確立を目指し、ウシ胎仔由来血清（FCS）を用いたADSCの培養が試験物の品質および安全性に及ぼす影響について検討を行った。すなわち、ADSCの培養培地に用いる血清を被験者由来血清あるいはFCSとし、ADSCの増殖能や細胞形態、細胞表面抗原の発現に及ぼす影響について比較検討を行った。さらに、FCSを用いたADSC培養時における試験物へのFCS成分の混入を可及的に除去・低減するために、細胞の遠心洗浄回数について検討を行った。

### 2. ADSCを用いた新規歯周組織再生療法の臨床研究の遂行

#### I. 被験者の選定と登録

大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科にて歯周基本治療を終了し歯周組織再生療法の適応と判断された歯周病患者を対象とし、研究参加の同意を取得した後、スクリーニング検査のうえ、選択基準および除外基準に従って臨床研究への登録を行った。

#### II. ADSCの単離と培養

大阪大学歯学部附属病院近未来歯科医療センターにて局所麻酔下にて被験者の腹部皮下より約30mLの脂肪組織を採取し、同センターに併設されたCPIにてADSCを単離した。

必要数(約  $1 \times 10^7$  個以上)まで培養・増殖させた後、フィブリンゲル(ボルヒール<sup>®</sup>)との複合体を作製し、歯周組織欠損部へ自家移植した。なお、培養期間中に二度の感染症検査(無菌試験・マイコプラズマ否定試験・エンドトキシン試験)と純度試験(FACSによる表面抗原発現解析:  $CD45^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD166^+$ )を実施した。細胞培養に用いる機器等は専門業者によるバリデーションを受け、さらに細胞の培養開始直前に培養室のサニテーションを実施した。

### III. ADSC 含有試験物の作製

必要数の規格を満たした ADSC を PBS にて細胞濃度が  $4.2 \times 10^7$  cells/mL となるように懸濁した。同懸濁液とボルヒール<sup>®</sup>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  $80 \mu\text{L}$  ずつ混合し、硬化させ試験物(ADSC  $6.7 \times 10^6$  cells/ $160 \mu\text{L}$ )を作製した。

なお、細胞培養工程および試験物作製工程は、GMP 基準に準拠した手順書および工程管理システムに則って行った。

### IV. 当該治療法の評価

本臨床研究のプライマリーエンドポイントは当該治療の安全性とし、移植 1 週間後、2 週間後、4 週間後、12 週間後、24 週間後、36 週間後にて全身所見・口腔内所見の観察と評価、臨床検査(血液・生化学検査・尿検査・心電図)ならびに X 線診断(胸部・局所)を実施し、有害事象の有無、種類、重症度および発現頻度等を評価する。セカンダリーエンドポイントは有効性とし、移植 36 週間後の新生歯槽骨の増加率(規格撮影された X 線 写真を測定し得られる、移植前の欠損深さに対する新生した歯槽骨の高

さの比率)、臨床的アタッチメントレベルの獲得量(セメントーエナメル境等から歯肉溝底までの距離の減少量)ならびに歯周組織検査値(プロービングポケットデプス、辺縁歯肉の退縮量)を測定することにより評価する。12 名の歯周病患者を対象とし、すべてのデータは大阪大学医学部附属病院未来医療開発部データセンターにて一元管理され、評価は、生物統計専門家や外部委員を含めた医学部未来医療開発部の審査・評価部門にて客観的に行われる。本年度、平成 27 年 2 月末日現在、1 例の移植 4 週間後の評価が完了した。

### 3. 試験物改良への取り組み

ADSC の歯周組織再生効果の増強法の探索を目指し、ADSC 移植による歯周組織再生過程における分子機序をさらに解明するために、本年度は ADSC が分泌する液性因子が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御するか否か、すなわち ADSC 移植による trophic 効果について検討した。すなわち、ADSC の培養上清を回収し、同培養上清をヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程に添加し、アルカリフォスファターゼ活性および石灰化ノジュール形成を指標として解析を行った。さらに、ADSC 培養上清中に含まれる増殖因子について同定し、それらの歯根膜細胞の分化制御に及ぼす影響について検討を加えた。

### 4. 歯科幹細胞治療拠点としての技術移転

東北大学病院への技術移転を行うための準備を開始した。すなわち、東北大学病院における臨床研究に先立ち、ブタ歯周病モデルにおける ADSC 移植療法の前臨床研究を行うための技術提供を開始した。

(倫理面への配慮)

本研究における臨床研究に際しては、被験者の人権の保護を第一に考え、被験者の理解できる言葉で、具体的な研究計画、予想される研究結果、予想される不利益、個人情報保護の方法、採取した組織・細胞の保存・廃棄の方針と方法等について十分説明し、慎重にインフォームドコンセントを得た。また、本研究はヒト体性幹細胞であるADSCを用いた臨床研究であることから、「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ている(厚生労働省医政0822第6号、平成23年8月22日)。その後、一部プロトコルの見直しに伴い、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に変更申請を行い、変更の許可を得ている(厚生労働省医政0822第6号、平成24年8月30日)。それを受け、平成24年9月7日に大阪大学大学院歯学研究科長および歯学部附属病院長より研究許可を受けている。さらにその後、細胞培養に用いる血清の変更を申請し、変更の許可を得た(平成26年7月31日)。

また、本課題にて行う臨床試験は大阪大学医学部附属病院未来医療開発部の審査・評価部門によりモニタリング・監査・データマネジメントが客観的に実施されている。

## C.研究結果

### 1. ADSC 培養方法の改良

自己血清を用いて十分な細胞増殖が得られなかった2名の被験者由来ADSCを用いて、

被験者由来自己血清あるいはFCS存在下にて培養した際の細胞形態を観察するとともに、細胞増殖について検討を行った。その結果、被験者血清存在下での培養では、細胞質が拡張した細胞あるいは死細胞が多数認められたが、FCS存在下で培養したADSCは間葉系幹細胞が示す紡錘形の細胞形態を示し、死細胞はほとんど認められなかった(Fig 1)。また、細胞増殖においても被験者由来血清に比べ、FCS存在下では順調な細胞増殖が認められた(Fig 2)。加えて、細胞表面抗原解析による純度試験において、FCS存在下での培養における細胞純度の低下は認めなかった(Fig 3)。

動物由来の血清であるFCSの使用にあたっては、病原微生物等の混入やFCS中の物質に対するアレルギー反応等を招く可能性が否定できない。そこで、このようなリスクを可及的に減じるために、我々はBSE発生の報告がないオーストラリア、ニュージーランドを原産国とする健康なウシの胎仔に由来する血液を使用し、ウイルス試験、無菌試験およびマイコプラズマ否定試験に合格したものを $\gamma$ 線照射処理したFCSを入手した(参考資料1)。同FCSを用いてADSCを培養した際の、FCS成分の試験物への混入を可及的に除去・低減するために、細胞の洗浄回数について検討を行った。その結果、3回の遠心洗浄にて洗浄液中のBSA濃度が5ng/ml未満に低減できることが明らかとなった(表1)。

以上の結果に基づいて、ADSCの培養工程に用いる血清の被験者由来自己血清からFCSへと変更と、試験物作製に際しての細胞の洗浄回数の変更について、ヒト幹細胞臨床研究のプロトコル変更申請(参考資料2および3)を行い、変更許可を得た(平成26年7月31日)。



## 2. ADSC を用いた新規歯周組織再生療法の臨床研究の遂行

上記のプロトコール変更後、1例目となる被験者から研究参加の同意を取得し、スクリーニング検査を実施した。同検査結果を基に選択基準、除外基準に照合のうえ、臨床研究への登録を行った。

被験者は初診時45歳女性で、平成25年10月1日に大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科を受診し、歯周組織検査の結果、広汎型重度慢性歯周炎と診断された。同年11月1日より歯周基本治療を実施し、平成26年6月23日に再評価を行い、下顎左側犬歯(33)遠心の垂直性骨欠損が歯周組織再生療法の適応であると判断した(Fig 4)。同年9月10日に臨床研究について同意説明文書を用いて説明を行い、同年10月1日に研究参加の同意を取得した。同年11月19日に歯学部附属病院近未来歯科医療センターにて臍下部より皮下脂肪組織を採取し、同日より同センター内に設置したCPI内にてADSCの単離、培養を開始した。培養開始から16日後(同年12月5日)、さらにその6日後(同年12月11日)に継代培養を行い、同年12月17日に細胞を凍結保存した(Fig 5)。凍結時には $6.45 \times 10^6$ 個(生細胞率:96.3%)の細胞が回収され、純度試験の結果 $CD105^+$ :83%、 $CD166^+$ :85%、 $CD45^+$ :100%であり、規格を満たしていることを確認した。その後、平成27年1月10日に凍結した細胞を解凍し、培養を再開した。その際の生細胞率は89.8%であった。再培養開始翌日(同年1月11日)、6日後(同年1月16日)にそれぞれ継代培養を行った(Fig 6)。そして、感染症検査(凍結時および移植3日前:同年1月19日実施)の結果が陰性であったことを確認し(参考資料4)、移植日(再培

養開始から12日後、同年1月22日)に細胞を回収し遠心洗浄し、 $2.43 \times 10^7$ 個(生細胞率:88.0%)の細胞が得られ、純度試験の結果、 $CD105^+$ :99%、 $CD166^+$ :99%、 $CD45^+$ :99%(Fig 7)と移植時の規格を満たしていたことから、前述の調製方法に従いボルヒール®と混和することにより試験物を作製した。

同日、歯学部附属病院近未来歯科医療センターにおいて下顎左側犬歯(33)遠心の垂直性骨欠損部に同試験物を移植した(Fig 8)。移植1週間後(同年1月29日)に移植部位の抜糸を行い、全身所見、口腔内所見を観察するとともに、血液検査、尿検査を実施した。移植2週間後(同年2月5日)に全身所見、口腔内所見(Fig 9)を観察し、移植4週間後(同年2月19日)には全身所見、口腔内所見(Fig 10A)の観察に加え、脂肪組織採取部位を観察するとともに、各種臨床検査(血液検査、尿検査、十二誘導心電図)およびX線診査(胸部X線および移植部位のデンタルX線(Fig 10B))を実施した。移植4週間までの観察で、試験物の移植が原因で発生したと考えられる有害事象は発生していない。

## 3. 試験物改良への取り組み

ADSC移植による歯周組織再生誘導過程における分子機序を明らかにするために、ADSCのtrophic効果による歯根膜細胞の分化制御機構を検討した。まずADSCの培養上清(ADSC-CM)を回収し、ヒト歯根膜細胞を播種した硬組織形成細胞への分化誘導培地(ベータグリセロリン酸、アスコルビン酸含有培地)に添加した。その結果、ADSC-CMの添加によりヒト歯根膜細胞の分化誘導過程におけるアルカリフォスファターゼ活性の有意な上昇を認めた。さらに、アリザリンレッド染

色の結果から、石灰化ノジュール形成の亢進を観察した。以上の結果から ADSC 由来の液性因子が歯根膜細胞の分化を促進的に制御している可能性が示唆された。次に、ADSC-CM 内に含まれる増殖因子について検討したところ、IGFBP6、VEGF、HGF 等が含まれていることが明らかとなった。そこで、これまで歯根膜細胞に対する作用が十分に検討されていなかった IGFBP6 に着目し、検討を行ったところ、ADSC-CM による歯根膜細胞の分化促進作用に同分子が関与していることが明らかとなった。

#### 4. 歯科幹細胞治療拠点としての技術移転

東北大学病院にて ADSC 移植による歯周組織再生療法を実施するに先立ち、分担研究者である東北大学齋藤正寛教授に対して技術移転の準備を開始した。本年度は、東北大学にてブタ歯周病モデルを用いた前臨床研究を開始するために、動物実験プロトコルの作成を支援し、細胞の単離および移植時の歯周外科処置について技術提供を行った。

#### 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、現在臨床応用されている 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る。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。我々は、歯周組織再生療法に用いる幹細胞として ADSC に着目し、ビーグル犬を用

いた前臨床研究にてその安全性と有効性を明らかにしてきた。その成果をもとに、臨床における当該治療法の安全性、有効性を検証するためにヒト幹細胞臨床研究「自己脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) を用いた新しい歯周組織再生療法開発」を申請し、実施許可を得た。

本臨床研究を実施する前に、2名のボランティアの協力のもとコールドランを行い、脂肪組織の採取、ADSC の単離、培養の手順とその有用性を確認した。しかしながら、その後2名の被験者を臨床研究に登録し、皮下脂肪組織由来幹細胞の単離、培養をコールドランと同様に行うものの、最終的規格を満たす細胞数が得られず移植前に研究中止となった。一方、これら被験者より単離した ADSC の表面抗原の発現を検討した結果から、予定されていたマーカーを発現した ADSC が得られていることが確認されたことから、その単離手法には問題がなかったと判断された。さらに、本研究の結果で示したように、被験者由来血清添加培地では十分な増殖が見られなかった ADSC が FCS 存在下では順調な細胞増殖を示したことから、*in vitro* での細胞増殖を維持する上で被験者由来血清に何らかの問題があったのではないかと考えられた。2013年、順天堂大学のグループは、ヒト血清に含まれる PDGF-AB・BB、TGF- $\beta$ 1 の3つの増殖因子がヒト脂肪組織由来幹細胞の増殖に重要であることを報告した。(Concentration of PDGF-AB, BB and TGF- $\beta$ 1 as valuable human serum parameters in adipose-derived stem cell proliferation. J Nippon Med Sch 2013; 80: 140-147)。同論文では、16人の健常人から採取された血清を用いて、上記増殖因子の濃度と ADSC の増殖が相関関係を示すことを明らかにしたが、16

人中 3~4 名の血清（増殖因子により異なる）では上記増殖因子の濃度が低く、それらの血清を用いた場合には ADSC の増殖が有意に低下していたと報告している。すなわち、何らかの理由で被験者由来血清中の上記増殖因子の濃度が低いために、*in vitro* における ADSC の増殖を十分に支持しない可能性があると考えられた。

そこで、我々は試験物の品質、安全性に影響を与えることなく、より安定的に試験物を作製するために、細胞培養に用いる血清を被験者由来血清から FCS に変更するという結論に至った。事実、FCS に変更した後に行った臨床研究では、定めた規格通りの ADSC を培養、回収することができ、試験物の出荷、移植に至った。また、移植 4 週間までの観察から移植に関連したと考えられる有害事象は認められていない。今後、同症例については移植後 36 週まで観察を継続することで安全性、有効性を評価する。一方で、一症例目の移植 12 週以降に、それまでに得られた観察結果を大阪大学歯学部附属病院倫理委員会に報告し、研究の継続許可を得た後に、二例目の被験者登録を行う予定である。

本年度の研究結果にて ADSC 由来液性因子がヒト歯根膜細胞の分化を促進的に制御している可能性、またこの分化促進作用に IGFBP6 が積極的に関与していることが示唆された。IGFBP6 は IGF-2 と特異的に結合する分子として精製された分子であるが、その後、同分子がビタミン D 受容体と結合し、ビタミン D シグナルを抑制することが報告された。ビタミン D は骨芽細胞の分化を促進的に制御することが知られる一方で、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程においては抑制的な役割を担うことが報告されている。こ

れらの知見は、本研究にて明らかとなった ADSC 由来液性因子の役割にビタミン D シグナルが関与する可能性を示唆している。今後より詳細な分子メカニズムを解明することにより、ADSC 移植による歯周組織再生効果を向上させるための足掛かりになるものと考えている。

#### E. 結論

1. ADSC の培養に用いる血清を FCS とすることにより、より安定的に試験物を作製できることが明らかとなった。
2. 移植一例目の被験者においては、ADSC ボルヒール複合体の歯周組織への移植後 4 週までに移植に関連すると考えられる有害事象は認められなかった。
3. ADSC 移植による歯周組織再生の分子機序に ADSC 由来液性因子中に含まれる IGFBP6 が関与する可能性が明らかとなった。

#### F.健康危険情報

該当なし。

#### G.研究発表

1. 論文発表
  1. S Yamada, T Tauchi, T Awata, K Maeda, T Kajikawa, M Yanagita, S Murakami : Characterization of a novel periodontal ligament-specific periostin isoform. J Dent Res, 2014/7
  2. WS Borgnakke, ILC Chapple, RJ Genco, GC Armitage, PM Bartold, F D'Aiuto, PI Eke, WV Giannobile, T Kocher, KS Kornman, NP Lang, PN Madianos, S Murakami, F Nishimura, S Offenbacher, PM Preshaw, Au

- Rahman, M Sanz, J Slots, MS Tonetti, TE Van Dyke : The multi-center randomized controlled trial (RCT) published by the Journal of the American Medical Association (JAMA) on the effect of periodontal therapy on glycated hemoglobin (HbA1c) has fundamental problems、 J Evid Base Dent Pract、 2014/9
3. T Minagawa, T Okui, N Takahashi, T Nakajima, K Tabeta, S Murakami, K Yamazaki\* : Resveratrol suppresses the inflammatory responses of human gingival epithelial cells in a SIRT1 independent manner、 J Periodont Res、 2014/10
  4. N Takahashi, Y Matsuda, H Yamada, K Tabeta, T Nakajima, S Murakami, K Yamazaki : Epithelial TRPV1 signaling accelerates gingival epithelial cell proliferation、 J Dent Res、 2014/11
  5. M Aino, E Nishida, A Mitani, T Noguchi, H Makino, S Murakami, A Umezawa, T Yoneda, M Saito : Isolation and characterization of the human immature osteoblast culture system from the alveolar bones of aged donors for bone regeneration therapy、 Expert Opin Biol Ther、 2014/12
  6. J Kitagaki, S Miyauchi, C Xie, M Yamashita, S Yamada, M Kitamura, S Murakami : Effects of proteasome inhibitor bortezomib on cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells、 J Periodont Res、 in press, 2014
  7. Y Kurushima, K Ikebe, K Matsuda, K Enoki, S Ogata, M Yamashita, S Murakami, K Hayakawa, Y Maeda : Influence of genetic and environmental factors on oral diseases and function in aged twins、 J of Oral Rehabilitation、 2015/1
  8. Y. Shimabukuro, Y Nakayama, Y. Ogata, K. Tamazawa, H. Shimauchi, T.Nishida, K Ito, T Chikazawa, S Kataoka, S Murakami\* : Effects of an ascorbic acid derivative dentifrice in patients with gingivitis: A Double-Blind, Randomized, Controlled Clinical Trial、 J Periodontol、 2015/1
  9. DC Cochran, CM Cobb, JD Bashutski, Y-H P Chun, Z Lin, G Mandelaris, BS McAllister, S Murakami, HF Rios\* : Emerging regenerative approaches for periodontal reconstruction: A consensus report from the AAP regenerative workshop、 J Periodontol、 2015/2
  10. J Kitagaki, G Shi, S Miyauchi, S Murakami, Y Yang : Cyclic depsipeptides as potential cancer therapeutics、 Anticancer Drugs、 2015/3
  11. S Masuda, S Miyagawa, S Fukushima, N Sougawa, E Ito, M Takeda, A Saito ,Y Sawa : Emerging innovation towards safety in the clinical application of ESCs and iPSCs、 Nature Reviews Cardiology、 2014/8
  12. S Masuda,S Miyagawa, S Fukushima, T Kawamura , N Kashiyaama, A Saito, Y Sawa : Regulating ES or Induced Pluripotent Stem Cells by Innate Lymphoid Cells、 Transplantation、 2014/9
  13. T Kawamura, S Miyagawa, S Fukushima, A Yoshida, N Kashiyaama, A Kawamura, E Ito, A Saito, A Maeda, H Eguchi, K Toda, JK Lee, S Miyagawa, Y Sawa : N-Glycans: Phenotypic Homology and Structural Differences between Myocardial Cells and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived

- Cardiomyocytes、PLOS ONE、2014/10
14. H Moriyama, M Moriyama, H Isshi, S Ishihara, H Okura, A Ichinose, T Ozawa, A Matsuyama, T Hayakawa. : Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions、Stem Cells Dev 2014 Sep 15 ; 23 (18): 2211-24.
  15. T Hirose, T Iwami, H Ogura, H Matsumoto, T Sakai, K Yamamoto, T Mano, Y Fujino and T Shimazu : Effectiveness of a simplified cardiopulmonary resuscitation training program for the non-medical staff of a university hospital、Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine、2014/5
  16. T Hirose, S Hamaguchi, N Matsumoto, T Irisawa, M Seki, O Tasaki, H Hosotsubo, K Yamamoto, Y Aakeda, K Oishi, K Tomono and T Shimazu. : Presence of Neutrophil extracellular traps and Citrullinated histone H3 in the Bloodstream of critically ill patients、PLOS ONE、2014/11
2. 学会発表
1. Shinya Murakami : Periodontal Tissue engineering by FGF-2、International Association for Dental Research (IADR) General Session、6/25/2014
  2. Satoru Yamada : “Molecular basis of periodontal ligament homeostasis regulated by PLAP-1/asperin”、 International Association for Dental Research (IADR) General Session、6/27/2014
  3. 村上伸也 : 歯周病で喪失した歯周組織の再生を目指して、シンポジウム : ヒト疾患モデル研究拠点の構築を目指して、2014/7/12
4. 村上伸也 : -科学的根拠に基づく歯周病の理解-、大阪大学歯学部同窓会 第 457 回臨床談話会 : 歯周治療学の最前線を俯瞰する、2014/7/13
  5. 村上伸也 : 歯周組織再生療法の生物学的基盤と将来展望、第 66 回近畿北陸地区歯科医学大会、2014/9/28
  6. 村上伸也 : 歯周組織の神秘を探る、第 7 回日本国際歯科大会、2014/10/10
  7. 森本千晶、竹立匡秀、山本智美、沢田啓吾、中村友美、山下元三、村上伸也 : 低酸素状態が歯肉線維芽細胞におけるコラーゲン産生に及ぼす影響、第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会、2014/10/19
  8. 野崎剛徳、田中利江、沢田啓吾、小笹匡雄、三木康史、池上久仁子、阪下裕美、山本智美、宮内静香、北垣次郎太、山下元三、山田 聡、白石紀子、安齋淳、北村正博、村上伸也 : 初期固定力の不十分なインプラントに対する FGF-2 の安定性獲得促進効果、第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会、2014/10/19
  9. 山本智美、竹立匡秀、沢田啓吾、山羽聡子、森本千晶、山田 聡、村上伸也 : 歯根膜細胞における低酸素誘導因子による PLAP-1 発現抑制、第 141 回秋季日本歯科保存学会、2014/10/31
  10. 長谷川詩織、柳田 学、久保田実木子、森 健太、山下元三、山田 聡、北村正博、村上伸也 : FGF-2 存在下で分化した単球は M2 マクロファージに類似した形質を有する、第 141 回秋季日本歯科保存学会、2014/10/31
  11. Toshie Nagayasu-Tanaka, Jun Anzai, Shu Takaki, Noriko Shiraishi, Akio Terashima,

- Taiji Asano, Takenori Nozaki, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami : Action mechanism of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) on periodontal regeneration in beagle dogs、第 62 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 学術大会、2014/12/4
12. Jun Anzai, Toshie Tanaka, Akio Terashima, Takenori Nozaki, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami : Long-term observation of regenerative periodontium induced by FGF-2 in dog、第 62 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 学術大会、2014/12/4
13. Satoru Yamada : “Molecular mechanisms maintaining periodontal tissue homeostasis”、第 62 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 学術大会、2014/12/5
14. M. Kimura, S. Kataoka, M. Murakoshi, S. Murakami : Influence of carbonyl stress on alkaline phosphatase activity in PDL cells、第 62 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 学術大会、2014/12/5
15. A. Hashimoto, L. Chiu, C. Morimoto, K. Fujita, M. Takedachi, Y. Yamaguchi, S. Kawata, S. Murakami, E. Tamiya : Time-lapse analysis of osteoblastic differentiation with Raman imaging、第 62 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 学術大会、2014/12/5
16. Satomi Yamamoto, Masahide Takedachi, Chiaki Morimoto, Toshihito Awata, Satoko Yamaba, Satoru Yamada, Shinya Murakami : Hypoxia Regulates PLAP-1 Expression in Periodontal Ligament Cells、2015 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition、March/12/2015
17. Lee CM, Saito A, Tanemura A, Nonomura N, Kaneda Y. : Toward a clinical application of pseudovirion to cancer therapy. Novel therapy of hemagglutinating virus of Japan Envelope (HVJ-E) for intractable cancer. (ポスター発表)、Molecular Medicine Tri-Conference (Cancer Immunotherapy 2015)、2015/2/19
18. Yamamoto, K. and Murakami, H. : Performance of the skew normal distribution type symmetry model for analyzing square ordinal tables・口頭、The 21st International Conference on Computational Statistics、2014/8
19. 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由 : 新規ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたインスリン産生細胞の作製 (ポスター) 生体機能と創薬シンポジウム 2014、東大阪、2014 年 8 月 28~29 日
20. 大森重成, 森山麻里子, 谷口祐紀, 深瀬堯哉, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由 : ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いたドパミン産生細胞への誘導法の確立 (ポスター)、第 5 回生命機能研究会、甲南大学ポートアイランドキャンパス、神戸、2014 年 11 月 23 日
21. 百合祐樹, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由 : 新規ヒト脂肪組織由来多能性前駆細胞に存在する OCT4 陽性細胞は真の多能性幹細胞たりうるのか? (ポスター)、第 5 回生命機能研究会、甲南大学ポートアイランドキャンパス、神戸、2014 年 11 月 23 日
22. Chiaki Sone, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama :

Transdifferentiation of human adipose  
tissue-derived multilineage progenitor cells  
into insulin-producing cells. [Poster  
presentation], The 36<sup>th</sup> annual meeting of the  
molecular biology society of Japan,  
Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan, Nov  
25-27

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

特願2006-259717PCT:「硬組織複合体再生  
誘導移植材」

##### 2. 実用新案登録

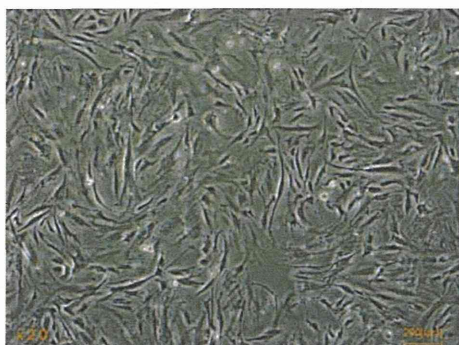
なし

##### 3. その他

なし

**Fig 1** 被験者血清、FCS存在下における  
ADSCの細胞性状の検討

被験者血清



FCS



顕微鏡像



**Fig 2** 被験者血清、FCS存在下におけるADSCの細胞増殖能の検討

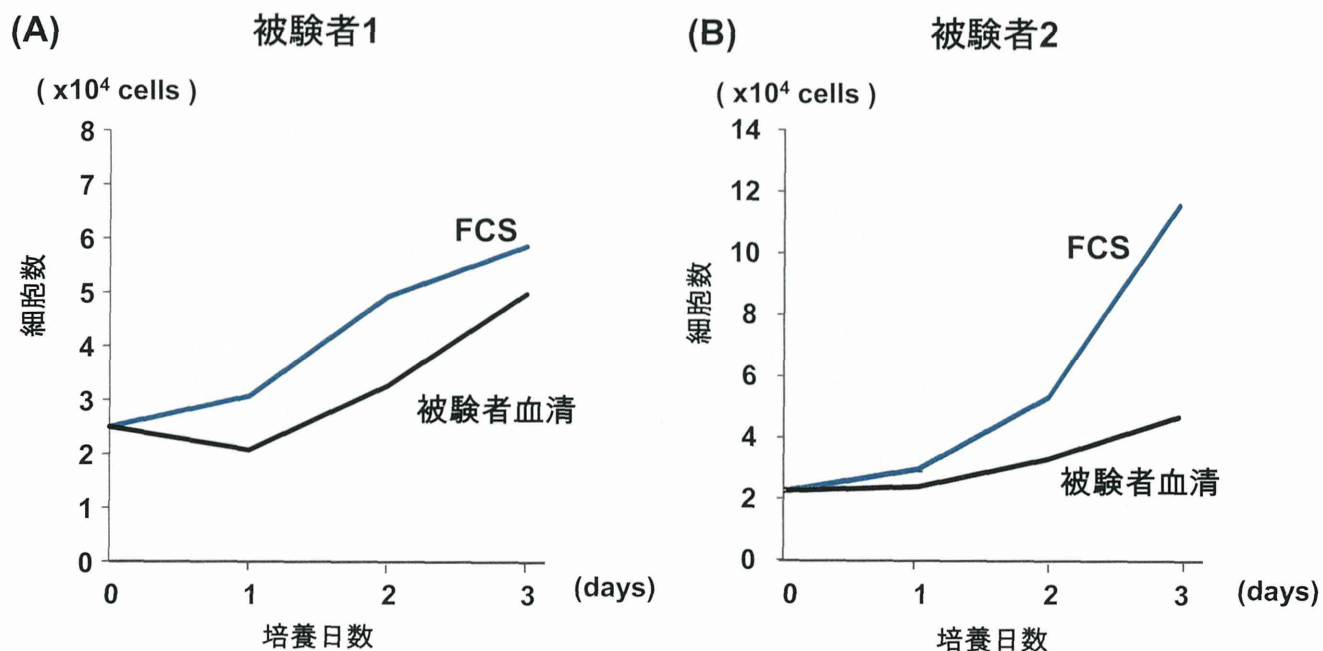
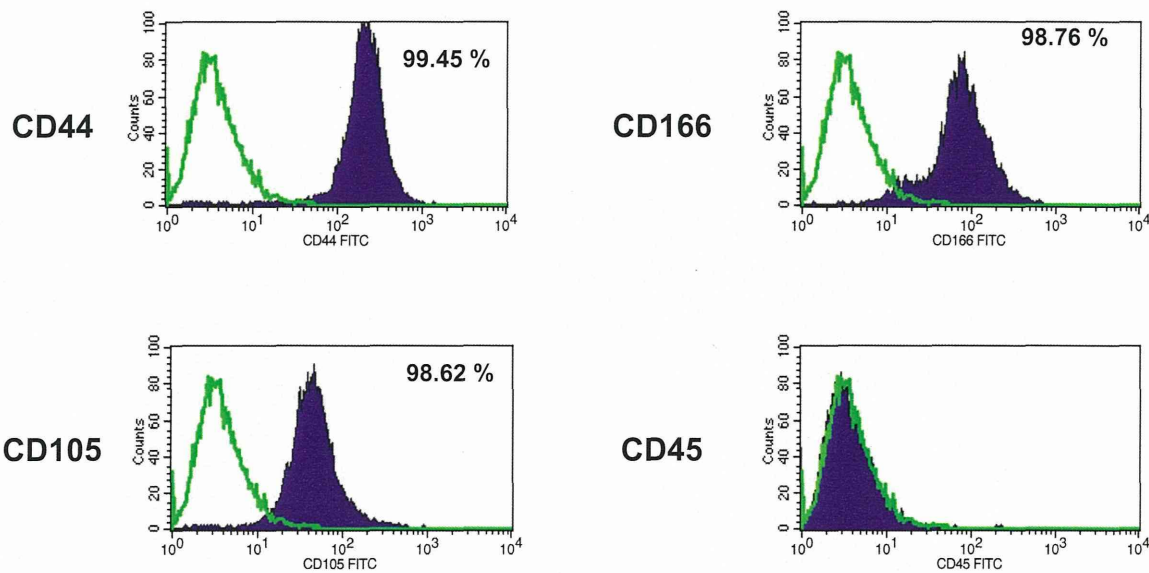


Fig 3

## FCS存在下における ADSCの細胞純度の検討



細胞純度試験(FCS培養、被験者2)

Fig 4

被験者の術前所見  
(被験部位: 下顎左側犬歯遠心部)

口腔内写真



X線



# Fig 5 被験者由来ADSCの検鏡所見

Day1 (EDTA処理前)



11/20

Day2 (EDTA処理後)



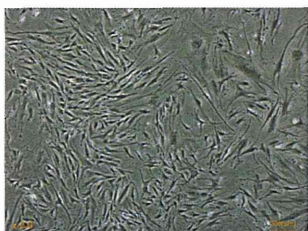
Day3



Day4

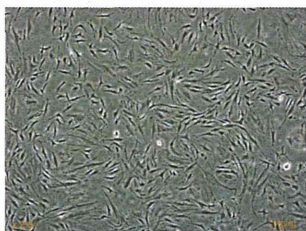


Day16 (継代培養)



12/5

Day22 (凍結保存)



12/11

凍結保存時  
 $6.45 \times 10^6$  cells  
生細胞率 96.3%