

長寿医療研究委託事業

総括研究報告書

歯髄幹細胞を用いた象牙質・歯髄再生医療によるウ蝕・歯髄疾患等のための治療技術の開発
研究代表者 中島美砂子 国立長寿医療センター 口腔疾患研究部口腔機能再生研究室長

研究要旨

超高齢社会において歯の健康は QOL 向上のために必須であり、深いウ蝕や歯髄炎でも極力歯髄を残して歯を延命化させるために歯髄・象牙質再生法を開発することは極めて重要である。本研究班では、歯を人工物により修復する従来のウ蝕・歯内治療技術を、歯髄・象牙質再生法により高性能化することを目的として、歯髄 CD105⁺ 細胞の安全で安定的な分取・増幅法の確立、歯髄幹細胞と再生根管充填材(遊走因子および scaffold)を用いた歯髄再生法の確立、および MMP3 の機能の検討と最適な scaffold による歯髄炎治療法の確立を試みた。その結果、以下のことが判明した。

1. 安全なヒト永久歯歯髄幹細胞分取法として、抗体ビーズ法を用いて、血管新生能・神経誘導能に優れた CD105⁺ 細胞を分取できることが示唆された。
2. 歯髄幹細胞の増幅条件および適合性指標の確立を目的として、高齢のイヌの歯髄 CD105⁺ 細胞の培養下での増幅と加齢に伴う形質変化を検討したところ、継代 10 代目で扁平化・巨大化し、老化が誘導され、増殖を停止することが判明した。
3. イヌ歯髄 CD105⁺ 細胞を免疫不全マウスの精巣あるいは皮下に移植してもがん化は認められなかった。
4. 前駆体 MMP3 はキモトリプシン処理により活性化できることが明らかとなった。
5. MMP3 は、組織再生関連因子群、CCN ファミリー遺伝子の発現誘導機能を有することが判明した。
6. MMP3 の抗炎症作用として、マクロファージからの NO 産生、IL6 および Cox2 の発現を抑制することが判明した。
7. MMP3 は、一部活性型および活性型両方において、カップ法およびディスク法にて抗菌性は認められなかった。
8. MMP3 はイヌ一部性歯髄炎において、歯髄炎治癒および歯髄再生を促進することが明らかとなった。
9. イヌ抜髄後根管内に歯髄 CD105⁺ 細胞および SDF1 あるいは GCSF とともに scaffold としてコラーゲン XYZ を移植すると歯髄組織が再生され、歯髄炎症・内部吸収・外部吸収などがみられなかったことから、コラーゲン XYZ は歯髄再生の scaffold として有用であることが示唆された。
10. MMP3 を含有する歯髄炎治療薬のための再生充填材として、2 週間程度徐放可能なスポンジ状キトサン scaffold を完成させることに成功した。
11. 歯髄・象牙質再生医療の実用化のための安全性・安定性を担保するために必

要な情報収集とその試験を行うための準備活動を行った。

本年度は、国内特許出願4件、海外特許出願2件、英文論文20論文、日本語論文7論文、総説1報、著書1報の研究成果を得た。

研究分担者

1. 本山昇（国立長寿医療センター研究所 室長）
2. 武井佳史（名古屋大学大学院医学系研究科 准教授）
3. 江口傑徳（国立長寿医療センター研究所 室長）
4. 川島伸之（東京医科歯科大学大学院 助教）
5. 中村洋（愛知学院大学歯学部 教授）
6. 林善彦（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授）
7. 松下健二（国立長寿医療センター研究所 部長）

研究協力者

1. 庵原耕一郎（国立長寿医療センター研究所 特任研究員）
2. 金森孝雄（愛知学院大学歯学部 教授）
3. 栗田賢一（愛知学院大学歯学部 教授）
4. 福田 理（愛知学院大学歯学部 教授）
5. 島垣昌明（東レ株式会社医療材事業企画推進室 主任部員）

A. 研究目的

超高齢社会において歯の健康は QOL 向上のために必須であり、深いウ蝕や歯髄炎でも極力歯髄を残して歯を延命化させるために歯髄・象牙質再生法を開発することは極めて重要である。近年、血管・神経再生能に優れた歯髄幹細胞 CD31⁻ SP 細胞を分取したが（19 公-2）、DNA 結合色素を用いるため安全性が問題となる。よって、本研究班では、歯髄・象牙質再生法により歯を人工物により修復する従来のウ蝕・歯内治療

技術を高性能化することを目的として、以下の3つの研究開発を試みた。(1)CD105 抗体ビーズ法を用いて、CD31⁻ SP 細胞と類似した形質をもつ歯髄 CD105⁺ 細胞を分取し、安全で安定的に分取・増幅する方法を確立する。(2) MMP3 の活性化、消炎・鎮痛作用、血管新生・歯髄再生作用、基質形成作用などの機能を解析し、MMP3 による歯髄炎治療法を非臨床研究にて確立する。(3) 全部性歯髄炎あるいは根尖性歯周炎において、根管内に再生根管充填材(遊走因子および scaffold)および歯髄幹細胞を移植し、歯髄を完全に再生する方法の安全性・有効性を非臨床研究にて確立する。

B. 研究方法

1. ヒト永久歯歯髄 CD105⁺ 細胞の安全な分取・増幅法の開発: ヒト抜去歯歯髄から、抗体ビーズ法により CD105⁺ 細胞を分取し、最適な培地と添加物を決定し、培養・増幅させた。増幅に伴う形質維持状態、ロット間での差異、多分化能、免疫原性を検討した（中島）。Pmda の薬事講習会等および前臨床試験受託会社等から安全性と安定性を担保するための試験に関して必要な情報を収集した（松下）。ヒト歯髄幹細胞の培養下での増幅過程及び加齢に伴う形質変化および老化マーカー発現を検討し、再生医療に用いる歯髄幹細胞の適合性指標を確立することを目的として、培養下での形質変化および老化マーカーの発現を検討した。まず、5 歳の高齢のイヌ歯髄 CD105⁺ 細胞を、各継代ごとに、形態観察を行い、細胞増殖能、SA-βgal による老化マーカー発現、p53 蛋白質発現を測定した。また、p53 の

ターゲット因子 p21 の mRNA 発現、および幹細胞マーカーの Rex1 と Stat3、さらには象牙芽細胞分化マーカー Dspp、Enamelysin の mRNA 発現を測定した。(本山)。さらに、ガン化のリスク評価を目的として、イヌ歯髓 CD105⁺ 細胞を免疫不全マウスの精巢および鼠脛部皮下へ移植して腫瘍形成を解析した(武井)。

2. MMP3 の機能の検討: MMP3 の cDNA をプラスミド pPSC8 上に組み換え(江口)、昆虫由来細胞とバキュロウィルスを援用し、シグナルペプチドを含む全長(前駆体)および Val52 よりも N 末端側を欠失したリコンビナントタンパク質(活性型)を精製した。安全で効率的かつ再現性のある MMP3 の活性化法を明らかにするため、キモトリプシンなどを用いて前駆体 MMP3 を活性化し、均一で安定な標品が得られる条件を選択した(金森)。組織再生因子群である CCN ファミリー遺伝子に対する MMP3 の効果および組織再生での MMP3 の役割を明らかにするため、COS7 細胞および 293 細胞に MMP3 の全長およびその変異体 PEX ドメイン(コラーゲン、TIMPs、HPI、DNA との分子間相互作用を担う)あるいは Cat ドメイン(プロテアーゼ活性を担う)をリポフェクションにより遺伝子導入し、18~30 時間後の組織再生因子 CCN2/CTGF の遺伝子発現変動を定量解析した(江口)。MMP3 の炎症細胞に対する作用を検討するため、ラット腹腔より採取したマクロファージを 24 時間培養後、LPS 単独、MMP3 単独あるいは両者を同時に添加し、一酸化窒素(NO)産生量を測定した。また同様の系を用いて、炎症性サイトカイン IL6、Cox2 発現を検討した(川島)。MMP3 の抗菌作用を検討するため、E. coli K-12 を用いてカップ法およびディスク法にて一部活性型および活性型 MMP3 の抗菌性試験を

行った(中村)。歯髓炎における MMP3 の作用を明らかにするため、歯髓 24 時間開放によるイヌ一部性歯髓炎モデルを作製し、歯髓面上に MMP3 を塗布し、経時的に歯髓の炎症反応消退および血管新生、歯髓再生を解析した(中島)。

3. 最適な再生歯科充填材の開発と安全性・安定性試験: 抜髄後歯髓再生における最適な再生根管充填材(scaffold と遊走因子)を明らかにするため、コラーゲン IP+III(1:1)、コラーゲン XYZ scaffold に混合した遊走因子(SDF1 あるいは GCSF)と自家歯髓 CD105⁺ 細胞を、イヌ抜髄後の根管内に注入し、形態学的観察を行い、最適な再生根管充填材を決定した(中島)。MMP3 歯髓炎治療薬における最適な scaffold を決定するため、硬組織再生に有効な組織親和性と生分解性を有するキトサン由来の多孔性担体(スポンジ状)を作製し、物理的特性を計測した。また、スポンジ体へ添加した bFGF の遊離・拡散を ELISA 法にて検討した(林)。

(倫理面への配慮)

上記研究は、動物倫理委員会および倫理・利益相反審査会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. ヒト永久歯歯髓 CD105⁺ 細胞の安全な分取・増幅法の開発:

抗体ビーズ法によりヒト歯髓 CD105⁺ 細胞を分取すると、フローサイトメトリーによる分取とほぼ同様に total 歯髓細胞の約 6% を占めていた。EGM2 を用いてこの CD105⁺ 細胞を培養・増幅すると 5 代目で 95% 以上形質が維持されていた。CD105⁺ 細胞は多分化能を有し、血管新生能・神経再生能が高く、また CD40, CD80, CD86, MHC class II の mRNA 発現は低く免疫原性が低いことが推察された(中島)。幹細胞の安全性試験に関しては製剤と同様の試験

を行う必要があるが、実施例が少ないこと、またソースとなる幹細胞が多様であることなどから、その都度必要事項を Pmda と協議する必要があることが明らかになった。安全性試験は GMP 準拠の施設（特区機器整備費により今年度中に整備完了の予定）において行われる必要がある（松下）。高齢のイヌの歯髄幹細胞は、継代 8 代目で増殖能の低下が生じ、しだいに p53 蛋白質の発現および p21 mRNA 発現の上昇がみられることから老化が誘導されることが明らかとなった。継代 12 代目では細胞は扁平化・巨大化し、増殖を停止し、老化マーカー SA- β gal を 100%発現することが判明した。また、継代を重ねても、幹細胞マーカーの Rex1 と Stat3 の mRNA 発現は維持され、象牙芽細胞分化マーカー Dspp および Enamelysin の mRNA 発現はみられなかったことから、継代による増殖能の欠失は細胞老化によることが示唆された（本山）。イヌ歯髄 CD105⁺ 細胞をヌードマウスへ移植したが、腫瘍形成はみられなかった（武井）。

2. MMP3 の機能の検討: 昆虫由来細胞とバキュロウイルスを援用して作製された日本農産前駆体 MMP3 はキモトリプシンを用いると約 15 倍活性化された。前駆体と活性体の混合物を含むヒト線維芽細胞由来 MMP3 (Millipore) はキモトリプシンにより約 30 倍活性化された（金森）。細胞内部で MMP3 の全長および PEX ドメインを発現させると CCN2 の発現誘導を認めた（江口）。腹腔マクロファージからの NO 産生量は、無刺激と比較して、LPS 添加により有意な増加が認められた。LPS とともに MMP3 を添加すると NO 産生量は有意に低下した。腹腔マクロファージに LPS を添加すると IL6、Cox2 といった炎症性メディエーターの mRNA 発現が増加したが、MMP3

を添加することによりその増加は有意に低下した。よって、MMP3 には LPS 刺激によるマクロファージからの炎症性メディエーターの発現および産生を抑える働きがあることが示唆された（川島）。MMP3 には E. Coli K-12 に対して抗菌作用がみられなかった（中村）。イヌ一部性歯髄炎モデルの歯髄面上に MMP3 を塗布すると 7 日後には歯髄炎の消退、治癒がみられ、14 日後には血管新生、歯髄再生がみられた（中島）。

3. 最適な再生歯科充填材の開発と安全性・安定性試験: 抜髄後歯髄再生においてコラーゲン XYZ は IP+III に比べて、再生歯髄内の炎症性細胞が有意に少なく、内部吸収像もほとんどみられなかった。また、遊走因子 SDF1 と GCSF を比較した場合、どちらも炎症はみられず、ほぼ同程度の歯髄組織再生がみられた（中島）。キトサン気孔径は各濃度とも 100-300 μ m となり、連通構造を呈した。キトサンの濃度が上昇すると、気孔径は小さくなり気孔壁の厚さが増加し、形態安定性が増した。キトサンの濃度が 2%群では 2 週間後に bFGF の約 70% が放出され、4%群では 2 週間後に 50% が放出された（林）。

D. 考察

1. ヒト永久歯歯髄 CD105⁺ 細胞の安全な分取・増幅法の開発:

以前私どもは、歯髄幹細胞分取にフローサイトメトリーを用いていたが、安全性の面から臨床応用には適さず、今回の CD105 抗体ビーズ法では、フローサイトメトリーとほぼ同等の効率で CD105⁺ 細胞が得られた。しかしながら、ヒトの永久歯から得られる歯髄が非常に少量の場合には、一度歯髄細胞を継代して増幅させた後に、

抗体ビーズ法を用いる必要があるという欠点がある。また、GMP レベルの抗体ビーズは現在のところ、CD34 に限定され、CD105 抗体ビーズは特注で非常に高価となることも明らかとなった（中島）。高齢のイヌ由来の歯髄幹細胞は今回早期に細胞老化が誘導されたが、テロメアの短縮が原因ではなく culture shock によると思われることから、今後は O₂ 濃度を 3% にした培養条件を検討する。細胞培養による細胞老化を回避できれば歯髄幹細胞の安定した増幅法を確立できる可能性が考えられる（本山）。イヌ歯髄 CD105⁺細胞を免疫不全マウスの精巣に移植した場合、移植後 50 日目までの検討時点で、重篤な腫瘍化を認めなかったが、今後、8 週間後のところを評価ポイントと定め、病理・組織学的に検討を行う予定である。さらに、1 2 週間後まで期間を拡張したがん化評価実験に着手する（武井）。

2. MMP3 の機能の検討:

昆虫細胞を用いて生産された前駆体 MMP3 はキモトリプシンで酵素活性を示す活性型に移行することが示され、一部活性型を含むヒト線維芽細胞由来の Millipore 社製 MMP3 と比べて半分の活性を有していた（金森）。今後歯髄炎治療薬として、安全性・安定性に優れた GMP レベルの MMP3 を創薬する上で、この昆虫細胞を用いた生産系の応用の可能性が示唆された（中島）。細胞内 MMP3 発現により組織再生因子の遺伝子発現が誘導されることが明らかとなり（江口）、生体内での MMP3 の機能における分子間相互作用のメカニズムを解明する上で、重要な手がかりとなることを示唆された（中島）。MMP3 は *in vitro* において

LPS に活性化されたマクロファージからの炎症性メディエーター産生を抑制することが明らかとなったが、その機序は不明である。一つの可能性としては、細胞表面および細胞外マトリックスの一部を MMP3 が分解することで、細胞表面および細胞外マトリックスにトラップされていた因子が放出され、その結果としてマクロファージの活性が沈静化した可能性が考えられる。また、MMP3 は浸潤してきたマクロファージの増殖を抑制することにより結果として炎症を抑制することが示唆される（川島）。MMP12 は抗菌性を有することが知られているが、今回の結果では、*E. coli* K12 に対して MMP3 は抗菌性がみられなかった。しかしながら、菌種により抗菌性に差があることも考えられるため、嫌気性菌などの他の菌種に対しても今後抗菌性を検討する。また、今回使用した MMP3 は活性の持続が短いため、より活性の持続の長い MMP3 を作成し、抗菌性の検討を行う必要があると考えられる（中村）。

3. 最適な再生歯科充填材の開発と安全性・安定性試験:

本来、歯髄組織は血管に富む組織であり、歯髄の血管系は栄養や酸素の供給源、代謝産物あるいは病原物質の排出路、歯髄の恒常性維持に重要な役割を有する。一方、歯髄の神経は血流、象牙細管内溶液の流れ、歯髄内圧の調節に重要な役割を有する。また、血管新生、免疫応答細胞あるいは炎症性細胞浸潤に関与し、炎症を調節して歯髄創傷による傷害を最小限にとどめ、歯髄の恒常性の維持、歯髄防御反応の強化に寄与するといわれている。根管内に歯髄を再生させるにあたっては、根管内の石灰化は最終的にこのような歯髄の様々な機能の喪失につながる。一方、歯髄の細胞外基質には

コラーゲンI型とともにIII型が含まれており、石灰化した象牙質基質にはIII型コラーゲンが含まれていない。よって、今回、コラーゲンI型とともにIII型を含む scaffold を検討した。その結果、抜髄後に再生された歯髄組織を解析すると、III型をすでに含有するコラーゲンXYZはIP+IIIに比べて、炎症性細胞が有意に少なく、内部吸収像も、初期石灰化像もほとんどみられなかった。また、コラーゲンXYZはすでに製造工程のウィルスバリデーションおよび安全性試験がなされているため、非臨床での安全性試験を行うのに有利であると考えられる。また、遊走因子SDF1とGCSFを比較した場合、どちらも炎症はみられず、ほぼ同程度の歯髄組織再生がみられた。GCSFはすでに製剤として認可されているため、臨床応用にはGCSFの方がSDF1に比べて有利と考えられる(中島)。MMP3歯髄炎治療薬における scaffold として、硬組織再生に有効な組織親和性と生分解性を有するキトサンのスポンジ体の作製・開発を行ったところ、キトサンの濃度を変化させることで気孔径、気孔率を変化させることが可能なことが明らかとなった。同時に、作製時のキトサン濃度が高いほど、持続的な徐放性が得られることも確認できた。このことは、スポンジ体作製時のキトサン濃度を調整することによって、MMP3の歯髄内部での機能特性に合わせた徐放が可能であることが判明した。今後のin vivoでの実験系へ活用する上で重要な特徴と考えられる(林)。

E. 結論

1. 安全なヒト永久歯歯髄幹細胞分取法として、抗体ビーズ法を用いて、血管新生能・神経誘導能に優れたCD105⁺細胞を分取できることが示唆された。

2. 高齢のイヌの歯髄CD105⁺細胞の培養下での増幅と加齢に伴う形質変化を検討したところ、継代10代目で扁平化・巨大化し、老化が誘導され、増殖を停止することが判明した。
3. イヌ歯髄CD105⁺細胞を免疫不全マウスの精巣あるいは皮下に移植してもがん化は認められなかった。
4. 前駆体MMP3はキモトリプシン処理により活性化できることが明らかとなった。
5. MMP3は、組織再生関連因子群、CCNファミリー遺伝子の発現誘導機能を有することが判明した。
6. MMP3の抗炎症作用として、マクロファージからのNO産生、IL6およびCox2の発現を抑制することが判明した。
7. MMP3は、一部活性型および非活性型両方において、カップ法およびディスク法にて抗菌性は認められなかった。
8. MMP3はイヌ一部性歯髄炎において、歯髄炎治癒・歯髄再生を促進することが明らかとなった。
9. イヌ抜髄後根管内に歯髄CD105⁺細胞およびSDF1あるいはGCSFとともに scaffold としてコラーゲンXYZを移植すると歯髄組織が再生され、歯髄炎症・内部吸収・外部吸収などがみられなかったことから、コラーゲンXYZは歯髄再生の scaffold として有用であることが示唆された。
10. MMP3を含有する歯髄炎治療薬のための再生充填材として、2週間程度徐放可能なスポンジ状キトサン scaffold を完成させることに成功した。
11. 歯髄・象牙質再生医療の実用化のための安全性・安定性を担保するために必要な情報収集とその試験を行うための準備活動を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iohara K., Zheng L., Ito M., Ishizaka R., Nakamura H., Into T., Matsushita K. and Nakashima M.: Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31⁺/CD146⁺ side population cells from a canine tooth. *Regen Med* 4(3): 377-385, 2009.
- 2) Inomata M., Into T., Nakashima M., Noguchi T. and 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(10): 2080-2089, 2009.
- 3) Zheng L., Amano K., Iohara K., Ito M., Imabayashi K., Into T., Matsushita K., Nakamura H. and Nakashima M.: Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. *Amer. J. Pathol.* 175(5), 1905-1914, 2009.
- 4) Ito M., Nakashima M., Yoshioka M. and Imaki J.: Organogenesis of the juxta-oral organ in mice. *J. Anat.* 215, 452-461, 2009.
- 5) 中島美砂子、庵原耕一郎、杉山昌彦：歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生 日本歯科評論 808, 70(2): 135-138, 2010.
- 6) Naka K., Hoshii T., Muraguchi T., Tadokoro Y., Ooshio T., Kondo Y., Nakao S., Motoyama N. and Hirao A.: TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature.* 463: 676-680, 2010.
- 7) Liu J., Cao L., Chen J., Song S., Lee IH., Quijano C., Liu H., Keyvanfar K., Chen H., Cao LY., Ahn BH., Kumar NG., Rovira II., Xu XL., van Lohuizen M., Motoyama N., Deng CX. and Finkel T.: Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature.* 459(7245): 387-392, 2009.
- 8) Nagano A., Ohno T., Shimizu K., Hara A., Yamamoto T., Kawai G., Saitou M., Takigami I., Matsushashi A., Yamada K. and Takei Y.: EWS/Fli-1 chimeric fusion gene up-regulates vascular endothelial growth factor-A. *Int J Cancer.* in press.
- 9) Mu P., Nagahara S., Makita N., Tarumi Y., Kadomatsu K. and Takei Y.: Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int J Cancer.* 125(12): 2978-2990, 2009.
- 10) Sakamoto I., Ito Y., Mizuno M., Suzuki Y., Sawai A., Tanaka A., Maruyama S., Takei Y., Yuzawa Y. and Matsuo S.: Lymphatic vessels develop in tubulo-interstitial fibrosis. *Kidney Int.* 75(8):828-838, 2009.
- 11) Kawata K., Kubota S., Eguchi T., Moritani NH., Shimo T., Kondo S., Nishida T., Minagi S. and Takigawa M.: Role of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 in regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Physiol.* 222(1):138-148, 2010.
- 12) Ohgawara T., Kubota S., Kawaki H., Kondo S., Eguchi T., Kurio N., Aoyama E., Sasaki A. and Takigawa M.: Regulation of chondrocytic phenotype by micro RNA 18a: involvement of Ccn2/Ctgf as a major target gene. *FEBS Lett.* 583(6):1006-1010, 2009 .
- 13) Kawashima N., Wadachi R., Suda H., Yeng T. and Parashos P.: Root Canal Medicaments. *Int Dent J.* 59(1):5-11, 2009.
- 14) Tsuji M., Yamasaki M., Amano K., Matsui H., Morimoto T. and Nakamura H.: Histochemical localization of neutral

- proteases released during development of rat periradicular lesion. Arch Oral Biol.54(12):1128-1135,2009.
- 15) Sato Y., Kishi J., Suzuki K., Nakamura H. and Hayakawa T.:Sonic extracts from a bacterium related to periapical disease activate gelatinase A and inactivate tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2.Int Endod J.42(12):1104-1111, 2009.
- 16) 尾関 伸明、川合 里絵、田中 毅、石塚 恭子、中田 和彦、中村 洋 : α 7 integrin 陽性ヒト骨格筋幹細胞の象牙質分化能 日本歯科保存学会誌 52(4):319-329, 2009.
- 17) Syudo M., Yamada., Yanagiguchi K., Matsunaga T. and Hayashi Y.: Early gene expression analyzed by a genome microarray and real-time PCR in osteoblasts cultured with a 4-META/MMA-TBB adhesive resin sealer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 107(3) : e77-e81,2009.
- 18) Matsunaga T., Ishizaki H., Tanabe S. and Hayashi Y.: Synchrotron radiation microbeam X-ray fluorescence analysis of zinc concentration in remineralized enamel *in situ*. Arch of Oral Biol .54(5):420-423,2009.
- 19) Ishizaki H., Yamada S., Yanagiguchi K., Koyama Z., Ikeda T. and Hayashi Y.: Pre-treatment with tannic acid inhibits the intracellular IL-8 production by chitosan in a human oral epithelial cancer cell line. Oral Med and Pathol .13(4):135-141,2009.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 松下健二: 未来歯科医学に向けて. 歯界展望. 114:781, 2009.
- 25) Meng X., Kawahara KI., Matsushita K., Nawa Y., Shrestha B., Kikuchi K., Sameshima H., Hashiguchi T. and Maruyama I.: Attenuation of LPS-induced iNOS expression by 1,5-anhydro-D-fructose. Biochem Biophys Res Commun. 387:42-46, 2009.
- 26) Inomata M., Ishihara Y., Matsuyama T., Imamura T., Maruyama I., Noguchi T. and Matsushita K.: Degradation of vascular endothelial thrombomodulin by arginine and lysine-specific cysteine proteases from *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontol. 80(9):1511-1517, 2009.
- 27) Jeong Y., Chaupin DF., Matsushita K., Yamakuchi M., Cameron S., Morell CN. and Lowenstein CJ.: Aldosterone activates endothelial exocytosis. Proc Natl Acad Sci USA. 106(10):3782-3787, 2009.
2. 著書・総説など
- 1) Nakashima M., Iohara K., and Sugiyama M.: Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. Cytokine & Growth Factor Reviews. 20(5-6): 435-440, 2009.
- 2) Eguchi T., Kubota S., Kawata K., Mukudai Y., Uehara J., Ohgawara T., Ibaragi S., Sasaki A., Kuboki T. and Takigawa M.: Novel Transcriptional Regulation of CCN2/CTGF by Nuclear Translocation of MMP3. Book

chapter in CCN proteins in health and disease
(Ed. Perbal B.) 2010 Springer.

3. 学会発表

- 1) 杉山昌彦、庵原耕一郎、脇田英明、服部宇、上田実、松下健二、中島美砂子：歯髄幹細胞を用いた脳虚血疾患治療の可能性 第 9 回日本再生医療学会総会：2010年3月19日, 広島
- 2) 瀧本晃陽、川島伸之、小泉悠、中島美砂子、須田英明：マクロファージの NO 産生能に対する MMP-3 の影響 第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会 2009年10月29日, 仙台
- 3) 松本 恵、鈴木今日子、大田久美子、新飯田俊平、本山 昇：DNA 損傷応答因子 Chk2 欠損による早期老化症モデルマウスの寿命延長 日本基礎老化学会第 32 回大会 2009年6月20日, 横浜
- 4) 武井佳史、柳原五吉：MicroRNA-516a-3p はヒトスキルス胃癌の腹膜播種性転移に関与する 第 68 回日本癌学会総会 2009年10月2日, 横浜市
- 5) 江口傑徳、河田かずみ、久保田聡、萩原真、小松寿明、杉浦進介、中島美砂子、滝川正春、松下健二：MMP3 はクロマチンに局在し、CCN ファミリー遺伝子を制御する。第 32 回日本分子生物学会 1P-0932(LBA). 2009年12月9日, 横浜
- 6) 江口傑徳、久保田聡、河田かずみ、椋代義樹、上原淳二、大河原敏博、伊原木聰一郎、佐々木朗、窪木拓男、滝川正春：ヒト MMP3 は新規の転写因子様機能により CTGF/CCN2 遺伝子を制御する 2009年11月8日, 岡山
- 7) 住吉久美、久保田聡、椋代義樹、近藤誠二、川木晴美、江口傑徳、大河原敏博、山城隆、滝川正春：Nucleophosmin/B23 による Chicken CCN2 遺伝子の軟骨細胞特異的転写後調節 第 51 回歯科基礎医学会 2009年9月9日, 新潟
- 8) 池田毅、石崎秀隆、松永常典、柳口嘉治郎、山田志津香、林善彦：キトサンスポンジに添加した bFGF の徐放性に関する研究. 日本歯科保存学会 2009 年度秋季大会 (第 131 回) 2009年10月30日, 仙台市
- 9) 山田志津香、池田毅、林善彦：フィッシュコラーゲンペプチドによるヒト骨芽細胞における石灰化の促進作用. 日本歯科保存学会 2009 年度秋季大会 (第 131 回) 2009年10月30日, 仙台市
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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 1 3 回生活習慣病対策研究会市民講座 2009年11月21日, 大阪
- 13) 坂下玲子、桑原未代子、松下健二、佐藤拓一、安彦友希、三重幸恵、井上昌一：高齢者の様々な口腔保健行動が口腔状態に及ぼす影響. 第 5 8 回日本口腔衛生学会・総会 2009年10月10日, 岐阜
- 14) Matsushita K: Vascular Biology in Oral Diseases. CVRI Special Seminar in University of Rochester, Oct 5. 2009, Rochester NY, USA.
- 15) 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

- 16) 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
- 17) 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
- 18) 位田毅彦、二ノ宮真之、瀬瀬 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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.
- 22) 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
4. シンポジウム
- 1) 中島美砂子：シンポジウムⅡ 象牙質・歯髄複合体再生療法の実状と展望「歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生」日本歯科保存学会春季大会 札幌 2009年6月12日
- 2) 中島美砂子：その2「発生工学カテゴリー」発生プロセスを踏まえた組織再生の可能性と課題 「歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生」 口腔 QOL 連続シンポジウム in Tokushima 2009-2010 2010年1月22日 徳島
- 3) 武井佳史：癌腹膜播種性転移を制御する miRNA の同定とその転移抑制の治療戦略 第14回神経芽腫研究会講演会 2010年3月6日、名古屋市
- 4) Takei Y. : Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association: Cancer Genomics, Epidemiology, and the Development of Novel Therapeutics. Feb 5-10, 2010. Hilton Waikoloa Village, Waikoloa, Hawaii, USA.
- 5) 武井佳史：バイオマテリアル・アテロコラーゲンを用いた革新的医薬の開発 アテロコラーゲン DDS 講演会(株式会社高研主催) 2009年11月20日、山形県鶴岡市
- 6) 武井佳史：RNA 干渉法による新規がん治療法 名城大学組換えDNA講演会(財団法人日比科学技術振興財団主催) 2009年11月19日、名古屋市
- 7) 武井佳史：アテロコラーゲンによる腫瘍特異的な siRNA 全身デリバリー法 第82回日本生化学会大会シンポジウム 遺伝子抑制法と遺伝子導入法の展開から見えるもの～新技術から医薬応用に向けての新しい研究展開～ 2009年10月24日、神戸市

5. 講演など

- 1) 中島美砂子：歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生 第6回長崎障害者支援再生医療研究会 2010年2月23日, 長崎
- 2) 中島美砂子：歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生 愛知学院大学口腔先端科学研究所講演会 2010年2月19日, 名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 中島美砂子、立花克郎
歯科用超音波薬剤導入システム及び歯科用超音波薬剤導入方法
特願 2009-285068 2009年12月16日
- 2) 中島美砂子、庵原耕一郎
非抜歯根管充填材及び非抜歯による歯組織再生方法
特願 2009-210441 2009年9月11日
- 3) 中島美砂子、杉山 昌彦
脳梗塞治療材及び脳組織再生方法
PCT JP2009-065024 2009年8月21日
- 4) 中島美砂子、中村洋
薬剤、歯科材料、及びスクリーニング方法
PCT JP2009-057410 2009年4月6日
- 5) 武井佳史、門松健治、村松喬
siRNAを用いたヒト血管内皮増殖因子の発現の強い抑制
特願 2003-141179 2009年12月22日特許成立
- 6) 山本徳則、小出直史、後藤百万、武井佳史
脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する前立腺癌治療用細胞製剤
特願 2009-277437 2009年12月7日