

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（21指-7）

主任研究者 中島 美砂子 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 室長

研究要旨

2年間全体について

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、若年および中高齢者の歯髄組織からの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. ヒト若年および中高齢者永久歯からの歯髄幹細胞分取法として、抗体ビーズ法はフローサイトメトリーに比べて安全であるが高価で分取効率が低いという欠点があった。よって、それに代わる方法として新たに膜分取法を開発し、血管新生能・神経誘導能に優れた CD105⁺ 細胞を多く含む歯髄幹細胞を分取できることが明らかとなった。
2. イヌ歯髄幹細胞を GMP 準拠の細胞加工施設（アイソレーター内）にて分取・増幅したところ、中高齢および若年ともに生存率 70%以上であり、無菌試験・エンドトキシン試験などにより感染の否定を明らかにした。
3. 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。中高齢のヒト膜分取歯髄幹細胞では、1 2 代目でも、形質が維持されていた。
4. 中高齢の継代 6 代目では、若年と比べて、細胞老化マーカーの Senescence-associated β -galactosidase (SA- β gal) 活性および老化関連因子の発現に差はみられなかった。
5. 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 1 6 週間後までがん化は認められなかった。長期継代細胞（継代数 50）において、染色体異常・核型異常を認めなかった。
6. 中高齢の歯髄幹細胞は若年と比べて免疫制御能に差はみられなかった。
7. GMP 準拠の細胞加工施設（アイソレーター内）での、歯髄幹細胞の調製のための標準作業手順書を作成し、基礎データを蓄積した。
8. 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。

9. 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。
10. MMP3 は、一部活性型および活性型両方において、*in vitro* において、カップ法、ペーパーディスク法あるいは希釈法ともに、MMP3 の抗菌作用は認められなかった。
11. MMP3 の抗炎症作用として、マクロファージからの NO 産生、IL-1 β 、TNF α および Cox2 の発現を抑制することが判明した。
12. 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。
13. 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 TE (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 TE (XYZ) は歯髄再生の scaffold として有用であることが示唆された。中高齢(5歳)のイヌにおいても、若年と同様に、歯髄 CD105⁺ 細胞および SDF1 をコラーゲン TE (XYZ) とともに移植すると歯髄組織が再生された。
14. MMP3 を含有する歯髄炎治療薬のための再生充填材として、MMP3 などの液性因子を 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。また、機械的物性も従来のコラーゲンタイプのものより強度があることが判明し、安全性も実証できた。
15. 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。
16. 高齢者の健全歯維持の重要性を明らかにするため、地域支援型オーラルヘルスプロモーション技法を検討した。

2 年全体で、国内特許出願 4 件、海外特許出願 8 件、英文論文 40 論文、日本語論文 16 論文、著書 1 報、学会発表及び講演 88 件の研究成果を得た。

平成 22 年度について

本年度は、抗体ビーズ法に比べて効率が高く安価な膜分取法を開発し、中高齢者からの歯髄幹細胞の安全で安定的な分取・増幅法の確立、中高齢のイヌ歯髄幹細胞と最適な再生根管充填材(遊走因子および scaffold)を用いた歯髄再生法の確立、MMP3 の抗炎症作用の検討、および歯髄炎治療薬の scaffold としてのキトサンスポンジの機械的物性、安全性を検討した。その結果、以下のことが判明した。

1. ヒト中高齢者永久歯からの歯髄幹細胞分取法として、膜分取法を用いて、若年と同様に、血管新生能・神経誘導能に優れた CD105⁺ 細胞を多く含む歯髄幹細胞を分取できることが明らかとなった。
2. イヌ歯髄幹細胞を GMP 準拠の細胞加工施設(アイソレーター内)にて分取・増幅したところ、中高齢および若年ともに生存率 70%以上であり、無菌試験・エンドトキシン試験などにより感染の否定を明らかにした。
3. 中高齢のヒト膜分取歯髄幹細胞では、12代目でも、形質が維持されていた。
4. 中高齢の継代6代目では、若年と比べて、細胞老化マーカーの Senescence-associated β -galactosidase (SA- β gal) 活性および老化関連因子の発現に差はみられなかった。

5. 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 16 週間後までがん化は認められなかった。長期継代細胞（継代数 50）において、染色体異常・核型異常を認められなかった。
6. 中高齢の歯髄幹細胞は若年と比べて免疫制御能に差はみられなかった。
7. GMP 準拠の細胞加工施設（アイソレーター内）での、歯髄幹細胞の調製のための標準作業手順書を作成し、基礎データを蓄積した。
8. MMP3 は、一部活性型および活性型両方において、in vitro において、希釈法による抗菌性試験においても、ペーパーディスク法と同様に、MMP3 の抗菌作用は認められなかった。
9. MMP3 の抗炎症作用として、マクロファージからの炎症メディエーター、NO 産生、IL-1 β 、TNF α および Cox2 の発現を抑制することが判明した。
10. MMP3 はイヌ一部性歯髄炎において、歯髄再生ばかりでなく、象牙芽細胞の分化促進、神経再生を促進することが示唆された。
11. イヌ中高齢（5 歳）において、若年と同様に、歯髄 CD105⁺ 細胞および SDF1 をコラーゲン TE (XYZ) とともに移植すると歯髄組織が再生された。
12. 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 は、機械的物性も従来のコラーゲンタイプのものより強度があることが判明し、安全性も実証できた。
13. 高齢者の健全歯維持の重要性を明らかにするため、地域支援型オーラルヘルスプロモーション技法を検討した。

平成 22 年度で、国内特許出願 2 件、海外特許出願 4 件、英文論文 18 論文、日本語論文 9 論文、著書 1 報、学会発表及び講演件の研究成果を得た。

主任研究者

中島 美砂子 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 室長

分担研究者

松下 健二 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 部長

本山 昇 国立長寿医療研究センター 加齢健康脳科学研究部 室長

中村 洋 愛知学院大学 歯学部 教授

林 善彦 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 教授

川島 伸之 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 助教

武井 佳史 名古屋大学大学院 医学系研究科 准教授

江口 傑徳 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 室長（平成 21 年度のみ）

研究協力者

庵原耕一郎（国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 研究員）

金森孝雄（愛知学院大学 歯学部 教授）

栗田賢一（愛知学院大学 歯学部 教授）

福田 理（愛知学院大学 歯学部 教授）

研究期間 平成21年6月26日～平成23年5月27日

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、ウ蝕が深くて露髄した場合あるいは歯髄炎を起こした場合でも極力歯髄を残して歯を延命化させることが必要である。そのために私どもは歯髄・象牙質を再生させる新しいウ蝕・歯髄炎治療法の開発を行ってきた(1)。近年、私どもは血管・神経再生能に優れた歯髄幹細胞 CD31⁻ SP 細胞を分取・増幅させ、下肢虚血部に移植すると血管新生が促進され(2)、脳梗塞部に移植すると神経再生促進、運動麻痺回復がみられることを明らかにした。しかしながら、CD31⁻ SP 細胞は分取に DNA 結合色素を用いるため安全性が問題となる。よって、類似した形質をもつ CD105⁺細胞を分取した。一方、歯髄 CD31⁻ SP 細胞は MMP3 を高発現しており(2)、歯髄創傷治癒過程において MMP3 mRNA 発現は上昇する。in vitro では MMP3 は血管内皮細胞の増殖、遊走を促進し、アポトーシスを抑制し、in vivo では MMP3 は血管新生、歯髄創傷治癒、象牙質形成を促進する(3)。イヌの歯髄炎モデルにおいても MMP3 は血管新生、歯髄再生を促進した。以上のことから、MMP3 を歯髄炎治療薬として応用する可能性が示唆された。したがって本研究はまず、中高齢者の歯から歯髄幹細胞画分を GMP に準拠した施設内（アイソレーター内）で分取し、若年者由来の歯髄幹細胞画分と比較しながら、安全で安定的に分取・増幅する方法を確立する。また、中高齢のイヌ全部性歯髄炎において、抜髄、根管拡大清掃後、再生根管充填材(遊走因子および scaffold) および自家歯髄幹細胞を根管内に注入し歯髄を完全に再生する方法の有効性を検討する。また、MMP3 の活性化、消炎・鎮痛作用、血管新生・歯髄再生作用を細菌学、生化学、病理学、分子生物学、生理学の多方面から解析し、一部性歯髄炎に有効な MMP3 による歯髄炎治療法を確立する。

1. Nakashima M. and Akamine A., J. Endod, 31(12), 711-718, 2005.
2. Iohara K., et al., Stem Cells, 26, 2408-2418, 2008.
3. Zheng L., et al., Amer. J. Pathol, 175(5), 1905-1914, 2009.

B. 研究方法

2年間全体について

1) ヒト永久歯歯髄 CD105⁺細胞の安全な分取・増幅法の開発

1. 細胞培養法（中島・庵原）：まず、中高齢および若年のイヌ抜去歯歯髄から、抗体ビーズ法、さらに平成22年度には新たに開発した膜分取法にて CD105⁺歯髄幹細胞を分取し、10%イヌ血清含有 DMEM にて培養・増幅させ、イヌ歯髄幹細胞培養法を確立した。ついで、ヒト中高齢者および若年者の抜去歯歯髄からイヌと同様に歯髄幹細胞を分取し、その特徴化を行った。
2. 安全性試験（庵原・松下）：アイソレーター内（GMP 準拠細胞加工施設）で膜分取法により分取・増幅した中高齢および若年の歯髄幹細胞の生存率、細胞形態を観察し、無菌試験・エンドトキシン試

験を行った。

3. 安定性試験（中島）：ヒト中高齢者および若年者由来歯髄幹細胞ともに、6代目および12代目において、幹細胞表面マーカー、多分化能、増殖能、遊走能の測定による形質の維持を検討した。
4. ガン化のリスク評価（武井）：イヌ歯髄幹細胞を免疫不全動物の精巣および鼠径部皮下へ移植して16週間後の腫瘍形成を評価した。また長期継代細胞（継代数50）において、染色体異常・核型異常の有無をQバンド解析にて検討した。
5. 加齢に伴う形質変化（本山）：中高齢のイヌの歯髄幹細胞の培養増幅に伴う細胞老化を検討するため、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。同様に、ヒト中高齢者の歯髄幹細胞の老化形質を若年と比較した。
6. 免疫的制御のメカニズム（中島）：ヒト中高齢者の歯髄幹細胞を用いて MLR assay を行い、若年者と比較した。
7. SOP 作製（中島）：自己中高齢者の歯髄幹細胞品質マニュアルとして、1. 理念・組織、2. 培養歯髄製品標準書、3. 作業手順書、4. 記録書を作製し、各項目において、GMP 準拠細胞加工施設の整備を進めながら、変更および追記を行った。

2) MMP3 の機能の検討

1. MMP3 の活性化（金森）：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。
2. MMP3 機能ドメインによる遺伝子発現制御（江口）：MMP3 の cDNA をプラスミド pPSC8 上に組み換え、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。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。
3. MMP3 の抗菌作用（中村）：通性嫌気性菌 (*Escherichia coli* K-12, *Enterococcus faecalis*)、偏性嫌気性菌 (*Eubacterium limosum*, *Streptococcus intermedius*) および真菌 (*Candida albicans*) を用いて、カップ法、ディスク法、希釈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。また、マクロファージ内での殺菌効果が認められている MMP12 をコントロールとして同様の実験を行った。
4. MMP3 による炎症性メディエーター発現の制御（川島）：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、あるいは株化マクロファージを用いて、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, IL-1β, TNFα, Cox2 mRNA 発現を検討した。

5. イヌ歯髄炎モデルにおける MMP3 の作用 (中島・中村) : イヌ一部性歯髄炎モデルを作製し、MMP3 を塗布し、歯髄の炎症抑制、歯髄・象牙質再生を形態学的・分子生物学的に明らかにした。

3) 最適な再生歯科充填材の開発と安全性・安定性試験

1. 抜髄後歯髄再生における最適な再生根管充填材 (中島) : 抜髄後歯髄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)と自家歯髄 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。コラーゲン XYZ (TE)に混合した遊走因子 SDF1 と歯髄幹細胞を、中高齢のイヌ抜髄後の根管内に自家移植し、歯髄再生を検討した。
2. MMP3 歯髄炎治療薬における scaffold (林) : 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。また、安全性も検討した。

平成 22 年度について

1) ヒト永久歯歯髄 CD105⁺ 細胞の安全な分取・増幅法の開発

1. 細胞培養法 (中島・庵原) : 中高齢および若年のイヌ抜去歯髄から、膜分取法にて CD105 陽性率の高い歯髄幹細胞を分取し、10%イヌ血清含有 DMEM にて培養・増幅させ、イヌ歯髄幹細胞培養法を確立した。ついで、ヒト中高齢者および若年者の抜去歯髄からイヌと同様に歯髄幹細胞を分取し、その特徴化を行った。
2. 安全性試験 (庵原・松下) : アイソレーター内 (GMP 準拠細胞加工施設) で膜分取法により分取・増幅した中高齢および若年の歯髄幹細胞の生存率、細胞形態を観察し、無菌試験・エンドトキシン試験を行った。
3. 安定性試験 (中島) : ヒト中高齢者および若年者由来歯髄幹細胞ともに、6 代目および 12 代目において、幹細胞表面マーカー、多分化能、増殖能、遊走能、アルカリフォスファターゼ活性の測定による形質の維持を検討した。
4. ガン化のリスク評価 (武井) : イヌ歯髄幹細胞を免疫不全動物の精巣および鼠径部皮下へ移植して 16 週間後の腫瘍形成を評価した。また長期継代細胞 (継代数 50) において、染色体異常・核型異常の有無を Q バンド解析にて検討した。
5. 加齢に伴う形質変化 (本山) : ヒト中高齢者の 6 代目の歯髄幹細胞の老化形質を若年と比較した。すなわち、SA-βgal 活性による老化マーカー発現、細胞老化誘導因子 (p21, p16) および Senescence-associated secretory phenotype (SASP) 関連因子(IL-8, GROα, IL-6, IL-1β, PAI-I)の mRNA 発現を比較した。
6. 免疫的制御のメカニズム (中島) : ヒト中高齢者の歯髄幹細胞の培養上清を用いて MLR assay を行い、若年者と比較した。
7. SOP 作製 (中島) : 自己中高齢者の歯髄幹細胞品質マニュアルとして、アイソレーターの整備を進めながら、変更および追記を行った。

2) MMP3 の機能の検討

1. MMP3 の抗菌作用（中村）：通性嫌気性菌（*Escherichia coli* K-12、*Enterococcus faecalis*）、偏性嫌気性菌（*Eubacterium limosum*、*Streptococcus intermedius*）および真菌（*Candida albicans*）を用いて、希釈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。また、マクロファージ内での殺菌効果が認められている MMP12 をコントロールとして同様の試験を行った。
2. MMP3 による炎症性メディエーター発現の制御（川島）：マクロファージ株化細胞に LPS 単独、MMP3(100ng/ml)単独あるいは両者を同時に添加し、NO 産生量測定および炎症性サイトカイン IL-1 β 、TNF α 、Cox2 mRNA 発現を検討した。
3. イヌ歯髄炎モデルにおける MMP3 の作用（中島・中村）：イヌ一部性歯髄炎モデルに MMP3 を塗布し、神経再生、歯髄・象牙質再生を形態学的・分子生物学的に検討した。

3) 最適な再生歯科充填材の開発と安全性・安定性試験

1. 抜髄後歯髄再生における最適な再生根管充填材(中島)：中高齢のイヌにおいて、コラーゲン XYZ (TE) に混合した遊走因子 SDF1 と歯髄幹細胞を、抜髄後の根管に自家移植し、歯髄再生を検討した。
2. MMP3 歯髄炎治療薬における scaffold (林)：キトサン由来の多孔性担体（スポンジ状）へ添加した bFGF の遊離・拡散を ELISA 法にて検討した。また、静的引張試験による機械的物性および安全性も検討した。

（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

2年間全体について

1) ヒト永久歯歯髄 CD105⁺ 細胞の安全な分取・増幅法の開発

1. 細胞培養法（中島・庵原）：抗体ビーズ法によりヒト歯髄 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 歯髄細胞の約 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。膜分取法により CD105 陽性率の高い歯髄幹細胞がヒト中高齢者および若年者ともに分取できた。幹細胞マーカー発現も 90% 以上で、高い血管誘導能、神経誘導能、遊走能、増殖能を有し、低いアルカリフォスファターゼ活性を示した。
2. 安全性試験（庵原・松下）：アイソレーター内で膜分取・増幅した中高齢および若年の歯髄幹細胞は生存率 70% 以上で、細胞形態は 12 代以上継代しても扁平ではなく、無菌試験・エンドトキシン試験で陰性であった。
3. 安定性試験（中島）：ヒト中高齢者および若年者歯髄幹細胞ともに、12 代目でも 6 代目と比較して、幹細胞表面マーカー、多分化能、増殖能、遊走能、アルカリフォスファターゼ活性などが変わらず、形質が維持されていた。

4. ガン化のリスク評価（武井）：イヌ歯髄幹細胞を免疫不全動物の精巣および鼠径部皮下へ移植して 16 週間後も腫瘍形成はみられなかった。また長期継代細胞（継代数 50）において、染色体異常・核型異常はみられなかった。
5. 加齢に伴う形質変化（本山）：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-βgal 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。一方、ヒト中高齢の歯髄細胞の継代 6 代目では、若年と比べて、細胞老化マーカーの Senescence-associated β-galactosidase (SA-βgal) 活性および細胞老化関連因子遺伝子発現に差はみられなかった。
6. 免疫的制御のメカニズム（中島）：ヒト中高齢者の歯髄幹細胞は、若年と同様に末梢血単核球の増殖抑制能を有し、免疫制御能が高いことが示唆された。
7. SOP 作製（中島）：自己中高齢者の歯髄幹細胞品質マニュアルを作製し、アイソレーターの整備を進めながら、準備室作業手順書、細胞加工施設内作業手順書（手洗い、入退室、パスボックス、CO₂ インキュベーター、滅菌作業、細胞培養操作、作業環境管理など）を作製した。

2) MMP3 の機能の検討

1. MMP3 の活性化（金森）：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。
2. MMP3 機能ドメインによる遺伝子発現制御（江口）：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。
3. MMP3 の抗菌作用（中村）：一部活性型および活性型 MMP3 の抗菌性試験の結果、MMP12 と同様に、抗菌性は認められなかった。
4. MMP3 による炎症性メディエーター発現の制御（川島）：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、IL-1β、TNFα 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。
5. イヌ歯髄炎モデルにおける MMP3 の作用（中島・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、28 日後には歯髄上部に基質形成あるいは象牙質形成、さらには歯髄組織内神経再生がみられた。

3) 最適な再生歯科充填材の開発と安全性・安定性試験

1. 抜髄後歯髄再生における最適な再生根管充填材（中島）：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。コラーゲン XYZ (TE)に混合した遊走因子 SDF1 と歯髄幹細胞を、中高齢のイヌ抜髄後の根管に自家移植すると、若年と同様に歯髄が再生された。

2. MMP3 歯髄炎治療薬における scaffold (林) : 作製されたキトサン多孔性担体 (スポンジ状) は、キトサン気孔径が各濃度とも 100-300 μm 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。機械的物性は従来のコラーゲンタイプのものより強度があった。また、キトサンスポンジはエンドトキシンの残量が安全性基準レベル以下であった。

平成 22 年度について

1) ヒト永久歯歯髄 CD105⁺ 細胞の安全な分取・増幅法の開発

1. 細胞培養法 (中島・庵原) : ヒト中高齢者および若年者より、膜分取法を用いて CD105 陽性率の高い歯髄幹細胞を分取したところ、幹細胞マーカー発現は 90%以上で、高い血管誘導能、神経誘導能、遊走能、増殖能を有し、低いアルカリフォスファターゼ活性を示した。
2. 安全性試験 (庵原・松下) : アイソレーター内で膜分取・増幅した中高齢および若年の歯髄幹細胞は生存率 70%以上で、細胞形態は 12 代以上継代しても扁平ではなく、無菌試験・エンドトキシン試験で陰性であった。
3. 安定性試験 (中島) : ヒト中高齢者および若年者歯髄幹細胞ともに、12 代目でも 6 代目と比較して、幹細胞表面マーカー、多分化能、増殖能、遊走能、アルカリフォスファターゼ活性などが変わらず、形質が維持されていた。
4. ガン化のリスク評価 (武井) : イヌ歯髄幹細胞を免疫不全動物の精巣および鼠径部皮下へ移植して 16 週間後も腫瘍形成はみられなかった。また長期継代細胞 (継代数 50) において、染色体異常・核型異常はみられなかった。
5. 加齢に伴う形質変化 (本山) : ヒト中高齢者の歯髄細胞の継代 6 代目において、若年と比べて、細胞老化マーカーの Senescence-associated β -galactosidase (SA- β gal) 活性および細胞老化関連因子遺伝子発現に差はみられなかった。
6. 免疫的制御のメカニズム (中島) : ヒト中高齢者の歯髄幹細胞は、若年と同様に末梢血単核球の増殖抑制能を有していた。よって、免疫制御能が高いことが示唆された。
7. SOP 作製 (中島) : 自己中高齢者の歯髄幹細胞品質マニュアルを作製し、アイソレーターの整備を進めながら、準備室作業手順書、細胞加工施設内作業手順書 (手洗い、入退室、パスボックス、CO₂ インキュベーター、滅菌作業、細胞培養操作、作業環境管理など) を作製した。

2) MMP3 の機能の検討

1. MMP3 の抗菌作用 (中村) : 希釈法による一部活性型および活性型 MMP3 の抗菌性試験の結果、MMP12 と同様に、抗菌性は認められなかった。

2. MMP3 による炎症性メディエーター発現の制御（川島）：株化マクロファージに LPS を添加すると NO 産生が増加したが、MMP3 を添加することによりその増加は有意に低下し、IL-1 β 、TNF α 、Cox2 などの炎症性メディエーターの mRNA 発現も同様の傾向がみられた。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。

3. イヌ歯髄炎モデルにおける MMP3 の作用（中島・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 28 日後には歯髄上部に基質形成あるいは象牙質形成、さらには歯髄組織内神経再生がみられた。

3) 最適な再生歯科充填材の開発と安全性・安定性試験

1. 抜髄後歯髄再生における最適な再生根管充填材（中島）：中高齢のイヌにおいて、コラーゲン XYZ (TE) に混合した遊走因子 SDF1 と自家歯髄幹細胞を、抜髄後の根管内に移植すると、若年と同様に歯髄が再生された。

2. MMP3 歯髄炎治療薬における scaffold（林）：キトサンスポンジの機械的物性は従来のコラーゲンタイプのものより強度があり、エンドトキシンの残量は安全性基準レベル以下であった。

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細胞の数は非常に少量であり、市販の磁気抗体ビーズ法では少量の細胞に対して吸着効率が悪く、細胞数が少ない場合喪失し、分取効率が悪いという欠点がある。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。よって、私どもは新たに膜分取器を開発し、中高齢の歯髄細胞からでも若年と同様に、高効率に安価に安全に歯髄幹細胞が分取できることを明らかにした。この膜分取した歯髄幹細胞は、CD105 陽性率が高く、CD105⁺細胞と同様に、血管新生能、神経誘導能、増殖能、遊走能が高く、イヌの抜髄後根管内に自家移植すると、CD105⁺細胞移植時と同様に歯髄が再生されたことから、歯髄再生に有用であると考えられる（中島）。

ヒト中高齢の歯髄中に含まれる歯髄幹細胞は若年に比較して少ないが、分取・増幅された膜分取歯髄幹細胞は幹細胞表面マーカー発現、多分化能、増殖能、遊走能、アルカリフォスファターゼ活性などの歯髄幹細胞の形質は若年と変わらなかった。また、若年と同様に 1 2 代継代しても形質は変わらなかった。よって、中高齢者においても、不用の智歯などがあれば、自家歯髄幹細胞が供給可能であることが示唆された。また、ヒト中高齢者由来の歯髄幹細胞でも、細胞老化形質にほとんど差がみられないという結果が得られた。今後、さらに症例数を増やし、検討を加え、ヒト歯髄幹細胞を安全かつ安定に増幅する方法を確立する予定である（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 1 6 週までで腫瘍化を認められず、染色体・核型異常がみられなかった。本検討は、歯髄再生治療法の安全性評価試験のガイドライン作成の一助となると考えられる（武井）。

さらに、MLR assay により、歯髄幹細胞の培養上清による末梢血単核球の増殖抑制が示されたことから、歯髄幹細胞は免疫制御能が高く、同種移植においても有利に働く可能性が示唆された。イヌの歯髄再生における同種移植でも良好な結果が得られている。幹細胞は一般に免疫制御能が高いことが知られているが、そのメカニズムは未だ明らかではない。今後、炎症刺激により歯髄幹細胞から分泌される蛋白質を系統的にプロテオーム解析して、免疫調整に関与する蛋白質を同定する予定である（中島）。

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、MMP3 とともに抗菌性がみられなかった。MMP12 の殺菌作用はマクロファージの食作用に関係していることが示唆されている。よって、MMPs による歯髄の無菌化は難しいと考えられる（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 (TE) 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 (TE) 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. ヒト中高齢者永久歯からの歯髄幹細胞分取法として、膜分取法を用いて、若年と同様に、血管新生能・神経誘導能に優れた CD105⁺ 細胞を多く含む歯髄幹細胞を分取できることが明らかとなった。
2. イヌ歯髄幹細胞を GMP 準拠の細胞加工施設（アイソレーター内）にて分取・増幅したところ、中高齢および若年ともに生存率 70%以上であり、無菌試験・エンドトキシン試験・マイコプラズマ否定試験などにより感染の否定を明らかにした。
3. 中高齢のヒト膜分取歯髄幹細胞では、1 2 代目でも、形質が維持されていた。
4. 中高齢の継代 6 代目では、若年と比べて、細胞老化マーカーおよび老化関連因子の発現に差はみられなかった。
5. 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 1 6 週間後までがん化は認められず、長期継代細胞（継代数 50）において、染色体異常・核型異常を認められなかった。
6. 中高齢の歯髄幹細胞は若年と比べて免疫制御能に差はみられなかった。
7. GMP 準拠の細胞加工施設（アイソレーター内）での、歯髄幹細胞の調製のための標準作業手順書を作成し、基礎データを蓄積した。
8. MMP3 は、一部活性型および活性型両方において MMP3 の抗菌作用は認められなかった。
9. MMP3 の抗炎症作用として、マクロファージからの炎症メディエーター、NO 産生、IL-1 β 、TNF α および Cox2 の発現を抑制することが判明した。
10. MMP3 はイヌ一部性歯髄炎において、歯髄再生ばかりでなく、象牙芽細胞の分化促進、神経再生を促進することが示唆された。
11. イヌ中高齢（5 歳）において、若年と同様に、歯髄 CD105⁺ 細胞および SDF1 をコラーゲン TE (XYZ) とともに移植すると歯髄組織が再生された。
12. 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 は、機械的物性も従来のコラーゲンタイプのものより強度があることが判明し、安全性も実証できた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成21年度

- 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 : $\alpha 7$ 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.
- 28) 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.

- 29) 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.

平成 22 年度

- 1) 中島美砂子、庵原耕一郎：歯の健康維持・延命化をめざした歯科再生医療による新しい齲蝕・歯髄炎治療法の開発. 小児歯科学雑誌. 48(6): 653-658, 2010.
- 2) 中島美砂子：高齢者の歯の病態と歯再生医療 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. P107-113, 2010.
- 3) Nakashima M. and Iohara K.: Regeneration of dental pulp by stem cells. Adv. Dent Res. 2011 in press.
- 4) Sugiyama M., Iohara K., Wakita H., Hattori H., Ueda M., Matsushita K. and Nakashima M.: Dental Pulp-Derived CD31(-)/CD146(-) Side Population Stem/Progenitor Cells Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. Tissue Eng. Part A. 17(9-10): 1303-1311, 2011.
- 5) Iohara K., Imabayashi K., Ishizaka R., Watanabe A., Nabekura J., Ito M., Matsushita K., Nakamura H. and Nakashima M.: Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105⁺ stem cells with SDF-1. Tissue Eng. Part A. Mar. 18, 2011 in press.
- 6) 中島美砂子、庵原耕一郎：歯の健康維持、延命化をめざした歯科再生医療による新しいう蝕・歯髄炎治療法の開発. 日本歯科保存学会誌. 54(3): 157-161, 2011.
- 7) Niida H., Murata K., Shimada M., Ogawa K., Ohta K., Suzuki K., Fujigaki H., Khaw A.K., Banerjee B., Hande M.P., Miyamoto T., Miyoshi I., Shirai T., Motoyama N., Delhase M., Appella E. and Nakanishi M.: Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumor susceptibility in vivo. EMBO J. 29: 3558-3570, 2010.
- 8) Kim S.S., Choo D.W., Shin D., Baek H.J., Kim T.H., Motoyama N., De Coster B.M., Gueulette J., Furusawa Y., Ando K. and Cho K.H.: In vivo radiobiological characterization of proton beam at the National Cancer Center in Korea: Effect of the CHK2 mutation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 79: 559-562, 2011.
- 9) Nagano A., Ohno T., Shimizu K., Hara A., Yamamoto T., Kawai G., Saitou M., Takigami I., Matsuhashi A., Yamada K. and Takei Y.: WS/Fli-1 chimeric fusion gene up-regulates vascular endothelial growth factor-A. Int J Cancer. 126: 2790-2998, 2010.
- 10) Mihara K., Yanagihara K., Takigahira M., Kitanaka A., Imai C., Bhattacharyya J., Kubo T., Takei Y., Yasunaga S., Takihara Y. and Kimura A.: Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Br J Haematol. 151: 37-46, 2010.
- 11) Takei Y*, Takigahira M., Tarumi Y., Mihara K. and Yanagihara K., (*, corresponding author): The metastasis-associated microRNA miR-516a-3p is a novel therapeutic target for inhibiting peritoneal dissemination of human scirrhus gastric cancer. Cancer Res. 71: 1442-1453, 2011.

- 12) Sakamoto K., Bu G., Chen S., Takei Y., Hibi K., Kodera Y., McCormick LM., Nakao A., Noda M., Muramatsu T. and Kadomatsu K.: The premature ligand-receptor interaction during biosynthesis limits the production of growth factor midkine and its receptor LDL receptor-related protein 1 (LRP1). *J Biol Chem.* , in press.
- 13) Sawai A., Ito Y, Mizuno M., Suzuki Y., Toda S., Ito I., Hattori R., Matsukawa Y., Gotoh M., Takei Y., Yuzawa Y. and Matsuo S.: Peritoneal macrophage infiltration is correlated with baseline peritoneal solute transport rate in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* , in press.
- 14) Kishida S., Ikematsu S., Takei Y. and Kadomatsu K.: Patients: Plasma growth factor midkine as a prognostic growth factor. *Tumors of the central nervous system.* , in press.
- 15) Wang S., Kawashima N., Sakamoto K., Katsube K., Umezawa A. and Suda H.: Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 400(1): 39-45, 2010.
- 16) Wang H.G., Kawashima N., Iwata T., Xu J., Takahashi S., Sugiyama T. and Suda H.: Differentiation of Odontoblasts Is Negatively Regulated by MEPE via Its C-Terminal Fragment. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 398(3): 406-412, 2010.
- 17) Sun H., Kawashima N., Xu J., Takahashi S. and Suda H.: Expression of Notch-Signalling-related Genes in Normal and Differentiating Rat Dental Pulp Cells. *Austrarian Endodontic Journal.* 36(2): 54-58, 2010.
- 18) Wang H.G., Kawashima N., Iwata T., Xu J., Takahashi S., Sugiyama T. and Suda H.: MEPE Activated by Furin Promotes Pulpal Cell Adhesion. *Jouranal of Dental Research.* 90(4): 529-534, 2011.
- 19) Hayashi Y.: Application of chitosan oligosaccharide and glucosamine in dentistry. In *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*, ed. Se-Kwon Kim, CRC Press- Taylor & Francis Group :447-460, 2010.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 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. *肥満と糖尿病.* 9(5): 729-731, 2010.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) Abiko Y., Sato T., Matsushita K., Sakashita R. and 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.
- 27) Kanno Y., Ishisaki A., Nakajima K., Nishihara T., Toyoshima T., Okada K., Ueshima S., Matsushita K.,

Matsuo O. and Matsuno H.: Plasminogen/plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function. J Biol Chem. 86(11): 8952-8960, 2011.

著書

- 1) 中島美砂子： 歯髄再生療法の現状と未来 第 1 1 章 pp. 313-321. 治癒の歯内療法 シリーズ MI に基づく歯科臨床 vo.2 月星光博・福西一浩著 クインテッセンス出版株式会社 2010.

2. 学会発表

平成 21 年度

- 1) 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
- 2) 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
- 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、伊原木聡一郎、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 13 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58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
- 23) 中島美砂子：シンポジウムII「歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生」 第130回日本歯科保存学会春季学術大会 2009年6月12日、札幌
- 24) 中島美砂子：口腔QOL連続シンポジウム「歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生」in Tokushima 2009-2010 2010年1月22日、徳島
- 25) 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止の治療戦略 第14回神経芽腫研究会講演会 2010年3月6日、名古屋市
- 26) 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, Epidenomics, and the Development of Novel Therapeutics. Feb 5-10, 2010. Hilton Waikoloa Village, Waikoloa, Hawaii, USA.
- 27) 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

- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 中島美砂子：歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生 長崎障害者支援再生医療研究会 2010年2月23日，長崎
- 32) 川島伸之、許セイ、岩田隆紀、周夢宇、瀧本晃陽、小泉悠、大井智恵、高橋里美、鈴木規元、須田英明：口演「象牙芽細胞分化におけるSp7によるdentin sialophosphoprotein発現誘導」日本再生医療学会 広島国際会議場 2010年3月18日
- 33) Kawashima N., Xu J., Suzuki N., Zhou M., Wei S., Takimoto K., Koizumi Y., Takahashi S. and Suda H.: Induction of IL17 synthesis in the experimentally-induced murine periapical lesions. 2010 Spring Scientific Meeting of Korean Academy of Endodontics. Poster, BEXCO Busan, Korea. March 27, 2010.

平成22年度

- 1) 中島美砂子：教育講演「歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生 新しい蝕・歯髄炎治療の実用化を目指して」 第48回日本小児歯科学会大会 名古屋 2010年5月20日
- 2) 今林貴代美、庵原耕一郎、石坂亮、江場久哲、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 熊本 2010年6月4日
- 3) 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2010年度春季学術大会 熊本 2010年6月4日
- 4) 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 熊本 2010年6月5日
- 5) 石坂亮、庵原耕一郎、福田理、松下健二、中村洋、中島美砂子：ブタ歯髄・骨髄・脂肪CD31-SP細胞の血管新生能の比較 第132回日本歯科保存学会春季学術大会 熊本 2010年6月5日
- 6) 中島美砂子：歯髄幹細胞を用いた象牙質・歯髄再生による新しい蝕・歯髄炎治療法の開発 第64回日本口腔科学会学術集会 札幌 2010年6月24日
- 7) Nakashima M. and Iohara K.: Pulp Stem Cells and Pulp Regeneration. Tissue Injury and Pulp Regeneration. Geneva, Switzerland, July 19, 2010.
- 8) Nakashima M.: Total regeneration of dental pulp by transplantation of dental pulp stem cells. 8th

- IFEA-WORLD CONGRESS OF ENDODONTICS. Athens, Greece, Oct. 7, 2010.
- 9) Nakamura H., Eba H., Iohara K., Matsushita K., Nakata K. and Nakashima M.: MMP3 accelerates dental pulp healing in partial pulpitis model in the dog. 8th IFEA-WORLD CONGRESS OF ENDODONTICS. Athens, Greece, Oct. 7, 2010.
 - 10) 中島美砂子 : 認定研修会「歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生」 第133回日本歯科保存学会秋季学術大会 岐阜 2010年10月28日
 - 11) Nakashima M.: Total Pulp Regeneration by Transplantation of Dental Pulp Stem Cells. 3rd International Workshop on Bio Dental Education & Research. Hiroshima, Jan. 29, 2011.
 - 12) Nakashima M., Iohara K., Imabayashi K.: Complete Pulp Regeneration after Pulpectomy by Transplantation of Pulp CD105⁺ Stem Cells with SDF-1. Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease. 2011 KEYSTONE SYMPOSIA. Santa Fe. Feb. 1, 2011.
 - 13) 中島美砂子: 歯髄幹細胞を用いた歯髄再生 第10回日本歯科再生医療学会総会 東京 2011年3月1日
 - 14) 中島美砂子 : 象牙質・歯髄再生による新しい蝕・歯髄炎治療法の実用化の現状と課題 第10回日本歯科再生医療学会総会 東京 2011年3月2日
 - 15) 庵原耕一郎、石坂亮、杉山昌彦、中島美砂子 : ブタ歯髄・脂肪CD31-SP細胞の歯髄再生能の比較 第10回日本歯科再生医療学会総会 東京 2011年3月2日
 - 16) 今林貴代美、渡邊淳、庵原耕一郎、石坂亮、中島美砂子 : CD105陽性幹細胞を用いた歯髄特異的タンパク質の検索 第10回日本歯科再生医療学会総会 東京 2011年3月2日
 - 17) 中島美砂子: スーパー特区を活用した歯科再生医療の推進 平成22年度あいち健康長寿産業クラスター成果発表会 愛知 2011年3月18日
 - 18) 柳野卓也、日比陽子、伊藤雄貴、家村俊一郎、夏目 徹、渡辺研、丸山和佳子、本山 昇 : 酸化ストレスによるフォークヘッド型転写因子FOXOの活性化メカニズムの解析. 第33回日本基礎老化学会. 名古屋 2010年6月18日
 - 19) 本山 昇 : DNA損傷応答と老化. 第52回日本老年学会学術集会(若手企画シンポジウム1 基礎研究: 老化メカニズムに関する最近の話題). 神戸 2010年6月25日
 - 20) 村松 昌, 山本誠士, 森脇佐和子, 本山 昇, 徳田治彦, 新飯田俊平 : Aging impacts on miRNAs expression in blood. 第2回日本RNAi研究会 広島 2010年8月28日
 - 21) Matsumoto-Ohya M., Suzuki K., Ohta K., Young S.G. and Motoyama N.: Extended lifespan of *Zmpste24*^{-/-} mice, a model mouse for Hutchison-Gilford Progeria Syndrome (HGPS), in a Chk2-null background. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on "Molecular Genetics of Aging". Cold Spring Harbor, NY, USA. Sep. 30, 2010.
 - 22) Yanagino T., Furukawa-Hibi Y., Iemura S., Natsume T., Watanabe K., Maruyama W. and Motoyama N.: Selective dephosphorylation of FOXO by PP2A mediates cellular oxidative stress response. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on "Molecular Genetics of Aging". Cold Spring Harbor, NY, USA. Sep. 30, 2010.

- 23) 丹伊田 浩行, 村田 和大, 島田 緑, 小川 久美子, 鈴木 今日子, 藤垣 秀和, Aik Kia Khaw, Birendranath Banerjee, M. Prakash Hande, 宮本 智美, 三好 一郎, 白井 智之, 本山 昇, Mireille Delhase, Ettore Appella, 中西 真: Chk1 と Chk2 の協調的な機能が生体内の発癌を抑制する BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会) 神戸 2010 年 12 月 8、9 日
- 24) 大矢 恵、鈴木今日子、大田久美子、早川智久、Stephen G Young、丸山和佳子、本山 昇: Hutchison-Gilford Progeria Syndromeモデルマウスの寿命制御におけるChk2 を介したDNA損傷応答の関与 BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会) 神戸 2010 年 12 月 9、10 日
- 25) Yanagino T., Hibi Y., Ito Y., Maruyama W. and Motoyama N.: PP2A protects cells from oxidative stress by selective dephosphorylation of FOXO. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会) 神戸 2010 年 12 月 9、10 日
- 26) 武井佳史:「血管内皮増殖因子の発現を抑制するsiRNAの作成と腫瘍への電氣的導入法について」第9回バイオテクノロジー国際会議・バイオ・アカデミック・フォーラム (東京都・2010年7月1日)
- 27) Takei Y.: Electroporation of the siRNA against VEGF in the xenografted tumors. Merck Technology Days: Partnering Meetings with Merck & Co., Inc. (Tokyo, Japan. Jul 2, 2010).
- 28) 武井佳史:「合成siRNAによるin vivo RNA干渉を基盤技術とした分子標的治療法～癌治療から炎症性疾患治療まで」サーモフィッシュヤーサイエンティフィック株式会社主催 ライフサイエンスセミナー 第2回 RNAi研究の最前線 siRNA/microRNA機能研究とin vivo応用 (東京都・2010年7月16日)
- 29) 武井佳史:「microRNAの特異的制御によるヒト・スキルス胃癌の腹膜播種性転移抑止」第697回千葉県がんセンター研究局集談会 (千葉市・2010年10月6日)
- 30) Takei Y.: Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. Symposium: Nucleic Acid Based Therapeutics. (Honolulu, Hawaii, USA, Dec 16, 2010).
- 31) Suzuki Y., Ito Y., Mizuno M., Sawai A., Kinashi H., Sato W., Maruyama S., Takei Y., Imai E., Yuzawa Y. and Matsuo S.: Lymphangiogenesis develop during tubulointerstitial fibrosis in rat unilateral ureteral obstruction via TGF-b-VEGF-C pathway. International Society of Nephrology (ISN) NEXUS Symposium –The Kidney and the Vascular System: Emerging Culprits in Pathogenesis and Advances in Therapy (Kyoto, Japan. Apr 18, 2010).
- 32) 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抑止の標的となりうる新規metastamirである」第 69 回日本癌学会総会 (大阪市・2010 年 9 月 24 日)
- 33) Sawai A., Ito Y., Mizuno, M., Suzuki Y., Toda S., Ito I., Sato W., Tsuboi N., Maruyama S., Imai E., Takei Y., Yuzawa, Y. and Matsuo S.: Peritoneal macrophage infiltration is correlated with baseline peritoneal solute transport rate in peritoneal dialysis patients. American Society of Nephrology, Renal Week 2010 (Denver, CO, USA. Nov 16, 2010).

- 34) Suzuki Y., Ito Y., Mizuno M., Sawai A., Kinashi H., Sato W., Maruyama S., Imai E., Takei Y. and Matsuo S.: Lymphangiogenesis develops during tubulo-interstitial fibrosis via the TGFb-VEGF-C pathway in rat unilateral ureteral obstruction. American Society of Nephrology, Renal Week 2010 (Colorado Convention Center, Denver, CO, USA. Nov 16, 2010).
- 35) Kawashima N., Xu J., Iwata T., Takahashi S., Koizumi Y., Takimoto K., Mengyu Z., Ohi C., Suzuki N., Sugiyama T. and Suda H.: Promotive effects of Sp7 on Dspg expression. 89th IADR General Session & Exhibition. Barcelona, Spain. July 14-17, 2010.
- 36) Suzuki N., Kawashima N., Xu J. and Suda H.: Effective suppression of periapical lesion expansion by Cathepsin K inhibitor. 89th IADR General Session & Exhibition. Barcelona, Spain. July 14-17, 2010.
- 37) Xu J., Kawashima N., Fujiwara N., Harada H. and Suda H.: Expression of Vasoactive Intestinal Peptide Receptors in HERS Cells. 89th IADR General Session & Exhibition. Barcelona, Spain. July 14-17, 2010.
- 38) Takimoto K., Kawashima N., Nakashima M., Nakamura H., Koizumi Y. and Suda H.: Effects of MMP-3 on Inflammatory Mediator Synthesis from Macrophages. 89th IADR General Session & Exhibition in Barcelona. Spain. July 14-17, 2010.
- 39) Kawashima N., Xu J., Suzuki N., Zhou M., Takimoto K., Koizumi Y., Yamamoto M., Salima A., Takahashi S. and Suda H.: Expression of Mef2c in Murine Odontoblasts. 8th World Endodontic Congress. Athens, Greece. to be held 6 - 9 October, 2010.
- 40) Takahashi S., Kawashima N., Katsube K., Sugiyama T. and Suda H.: Shh Signaling is Related to BMP and Wnt Signaling in Ameloblast Differentiation. 8th World Endodontic Congress. Athens, Greece. to be held 6 - 9 October, 2010.
- 41) Koizumi Y., Kawashima N., Takimoto K., Takahashi S., Xu J., Suzuki N., Zhou M., Yamamoto M., Salima A., Sugiyama T. and Suda H.: Wnt Signaling in Odontoblast Differentiation Induced by BMP. 8th World Endodontic Congress. Athens, Greece. to be held 6 - 9 October, 2010.
- 42) Bolortuya G., Ebihara A., Watanabe S., Anjo T., Kokuzawa C., Saegusa H., Kawashima N., and Suda H.: Analysis of osteoblastic mesenchymal cell adhesion on laser-induced dentin modification. 8th World Endodontic Congress. Athens, Greece. to be held 6 - 9 October, 2010.
- 43) 辺見浩一、川島伸之、須田英明、鈴木孝尚、山下直也、立花克郎、中島美砂子：「ナノバブルを併用した新しい根管洗浄法に関する基礎的研究」第3回超音波分子診断治療研究会 福岡大学 2011年3月5日
- 44) Ikeda T.: Growth factor release from chitosan sponge as a scaffold for tissue engineering, Invited lecture at University of The East, Manila, Philippines. July 12, 2010.
- 45) 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」 鹿児島 2010年4月22日
- 46) 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 鹿児島 2010年4月24日

- 47) Matsushita K., Morrell C.N., Mason E.L., O'Rourke B., Champion H.C. and Lowenstein C.J.: Angiotensin II Activates Endothelial Exocytosis by Stimulating Superoxide Production 第33回日本血栓止血学会学術集会 鹿児島 2010年4月24日
- 48) 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 東京 2010年6月5日
- 49) 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 東京 2010年8月21日
- 50) 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 東京 2010年8月21日
- 51) 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ティーチーム医療- 日本健康心理学会第23回大会シンポジウム 千葉 2010年9月11日
- 52) 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. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology. Honolulu, HI, USA. Oct. 31, 2010.
- 53) Sugiura S., Ishihara Y., Komatsu T., Hagiwara M., Tanigawa N., Eguchi T., Mizutani H., Matsushita K. and Noguchi T.: Valproic acid enhances innate immune response to LPS by HMGB1 release. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology. Honolulu, HI, USA. Oct. 31, 2010.
- 54) 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回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 奈良 2010年11月13日
- 55) 松下健二 : 老年期・衰退期を想定した歯科医学・医療とQOL 未来口腔医療研究センター講演会 名古屋 2011年3月12日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

平成21年度

1) 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 平成21年4月6日

12/936474 (米国移行番号) , 09730839.9 (欧州移行番号) , 200980112243.1 (中国移行番号) 平成22

年 10 月 6 日

- 2) 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(WO/2010/021412) 平成 21 年 8 月 21 日
- 3) 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 平成 21 年 9 月 11 日
PCT 2010-005536 平成 22 年 9 月 13 日
- 4) 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 平成 21 年 12 月 16 日
PCT/JP2010/007315 平成 22 年 12 月 16 日
- 5) 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 平成 21 年 12 月 7 日
- 6) 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 平成 21 年 12 月 22 日特許成立

平成 22 年度

- 1) 中島美砂子、庵原耕一郎
根管充填材及び歯組織再生方法
PCT JP 2009-055541(WO2009/113733) 平成 21 年 3 月 12 日
12/922097 (米国移行番号) ,09718864.3 (欧州移行番号) , 200980108613.4 (中国移行番号) 平成 22
年 9 月 13 日
- 2) 中島美砂子、石田敬雄
細胞分化装置、細胞分化方法、及び象牙芽細胞
PCT/JP2010/02652 平成 22 年 4 月 12 日
- 3) 中島美砂子、石田敬雄
歯髄炎診断マーカー及び歯髄炎診断システム
PCT/ JP2010/002653 平成 22 年 4 月 12 日
- 4) 中島美砂子、庵原耕一郎
間葉系幹細胞を含んでなる根管充填材及びこれを用いた歯組織再生方法
特願 2011-042862 平成 23 年 2 月 28 日
- 5) 中島美砂子、庵原耕一郎、山田和正
幹細胞膜分離器、膜分取培養キット、およびこれを用いた幹細胞分取方法

特願 2011-075861 平成 23 年 3 月 30 日

6) 山本徳則、武井佳史、松川宣久、舟橋康人、後藤百万

脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する、勃起不全又は尿意障害用の細胞製剤

PCT/JP2010-065271 (WO) 国際出願日：平成 22 年 9 月 7 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

中島美砂子「大手企業がようやく参戦 規制当局の対応が鍵」実用化進む再生医療

日経バイオテク 取材日 2011 年 3 月 16 日 4-11 2011