
**脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた
橋渡し研究**
(プロジェクト番号:S1411018)

平成 26 年度～平成 30 年度

文部科学省

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

研究成果報告書

令和元年 5 月

学校法人名： 日本大学

大 学 名： 日本大学

研究組織名： 医学部総合医学研究所・細胞治療研究グループ

研究代表者： 松本 太郎（日本大学医学部・教授）

〈目 次〉

1. はしがき.....	3
2. 研究成果報告書概要.....	4
3. 研究成果の概要.....	70
マウス脱分化脂肪細胞の血管新生作用に関する研究.....	71
ブタ心外膜下脂肪組織に由来する脱分化脂肪細胞の特性解析.....	77
ヒト頬脂肪体から単離・調製した脱分化脂肪細胞の特性.....	80
脱分化脂肪細胞形成及び骨芽細胞への再分化におけるビタミンDシグナルの影響.....	83
脱分化脂肪細胞による移植治療のための細胞キャリアの開発.....	87
マウス皮膚欠損治癒過程における成熟脂肪細胞の形質転換.....	93
吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析.....	96
ヒト頬脂肪体から脱分化脂肪細胞を獲得する酵素処理条件の検討.....	100
ラット人工真皮移植モデルにおける脱分化脂肪細胞の効果に関する研究.....	103
脱分化脂肪細胞による血流不全組織の救済効果に関する検討.....	106
脱分化脂肪細胞による自家培養表皮移植時の基底膜構築促進効果に関する研究.....	109
ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果.....	112
脱分化脂肪細胞による歯周組織再生.....	115
ラットモデルにおけるPGA CONDUIT、DFATを使用した顔面神経再生能の検討.....	118
マウス急性移植片対宿主病モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果.....	121
4. 資料.....	124

1. はしがき

本報告書は、平成 26 年度から文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(研究拠点を形成する研究)に採択された研究プロジェクト「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」の 5 年間の研究成果をまとめたものです。私たちの研究グループでは、成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することによって得られる脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cells: DFAT)という細胞が、間葉系幹細胞(MSC)に類似した高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにしました。DFAT は約1gの脂肪組織から大量調製が可能であるため、低コストで実用性の高い治療用細胞ソースとしてその臨床応用が期待されます。本研究プロジェクトでは、今まで蓄積してきた研究成果を発展させ、治療用細胞としての DFAT の特性解析や、臨床応用に適合した細胞調製法の確立、移植安全性の検証などを行い、DFAT 細胞治療の安全性や妥当性を明確にすることを目的としています。また同時に、種々の疾患モデル動物に対する DFAT 細胞治療の前臨床試験を行い、その有効性や移植安全性を明らかにし、最終的に DFAT を用いた First-in-Human 臨床試験の実施を目指しています。このような「DFAT による細胞治療開発」という共通テーマの元、日本大学医学部を中心に歯学部、生物資源科学部、生産工学部、総合科学研究所など本学のスケールメリットを生かした学部横断的な研究組織による新しい研究が活発に展開されました。また東京大学生産技術研究所、東京女子医科大学など複数の学外研究グループが参画し、多くの研究者が各々の専門分野を活かし精力的に研究を行った結果、多大な研究成果を挙げることができました。特に DFAT が高い血管新生作用を有することを明らかにし、重症下肢虚血患者を対象とした細胞治療開発を重点的に行い、アイソレータを用いた臨床グレード細胞製造や品質管理法を確立するなど、臨床研究実施に向け大きく前進しました。また難治性皮膚疾患や難治性歯周病、椎間板変性症など多くの疾患で、前臨床試験を行い、DFAT 細胞治療の有効性を明らかにすることができました。今後、これらの成果を発展させ、多くの人が普遍的に利用できる再生医療を実現させたいと思います。

最後に本研究プロジェクトを支えていただいた文部科学省、日本私立大学振興・共済事業団、共同研究者の皆様、研究スタッフの方々、日本大学本部研究推進部、医学部研究事務課、研究支援部門の皆様、関連研究機関の方々に深くお礼申し上げます。また本プロジェクトの外部評価委員として、評価を賜りました森聖二郎先生(東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長)、長村登紀子先生(東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部 准教授)に深く感謝申し上げます。

研究代表者 松本 太郎

2. 研究成果報告書概要

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

**平成 26 年度～平成 30 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」
研究成果報告書概要**

- 1 学校法人名 日本大学 2 大学名 日本大学
- 3 研究組織名 医学部総合医学研究所・細胞治療研究グループ
- 4 プロジェクト所在地 東京都板橋区大谷口上町 30-1
- 5 研究プロジェクト名 脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究

6 研究観点 研究拠点を形成する研究

7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
松本 太郎	医学部	教授

8 プロジェクト参加研究者数 24 名

9 該当審査区分 理工・情報 生物・医歯 人文・社会

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
松本 太郎	医学部・教授	治療用細胞としての特性解析	研究の総括、血管新生能分子機構の解明
加野 浩一郎	生物資源科学部・教授	治療用細胞としての特性解析	脱分化による多能性獲得機構の解明
越永 従道	医学部・教授	治療用細胞としての特性解析	ヒト検体の採取・提供
池田 太郎	医学部・研究医員	治療用細胞としての特性解析	組織特異的分化指向性の解明
槇島 誠	医学部・教授	治療用細胞としての特性解析	脱分化による多能性獲得機構の解明
野呂 知加子	生産工学部・教授	治療用細胞としての特性解析	移植組織内における細胞特性の解明
副島 一孝	医学部・准教授	臨床応用に適合した調製法の確立	吸引脂肪を用いた調製法の開発
上野 高浩	医学部・兼任講師	移植安全性の検討	遺伝的安定性の検討、造腫瘍性試験の実施
風間 智彦	医学部・助手	移植安全性の検討	遺伝的安定性の検討、造腫瘍性試験の実施
徳橋 泰明	医学部・教	DFAT を用いた新規細胞治	難治性骨折に対する細

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

	授	療の開発	胞治療の開発
福田 昇	総合科学 研究所・教授	DFAT を用いた新規細胞治 療の開発	慢性腎炎に対する細胞 治療の開発
仲沢 弘明	医学部・教 授	DFAT を用いた新規細胞治 療の開発	重度熱傷に対する細胞 治療の開発
高橋 悟	医学部・教 授	DFAT を用いた新規細胞治 療の開発	腹圧性尿失禁に対する 細胞治療の開発
大日方 大亮	医学部・助 教	DFAT を用いた新規細胞治 療の開発	腹圧性尿失禁に対する 細胞治療の開発
高橋 昌里	医学部・客 員教授	DFAT を用いた新規細胞治 療の開発	造血幹細胞生着促進、 GVHD 予防を目的とした 細胞治療の開発
平山 篤志	医学部・研 究所教授	DFAT 細胞治療の前臨床試 験	虚血性心疾患に対する 細胞治療の確立
山口 健哉	医学部・准 教授	DFAT 細胞治療の前臨床試 験	至適移植条件の確立
石毛 美夏	医学部・専 任講師	DFAT 細胞治療の前臨床試 験	造血幹細胞生着促進、 GVHD 予防を目的とした 細胞治療の開発
谷ヶ崎 博	医学部・准 教授	DFAT 細胞治療の前臨床試 験	造血幹細胞生着促進、 GVHD 予防を目的とした 細胞治療の開発
月村 直樹	歯学部・准 教授	DFAT を用いた新規細胞治 療の開発	歯周病に対する細胞治 療の開発
秋田 大輔	歯学部・助 教	DFAT を用いた新規細胞治 療の開発	歯周病に対する細胞治 療の開発
(共同研究機関等) 竹内 昌治	東京大学 生産技術 研究所・教 授	治療用細胞としての特性解 析	高次組織誘導法の開発
興津 輝	東京大学 生産技術 研究所・特 任教授	治療用細胞としての特性解 析	高次組織誘導法の開発
松峯 元	東京女子 医科大学・ 講師	DFAT を用いた新規細胞治 療の開発	末梢神経再生法の検討

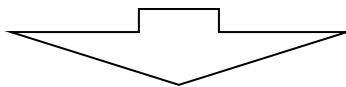
<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
DFAT を用いた新規細 胞治療の開発	歯学部・准教授	本田 雅規	歯周病に対する細胞治 療の開発

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

(変更の時期:平成 27 年 4 月 1 日)



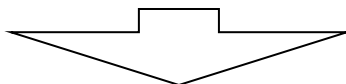
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
歯学部・准教授	歯学部・准教授	月村 直樹	歯周病に対する細胞治療の開発
歯学部・助教	歯学部・助教	秋田 大輔	歯周病に対する細胞治療の開発

旧

プロジェクト外での研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
DFATを用いた新規細胞治療の開発	大学院総合科学研究科・教授	福田 昇	慢性腎炎に対する細胞治療の開発

(変更の時期:平成 27 年 4 月 1 日)



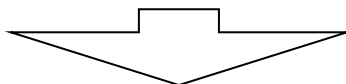
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
大学院総合科学研究科・教授	総合科学研究所・教授	福田 昇	慢性腎炎に対する細胞治療の開発

旧

プロジェクト外での研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
治療用細胞としての特性解析	東京大学生産技術研究所・准教授	竹内 昌治	高次組織誘導法の開発

(変更の時期:平成 27 年 4 月 1 日)



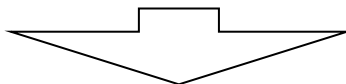
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
東京大学生産技術研究所・准教授	東京大学生産技術研究所・教授	竹内 昌治	高次組織誘導法の開発

旧

プロジェクト外での研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
治療用細胞としての特性解析	医学部・助教	池田 太郎	組織特異的分化指向性の解明

(変更の時期:平成 27 年 12 月 1 日)



法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

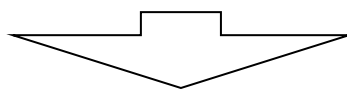
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・助教	医学部・研究医員	池田 太郎	組織特異的分化指向性の解明

旧

プロジェクト外での研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
移植安全性の検討	医学部・准教授	上野 高浩	遺伝的安定性の検討, 造腫瘍性試験の実施

(変更の時期:平成 28 年 3 月 1 日)



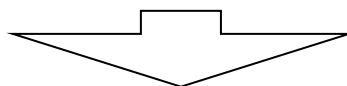
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・准教授	医学部・兼任講師	上野 高浩	遺伝的安定性の検討, 造腫瘍性試験の実施

旧

プロジェクト外での研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
治療用細胞としての特性解析	東京大学生産技術研究所・特任准教授	興津 輝	高次組織誘導法の開発

(変更の時期:平成 28 年 4 月 1 日)



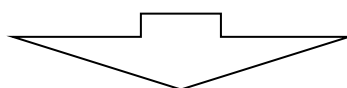
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
東京大学生産技術研究所・特任准教授	東京大学生産技術研究所・特任教授	興津 輝	高次組織誘導法の開発

旧

プロジェクト外での研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
DFATを用いた新規細胞治療の開発	東京女子医科大学・助教	松峯 元	末梢神経再生法の検討

(変更の時期:平成 29 年 4 月 1 日)



新

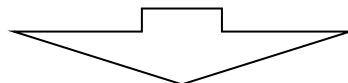
変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
東京女子医科大学・助教	東京女子医科大学・講師	松峯 元	末梢神経再生法の検討

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
DFAT細胞治療の前臨床試験	医学部・助教	石毛 美夏	造血幹細胞生着促進、GVHD 予防を目的とした細胞治療の開発

(変更の時期:平成 28 年 5 月 1 日)



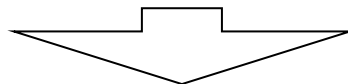
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・助教	医学部・専任講師	石毛 美夏	造血幹細胞生着促進、GVHD 予防を目的とした細胞治療の開発

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
DFATを用いた新規細胞治療の開発	医学部・教授	高橋 昌里	造血幹細胞生着促進、GVHD 予防を目的とした細胞治療の開発

(変更の時期:平成 30 年 4 月 1 日)



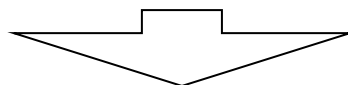
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・教授	医学部・客員教授	高橋 昌里	造血幹細胞生着促進、GVHD 予防を目的とした細胞治療の開発

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
DFAT細胞治療の前臨床試験	医学部・教授	平山 篤志	虚血性心疾患に対する細胞治療の確立

(変更の時期:平成 30 年 4 月 1 日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医学部・教授	医学部・研究所教授	平山 篤志	虚血性心疾患に対する細胞治療の確率

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

11 研究の概要

(1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

細胞治療を広く普及させるためには、苦痛を伴わず採取でき簡便に大量調製が可能な移植用細胞の開発が望まれる。我々の研究グループは、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することによって得られる細胞群(脱分化脂肪細胞: Dedifferentiated fat cells, DFAT)が、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell, MSC)に類似した多能性を獲得することを明らかにした。DFATは少量の脂肪組織から均質なMSC様細胞を大量調製できるため、実用性の高い治療用細胞ソースとして期待できる。本事業では既存の治療用細胞との比較などを通じて DFAT の治療用細胞としての適性を明らかにし、臨床応用に適合した DFAT 調製法や品質管理法を確立する。そして下肢虚血モデル動物などを用いて DFAT 細胞治療の有効性と安全性を検証する。これらのデータを基に DFAT を用いた血管再生細胞治療の臨床研究の実施を目指す。具体的には、「治療用細胞としての特性解析」、「臨床応用に適合した細胞調製法の確立と移植安全性の検証」、「DFAT 細胞治療の開発と前臨床試験」の各テーマに沿って臨床応用に向けた橋渡し研究を展開する。本事業によって得られる研究成果は、医療経済的にも優れた普遍的な細胞治療の確立に寄与することが予想される。

(2) 研究組織

1. 研究代表者の役割

研究代表者は、本プロジェクトで実施する研究の総括及び成果発表、研究グループ間の情報共有、役割分担、知財戦略等の統括を担った。

2. 各研究者の役割分担や責任体制の明確さ

臨床研究に向けた橋渡し研究では、研究代表者が医学部の複数の診療科における役割分担や研究課題を取りまとめ、ヒト脂肪組織の採取から臨床試験まで系統的に実施できる研究体制を形成した。日本大学医学部では、臨床系教室 11 分野(小児科、循環器内科、腎臓内分泌内科、総合内科、総合外科、小児外科、整形外科、形成外科、心臓血管外科、泌尿器科、耳鼻咽喉頭頸部外科)および基礎系教室として生化学分野が研究に参加し、有機的な研究組織を構築した。また医学部以外の学部と共同で行う学際的研究では、4 名のコアメンバーである加野、野呂、福田、本田(平成 27 年 4 月より月村に変更)が、それぞれ生物資源科学部、生産工学部、大学院総合科学研究所、歯学部における研究グループの統括を行った。研究代表者および分担者は全員、一般財団法人公正研究推進協会(APRIN) が提供する e ラーニングプログラム(CITI Japan)を受講することにより、研究倫理に関する教育を受けた。

3. 研究プロジェクトに参加する研究者の人数

本プロジェクトでは、9 名の基礎研究者と、12 名の臨床医学を専門とする研究者及び 3 名の学外研究者(合計 24 名)が主な研究者として参加した。さらに大学院生、PD、RA、研究員、研究協力員、臨時職員を含めると合計 76 名の研究者が参加した。

4. 大学院生・PD 及び RA の人数・活用状況

計 28 名の大学院生、3 名のポスト・ドクター(PD)、2 名のリサーチ・アシスタント(RA)が本プロジェクトに参加した。

5. 研究チーム間の連携状況

研究代表者の松本と 4 名のコアメンバーとはすでに多くの共同研究を行っており、学部横断的な研究体制が構築されている。研究代表者と 4 名のコアメンバーは医学部で行われるミー

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

ティングにて進捗状況の確認や相互評価を定期的に行った。

6. 研究支援体制

日本大学産官学連携知財センター(NUBIC)より知財コーディネーター(2名)が本事業を担当し、知財戦略支援を行った。また日本大学医学部では総合医学研究所、医学研究支援部門、研究事務課が一体となり本事業を側面より支援した。また臨床研究の立案・実施に関しては、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究センターの支援を受けた。

7. 共同研究機関との連携状況

大学研究機関として、東京大学・生産技術研究所、東京女子医科大学・形成外科、名古屋大学・小児科、北海道大学・地球環境科学研究所、福岡歯科大学・再生医学研究センターと共同研究を実施した。またバイオ関連企業として、株式会社細胞科学研究所、協和発酵キリン株式会社、日水製薬株式会社、協和発酵キリン株式会社、サンプラテック株式会社、株式会社ジェイテックコーポレーションと共同研究を実施した。

(3) 研究施設・設備等

日本大学医学部総合医学研究所の研究拠点として、医学部創立 70 周年記念館(リサーチセンター) 5,722 m²を中心に、本研究プロジェクトの実験やデータ解析施設として使用した。本研究施設は 200 名以上の研究者と大学院生が利用している。また本研究プロジェクトの動物実験施設として医学研究支援部門ラボラトリーアニマル系実験動物施設および医学研究支援部門生物化学系感染症ゲノムセンターを利用した。研究設備に関しては、本事業において FACS Aria セルソーター(稼働時間 634 時間)、超低温槽(稼働時間 38,832 時間)、ロータリーマイクローム(稼働時間 160 時間)、CO₂ インキュベーター(稼働時間 9,888 時間)、マイクロプレートリーダー(稼働時間 146 時間)、倒立型顕微鏡(稼働時間 800 時間)、CO₂ 制御チャンバー(稼働時間 1,200 時間)、全自動セルカウンター(稼働時間 40 時間)、サーマルサイクラー(稼働時間 1,440 時間)、パラフィン包埋装置(稼働時間 345 時間)、ケミルミイメージングシステム(稼働時間 250 時間)などを整備し、本研究プロジェクトに役立てた。

(4) 研究成果の概要

<現在までの進捗状況及び達成度>

① 治療用細胞としての特性解析(達成度 90%)

・皮下脂肪組織に由来する DFAT の遺伝子発現プロファイルは、脂肪組織由来幹細胞(ASC)と高い相同性を示し、脂肪分化指向性が高いことを明らかにした(図書*4, 学会発表*59, 68, 75)。また脂肪組織の局在部位の相違により、その組織に由来する DFAT の分化指向性が異なることを明らかにした(学会発表*21, 101, 103, 145, 159, 167)。

・脱分化による多能性獲得に関わる転写因子の候補を同定した(学会発表*127, 128, 149, 150, 151, 152, 展示会等*4, 6, 8)。

・DFAT を血管内皮細胞と共培養することにより血管構成細胞であるペリサイトへ分化させる分化誘導系を確立した。また TGFβとその細胞内シグナル Smad2/3 経路が DFAT のペリサイト分化の主要経路であることを明らかにした(学会発表*29, 50, 54, 78, 80, 92, 103, 139, インターネット*11)。

・アクチン細胞骨格動態変化により脂肪分化が誘導される分子機序を明らかにした(学会発表*162)。

・マイクロ流体デバイスを用いて作成した DFAT コアシェル型細胞ファイバーから収縮能を有する機能的平滑筋細胞の誘導に成功した(論文*20)。

・ヒト類脂肪体には皮下脂肪に比べ小型の脂肪細胞が多く存在し、この脂肪細胞から調製した DFAT は高い骨分化能を示すことを明らかにした(論文*14, 学会発表*102, 109, 129, 164,

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

インターネット*8, 9)。

・ビタミン D 受容体の活性化が、成熟脂肪細胞の脱分化に対し抑制的な作用を示すことを明らかにした(学会発表*70, 73, 107, 115, 140, 156, 161)。

・ブタ心外膜脂肪から調製した DFAT が高い心筋分化能を有することを明らかにした(論文*8, 学会発表*111, 120, 146, インターネット*5)。

・ヒト DFAT の細胞純度や品質を評価するのに適した細胞表面マーカーを同定した(インターネット*4)。

・ヒト DFAT から iPS 細胞を作成に成功した(学会発表*88, 96, 124, 148)。

・DFAT の生着率向上や終末分化細胞への効率的分化を目的とした細胞キャリアの検討を行った(学会発表*3, 9, 10, 14, 27, 28, 47, 64, 67, 99, 131)。

・DFAT から機能性神経細胞への分化誘導に成功した(学会発表*44, 69, 83, 特許*5)。

・ヒト DFAT の遺伝子発現プロファイルに及ぼす継代培養の影響をクラスター解析及び X-means 解析を用いて検討した。その結果、初代培養～第 5 継代までは DFAT が安定な状態にあるが、7～10 継代では安定性が低下することを明らかにした。

・ヒト膝蓋下脂肪体から単離した成熟脂肪細胞から DFAT の調製に成功した。また膝窩下脂肪体由来 DFAT から硝子軟骨様細胞凝集体の誘導に成功した(学会発表*21)。

・ヒト DFAT の免疫制御能や造血細胞維持能を他細胞と比較し、優れた治療効果を示すことを明らかにした(学会発表*71, 108, 123, 125, 136, 142, 165, 166, 図書 6, 7)。

・ヒト DFAT が ASC と同等の T 細胞増殖抑制作用、調節性 T 細胞誘導促進作用、Th17 細胞誘導抑制作用を有することを明らかにした(学会発表*32, 36, 53, 65)。

・ヒト DFAT 由来エクソソーム中に含まれるマイクロ RNA の網羅的解析を行い、ヒト ASC 由来エクソソームと比べて特徴的に発現するマイクロ RNA を同定した。

・ヒト DFAT 由来エクソソームが椎間板髄核細胞の増殖促進作用を示すことを明らかにした。

・ヒト DFAT 由来エクソソームが、T 細胞増殖抑制、調節性 T 細胞誘導促進、Th17 細胞誘導抑制作用を有することを明らかにした(学会発表*32, 36, 53, 56, 65)。

・タモキシフェン誘導下に脂肪細胞の運命追跡ができる遺伝子改変レポーターマウス(Adipo-Cre-ERT2/tdTomato-ROSA26 マウス)に皮膚全層欠損を作成し、創傷治癒過程における脂肪細胞の運命追跡を行った。その結果、皮膚欠損後の組織修復過程で脂肪細胞に由来する線維芽細胞様の形態を示す細胞が出現し、その一部は肉芽組織内で前駆脂肪細胞やペリサイトの形質を獲得していることを明らかにした(学会発表*5, 40)。

・上記レポーターマウスの乳腺脂肪体に乳癌細胞を移植し、癌の進展過程における脂肪細胞の挙動を検討した。その結果、腫瘍組織中に脂肪細胞に由来する線維芽細胞様細胞が出現し、その一部は間葉系幹細胞やペリサイトの形質を獲得していることを明らかにした。一方、癌関連線維芽細胞(CAF)の起源にはなっていないことを示した(学会発表*8)。

・高血圧自然発症ラット(SHR)において、補体 C3 の発現を介して平滑筋細胞の脱分化が起こることを明らかにした(学会発表*13, 23, 24, 25, 37, 87)。

・DFAT を「反重力培養装置」で培養すると細胞増殖能や、コラーゲンの産生能が促進することを明らかにした(学会発表*15, 45)。

・DFAT と神経芽腫細胞の共培養実験により、DFAT が神経芽腫細胞の神経細胞への分化を促進することを明らかにした(学会発表*4, 16, 55)。

・遺伝子導入により DFAT から肝細胞を分化誘導させる方法を明らかにした(受賞*1)。

② 臨床応用に適合した細胞調製法の確立と移植安全性の検証(達成度 95%)

・臨床グレードの DFAT を調製するために必要なアイソレーターを稼働させ、閉鎖系システムで DFAT を作成できることを確認した(学会発表*97, 101, 103, 新聞報道*4, 7, 10)。

・脂肪細胞を容易に効率良く脱分化させるフラスコを設計・開発した(特許*4, 6, 展示会等

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

*1)。

- ・ヒト DFAT を効率良く増殖させる GMP 準拠培地を開発した(論文*13)。
- ・ヒト類脂肪体から DFAT を効率良く調製する至適酵素濃度を決定した(論文*4, 学会発表*122, 135, 特許*1)。
- ・軟寒天コロニー形成試験や免疫不全(NOG)マウス皮下移植による造腫瘍性試験を委託実施し、DFAT に造腫瘍性がないことを確認した(学会発表*59, 63)。
- ・独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)の施設調査を受け、厚生労働省より特定細胞加工物(DFAT)の製造許可を受けた。
- ・ヒト吸引脂肪組織(約 5 mL)から臨床グレードの DFAT を調製し、細胞製造および品質管理に関するプロトコルを作成した(学会発表*12, 18, 22, 26, 41, 59, 63, 95, 110, 119, 143)
- ・ウサギ下肢虚血モデルに対して自家 DFAT の筋肉内注射を行い、移植部位および主要臓器に腫瘍形成や異常分化が認められないことを確認した(学会発表 12, 18, 22, 26, 41, 59, 116, 130, 新聞報道*10, 展示会等*4, 5)。
- ・ブタ下肢虚血モデルに対して自家 DFAT の筋肉内注射を行い、移植部位および主要臓器に腫瘍形成や異常分化が認められないことを確認した。
- ・2 種類の免疫不全ブタ(タクロリムス投与ブタ、IL-2rg ノックアウトブタ)に対し、ヒト DFAT の筋肉内注射を行い、移植部位および主要臓器に腫瘍形成が認められないことを確認した(学会発表*7, 17)。
- ・健常ボランティアから脂肪吸引を行い、自施設の細胞加工施設(CPF)内にて臨床グレードの DFAT を調製する臨床研究を実施した。

③ DFAT 細胞治療の開発と前臨床試験(達成度 85%)

- ・ヒト DFAT が末梢血単核球や ASC などの細胞に比較して高い血管新生能を示すことを明らかにした(論文*17, 学会発表*18, 22, 29, 39, 50, 74, 103, 153, 154, 特許*3, 新聞報道*5, 6, 7, 9, 10, 展示会等*6, 8)。
- ・ウサギ下肢虚血モデルに対する自家 DFAT 移植実験を行い、有効性や移植安全性を確認した(学会発表 12, 18, 22, 26, 41, 59, 74, 90, 116, 130, 新聞報道*5, 6, 7, 9, 10, 展示会等*4, 5)。
- ・ウサギ下肢虚血モデルに対する DFAT の自家移植は、細胞の凍結・解凍を行っても高い血管新生効果が期待できることを明らかにした。
- ・重症下肢虚血患者を対象とした自家 DFAT 細胞移植による血管再生細胞治療の臨床研究プロトコルを作成した。
- ・マウス脊髄損傷モデルに DFAT 移植すると長期間にわたり運動機能が回復することを示した(論文*24, 学会発表*134, 展示会等*4, 5)。
- ・バルーン腔拡張術と両側卵巣摘出を併用したラット持続性腹圧性尿失禁モデルに DFAT を移植すると、排尿機能が改善することを明らかにした(図書*9, 展示会等*4, 5, 6, 8)
- ・ラット顔面神経切離モデルに DFAT 入りシリコンチューブを用いて架橋すると神経再生が促進することを明らかにした(論文*3, 23, 学会発表*19, 31, 61, 展示会等*4, 5, 6)。
- ・マウス炎症性腸疾患モデルに対する DFAT 細胞移植の治療効果を明らかにした(学会発表*56, 93, 図書*3, 4)。
- ・ラット皮膚全層欠損モデルに対する人工真皮移植の際に bFGF と DFAT 移植を併用すると、真皮再生が促進することを示した(論文*22, 図書*8, 学会発表*46, 51, 58, 60, 66, 72, 78, 105, 114, 117, 126, 137, 157, 特許*2)。
- ・ラット難治性骨折モデルや椎間板変性モデルに対する骨・軟骨再生効果を明らかにした(論文*5, 9, 学会発表*48, 82, 85, 89, 98, 104, 112, 118, 134, 144, 158, 168)。
- ・ラット免疫性腎炎モデルに DFAT を静脈内投与すると尿蛋白や腎機能が改善することを明

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

らかにした。またその作用機序が腎臓における抗炎症サイトカイン TSG6 の分泌によることを明らかにした(論文*21, 図書*2, 5, 学会発表*1, 30, 38, 62, 77, 86, 100, 106, 121, 147, 155)。

・ラット全層植皮モデルに bFGF 投与と DFAT 移植を併用すると、bFGF 単独投与に比べ移植皮膚内の血管数が増加することを示した(論文*19, 図書*10, 学会発表 35, 52, 72, 105, 126)。

・ラット皮弁モデルの皮弁基部に DFAT を移植すると皮弁内の血管数が有意に増加し皮弁生着が促進することを明らかにした(論文*15, 図書*10, 学会発表 11, 49, 52, 60, 91, 132, 163)。

・歯周組織欠損ラットに DFAT を含む乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)ブロックの移植を行うと、歯槽骨、セメント質、歯根膜の再生を促進することを明らかにした(論文*10, 12, 図書*1, 学会発表*76, 113, 141, 受賞*3)。

・ラット下顎骨欠損モデルに DFAT と RCP(リコンビナントペプチド)複合体を移植すると、骨様硬組織と血管の再生が促進することを明らかにした(論文*1, 学会発表 42)

・ラット尿管逆流症(VUR)モデルに対する DFAT の治療効果を示した(論文*11, 図書*9)。

・ラット低酸素性虚血性脳症モデルに対して DFAT 静脈内投与すると海馬のアポトーシス細胞の減少や運動機能の改善が認められることを明らかにした(論文*6, 学会発表*84)。

・マウス急性移植片対宿主病(GVHD)モデルに DFAT を静脈内投与すると、GVHD に伴う体重減少が抑制され、GVHD の臨床スコアを有意に改善することを明らかにした(論文*7, インターネット 3)。

・ラット尾椎椎間板傷害モデルに対して、DFAT を椎間板内注射することにより、椎間板間隙の狭小化の有意な抑制と、DFAT が軟骨様細胞(髄核細胞)に直接分化することを明らかにした(論文*9, 学会発表*20, 34, 57, 81, 94, 138, 160, インターネット*1)。

・ブタ皮膚全層欠損モデルに対して、DFAT を含浸させた人工真皮の移植を行うと、その後の自家培養表皮移植時に真皮・上皮接合部の基底膜構築が促進されることを明らかにした(論文*1, 学会発表*2, 33, 35)。

・椎間板傷害や受動喫煙によるラット椎間板変性モデルに対し、DFAT を静脈内全身投与することにより椎間板変性が抑制されることを明らかにした(学会発表*20, 48, 82, 89, 104, 112, 展示会等*8)。

・コラーゲン充填シリコンチューブ架橋によるラット反回神経再生モデルの作出に成功した(学会発表*43)。

・ラット軟骨欠損モデルに DFAT から分化誘導した軟骨様細胞凝集体を移植すると、軟骨修復の肉眼的スコア、組織学的スコアが改善することを明らかにした。移植された DFAT 由来細胞凝集体は、移植 2 週間後までは確認できたが 12 週間後には検出が困難になった(論文*3, 展示会等*5, 6, 8)。

・ミニブタ根分岐部欠損モデルに対して病変部に自家 DFAT 移植を行うと、歯周ポケットが改善することを明らかにした。

・ラット新生児壊死性腸炎モデルに DFAT を腹腔内投与すると、生存率や肉眼的・組織構造学的重症度が改善することを明らかにした(特許出願*7, 学会発表*6)。

<優れた成果が上がった点>

1. DFAT が、末梢血単核球や線維芽細胞といった他の細胞源と比較しても、ドナー年齢や継代数に影響されず安定した血管新生作用を示すことを明らかにした。また下肢虚血モデルを用いた移植実験により DFAT は高い血流改善作用を示し、安全に移植できることを確認した(論文*16, 17, 図書*4, 7, 学会発表*18, 22, 39, 41, 59, 90, 101, 103, 116, 153, 154, 新聞報道*10, 展示会等*1, 4, 5, 6, 8)。これらの研究成果により、平成 30 年度より

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)再生医療実用化研究事業に採択され、重症下肢虚血に対する自家 DFAT 移植による再生医療の治験実施に向けた支援を受けることになった。
2. 企業との連携により、従来法より効率的に DFAT を調製できる調製培地や、天井培養を簡便・容易にする培養フラスコの開発に成功した。開発した培養フラスコは特許出願および意匠出願を行った(特許出願*4, 6, 学会発表*22, 41, インターネット*2, 7, 展示会等*1, 4)。
 3. ヒト吸引脂肪組織を用いた検討により、臨床グレードの DFAT をアイソレータを用いた閉鎖系システムで調製する製造法および品質管理法を確立した(学会発表*12, 18, 22, 26, 41, 59, 63, インターネット*2, 10, 12, 新聞報道*4, 展示会等*1, 4, 5)。
 4. 重症下肢虚血に対する DFAT を用いた細胞治療の臨床研究開始に向け、日本大学医学部リサーチセンター細胞加工施設(CPF)に対する PMDA の施設調査を受け、厚生労働省より特定細胞加工物(DFAT)の製造許可を受けた。また適合基準・除外基準、移植細胞数、評価法などを定め、臨床研究のプロトコル作成を行った(インターネット*6, 12)。
 5. 脂肪特異的レポーターマウスを用いた実験により、創傷治癒過程やがんの進展過程において、生体内でも脂肪細胞の脱分化が起こることを明らかにした(学会発表*5, 8, 40)。
 6. 重度熱傷などの皮膚再生を目的とした細胞治療に DFAT が有望であることを種々の検討により明らかにした(論文*22, 図書*8, 学会発表*2, 35, 46, 49, 51, 52, 60, 66, 72, 78, 105, 114, 117, 126, 137, 157, 特許*2, 新聞報道*8, 展示会等*4, 5, 6, 8, 受賞*2)。
 7. 難治性歯周病に対する DFAT 細胞治療の有効性・安全性を明らかにすることができた。また頬脂肪体由来する DFAT が細胞源として有望であることを明らかにした(論文*1, 4, 10, 12, 図書*1, 学会発表*42, 76, 113, 122, 137, 141, 受賞*3, 特許*1, インターネット*8, 9)。
 8. 変形性脊椎症などの骨軟骨疾患に対する DFAT 細胞移植の治療効果や作用メカニズムを明らかにした(論文*5, 9, 18, 学会発表*20, 48, 57, 81, 82, 89, 94, 98, 104, 112, 134, 138, 144, 158, 159, 160, 167, 168, インターネット*1, 展示会等*4, 5, 6, 7, 8)。

<課題となった点>

天井培養による脂肪細胞の多分化能獲得メカニズム解明を目指した検討をいろいろな実験系を用いて実施したが、本プロジェクト終了時までには鍵となる分子メカニズムの同定には至らなかった。しかし、検討の過程において、脂肪細胞が細胞増殖能を獲得するフェーズと多分化能を獲得するフェーズでそれぞれ異なったシグナル経路が活性化することや、天井培養開始直後に脂肪細胞から数種類の液性因子が異なったタイミングで分泌され、これらのオートクライン作用が DNA 複製開始のトリガーとなることが強く推測されるなど、一定の進捗はあったと思われる。今後 DFAT を用いた細胞治療の産業化を目指す上で、脂肪細胞の多分化能獲得メカニズムの解明や DFAT の多能性を担保するバイオマーカーの同定は、知財強化に直結する重要な研究成果となるため、今後も精力的に研究を継続していく予定である。

血管再生治療用細胞として DFAT の研究開発を進める上で、同じ脂肪組織から調製できる ASC との性能比較を行い、DFAT の優位性を示すことが重要であると考えた。そこで本プロジェクトでは、ヒト DFAT の調製と同時に、同一ドナー由来する ASC を調製し、性能比較を行った。その結果、in vitro の実験系では、DFAT は ASC に比べ、血管新生因子の分泌能や血管内皮細胞の管腔形成能が高いという結果が得られたが、下肢虚血モデルマウスを用いた in vivo 移植実験では、治療効果の優位性を示すことができなかつた。今後、虚血部の血流や血管密度の比較のみならず、側副血行路の発達への影響などより詳細な治療効果の評価を行い、ASC との違いを明確にする予定である。ASC は糖尿病などの基礎疾患があるとその

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

性能が低下することが知られおり、糖尿病モデル動物を用いた実験系で、DFAT と ASC の性能比較試験を行うことにより、DFAT の優位性を示すことができる可能性があると考えられる。また重症下肢虚血を対象とした新たな治療法として、HGF プラスミドを用いた遺伝子治療や自家末梢血 CD34 陽性細胞を用いた細胞治療が実用化段階となっている。このような先行している治療法と DFAT 細胞治療との医療経済学的視点も含めた総合的な性能比較が必要となると思われる。

<自己評価の実施結果と対応状況>

本プロジェクトでは、「DFAT による細胞治療開発」という共通テーマの元、医学部を中心に学部横断的な総合医学研究拠点を形成することを目標とした。その結果、医学部、歯学部、生物資源科学部、生産工学部、総合科学研究所から 76 名に上る研究者が精力的に研究を実施し、多くの研究成果が得られたことから、その目標はほぼ達成されたと思われる。またプロジェクト開始時より大学院生を中心とした若手研究者の育成を念頭においた研究計画を立て、それを実践した結果、30 名を超える若手研究者の参画が得られ、教育面においても大きな成果を上げることができた。研究機器に関しては、セルソーター、ロータリーミクローム、CO₂ インキュベーター、マイクロプレートリーダー、サーマルサイクラー、倒立型顕微鏡、CO₂ 制御チャンバー、全自動セルカウンターなど多くの研究機器を整備することができ、これらはプロジェクト期間中多くの研究者に使用され、本プロジェクトの研究成果に直接つながった。一部の機器(パラフィン包埋装置、ケミルミイメージングシステム)は、本プロジェクトの最終年度に既存の機器が経年劣化により使用できなくなったため、急遽整備することになったが、この整備により多くの研究を滞りなく遂行することができた。研究費の分配に関しては、各研究単位に分担者と定期的にミーティングを行い、必要経費を算出するとともに、発注時にすべて研究代表者が確認する体制を構築することにより、効率的で研究成果に直結する分配を行うことができた。以上の実施内容より、本プロジェクトは日本大学の研究基盤の形成・発展に大きく寄与し、費用対効果の観点から見ても、十分な成果がえられたと思われる。

研究テーマ別の進捗度としては、「治療用細胞としての特性解析」では、DFAT の多分化能獲得メカニズムの解明など一部遅れが生じたが、他の研究はおおむね順調に進捗した。一方、DFAT 三次元培養による高次組織構築の研究など予定より早く完了した項目もあった。これらの状況から達成度 90%と自己評価した。「臨床応用に適合した細胞調製法の確立と移植安全性の検証」では、日本大学医学部リサーチセンターCPF に設置されているアイソレータを用いて GMP 準拠した閉鎖系 DFAT 調製システムを構築し、調製した DFAT の品質管理法を確立するに至った。また調製過程における遺伝的安定性の検証や、移植安全性試験、造腫瘍性試験を実施し、DFAT の治療用細胞としての安全性・妥当性を明確にすることができた。担がんマウスに対する移植実験など一部未実施項目は残ったが、当初達成目標としていた項目はほぼ達成されたと判断し、達成度 95%と自己評価した。「DFAT 細胞治療の開発と前臨床試験」では、血管再生、皮膚再生、歯槽骨再生に関する研究はほぼ順調に進捗した。DFAT を用いた血管再生細胞治療の臨床研究については、臨床研究プロトコルの作成を行ったが、特定認定再生医療等委員会への申請には至らなかった。これらの状況から達成度 85%と自己評価した。

本事業に直接関連する 5 年間の研究成果として、雑誌論文(24 件)、図書(9 件)、学会発表(168 回)、公開シンポジウム(5 回)がなされた。また本事業に係わる特許出願(7 件)や新聞・テレビ報道(10 件)などもなされた。まだ論文化に至っていない研究成果が複数あるため、今後、順次論文化していく予定である。

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

<外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>

2名の有識者(評価者 1: 東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長 森聖二郎先生、評価者 2: 東京大学医科学研究所附属病院セルプロセッシング・輸血部・准教授 長村登紀子先生)に依頼し、3年目終了時および5年目終了時に外部評価を受けた。そのコメントと評価スコアを以下に示す。評価スコアは、「研究内容」、「進捗状況」、「成果報告状況」、「産業財産権」、「社会貢献」についてそれぞれ5: 非常に優れている、4: 優れている、3: 普通、2: やや劣っている、1: 劣っている、の5段階評価とし、その合計点を算出した。

【評価者1】中間評価: DFAT を用いた細胞治療の臨床応用というテーマを共有する個々の研究者が、基礎から臨床にわたるそれぞれの特異分野を生かしながら、チーム全体として相補的に関わりながら研究を進めており高く評価できる。細胞特性解析、細胞調製法確立、前臨床試験という3本柱の達成度は現時点で計画通りの水準を維持しており、近い将来、ヒトへの臨床応用が十分期待できる(評価スコア 21点/25点満点)。**最終評価:** 本プロジェクトでは、DFAT を用いた血管再生細胞治療の実地臨床導入を主たる目的に設定し、その準備段階としてDFATの「治療用細胞としての特性解析(自己評価での達成度90%)」、「臨床応用に適合した細胞調製法の確立と移植安全性の検証(自己評価での達成度95%)」、「DFAT細胞治療の開発と前臨床試験(自己評価での達成度85%)」という3つのテーマに沿って研究が進められた。各テーマの達成度は高く、さらに本プロジェクトは日本大学の研究基盤の形成・発展にも大きく寄与しており、費用対効果の観点から見ても十分な成果がえられたと判断できる。今後、本プロジェクトでえられた知見をもとに、重症下肢虚血に対するDFATを用いた細胞治療の臨床研究の早期開始が期待される(評価スコア 24点/25点満点)。

【評価者2】中間評価: ①研究内容は、動物モデルを作成して有効性を検証し、それを臨床応用へ進めており、基礎から臨床応用までの工程がしっかりできている。進捗も、ほぼ計画通りに行われている点は、高く評価される。②同種細胞としての利用の場合には、将来的にはPMDAと薬事戦略相談の上、再生医療等製品として製剤化を目指す必要があると思われる。臨床研究にてヒトでのPOCを確立された後に、導出企業を決めて、進まれることが期待される。なお、健常ドナーの安全性の担保、どのくらいのドナープールが必要なのかの試算も必要となると考える(評価スコア 23点/25点満点)。**最終評価:** ①オール日本大学と関連外部研究機関および企業との共同研究という大きな体制を率いて研究を牽引されたことは、高く評価される。特に臨床系および基盤的な研究科が参画することで、DFATの特性解析、細胞調製法の確立と移植安全性の検証(非臨床安全性)および細胞治療と前臨床有効性の検証が多方面で進められたこと、特許戦略も十分であり、将来への適応拡大に期待される。②その一方で、AMED再生医療実用化研究事業「重症下肢虚血に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞治療の実用化」に採択されたとのことなので、今後はこの臨床研究達成に集中することも必要と考える。なお、非臨床安全性(薬理)試験は、PMDAとの薬事戦略相談後に決定されたヒトへ投与する最終産物を以て検証する必要があるため、PMDAとの薬事戦略相談は欠かせない。③前項において、投与細胞数から勘案した全体の細胞製剤のスケール感を本事業での動物実験等からも推測されるとよいと考える(評価スコア 23点/25点満点)。

<研究期間終了後の展望>

DFATによる血管再生細胞治療の臨床研究に関しては、平成30年度より採択を受けているAMED再生医療実用化研究事業の支援を受け、「重症下肢虚血に対する自家DFAT移植

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

による細胞治療の First-in-Human 臨床研究」の実施を目指していく。これが実現すれば、世界初の DFAT を用いた血管再生細胞治療の試みとなる予定である。また同時に治験への円滑な移行を図るため、PMDA 薬事戦略相談を実施し、臨床に用いる DFAT の品質や安全性の確認、治験プロトコルの策定などを進める。将来的に重症下肢虚血を対象とした臨床研究にて安全性と有効性が確認されれば、より患者数の多い脳梗塞や難治性皮膚潰瘍などへ適応を拡大したいと考えている。また歯科領域、獣医科領域の細胞治療開発といった学部横断的研究に関しては、平成 30 年度より採択を受けている日本大学理事長特別研究の研究費などを用いて、継続発展させていく予定である。本プロジェクトにより整備した機器・備品は継続してこれらの研究に活用していく。

<研究成果の副次的効果>

本プロジェクト研究成果の副次的効果として以下の企業連携、特許申請を行った。

【企業との連携実績】

1. 株式会社細胞科学研究所:DFAT 調製用培地の開発を行った(2015-2018 年)。
2. 360ip ジャパン株式会社:DFAT 細胞治療に関するベンチャー創出に向けた研究を行った(2014. 9-2017. 3 JST 大学発新産業創出プログラム START プロジェクト支援型)。
3. 日水製薬株式会社:DFAT 調製用培地の開発を行った(2018 年-現在)。
4. 一般社団法人体性幹細胞臨床研究会:DFAT 培養上清を用いた再生医療開発を行った(2016-現在)。
5. 協和発酵キリン株式会社:DFAT 及び MSC の大量調製法の開発を行った(2017 年)。
6. サンプラテック株式会社:DFAT 培養フラスコの委託開発を行った(2016 年-現在)。
7. 株式会社ジェイテック・コーポレーション:DFAT 及び MSC の三次元培養に関する研究を行った(2015-2016 年)。

【特許申請】

1. * 出願番号:PCT/JP2015/068658 特願 2014-149676
発明者: 本田雅規, 鶴町仁奈, 秋田大輔, 外木守男, 加野浩一郎, 松本太郎
発明の名称:「脱分化脂肪細胞の取得方法」
出願人: 日本大学
出願日: 2015 年 6 月 29 日
2. * 出願番号: 特願 2014-226599
発明者: 副島一孝, 松本太郎, 風間智彦
発明の名称:「真皮再建用プレート」
出願人: 日本大学
出願日: 2014 年 11 月 7 日
3. * 出願番号: 特願 2015-065598
発明者: 松本太郎, 風間智彦, 加野浩一郎
発明の名称:「脱分化脂肪細胞を有効成分とする血管再生療法用組成物」
出願人: 日本大学
出願日: 2015 年 3 月 27 日
4. * 出願番号: PCT/JP2016/082413 特願 2015-218569
発明者: 松本太郎, 風間智彦, 萩倉一博
発明の名称:「培養容器」

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

出願人: 日本大学
出願日: 2015 年 11 月 6 日

5. *出願番号: 特願 2017-237231
発明者: 杉谷博士, 中野令, 松本太郎, 加野浩一郎
発明の名称: 「哺乳動物由来脱分化脂肪細胞から神経細胞を製造する方法及び哺乳動物由来の脱分化脂肪細胞から神経細胞への分化誘導用キット」
出願人: 日本大学
出願日: 2017 年 12 月 11 日
6. *出願番号: 意願 2018-015323
発明者: 桑原順一, 松本太郎, 風間智彦
発明の名称: 「培養容器」
出願人: 日本大学・株式会社サンプラテック
出願日: 2018 年 7 月 11 日
7. *出願番号: 特願 2018-196820
発明者: 松本太郎, 風間智彦, 佐藤義朗, 見松はるか
発明の名称: 「壊死性腸炎治療用組成物」
出願人: 日本大学・名古屋大学
出願日: 2018 年 10 月 18 日

12 キーワード

- (1) 再生医学 (2) 細胞治療 (3) 間葉系幹細胞
(4) 血管新生 (5) 脂肪細胞 (6) 脱分化脂肪細胞
(7) 創傷治癒 (8) 脂肪組織由来幹細胞

13 研究発表の状況

<雑誌論文>

【本事業に直接関連するもの】

- *Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. Effect of mature adipocyte-derived fat (DFAT) cells on formation of basement membrane after cultured epithelial autograft on artificial dermis. Plast Reconstr Surg 2019 In press (査読有)
- *Tateno A, Asano M, Akita D, Toriumi T, Tsurumachi-Iwasaki N, Kazama T, Arai Y, Matsumoto T, Kano K, Honda M. Transplantation of dedifferentiated fat cells combined with a biodegradable type I collagen-recombinant peptide scaffold for critical-size bone defects in rats. J Oral Sci 2019 In press (査読有)
- *Shimizu M, Matsumine H, Osaki H, Ueta Y, Tsunoda S, Kamei W, Hashimoto K, Niimi Y, Watanabe Y, Miyata M, Sakurai H. Adipose-derived stem cells and the stromal vascular fraction in polyglycolic-acid (PGA)-collagen nerve conduits promote rat facial nerve regeneration. Wound Repair Regen 26(6): 446-455, 2018 (査読有)
- *Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonogi N, Shimizu N, Honda M. Effect of collagenase concentration to isolate small adipocytes from human buccal fat pad. J Oral Sci 60(1): 14-23, 2018 (査読有)
- *Shimizu M, Matsumoto T, Kikuta S, Ohtaki M, Kano K, Taniguchi H, Saito S, Nagaoka M, Tokuhashi Y. Transplantation of dedifferentiated fat cell-derived micromass pellets

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

contributed to cartilage repair in the rat osteochondral defect model. *J Orthop Sci* 23(4): 688-696, 2018 (査読有)

6. *Mikrogeorgiou A, Kondo T, Hattori T, Sugiyama Y, Nakanishi K, Tsuji M, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Hayakawa M, Sato Y. Dedifferentiated fat cells, as a novel source for cell therapy to target neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Dev Neurosci* 34(1-4): 273-286, 2017 (査読有)
7. *Murai T, Matsumoto T, Ishige M, Kazama T, Kano K, Mugishima H. Effect of dedifferentiated fat cell transplantation in a mouse model of acute graft-versus-host disease. *J Nihon Univ Med* 76(4-5): 187-194, 2017(査読有)
8. *Toyama K, Kano K, Matsumoto T, Hirayama A. Study of cardiac muscle differentiation potential in epicardial adipose-derived dedifferentiated fat cells (DFAT). *J Nihon Univ Med* 76(4-5): 175-185, 2017(査読有)
9. *Nakayama E, Matsumoto T, Kazama T, Kano K, Tokuhashi Y. Transplantation of dedifferentiated fat cells promotes intervertebral disc regeneration in a rat intervertebral disc degeneration model. *Biochem Biophys Res Commun* 493(2):1004-1009, 2017(査読有)
10. *Suzuki D, Akita D, Tsurumachi N, Kano K, Yamanaka K, Kaneko T, Kawano E, Iguchi S, Toriumi T, Arai Y, Matsumoto T, Isokawa K, Sato S, Honda M. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells into three-wall defects in the rat periodontium induces tissue regeneration. *J Oral Sci* 59(4): 611-620, 2017 (査読有)
11. *Ikado Y, Obinata D, Matsumoto T, Murata Y, Kano K, Fukuda N, Yamaguchi K, Takahashi S. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells for treatment of vesicoureteral reflux in a rat model. *Int Urol Nephrol* 48(12): 1951-1960, 2016 (査読有)
12. *Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, Mashimo T, Sato-Shionome M, Tsurumachi N, Yamanaka K, Kaneko T, Toriumi T, Arai Y, Tsukimura N, Matsumoto T, Ishigami T, Isokawa K, Honda M. Use of rat mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells as a cell source for periodontal tissue regeneration. *Front Physiol* 7: 50, 2016(査読有)
13. *Taniguchi H, Kazama T, Hagikura K, Yamamoto C, Kazama M, Nagaoka Y, Matsumoto T. An efficient method to obtain dedifferentiated fat cells. *J Vis Exp* Jul 15;(133), 2016(査読有)
14. *Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonogi M, Isokawa K, Shimizu N, Honda M. Small buccal fat pad cells have high osteogenic differentiation potential. *Tissue Eng Part C*, 22(3): 250-259, 2016(査読有)
15. *Kashimura T, Soejima K, Asamai T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on a dorsal skin flap model. *J Invest Surg* 29(1): 6-12, 2016(査読有)
16. *Nakamura T, Kazama T, Nagaoka Y, Inamo Y, Mugishima H, Takahashi S, Matsumoto T. Influence of donor age and passage number on angiogenic activity in human adipose-derived stem cell-conditioned media. *J Stem Cell Res Ther* 5: 307, 2015 (査読有)
17. *渡邊拓史, 松本太郎, 萩倉一博, 風間智彦, 高橋昌里. 脱分化脂肪細胞(DFAT)における血管新生効果の検討. *日大医学雑誌* 74(5): 238-245, 2015(査読有)
18. *大瀧宗典, 松本太郎, 加野浩一郎, 徳橋泰明. ヒト脱分化脂肪細胞の軟骨分化能の検討. *日大医学雑誌* 74(5): 246-252, 2015(査読有)
19. *Asami T, Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Morioka K, Nakazawa H. Effects of combination therapy using basic fibroblast growth factor and mature

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin graft revascularization. *J Plast Surg Hand Surg* 49(4): 229-233, 2015 (査読有)
20. *Hsiao AY, Okitsu T, Onoe H, Kiyosawa M, Teramae H, Iwanaga S, Kazama T, Matsumoto T, Takeuchi S. Smooth muscle-like tissue constructs with circumferentially oriented cells formed by the cell fiber technology. *PLoS One* 10(3): e0119010, 2015 (査読有)
21. *Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, Kano K, Endo M, Kazama M, Kazama T, Ikeda J, Matsuda H, Ueno T, Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K, Kawachi H. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increasing in TNF-stimulated gene 6. *Stem Cell Res Ther* 6(1): 80, 2015 (査読有)
22. *Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularization of dermis like tissue after artificial dermis grafting. *J Plast Surg Hand Surg* 49(1): 25-31, 2015 (査読有)
23. *Matsumine H, Takeuchi Y, Sakaki R, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Sakurai H, Miyata M, Yamato M. Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 134(4): 686-697, 2014 (査読有)
24. *Yamada H, Ito D, Oki Y, Kitagawa M, Matsumoto T, Watari T, Kano K. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells promotes locomotor functional recovery by remyelination and glial scar reduction after spinal cord injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 454(2): 341-346, 2014 (査読有)
- 【その他】
25. Fujii R, Osaka E, Sato K, Tokuhashi Y. MiR-1 suppresses proliferation of osteosarcoma cells by up-regulating p21 via PAX3. *Cancer Genomics Proteomics* 2019 In press (査読有)
26. Matsumaru T, Sakamaki K, Oki Y, Kano K. Mice liver after 70% partial hepatectomy completes regeneration by restructure of central vein networks. *Hematol Commun* 2019 In press (査読有)
27. Matsumine H, Sasaki R, Fujii K, Sakurai H. Intramasseteric schwannoma derived from the masseteric nerve. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2019 In press (査読有)
28. Niimi Y, Matsumine H, Fukuda S, Salisbury J, Niimi Y, Herndon D, Prough D, Enkhbaatar P. Surgical anatomy of ovine facial and hypoglossal nerves for facial nerve reconstruction and regeneration research: An experimental study in sheep. *Microsurgery* 2019 In press (査読有)
29. Uno S, Shimizu T, Tanaka T, Ashiba H, Fujimaki M, Tanaka M, Awazu K, Makishima M. Application of a waveguide-mode sensor to blood testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus and Treponema pallidum infection. *Sensors* 2019 In press (査読有)
30. Nanjyo S, Ohgane K, Yoshioka H, Makishima M, Hashimoto Y, Noguchi-Yachide M. Structure-activity relationship study of estrogen receptor down-regulators with a diphenylmethane skeleton. *Bioorg Med Chem* 2019 In press (査読有)
31. Fouache A, Zabaïou N, de Joussineau C, Morel L, Silvente-Poirot S, Namsi A, Lizard G, Poirot M, Makishima M, Baron S, Lobaccaro JA, Trousson A. Flavonoids differentially modulate liver X receptors activity. Structure-function relationship analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019 In press (査読有)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

32. Chuma M, Makishima M, Imai T, Tochikura N, Suzuki S, Kuwana T, Sawada N, Iwabuchi S, Sekimoto M, Nakayama T, Sakaue T, Kikuchi N, Yoshida Y, Kinoshita K. Relationship between hemoglobin levels and vancomycin clearance in patients with sepsis. *Eur J Clin Pharmacol* 2019 In press(査読有)
33. Onuki M, Watanabe M, Ishihara N, Suzuki K, Takizawa K, Hirota M, Yamada T, Egawa A, Shibahara O, Nishii M, Fujihara M, Makishima M, Takahashi D, Furusawa Y, Kakuta H, Hase K. A partial agonist for retinoid X receptor mitigates experimental colitis. *Int Immunol* 2019 In press(査読有)
34. Miura W, Nagano N, Kato R, Okahashi A, Yoshikawa K, Ohashi K, Koshinaga T, Morioka I. Intestinal Failure-associated liver disease and eicosapentaenoic acid/arachidonic acid ratio. *Indian J Pediatr* 2019 In press (査読有)
35. Koshinaga T, Takimoto T, Okita H, Tanaka Y, Inoue E, Oue T, Nozaki M, Tsuchiya K, Haruta M, Kaneko Y, Fukuzawa M. Blastemal predominant type Wilms tumors in Japan: Japan Children's Cancer Group. *Pediatr Int* 2019 In press(査読有)
36. Hoshi R, Uehara S, Ono K, Ohashi K, Koshinaga T. Management for H-type anorectal malformation with rectourethral and rectoscrotal fistula. *Pediatr Int* 2019 In press(査読有)
37. Suzuki S, Sotomi Y, Kobayashi T, Hamanaka Y, Nakatani S, Shiojima I, Sakata Y, Hirayama A, Higuchi Y. Early vessel healing after implantation of biodegradable-polymer and durable-polymer drug-eluting stent: 3-month angioscopic evaluation of the RESTORE registry. *Int J Cardiovasc Imaging* 2019 In press (査読有)
38. Sato K, Takahashi J, Odaka Y, Suda A, Sueda S, Teragawa H, Ishii K, Kiyooka T, Hirayama A, Sumiyoshi T, Tanabe Y, Kimura K, Kaikita K, Ong P, Sechtem U, Camici PG, Kaski JC, Crea F, Beltrame JF, Shimokawa H. Japanese Coronary Spasm Association. Clinical characteristics and long-term prognosis of contemporary patients with vasospastic angina: Ethnic differences detected in an international comparative study. *Int J Cardiol* 2019 In press (査読有)
39. Nakamura M, Ako J, Arai H, Hirayama A, Murakami Y, Nohara A, Uno K, Ozaki A, Harada-Shiba M. Investigation into lipid management in acute coronary syndrome patients from the EXPLORE-J Study. *J Atheroscler Thromb* 2019 In press (査読有)
40. Misawa N, Fujii S, Kamiya K, Osaki T, Takaku T, Takahashi Y, Takeuchi S. Construction of a biohybrid odorant sensor using biological olfactory receptors embedded into bilayer lipid membrane on a chip. *ACS Sens* 2019 In press (査読有)
41. Larramendy F, Yoshida S, Maier D, Fekete Z, Takeuchi S, Paul O. 3D arrays of microcages by two-photon lithography for spatial organization of living cells. *Lab Chip* 2019 In press (査読有)
42. Morimoto Y, Onoe H, Takeuchi S. Biohybrid device with antagonistic skeletal muscle tissue for measurement of contractile force. *Advanced Robotics* 2019 In press (査読有)
43. Ikeda K, Takeuchi S. Anchorage-dependent cell expansion in fiber-shaped microcarrier aggregates. *Biotechnol Prog* 2019 In press (査読有)
44. Nakai T, Sakurada A, Endo T, Kobayashi H, Masuda S, Makishima M, Esumi M. Caution for simple sequence repeat number variation in the mitochondrial DNA D-loop to determine cancer-specific variants. *Oncol Lett* 17(2): 1883-1888, 2019(査読有)
45. Mori N, Morimoto Y, Takeuchi S. Perfusable and stretchable 3D culture system for skin-equivalent. *Biofabrication* 11(1): 011001, 2019 (査読有)
46. Groll J, Burdick J, Cho D, Derby B, Gelinsky M, Heilshorn S, Juengst T, Malda J, Mironov

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- V, Nakayama K, Ovsianikov A, Sun W, Takeuchi S, Yoo J, Woodfield T. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication* 11(1): 013001, 2019 (査読有)
47. Kato S, Wada Y, Katayama M, Noro C, Yoshimune K, Hiaki T, Matsumoto M. Promotion of cyanobacteria growth induced by fine bubble injection. *Bull Soc Sea Water Sci Jpn* 73, 30–34. 2019 (査読有)
48. Inagaki Y, Tokunaga T, Yanai M, Wu D, Huang J, Nagase H, Fukuda N, Ozaki T, Soma M, Fujiwara K. Silencing of *EPHB2* promotes the epithelial-mesenchymal transition of skin squamous cell carcinoma-derived A431 cells. *Oncol Lett* 17(4): 3735–3742, 2019 (査読有)
49. Tanaka S, Ueno T, Tsunemi A, Nagura C, Tahira K, Fukuda N, Soma M, Abe M. The adrenal gland circadian clock exhibits a distinct phase advance in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 42(2): 165–173, 2019 (査読有)
50. Murata N, Okumura Y, Yokoyama K, Matsumoto N, Tachibana E, Kuronuma K, Oiwa K, Matsumoto M, Kojima T, Hanada S, Nomoto K, Arima K, Takahashi F, Kotani T, Ikeya Y, Fukushima S, Itoh S, Kondo K, Chiku M, Ohno Y, Onikura M, Hirayama A. SAKURA AF Registry Investigators. Clinical outcomes of off-label dosing of direct oral anticoagulant therapy among Japanese patients with atrial fibrillation identified from the SAKURA AF registry. *Circ J* 83(4): 727–735, 2019 (査読有)
51. Sotomi Y, Hirata A, Amiya R, Kobayashi T, Hirayama A, Sakata Y, Higuchi Y. Bleeding risk of add-on anti-platelet agents to direct oral anticoagulants in patients with nonvalvular atrial fibrillation (from 2216 patients in the DIRECT registry). *Am J Cardiol* 123(8): 1293–1300, 2019 (査読有)
52. Kuronuma K, Okumura Y, Yokoyama K, Matsumoto N, Tachibana E, Oiwa K, Matsumoto M, Kojima T, Hanada S, Nomoto K, Arima K, Takahashi F, Kotani T, Ikeya Y, Fukushima S, Itou S, Kondo K, Chiku M, Ohno Y, Onikura M, Hirayama A; SAKURA AF Registry Investigators. Different determinants of vascular and nonvascular deaths in patients with atrial fibrillation: A SAKURA AF registry substudy. *J Cardiol* 73(3): 210–217, 2019 (査読有)
53. Tanaka S, Ueno T, Tsunemi A, Nakamura Y, Kobayashi H, Hatanaka Y, Haketa A, Fukuda N, Soma M, Abe M. Lipoprotein lipase deficiency arising in type V dyslipidemia. *Int Med* 58(2): 251–257, 2019 (査読有)
54. Tani S, Matsuo R, Hirayama A. Does administration of eicosapentaenoic acid increase soluble thrombomodulin level in statin-treated patients with stable coronary artery disease? *Heart Vessels* 34(2): 368–374, 2019 (査読有)
55. Moriguchi K, Jogahara T, Oda S, Honda M. Scanning transmission electron microscopic analysis of nitrogen generated by 3, 3'-diaminobenzidine-based peroxidase reaction with resin ultrathin sections of rhinoceros parotid gland acinar cells. *Microscopy* 68(2): 111–121, 2019 (査読有)
56. Takayama KI, Suzuki Y, Yamamoto S, Obinata D, Takahashi S, Inoue S. Integrative genomic analysis of OCT1 reveals coordinated regulation of androgen receptor in advanced prostate cancer. *Endocrinology* 160(2): 463–472, 2019 (査読有).
57. Hashimoto S, Obinata D, Yamaguchi K, Sakurai F, Yoshida T, Yoshizawa T, Matsui T, Mochida J, Masuda S, Takahashi S. Case of caval lobular capillary hemangioma mimicking tumor thrombus. *IJU Case Report* 2: 80–82, 2019 (査読有).
58. Obata S, Yoshimaru K, Kirino K, Izaki T, Ieiri S, Yamataka A, Koshinaga T, Iwai J, Ikeda H,

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- Matsufuji H, Oda Y, Taguchi T. Acquired isolated hypoganglionosis as a distinct entity: results from a nationwide survey. *Pediatr Surg Int* 35: 215–220, 2019 (査読有)
59. Haruta M, Arai Y, Okita H, Tanaka Y, Takimoto T, Sugino RP, Yamada Y, Kamiyo T, Oue T, Fukuzawa M, Koshinaga T, Kaneko Y. Combined genetic and chromosomal characterization of Wilms tumors identifies chromosome 12 gain as a potential new marker predicting a favorable outcome. *Neoplasia* 21: 117–131, 2019 (査読有)
60. Giatsidis G, Succar J, Haddad A, Lago G, Schaffer C, Wang W, Schilling B, Chnari E, Matsumine H, Orgill D. Preclinical optimization of a shelf-ready, human-derived, decellularized allograft adipose Matrix. *Tissue Eng Part A* 25(3–4): 271–287, 2019 (査読有)
61. Niim Y, Matsumine H, Takeuchi Y, Osaki H, Tsunoda S, Miyata M, Yamato M, Sakurai H. A collagen-coated PGA conduit for interpositional-jump graft with end-to-side neuroorrhaphy fortreating facial nerve paralysis in rat. *Microsurgery* 39(1): 70–80, 2019 (査読有)
62. Kato M, Ayusawa M, Watanabe H, Komori A, Abe Y, Nakamura T, Kamiyama H, Takahashi S. Cardiac function on 3-D speckle tracking imaging and cytokines in Kawasaki disease. *Pediatr Int* 60(4): 342–348, 2018
63. Abe Y, Ayusawa M, Kato M, Watanabe H, Cho A, Komori A, Okuma H, Ichikawa R, Kamiyama H, Sumitomo N, Ito S, Takahashi S. Sudden death in schoolchildren: A retrospective study on hypertrophic cardiomyopathy and cardiac events occurring under school supervision. *J Pediatr Cardiol Cardiac Surg* 2(1): 60–67, 2018
64. Noto N, Komori A, Ayusawa M, Takahashi S. Recent updates on echocardiography and ultrasound for Kawasaki disease: beyond the coronary artery. *Cardiovasc Diag Ther* 8(1): 80–89, 2018
65. Miyakawa Y, Fuchigami T, Aoki M, Mine Y, Suzuki J, Urakami T, Takahashi S. Agraphia with reversible splenial corpus callosum lesion caused by hypoglycemia. *Brain Dev* 40(7): 592–595, 2018
66. Takano C, Sekia M, Shiihara H, Komine-Aizawa S, Kuroda K, Takahashi S, Ushijima H, Hayakawa S. Frequent isolation of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria from fecal samples of individuals with severe motor and intellectual disabilities. *J Infect Chemother* 182e187, 2018
67. Ichikawa R, Maeda Y, Shibuya A, Umesato Y, Kondo Y, Maeda T, Yoshino A, Takahashi S. Prediction of Poor Prognosis After Severe Head Injury in Children Using Logistic Regression. *Pediatric Emergency Care* 34(12):825–831, 2018
68. Yamada K, Shiraishi H, Oki E, Ishige M, Fukao T, Hamada Y, Sakai N, Ochi F, Watanabe A, Kawakami S, Kuzume K, Watanabe K, Sameshima K, Nakamagoe K, Tamaoka A, Asahina N, Yokoshiki S, Miyakoshi T, Ono K, Oba K, Isoe T, Hayashi H, Yamaguchi S, Sato N. Open-label clinical trial of bezafibrate treatment in patients with fatty acid oxidation disorders in Japan. *Mol Genet Metab Rep* 15: 55–63, 2018 (査読有)
69. Nakazaki K, Ogawa E, Ishige M, Ishige N, Fuchigami T, Takahashi S. Hypocarnitinemia observed in an infant treated with short-term administration of antibiotic containing pivalic acid. *Tohoku J Exp Med* 244(4): 279–282, 2018 (査読有)
70. 五十嵐都志子, 市川保和, 真柴新一, 江副純, 久川聡, 志方えりさ, 高野智圭, 小川えりか, 石毛美夏, 中山智祥. 登録衛生検査所でのフェニルケトン尿症の遺伝学的検査体制構築. *日本染色体遺伝子検査学会雑誌* 36(1): 62–68, 2018 (査読有)
71. Wada Y, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Takezawa Y, Iwasawa S, Nihori T,

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- Nyuzuki H, Nakajima Y, Ogawa E, Ishige M, Hirai H, Sasai H, Fujiki R, Shiota M, Funayama R, Yamamoto M, Ito T, Ohara O, Nakayama K, Aoki Y, Koshiba S, Fukao T, Kure S. Biallelic GALM pathogenic variants cause a novel type of galactosemia. *Genet Med*. doi: 10.1038/s41436-018-0340-x, 2018 (査読有)
72. 石毛信之, 渡辺和宏, 長谷川智美, 小西薫, 間下充子, 世良保美, 村山圭, 菅原秀典, 金城健一, 堀川玲子, 石毛美夏, 大和田操. LC/MS/MS 法によるイソ吉草酸血症の 2 次検査法の有用性 ろ紙血 C5 アシルカルニチン異性体とイソバレリルグリシン同時分析法. *日本マス・スクリーニング学会誌* 28(3): 305-314, 2018 (査読有)
73. Matsumoto K, Tokuhashi Y. Durability and biological response of a new posterior dynamic stabilization system using polyethylene with vitamin E. *BioMed Res Int* 2018: 5785708, 2018 (査読有)
74. Uei H, Tokuhashi Y. Prognostic factors in patients with metastatic spine tumors derived from lung cancer—a novel scoring system for predicting life expectancy. *World J Surg Oncol* 16(1): 131, 2018 (査読有)
75. Uei H, Tokuhashi Y, Oshima M, Maseda M, Nakahashi M, Nakayama E. Efficacy of posterior decompression and fixation based on ossification–kyphosis angle criteria for multilevel ossification of the posterior longitudinal ligament in the thoracic spine. *J Neurosurg Spine* 29(2): 150–156, 2018 (査読有)
76. Uei H, Tokuhashi Y, Maseda M, Nakahashi M, Sawada H, Nakayama E, Soma H. Coparison between minimally invasive spine stabilization with and without posterior decompression for the management of spinal metastases: a retrospective cohort study. *J Orthop Surg Res* 13(1): 87, 2018 (査読有)
77. Uei H, Tokuhashi Y, Maseda M. Treatment outcomes of patients with spinal metastases derived from hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 23(5): 886–893, 2018 (査読有)
78. Uei H, Tokuhashi Y, Maseda M, Nakahashi M, Sawada H, Nakayama E, Soma H. Clinical results of multidisciplinary therapy including palliative posterior spinal stabilization surgery and postoperative adjuvant therapy for metastatic spinal tumor. *J Orthop Surg Res* 13(1): 30, 2018 (査読有)
79. Matsumine H, Kamei W, Fujii K, Shimizu M, Osada A, Sakurai H. One-stage reconstruction by dual-innervated double muscle flap transplantation with the neural interconnection between the ipsilateral masseter and contralateral facial nerve for reanimating established facial paralysis: A report of 2 cases. *Microsurgery* doi: 10.1002/micr.30397. 2018 (査読有)
80. Kamei W, Matsumine H, Osaki H, Ueta Y, Tsunoda S, Shimizu M, Hashimoto K, Niimi Y, Miyata M, Sakurai H. Axonal supercharged interpositional jump-graft with a hybrid artificial nerve conduit containing adipose-derived stem cells in facial nerve paresis rat model. *Microsurgery* 38(8): 889–898, 2018 (査読有)
81. Rhodius P, Haddad A, Matsumine H, Sakthivel D, Ackermann M, Sinha I, Orgill DP, Giatsidis G. Non-invasive flap preconditioning by foam-mediated external suction improves the survival of fascio-cutaneous axial-pattern flaps in a type-2 diabetic murine model. *Plast Reconstr Surg* 142(6): 872e–883e, 2018 (査読有)
82. Sasaki Y, Matsumine H. Modified medical tattooing techniques in nipple-areola complex reconstruction. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 14;6(9):e1926, 2018 (査読有)
83. Takeuchi Y, Osaki H, Matsumine H, Niimi Y, Sasaki R, Miyata M. A method package for electrophysiological evaluation of reconstructed or regenerated facial nerves in rodents. *MethodsX* 30(5):283–298, 2018 (査読有)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

84. Giatsidis G, Cheng L, Haddad A, Ji K, Succar J, Lancerotto L, Lujan-Hernandez J, Fiorina P, Matsumine H, Orgill DP. Noninvasive induction of angiogenesis in tissues by external suction: Sequential optimization for use in reconstructive surgery. *Angiogenesis* 21(1): 61-78, 2018 (査読有)
85. Shibasaki Y, Yoshida-Noro C, Saito M. A Size-dependent multiple-loop negative feedback system describes biological segment formation based on the clock and wavefront mechanism. *Biophys Rev Lett* 13(4): 217-228, 2018 (査読有)
86. Iso K, Watanabe I, Okumura Y, Nagashima K, Takahashi K, Kurokawa S, Arai M, Watanabe R, Wakamatsu Y, Ohkubo K, Nakai T, Hirayama A, Sonoda K, Tosaka T. No association between dormant conduction sites and pulmonary vein reconnection sites in late atrial fibrillation recurrence after catheter ablation. *J Cardiol* 72(6): 488-493, 2018 (査読有)
87. Okumura Y, Yokoyama K, Matsumoto N, Tachibana E, Kuronuma K, Oiwa K, Matsumoto M, Kojima T, Arima K, Kotani T, Nomoto K, Ikeya Y, Fukushima S, Onikura M, Suzuki Y, Fujita M, Ando H, Ishikawa N, Hirayama A; SAKURA AF Registry Investigators. Patient satisfaction with direct oral anticoagulants and warfarin. *Int Heart J* 59(6): 1266-1274, 2018 (査読有)
88. 中原健, 大日方大亮, 吉田利之, 橋本翔, 山本慎一郎, 桜井文紀, 高田将吾, 堀祐太郎, 大野将, 村田保貴, 吉澤剛, 松井強, 佐藤克彦, 持田淳一, 山口健哉, 高橋悟. 水腎症を契機に発見された尿管線維性上皮性ポリープの 1 例. *泌尿器外科* 31(11): 1543-1546, 2018 (査読有).
89. Monno K, Okumura Y, Saito Y, Aizawa Y, Nagashima K, Arai M, Watanabe R, Wakamatsu Y, Otsuka N, Yoda S, Hiro T, Watanabe I, Hirayama A. Effect of epicardial fat and metabolic syndrome on reverse atrial remodeling after ablation for atrial fibrillation. *J Arrhythm* 34(6): 607-616, 2018 (査読有)
90. Suzuki S, Sotomi Y, Nakatani S, Hirata A, Hao H, Tsujimoto M, Tsuji H, Shiojima I, Sakata Y, Hirayama A, Higuchi Y. Histopathologic insights into the honeycomb-like structure in the coronary artery: In vivo multimodality imaging assessment with directional coronary atherectomy. *JACC Cardiovasc Interv* 11(19): e157-e159, 2018 (査読有)
91. Harada-Shiba M, Ako J, Arai H, Hirayama A, Murakami Y, Nohara A, Ozaki A, Uno K, Nakamura M. Prevalence of familial hypercholesterolemia in patients with acute coronary syndrome in Japan: Results of the EXPLORE-J study. *Atherosclerosis* 277: 362-368, 2018 (査読有)
92. Inoue H, Yamashita T, Akao M, Atarashi H, Ikeda T, Okumura K, Koretsune Y, Shimizu W, Tsutsui H, Toyoda K, Hirayama A, Yasaka M, Yamaguchi T, Akishita M, Hasebe N, Kario K, Mizokami Y, Nagata K, Nakamura M, Terauchi Y, Yamamoto T, Teramukai S, Kimura T, Kaburagi J, Takita A. Prospective observational study in elderly patients with non-valvular atrial fibrillation: Rationale and design of the All Nippon AF In the Elderly (ANAFIE) Registry. *J Cardiol* 72(4): 300-306, 2018 (査読有)
93. Watanabe R, Okumura Y, Nagashima K, Iso K, Takahashi K, Arai M, Wakamatsu Y, Kurokawa S, Ohkubo K, Nakai T, Yoda S, Watanabe I, Hirayama A, Sonoda K, Tosaka T. Influence of balloon temperature and time to pulmonary vein isolation on acute pulmonary vein reconnection and clinical outcomes after cryoballoon ablation of atrial fibrillation. *J Arrhythm* 34(5): 511-519, 2018 (査読有)
94. Okumura Y, Yokoyama K, Matsumoto N, Tachibana E, Kuronuma K, Oiwa K, Matsumoto M, Kojima T, Hanada S, Nomoto K, Arima K, Takahashi F, Kotani T, Ikeya Y, Fukushima S, Ito S, Kondo K, Chiku M, Ohno Y, Onikura M, Hirayama A. SAKURA AF Registry

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- Investigators. Three-year clinical outcomes associated with warfarin vs. direct oral anticoagulant use among Japanese patients with atrial fibrillation – Findings from the SAKURA AF registry. *Circ J* 82(10): 2500–2509, 2018 (査読有)
95. Nanasato M, Matsumoto N, Nakajima K, Chikamori T, Moroi M, Takehana K, Momose M, Nishina H, Kasai T, Yoda S, Kiso K, Yamamoto H, Nishimura S, Yamashina A, Kusuoka H, Hirayama A, Nishimura T. Prognostic impact of reducing myocardial ischemia identified using ECG-gated myocardial perfusion SPECT in Japanese patients with coronary artery disease: J-ACCESS 4 study. *Int J Cardiol* 267: 202–207, 2018 (査読有)
96. Sumitomo N, Baba R, Doi S, Higaki T, Horigome H, Ichida F, Ishikawa H, Iwamoto M, Izumida N, Kasamaki Y, Kuga K, Mitani Y, Musha H, Nakanishi T, Yoshinaga M, Abe K, Ayusawa M, Hokosaki T, Kato T, Kato Y, Ohta K, Sawada H, Ushinohama H, Yoshiba S, Atarashi H, Hirayama A, Horie M, Nagashima M, Niwa K, Ogawa S, Okumura K, Tsutsui H. Japanese Circulation Society and the Japanese Society of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery of joint working. Guidelines for heart disease screening in schools (JCS 2016/JSPCCS 2016) – Digest version. *Circ J* 82(9): 2385–2444, 2018 (査読有)
97. Yasuda S, Kaikita K, Ogawa H, Akao M, Ako J, Matoba T, Nakamura M, Miyauchi K, Hagiwara N, Kimura K, Hirayama A, Matsui K. Atrial fibrillation and ischemic events with rivaroxaban in patients with stable coronary artery disease (AFIRE): Protocol for a multicenter, prospective, randomized, open-label, parallel group study. *Int J Cardiol* 265: 108–112, 2018 (査読有)
98. Fukamachi D, Hirayama A, Miyauchi K, Yasuda S, Ogawa H, Ito H, Daida H. Antithrombotic therapy trends in non-valvular atrial fibrillation patients undergoing percutaneous coronary stent implantation: Results from a survey among fellows at the Japanese College of Cardiology. *J Cardiol* 72(2): 113–119, 2018 (査読有)
99. Atsumi W, Tani S, Tachibana E, Hirayama A. Combined evaluation of the plasma arginine vasopressin and noradrenaline levels may be a useful predictor of the prognosis of patients with acute decompensated heart failure. *Int Heart J* 59(4): 791–801, 2018 (査読有)
100. Okumura Y, Fukuda I, Nakamura M, Yamada N, Takayama M, Maeda H, Yamashita T, Ikeda T, Mo M, Yamazaki T, Hirayama A; J'xactly Investigators. Design and rationale for the Japanese registry of rivaroxaban effectiveness & safety for the prevention of recurrence in patients with deep vein thrombosis and pulmonary embolism (J'xactly) study. *BMJ Open* 8(6): e020286, 2018 (査読有)
101. Komatsu S, Yutani C, Ohara T, Takahashi S, Takewa M, Hirayama A, Kodama K. Angioscopic evaluation of spontaneously ruptured aortic plaques. *J Am Coll Cardiol* 71(25): 2893–2902, 2018.6 (査読有)
102. Saito Y, Kato M, Nagashima K, Monno K, Aizawa Y, Okumura Y, Matsumoto N, Moriyama M, Hirayama A. Prognostic relevance of liver stiffness assessed by transient elastography in patients with acute decompensated heart failure. *Circ J* 82(7): 1822–1829, 2018 (査読有)
103. Shiba M, Kitano D, Kunimoto S, Hirayama A. Identification of left ventricular chamber-like aneurysm related to cardiac sarcoidosis. *BMJ Case Rep* 2018. pii: bcr-2017-223910, 2018 (査読有)
104. Takayama T, Hiro T, Yoda S, Fukamachi D, Haruta H, Kogo T, Mineki T, Murata H, Oshima T, Hirayama A. Effect of aggressive lipid-lowering treatment with rosuvastatin on vascular endothelium function: evaluation of vascular endothelium function (EARTH

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- study). *Heart Vessels* 33(6): 590–594, 2018 (査読有)
105. Murata N, Takayama T, Hiro T, Hirayama A. Balloon pin-hole rupture during percutaneous coronary intervention for recurrent, calcified in-stent restenosis: A case report. *Catheter Cardiovasc Interv* 91(7): 1287–1290, 2018 (査読有)
106. Tani S, Matsuo R, Kawauchi K, Yagi T, Atsumi W, Hirayama A. A cross-sectional and longitudinal study between association of n-3 polyunsaturated fatty acids derived from fish consumption and high-density lipoprotein heterogeneity. *Heart Vessels* 33(5): 470–480, 2018 (査読有)
107. Yamaguchi N, Okumura Y, Watanabe I, Nagashima K, Takahashi K, Iso K, Watanabe R, Arai M, Mano H, Kogawa R, Kurokawa S, Ohkubo K, Nakai T, Hirayama A, Sonoda K, Tosaka T. Impact of sinus node recovery time after long-standing atrial fibrillation termination on the long-term outcome of catheter ablation. *Int Heart J* 59(3): 497–502, 2018 (査読有)
108. Taguchi I, Iimuro S, Iwata H, Takashima H, Abe M, Amiya E, Ogawa T, Ozaki Y, Sakuma I, Nakagawa Y, Hibi K, Hiro T, Fukumoto Y, Hokimoto S, Miyauchi K, Yamazaki T, Ito H, Otsuji Y, Kimura K, Takahashi J, Hirayama A, Yokoi H, Kitagawa K, Urabe T, Okada Y, Terayama Y, Toyoda K, Nagao T, Matsumoto M, Ohashi Y, Kaneko T, Fujita R, Ohtsu H, Ogawa H, Daida H, Shimokawa H, Saito Y, Kimura T, Inoue T, Matsuzaki M, Nagai R. High-dose versus low-dose pitavastatin in Japanese patients with stable coronary artery disease (REAL-CAD): A Randomized superiority trial. *Circulation* 137(19): 1997–2009, 2018 (査読有)
109. Nagashima K, Okumura Y, Watanabe I, Nakahara S, Hori Y, Iso K, Watanabe R, Arai M, Wakamatsu Y, Kurokawa S, Mano H, Nakai T, Ohkubo K, Hirayama A. Hot balloon versus cryoballoon ablation for atrial fibrillation: Lesion characteristics and middle-term outcomes. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 11(5): e005861, 2018 (査読有)
110. Aizawa Y, Nakai T, Saito Y, Monno K, Morikawa T, Kogawa R, Hatta T, Tamaki T, Kato M, Arimoto M, Osaka S, Sunagawa K, Tang XY, Tanaka M, Hao H, Hirayama A. Calcified amorphous tumor-induced acute cerebral infarction. *Int Heart J* 59(1): 240–242, 2018 (査読有)
111. Yoda S, Hori Y, Hayase M, Mineki T, Hatta T, Suzuki Y, Matsumoto N, Hirayama A. Correlation between early revascularization and major cardiac events demonstrated by ischemic myocardium in Japanese patients with stable coronary artery disease. *J Cardiol* 71(1): 44–51, 2018 (査読有)
112. Wada T, Ichihashi Y, Suzuki E, Kosuge Y, Ishige K, Uchiyama T, Makishima M, Nakao R, Oishi K, Shimba S. Deletion of Bmal1 prevents diet-induced ectopic fat accumulation by controlling oxidative capacity in the skeletal muscle. *Int J Mol Sci* 19(9): E2813, 2018 (査読有)
113. Nishiyama Y, Fujii S, Makishima M, Hashimoto Y, Ishikawa M. Efficient lead finding, activity enhancement and preliminary selectivity control of nuclear receptor ligands bearing a phenanthridinone skeleton. *Int J Mol Sci* 19(7): E2090, 2018 (査読有)
114. Otero R, Ishizawa M, Numoto N, Ikura T, Ito N, Tokiwa H, Mourino A, Makishima M, Yamada S. 25S-Adamantyl-23-yne-26,27-dinor-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃: Synthesis, tissue selective biological activities and X-ray crystal structural analysis of its vitamin D receptor complex. *J Med Chem* 61(15): 6658–6673, 2018 (査読有)
115. Ishizawa M, Akagi D, Makishima M. Lithocholic acid is a vitamin D receptor ligand that acts preferentially in the ileum. *Int J Mol Sci* 19(7): E1975, 2018 (査読有)
116. Kainuma M, Takada I, Makishima M, Sano K. Farnesoid X receptor activation enhances

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- transforming growth factor β -induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Sci* 19(7): E1898, 2018(査読有)
117. Nishiyama Y, Mori S, Makishima M, Fujii S, Kagechika H, Hashimoto Y, Ishikawa M. Novel non-steroidal progesterone receptor (PR) antagonists with a phenanthridinone skeleton. *ACS Med Chem Lett* 9(7): 641-645, 2018(査読有)
118. Endo-Umeda K, Nakashima H, Komine-Aizawa S, Umeda N, Seki S, Makishima M. Liver X receptors regulate hepatic F4/80⁺CD11b⁺ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice. *Sci Rep* 18(1): 9281, 2018(査読有)
119. Shioi R, Toyota Y, Noguchi-Yachide T, Ishikawa M, Yamaguchi T, Makishima M, Hashimoto Y, Ohgane K. Unexpected emergence of luciferase-inhibitory activity during structural development study of phenyloxadiazole-based PPAR ligands. *Heterocycles* 97(2): 854-864, 2018(査読有)
120. Nakagawa M, Uno S, Iriyama N, Matsunawa M, Makishima M, Takeuchi J, Tsuboi I, Hatta Y, Takei M. Combined treatment with benzo[a]pyrene and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces expression of plasminogen activator inhibitor 1 in monocyte/macrophage-derived cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 345: 48-56, 2018(査読有)
121. Takada I, Tsuchiya M, Yanaka K, Hidano S, Takahashi S, Kobayashi T, Ogawa H, Nakagawa S, Makishima M. Ess2 bridges transcriptional regulators and spliceosomal complexes via distinct interacting domains. *Biochem Biophys Res Commun* 497(2): 597-604, 2018(査読有)
122. Uno S, Tanaka T, Ashiba H, Fujimaki M, Tanaka M, Hatta Y, Takei M, Awazu K, Makishima M. Sensitive typing of reverse ABO blood groups with a waveguide-mode sensor. *J Biosci Bioeng* 126(1): 131-137, 2018(査読有)
123. Endo-Umeda K, Nakashima H, Umeda N, Seki S, Makishima M. Dysregulation of kupffer cells/ macrophages and natural killer T cells in steatohepatitis in LXR α knockout male mice. *Endocrinology* 159(3): 1419-1432, 2018(査読有)
124. Uno S, Nebert DW, Makishima M. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) protects against nonalcoholic fatty liver disease caused by Western diet containing benzo[a]pyrene in mice. *Food Chem Toxicol* 113: 73-82, 2018(査読有)
125. Nomura S, Endo-Umeda K, Fujii S, Makishima M, Hashimoto Y, Ishikawa M. Structural development of tetrachlorophthalimides as liver X receptor β (LXR β)-selective agonists with improved aqueous solubility. *Bioorg Med Chem Lett* 28(4): 796-801, 2018(査読有)
126. Ishibashi M, Yamaguchi H, Hirotani Y, Sakurada A, Endo T, Sugitani M, Takayama T, Makishima M, Esumi M. Contradictory intrahepatic immune responses activated in high-load hepatitis C virus livers compared with low-load livers. *Arch Virol* 163(4): 855-865, 2018(査読有)
127. 竹内紘子, 池田太郎, 力山敏樹. 異なる発育形態を呈した小児小腸腸間膜リンパ管腫の2例. *小児外科* 50(6): 545-549, 2018(査読有)
128. 八木実, 河野美幸, 浅桐公男, 池田太郎, 岡田忠男, 金田 聡, 川島章子, 後藤由紀子, 高野周一, 安福正男, 和田 基. わが国における新生児外科の動向 日本小児外科学会学術・先進医療検討委員会アンケート集計からみた 20 年の変遷. *小児外科* 50(6): 545-549, 2018(査読無)
129. 大崎雅則, 杉山洋平, 野中航仁, 平久保由香, 市橋 光, 益子貴行, 池田太郎. 排尿時膀胱尿道造影で膀胱外への外翻像を呈した単純性尿管瘤の 1 例. *小児科臨床* 71(6): 1133-1137, 2018(査読有)
130. 樫村勉, 仲沢弘明. 手指部熱傷の急性期治療. *PEPARS* 134: 49-56, 2018(査読有)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 131.竹田昌平, 副島一孝, 檜村勉, 屋形有美, 吉田光徳, 堀米迪生, 菊池雄二, 仲沢弘明, 山口順子, 木下浩作. 練炭を用いた自殺未遂による遠赤外線熱傷(仮称)の治療経験. 熱傷 44(1): 29-37, 2018 (査読有)
- 132.Kamiya K, Osaki T, Nakao K, Kawano R, Fujii S, Misawa N, Hayakawa M, and Takeuchi S. Electrophysiological measurement of ion channels on plasma/organelle membranes using an on-chip lipid bilayer system. *Sci Rep* 8: 17498, 2018 (査読有)
- 133.Kamm R, Bashir R, Arora N, Dar R, Gillette M, Griffith L, Kemp M, Kinlaw K, Levin M, Martin A, McDevitt T, Nerem R, Powers M, Saif T, Sharpe J, Takayama S, Takeuchi S, Kaiming Ye, Yevick H, Zaman M. The promise of multi-cellular engineered living systems. *APL Bioeng* 2: 040901, 2018 (査読有)
- 134.Nie M, Takeuchi S. Bottom-up biofabrication using microfluidic techniques. *Biofabrication* 10(4): 044103, 2018 (査読有)
- 135.Elfaraway M, Fujii S, Uyeda A, Osaki T, Takeuchi S, Kato Y, Watanabe H, Matsuura T. Quantitative analysis of cell-free synthesized membrane proteins at the stabilized droplet interface bilayer. *Chem Commun* 54: 12226-12229, 2018 (査読有)
- 136.Fujii S, Kamiya K, Osaki T, Misawa N, Hayakawa M and Takeuchi S. Purification-free microRNA detection by using magnetically immobilized nanopores on liposome membrane. *Anal Chem* 90(17): 10217-10222, 2018 (査読有)
- 137.Morimoto Y, Kiyosawa M, Takeuchi S. Three-dimensional printed microfluidic modules for design changeable coaxial microfluidic devices. *Sens Actuators B Chem* 274(20): 491-500, 2018 (査読有)
- 138.Shima A, Morimoto Y, Sweeney H, Takeuchi S. Three-dimensional contractile muscle tissue consisting of human skeletal myocyte cell line. *Exp Cell Res* 370(1): 168-173, 2018 (査読有)
- 139.Yoshida S, Morimoto Y, Zheng L, Onoe H, Takeuchi S. Multipoint bending and shape retention of a pneumatic bending actuator by a variable stiffness endoskeleton. *Soft Robot* 5(6): 718-725, 2018 (査読有)
- 140.Morimoto Y, Onoe H, Takeuchi S. Biohybrid robot powered by an antagonistic pair of skeletal muscle tissues. *Sci Robot* 3: eaat4440, 2018 (査読有)
- 141.Nishimura K, Morimoto Y, Mori N, Takeuchi S. Formation of branched and chained alginate microfibers using theta-glass capillaries. *Micromachines* 9: 303, 2018 (査読有)
- 142.Yoshida S, Kato-Negishi M, Takeuchi S. Assembly and connection of micropatterned single neurons for neuronal network formation. *Micromachine* 9(5): 235, 2018 (査読有)
- 143.Moroni L, Burdick J, Highley C, Lee S, Morimoto Y, Takeuchi S, Yoo J. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nat Rev Mater* 3(5): 21-37, 2018 (査読有)
- 144.Misawa N, Osaki T, Takeuchi S. Membrane protein-based biosensors. *J R Soc Interface* 15: 20170952, 2018 (査読有)
- 145.Yasuga H, Kamiya K, Takeuchi S, Miki N. Self-generation of two-dimensional droplet array using oil/water immiscibility and replacement. *Lab Chip* 18(7): 1130-1137, 2018 (査読有)
- 146.Gotanda M, Kamiya K, Osaki T, Fujii S, Misawa N, Miki N, Takeuchi S. Sequential generation of asymmetric lipid vesicles using a pulsed-jetting method in rotational wells. *Sens Actuators B Chem* 261(15): 392-397, 2018 (査読有)
- 147.Kamiya K, Abe Y, Inoue K, Osaki T, Kawano R, Miki N, Takeuchi S. Well-controlled cell-trapping systems for investigating heterogeneous cell-cell interactions. *Adv Healthc*

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

Mater 7: 1701208, 2018 (査読有)

148. Izawa Y, Osaki T, Kamiya K, Fujii S, Misawa N, Takeuchi S, Miki N. Suppression of sloshing by utilizing surface energy and geometry in microliter cylindrical well. *Sens Actuators B Chem* 258: 1036–1041, 2018 (査読有)

149. Gutierrez M, Yoshida S, Malmstadt N, Takeuchi S. Rehydration on a photolithographic patterned surface forms size-controlled lipid vesicle. *APL Bioeng* 2: 016104, 2018 (査読有)

150. Matsumine H, Mogami M, Fujiwara O, Hasegawa M, Ito H, Sakurai H. Improvement of the salvage-rate of flap after venous thrombosis with Intraparenchymatous venous pressure monitoring. *Microsurgery* 38(5): 498–503, 2018 (査読有)

151. Negishi E, Fukuda N, Otsuki T, Katakawa M, Komatsu K, Chen L, Tanaka S, Kobayashi H, Hatanaka Y, Ueno T, Endo M, Mashimo T, Nishiyama A, Abe M. Involvement of complement 3 in the salt-sensitive hypertension by activation of renal renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 315(6): F1747–F1758, 2018 (査読有)

152. Higuchi T, Moriyama M, Fukushima A, Matsumura H, Matsuoka S, Kanda T, Sugitani M, Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N. Association of mRNA expression of iron metabolism-associated genes and progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Oncotarget* 9(40): 26183–26194. 2018 (査読有)

153. Ishizuka Y, Koshinaga T, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Watanabe Y, Hoshi R, Yoshizawa S, Sugito K, Kawashima H, Uekusa S, Fukuda N, Soma M, Fujiwara K. NRP1 knockdown promotes the migration and invasion of human neuroblastoma-derived SK-N-AS cells via the activation of $\beta 1$ integrin expression. *Int J Oncol* 53(1): 159–166, 2018 (査読有)

154. Miyamae J, Suzuki S, Katakura F, Uno S, Tanaka M, Okano M, Matsumoto T, Kulski JK, Moritomo T, Shiina T. Identification of novel polymorphisms and two distinct haplotype structures in dog leukocyte antigen class I genes: DLA-88, DLA-12 and DLA-64. *Immunogenetics* 70(4): 237–255, 2018 (査読有)

155. Tanaka S, Haketa A, Yamamuro S, Suzuki T, Kobayashi H, Hatanaka Y, Ueno T, Fukuda N, Abe M, Yoshino A, Soma M. Marked alteration of glycemic profile surrounding lanreotide administration in acromegaly: a case report. *J Diabetes Investig* 9(1): 223–225. 2018 (査読有)

156. Okano T, Imai K, Tsujita Y, Mitsui N, Yoshida K, Kamae C, Honma K, Mitsui-Sekinaka K, Sekinaka Y, Kato T, Hanabusa K, Endo E, Takashima T, Hiroki H, Yeh TW, Tanaka K, Nagahori M, Tsuge I, Bando Y, Iwasaki F, Shikama Y, Inoue M, Kimoto T, Moriguchi N, Yuza Y, Kaneko T, Suzuki K, Matsubara T, Maruo Y, Kunitsu T, Waragai T, Sano H, Hashimoto Y, Tasaki K, Suzuki O, Shirakawa T, Kato M, Uchiyama T, Ishimura M, Tauchi T, Yagasaki H, Jou ST, Yu HH, Kanegane H, Kracker S, Durandy A, Kojima D, Muramatsu H, Wada T, Inoue Y, Takada H, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Nonoyama S, Morio. Hematopoietic stem cell transplantation for progressive combined immunodeficiency and lymphoproliferation in activated PI3K δ syndrome type 1. *J Allergy Clin Immunol* 43(1): 266–275, 2018 (査読有)

157. Shijo K, Moro N, Sasano M, Watanabe M, Yagasaki H, Takahashi S, Homma T, Yoshino A. Unusual presentation of a skull base mass lesion in sarcoidosis mimicking malignant neoplasm: a case report. *BMC Neurol* 18(1): 77, 2018 (査読有)

158. Hirai M, Yagasaki H, Fujimura J, Inoue M, Shimosawa K, Okuma H, Chin M, Takahashi S. Successful preemptive donor lymphocyte infusions from a haploidentical donor in a boy

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- with E2A-HLF positive ALL. *Leuk Lymphoma* 59(3): 746-748, 2018 (査読有)
159. Okubo T, Tsukimura N, Taniyama T, Ishijima M, Nakhaei K, Rezaei NM, Hirota M, Park W, Akita D, Tateno A, Ishigami T, Ogawa T. Ultraviolet treatment restores bioactivity of titanium mesh plate degraded by contact with medical gloves. *J Oral Sci* 60(4): 567-573, 2018 (査読有)
160. Okuwa Y, Toriumi T, Nakayama H, Ito T, Otake K, Kurita K, Nakashima M, Honda M. Transplantation effects of dental pulp-derived cells on peripheral nerve regeneration in crushed sciatic nerve injury. *J Oral Sci* 60(4): 526-535, 2018 (査読有)
161. Mori H, Hamamura K, Yo S, Hamajima K, Ootani K, Honda M, Ishizuka K, Kondo H, Tanaka K, Kodama D, Hirai T, Miyazawa K, Goto S, Togari A. Conditioned medium from rat dental pulp reduces the number of osteoclasts via attenuation of adhesiveness in osteoclast precursors. *J Oral Sci* 60(3): 352-359, 2018. (査読有)
162. Yoshizawa T, Hayashi Y, Yoshida A, Yoshida S, Ito Y, Yamaguchi K, Yamada S, Takahashi S. Concomitant alteration in number and affinity of P2X and muscarinic receptors are associated with bladder dysfunction in early stage of diabetic rats. *Int Urol Nephrol* 50: 451-458, 2018 (査読有).
163. Lawrence MG, Obinata D, Sandhu S, Selth LA, Wong SQ, Porter LH, Lister N, Pook D, Pezaro CJ, Goode DL, Rebello RJ, Clark AK, Papargiris M, Van Gramberg J, Hanson AR, Banks P, Wang H, Niranjana B, Keerthikumar S, Hedwards S, Huglo A, Yang R, Henzler C, Li Y, Lopez-Campos F, Castro E, Toivanen R, Azad A, Bolton D, Goad J, Grummet J, Harewood L, Kourambas J, Lawrentschuk N, Moon D, Murphy DG, Sengupta S, Snow R, Thorne H, Mitchell C, Pedersen J, Clouston D, Norden S, Ryan A, Dehm SM, Tilley WD, Pearson RB, Hannan RD, Frydenberg M, Furic L, Taylor RA, Risbridger GP. Patient-derived models of abiraterone- and enzalutamide-resistant prostate cancer reveal sensitivity to ribosome-directed therapy. *Eur Urol* 74(5): 562-572, 2018 (査読有).
164. Obinata D, Sugihara T, Yasunaga H, Mochida J, Yamaguchi K, Murata Y, Yoshizawa T, Matsui T, Matsui H, Sasabuchi Y, Fujimura T, Homma Y, Takahashi S. Tension-free vaginal mesh surgery versus laparoscopic sacrocolpopexy for pelvic organ prolapse: Analysis of perioperative outcomes using a Japanese national inpatient database. *Int J Urol* 25(7): 655-659, 2018 (査読有).
165. Koshinaga T, Takimoto T, Oue T, Okita H, Tanaka Y, Nozaki M, Tsuchiya K, Inoue E, Haruta M, Kaneko Y, Fukuzawa M. Outcome of renal tumors registered in Japan Wilms Tumor Study-2 (JWiTS-2): A report from the Japan Children's Cancer Group (JCCG). *Pediatr Blood Cancer* 65: e27056, 2018 (査読有)
166. Koshinaga T, Ohashi K, Ono K, Kaneda H, Furuya T. Obliterative cholangiopathy in acquired cystic biliary atresia type III after cyst perforation: A case report. *BMC Pediatr* 18: 158, 2018 (査読有)
167. Yoda M, Hosono S, Nagano N, Yoshikawa K, Takahashi S. Hemolytic disease of the newborn due to anti-E and anti-c antibody following maternal transfusion. *Pediatr Int* 59(10): 1093-1094, 2017 (査読有)
168. Odajima H, Hosono S, Kayama K, Yoshikawa K, Takahashi S. Congenital adrenal hyperplasia and violation of newborn screening procedures. *Pediatr Int* 59(10): 1107-1108, 2017 (査読有)
169. Komori A, Ayusawa M, Kato M, Nakamura T, Takahashi S. Congenital complete atrioventricular block with pulmonary hypertension. *Pediatr Int* 59(10): 1095-1096, 2017 (査読有)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

170. Taguchi Y, Hosono S, Kayama K, Kato R, Hine K, Nagano N, Yoshikawa K, Takahashi S, Takahashi S. Target value of oxygen saturation during the first 10 min after birth. *Pediatr Int* 59(10): 1064–1068, 2017 (査読有)
171. Takano C, Ishige M, Ogawa E, Usui H, Kagawa R, Tajima G, Fujiki R, Fukao T, Mizuta K, Fuchigami T, Takahashi S. A case of classical maple syrup urine disease that was successfully managed by living donor liver transplantation. *Ediatr Transplant* 21(5), 2017 (査読有)
172. Kamei K, Ishikura K, Sako M, Aya K, Tanaka R, Nozu K, Kaito H, Nakanishi K, Ohtomo Y, Miura K, Takahashi S, Morimoto T, Kubota W, Ito S, Nakamura H, Iijima K; Rituximab for Childhood-Onset Refractory Nephrotic Syndrome (RCRNS) Study Group. Long-term outcome of childhood-onset complicated nephrotic syndrome after a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial of rituximab. *Pediatr Nephrol* 32(11): 2071–2078, 2017 (査読有)
173. Fuchigami T, Fujita Y, Oyama M, Inamo Y, Takahashi S, Yamaguchi T, Miyazaki O, Nishimura G. Familial unilateral carpal bone dysplasia in mother and daughter. *Clin Dysmorphol* 26(3): 167–169, 2017 (査読有)
174. Yagasaki H, Watanabe N, Hirai M, Shimozawa K, Mugishima H, Takahashi S. A Japanese infant with systemic juvenile xanthogranuloma mimicking severe microangiopathy. *Ann Hematol* 96(7): 1233–1235, 2017 (査読有)
175. Saito H, Takahashi Y, Takahashi S. Measurement of blood pressure to detect elusive kidney disease. *Pediatr Int* 59(5): 638–639, 2017 (査読有)
176. Fuwa K, Hosono S, Nagano N, Takahashi S, Nakashima M. Retinopathy of prematurity after sildenafil treatment. *Pediatr Int* 59(3): 360–361, 2017 (査読有)
177. Ishige M, Fuchigami T, Ogawa E, Usui H, Kohira R, Watanabe Y, Takahashi S. Severe acute subdural hemorrhages in a patient with glutaric acidemia type 1 under recommended treatment. *Pediatr Neurosurg* 52(1): 46–50, 2017 (査読有)
178. Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R, Okada S, Sakura N, Maruyama S, Noguchi A, Awaya T, Ishige M, Ishige N, Musha I, Ajihara S, Ohtake A, Naito E, Hamada Y, Kono T, Asada T, Sasai H, Fukao T, Fujiki R, Ohara O, Bo R, Yamada K, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Takayanagi M, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M. Newborn screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency using (C16+C18:1)/C2: Evaluation of additional indices for adequate sensitivity and lower false-positivity. *Mol Genet Metab* 122(3): 67–75, 2017 (査読有)
179. Ogawa E, Shimura M, Fushimi T, Tajika M, Ichimoto K, Matsunaga A, Tsuruoka T, Ishige M, Fuchigami T, Yamazaki T, Mori M, Kohda M, Kishita Y, Okazaki Y, Takahashi S, Ohtake A, Murayama K. Clinical validity of biochemical and molecular analysis in diagnosing Leigh syndrome: a study of 106 Japanese patients. *J Inherit Metab Dis* 40(5): 685–693, 2017 (査読有)
180. Takano C, Ishige M, Ogawa E, Usui H, Kagawa R, Tajima G, Fujiki R, Fukao T, Mizuta K, Fuchigami T, Takahashi S. A case of classical maple syrup urine disease that was successfully managed by living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant* 21(5): e12948, 2017 (査読有)
181. Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Toyoshima S, Kuroda K, Saito S, Tokuhashi Y, Okayama Y. The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. *Allergol Int Sep*;66S: S9–S20, 2017 (査読有)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

182. Uei H, Tokuhashi Y, Oshima M, Maseda M, Matsumoto K, Soma H, Nakayama E, Tachikawa Y. Clinical results of minimally invasive spine stabilization for spinal metastasis. *Orthopedics* 40(4): e693–e698, 2017 (査読有)
183. Uei H, Tokuhashi Y, Maseda M. Analysis of the relationship between the epidural spinal cord compression (ESCC) scale and paralysis caused by metastatic spine tumors. *Spine* 43(8): E448–E455, 2018 (査読有)
184. Ohshima Y, Takata N, Suzuki–Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Suzuki–Karasaki Y. Disruptin mitochondrial Ca^{2+} homeostasis causes tumorselective TRAIL sensitization through mitochondrial network abnormalities. *Int J Oncol* 51: 1146–1158, 2017 (査読有)
185. Uei H, Tokuhashi Y, Maseda M. Treatment outcome of metastatic spine tumor in lung cancer patients: Did the treatments improve their outcomes? *Spine* 42(24): E1446–E1451, 2017 (査読有)
186. Takata N, Ohshima Y, Suzuki–Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Suzuki–Karasaki Y. Mitochondrial Ca^{2+} removal amplifies TRAIL cytotoxicity toward apoptosis–resistant tumor cells via promotion of multiple cell death modalities. *Int J Oncol* 51: 193–203, 2017 (査読有)
187. Amelot A, Balabaud L, Choi D, Fox Z, Crockard HA, Albert T, Arts CM, Buchowski JM, Bunker C, Chung CK, Coppes MH, Depreitere B, Fehlings MG, Harrop J, Kawahara N, Kim ES, Lee CS, Leung Y, Liu ZJ, Martin–Benloch JA, Massicotte EM, Meyer B, Oner FC, Peul W, Quraishi N, Tokuhashi Y, Tomita K, Ulbricht C, Verlaan JJ, Wang M, Mazel C. Surgery for metastatic spine tumors in the elderly. Advanced age is not a contraindication to surgery! *Spine J* 17(6): 759–767, 2017 (査読有)
188. Hosaka K, Saito S, Oyama T, Fujimaki H, Cho E, Ishigaki K, Tokuhashi Y. Union, knee alignment, and clinical outcomes of patients treated with autologous bone grafting for medial tibial defects in primary total knee arthroplasty. *Orthopaedics* 40(4): e604–e608, 2017 (査読有)
189. Suruga M, Horaguchi T, Iriuchishima T, Yahag Y, Iwama G, Tokuhashi Y, Aizawa S. Morphological size evaluation of the mid–substance insertion areas and the fan–like extension fibers in the femoral ACL footprint. *Arch Orthop Trauma Surg* 137(8): 1107–1113, 2017 (査読有)
190. Kato M, Komamura K, Kitakaze M, Hirayama A. The impact of bronchodilator therapy on systolic heart failure with concomitant mild to moderate COPD. *Diseases* 6(1). pii: E4, 2017 (査読有)
191. Yamaguchi N, Okumura Y, Watanabe I, Nagashima K, Takahashi K, Iso K, Watanabe R, Arai M, Kurokawa S, Ohkubo K, Nakai T, Hirayama A. Clinical implications of serum adiponectin on progression of atrial fibrillation. *J Arrhythm* 33(6): 608–612, 2017 (査読有)
192. Nakai T, Sato T, Soejima K, Takamine Y, Watanabe M, Kobayashi K, Oshima H, Fukaya C, Okumura Y, Ohkubo K, Kunimoto S, Watanabe I, Yoshino A, Hirayama A. Brain magnetic resonance imaging examination in a patient with non–magnetic resonance conditional pacemaker. *J Arrhythm* 33(5): 518–520, 2017 (査読有)
193. Kogawa R, Okumura Y, Watanabe I, Nagashima K, Takahashi K, Iso K, Watanabe R, Arai M, Kurokawa S, Ohkubo K, Nakai T, Hirayama A, Sonoda K, Tosaka T. Left atrial remodeling: regional differences between paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *J Arrhythm* 33(5): 483–487, 2017 (査読有)
194. Sonoda K, Okumura Y, Watanabe I, Nagashima K, Mano H, Kogawa R, Yamaguchi N, Takahashi K, Iso K, Ohkubo K, Nakai T, Kunimoto S, Hirayama A. Scar characteristics

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- derived from two- and three-dimensional reconstructions of cardiac contrast-enhanced magnetic resonance images: Relationship to ventricular tachycardia inducibility and ablation success. *J Arrhythm* 33(5): 447-454, 2017 (査読有)
195. Tani S, Yagi T, Atsumi W, Kawauchi K, Matsuo R, Hirayama A. Relation between low-density lipoprotein cholesterol/apolipoprotein B ratio and triglyceride-rich lipoproteins in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 16(1): 123, 2017 (査読有)
196. Ando Y, Saito M, Machida M, Yoshida-Noro C, Takahashi M, Toyoda M and Umezawa A. Can human embryonic stem cell-derived stromal cells serve a starting material for myoblasts? *Stem Cell Int* 2017:7541734, 2017 (査読有)
197. Maebayashi T, Ishibashi N, Aizawa T, Sakaguchi M, Sato H, Matsui T, Yamaguchi K, Takahashi S: Factors predicting late rectal disorders after radiation therapy for prostate cancer. *Chin Med J* 130: 2441-2446, 2017 (査読有)
198. 山本慎一郎, 吉田利之, 橋本翔, 高田将吾, 桜井文紀, 堀祐太郎, 村田保貴, 大野将, 吉澤剛, 松井強, 佐藤克彦, 持田淳一, 山口健哉, 高橋悟. 帝王切開術後に発生した尿管子宮瘻の1例. *日本泌尿器科学会雑誌* 108(4): 234-237, 2017 (査読有)
199. Okumura Y, Yokoyama K, Matsumoto N, Tachibana E, Kuronuma K, Oiwa K, Matsumoto M, Kojima T, Hanada S, Nomoto K, Arima K, Takahashi F, Kotani T, Ikeya Y, Fukushima S, Itoh S, Kondo K, Chiku M, Ohno Y, Onikura M, Hirayama A, The Sakura Af Registry Investigators. Current use of direct oral anticoagulants for atrial fibrillation in Japan: Findings from the SAKURA AF Registry. *J Arrhythm* 33(4): 289-296, 2017 (査読有)
200. Iso K, Watanabe I, Kogawa R, Okumura Y, Nagashima K, Takahashi K, Watanabe R, Arai M, Ohkubo K, Nakai T, Hirayama A, Nikaido M. Wavefront direction and cycle length affect left atrial electrogram amplitude. *J Arrhythm* 33(4): 269-274, 2017 (査読有)
201. Sudo M, Li Y, Hiro T, Takayama T, Mitsumata M, Shiomi M, Sugitani M, Matsumoto T, Hao H, Hirayama A. Inhibition of plaque progression and promotion of plaque stability by glucagon-like peptide-1 receptor agonist: Serial in vivo findings from iMap-IVUS in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*. 265: 283-291, 2017 (査読有)
202. Iida K, Tani S, Atsumi W, Yagi T, Kawauchi K, Matsumoto N, Hirayama A. Association of plasminogen activator inhibitor-1 and low-density lipoprotein heterogeneity as a risk factor of atherosclerotic cardiovascular disease with triglyceride metabolic disorder: a pilot cross-sectional study. *Coron Artery Dis* 28(7): 577-587, 2017 (査読有)
203. Saito Y, Ohtani T, Kioka H, Onishi T, Tsukamoto Y, Nakamoto K, Taniguchi T, Nakatani S, Hirayama A, Sakata Y. Clinical significance of pulmonary arterial capacitance calculated by echocardiography in patients with advanced heart failure. *Circ J* 81(12): 1871-1878, 2017 (査読有)
204. Tani S, Nagao K, Kawauchi K, Yagi T, Atsumi W, Matsuo R, Hirayama A. The ratio of eicosapentaenoic acid (EPA) to arachidonic acid may be a residual risk marker in stable coronary artery disease patients receiving treatment with statin following EPA therapy. *Am J Cardiovasc Drugs* 17(5): 409-420, 2017 (査読有)
205. Ueda Y, Hiro T, Hirayama A, Komatsu S, Matsuoka H, Takayama T, Ishihara M, Hayashi T, Saito S, Kodama K; ZIPANGU Investigators. Effect of ezetimibe on stabilization and regression of intracoronary plaque - The ZIPANGU Study. *Circ J* 81(11): 1611-1619, 2017 (査読有)
206. Tani S, Asayama K, Oiwa K, Harasawa S, Okubo K, Takahashi A, Tanabe A, Ohkubo T, Hirayama A, Kushiro T. The effects of increasing calcium channel blocker dose vs. adding

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- a diuretic to treatment regimens for patients with uncontrolled hypertension. *Hypertens Res.* 40(10):892–898, 2017 (査読有)
207. Osada A, Sekine H, Soejima K, Sakurai H, Shimizu T. Harvesting epithelial keratinocyte sheets from temperature-responsive dishes preserves basement membrane proteins and improves cell survival in a skin defect model. *J Tissue Eng Regen Med* 11(9): 2516–2524, 2017 (査読有)
208. Nagashima K, Watanabe I, Okumura Y, Iso K, Takahashi K, Watanabe R, Arai M, Kurokawa S, Nakai T, Ohkubo K, Yoda S, Hirayama A. High-voltage zones within the pulmonary vein antra: Major determinants of acute pulmonary vein reconnections after atrial fibrillation ablation. *J Interv Card Electrophysiol* 49(2): 137–145, 2017 (査読有)
209. Nakamura M, Uno K, Hirayama A, Ako J, Nohara A, Arai H, Harada-Shiba M. Exploration into lipid management and persistent risk in patients hospitalised for acute coronary syndrome in Japan (EXPLORE-J): protocol for a prospective observational study. *BMJ Open* 7(6): e014427, 2017 (査読有)
210. Sasaki N, Watanabe I, Okumura Y, Nagashima K, Kogawa R, Sonoda K, Iso K, Takahashi K, Arai M, Watanabe R, Kurokawa S, Ohkubo K, Nakai T, Hirayama A, Nikaido M. Complex fractionated atrial electrograms, high dominant frequency regions, and left atrial voltages during sinus rhythm and atrial fibrillation. *J Arrhythm* 33(3): 185–191, 2017 (査読有)
211. Hirayama A, Yamashita S, Inomata H, Kassahun H, Cyrille M, Ruzza A, Yoshida M, Kiyosue A, Ma Y, Teramoto T. One-year efficacy and safety of evolocumab in Japanese patients – A pooled analysis from the open-label extension OSLER studies. *Circ J* 81(7): 1029–1035, 2017 (査読有)
212. Saito Y, Aizawa Y, Monno K, Nagashima K, Kurokawa S, Osaka S, Akimoto T, Kamei S, Tanaka M, Hirayama A. Small, smooth, nonmobile cardiac myxoma detected by transesophageal echocardiography following recurrent cerebral infarction: a case report. *J Med Case Rep* 11(1): 131, 2017 (査読有)
213. Okumura Y, Watanabe I, Iso K, Takahashi K, Nagashima K, Sonoda K, Mano H, Yamaguchi N, Kogawa R, Watanabe R, Arai M, Ohkubo K, Kurokawa S, Nakai T, Hirayama A. Mechanistic insights into durable pulmonary vein isolation achieved by second-generation cryoballoon ablation. *J Atr Fibrillation* 9(6): 1538, 2017 (査読有)
214. Nishina A, Itagaki M, Sato D, Kimura H, Hirai Y, Phay N, Makishima M. Rosiglitazone-like effect of vitexilactone, a constituent from *Vitex trifolia* L. in 3T3-L1 preadipocytes. *Molecules* 22(11): E2030, 2017 (査読有)
215. Chuma M, Makishima M, Imai T, Tochikura N, Suzuki S, Kuwana T, Sawada N, Komatsu T, Sakaue T, Kikuchi N, Yoshida Y, Kinoshita K. Relationship between initial vancomycin trough levels and early-onset vancomycin-associated nephrotoxicity in critically ill patients. *Ther Drug Monit* 40(1): 109–114, 2018 (査読有)
216. Sakane R, Kimura K, Hirota Y, Ishizawa M, Takagi Y, Wada A, Kuwahara S, Makishima M, Suhara Y. Synthesis of novel vitamin K derivatives with alkylated phenyl groups introduced at the ω -terminal side chain and evaluation of their neural differentiation activities. *Bioorg Med Chem Lett* 27(21): 4881–4884, 2017 (査読有)
217. Neelankal John A, Iqbal Z, Colley S, Morahan G, Makishima M, Jiang FX. Vitamin D receptor-targeted treatment to prevent pathological dedifferentiation of pancreatic β cells under hyperglycaemic stress. *Diabetes Metab* 44(3): 269–280, 2018 (査読有)
218. Endo-Umeda K, Aoyama A, Shimizu M, Ishikawa M, Hashimoto Y, Yamada S, Makishima M. 1α -Hydroxy derivatives of 7-dehydrocholesterol are selective liver X receptor

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- modulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 172: 136–148, 2017(査読有)
219. Arichi N, Fujiwara S, Ishizawa M, Makishima M, Hua HD, Yamada K, Yamaoka Y, Takasu K. Synthesis and biological evaluation of steroidal derivatives bearing a small ring as vitamin D receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 27(15): 3408–3411, 2017(査読有)
220. Ishizawa M, Akagi D, Yamamoto J, Makishima M. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ enhances TRPV6 transcription through p38 MAPK activation and GADD45 expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 172: 55–61, 2017(査読有)
221. Tamura M, Ishizawa M, Isojima T, Ozen S, Oka A, Makishima M, Kitanaka S. Functional analyses of a novel missense and other mutations of the vitamin D receptor in association with alopecia. *Sci Rep* 7(1): 5102, 2017(査読有)
222. Shioi R, Okazaki S, Noguchi-Yachide T, Ishikawa M, Makishima M, Hashimoto Y, Yamaguchi T. Switching subtype-selectivity: Fragment replacement strategy affords novel class of peroxisome proliferator-activated receptor α/δ (PPAR α/δ) dual agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 27(14): 3131–3134, 2017(査読有)
223. Toyota Y, Nomura S, Makishima M, Hashimoto Y, Ishikawa M. Structure-activity relationships of rosiglitazone for peroxisome proliferator-activated receptor gamma transrepression. *Bioorg Med Chem Lett* 27(12): 2776–2780, 2017(査読有)
224. Shimizu T, Tanaka T, Uno S, Ashiba H, Fujimaki M, Tanaka M, Awazu K, Makishima M. Detection of antibodies against hepatitis B virus surface antigen and hepatitis C virus core antigen in plasma with a waveguide-mode sensor. *J Biosci Bioeng* 123(6): 760–764, 2017(査読有)
225. Takada I, Makishima M. Control of inflammatory bowel disease and colorectal cancer by synthetic vitamin D receptor ligands. *Current Medicinal Chemistry* 24(9): 868–875, 2017(査読有)
226. Ohashi K, Koshinaga T, Uehara S, Furuya T, Kaneda H, Kawashima H, Ikeda T. Sutureless enterostomy for extremely low birth weight infants. *J Pediatr Surg* 52(11): 1873–1877, 2017(査読有)
227. 永井康平, 佐藤洋明, 益子貴行, 池田太郎, 丸山麻美, 佐藤有子, 市橋光, 高木健次郎. Hirschsprung 病, 神経芽腫を合併した先天性中枢性低換気症候群の 1 例. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 53(3): 853–856, 2017(査読有)
228. 前岡瑛里, 益子貴行, 花田学, 古屋武史, 杉藤公信, 池田太郎, 越永従道. 腎動脈本幹に仮性動脈瘤を形成した小児鈍的腎外傷の 1 例 経カテーテル動脈塞栓術と腎摘除術の組み合わせ治療. *日本小児外科学会雑誌* 53(2): 266–271, 2017(査読有)
229. 織田恭子, 大河内知久, 松浦克彦, 赤羽佳子, 濱本耕平, 千葉英美子, 田中修, 池田太郎, 山田盛久, 磯貝純. Abdominoscrotal hydrocele の 1 例. *埼玉県医学会雑誌* 51(1): 409–411, 2017(査読有)
230. Matsumine H, Kubo K, Hamahata A, Sakurai H. Deltopectoral and pectoralis musculocutaneous flap technique for cervical esophageal reconstruction after free-jejunal-flap necrosis. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 5(8): e1444, 2017(査読有)
231. Chin MS, Chappell AG, Giatsidis G, Perry DJ, Lujan-Hernandez J, Haddad A, Matsumine H, Orgill DP. Hyperspectral imaging provides early prediction of random axial flap necrosis in a preclinical model. *Plast Reconstr Surg* 139(6): 1285e–1290e, 2017(査読有)
232. Matsumine H, Numakura K, Tsunoda S, Wang K, Matsumine R, Klimov M, Giatsidis G, Sukhatme V, Orgill D. Adipose-derived aldehyde-dehydrogenase-expressing cells promote dermal regenerative potential with collagen-glycosaminoglycan scaffold. *Wound Repair Regen* 25(1): 882–890, 2017(査読有)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

233. Giatsidis G, Cheng L, Facchin F, Haddad A, Hernandez J, Lancerotto L, Gunther C, Nabzdyk S, Matsumine H, Orgill D. Moderate-intensity intermittent external volume expansion optimizes the soft tissue response in a murine model. *Plast Reconstr Surg* 139(4): 882–890, 2017 (査読有)
234. Matsumine H, Numakura K, Klimov M, Watanabe Y, Giatsidis G, Orgill D. Facial-nerve regeneration ability of a hybrid artificial nerve conduit containing uncultured adipose-derived stromal vascular fraction: An experimental study. *Microsurgery* 37(7): 808–818, 2017 (査読有)
235. Nirei K, Nakamura H, Matsuoka S, Yamana Y, Yoda S, Hirayama A, Moriyama M. Ventricular tachycardia as a complication of ledipasvir and sofosbuvir treatment for HCV infection. *Intern Med* 56(7): 787–790, 2017. (査読有)
236. Moroni L, Boland T, Burdick J, Maria C, Derby B, Forgacs G, Groll J, Li Q, Malda J, Mironov V, Mota C, Nakamura M, Shu W, Takeuchi S, Woodfield T, Xu T, Yoo J, Vozzi G. Biofabrication: A guide to technology and terminology. *Trends Biotechnol* 36(4): 384–402, 2017 (査読有)
237. Daniela S, Takeuchi S. Two-photon direct laser writing for proteinaceous microstructures with additional sensitizer. *J Laser Micro Nanoen* 12(2): 80–85, 2017 (査読有)
238. Kamiya K, Takeuchi S. Giant liposome formation toward synthesis of well-defined artificial cells. *J Mater Chem B* 5: 5911–5923, 2017 (査読有)
239. Yasuga H, Inoue K, Kawano R, Takinoue M, Osaki T, Kamiya K, Miki N, Takeuchi S. Serial DNA relay in DNA logic gates by electrical fusion and mechanical splitting of droplets. *PLoS One* 12(7): e0180876, 2017 (査読有)
240. Nie M, Takeuchi S. Microfluidics based synthesis of coiled hydrogel microfibers with flexible shape and dimension control. *Sens Actuators B Chem* 246: 358–362, 2017 (査読有)
241. Fujii S, Nobukawa A, Osaki T, Morimoto Y, Kamiya K, Misawaa N, Takeuchi S. Pesticide vapor sensing using an aptamer, nanopore, and agarose gel on a chip. *Lab Chip*. 17: 2421–2425, 2017 (査読有)
242. Ikeda K, Nagata S, Okitsu T, Takeuchi S. Cell fiber-based three-dimensional culture system for highly efficient expansion of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 7: 2850, 2017 (査読有)
243. Ueno N, Banno T, Asami A, Kazayama Y, Morimoto Y, Osaki T, Takeuchi S, Kitahata H, Toyota T. Self-propelled motion of monodisperse underwater oil droplets formed by a microfluidic device. *Langmuir* 33(22): 5393–5397, 2017 (査読有)
244. Morimoto Y, Onuki M, Takeuchi S. Mass production of cell-laden calcium alginate particles with centrifugal force. *Adv Healthc Mater* 6: 1601375, 2017 (査読有)
245. Negishi M, Onoe H, Takeuchi S. Rod-shaped neural units for aligned 3D neural network connection. *Adv Healthc Mater* 6: 1700143, 2017 (査読有)
246. Tsuchiya M, Karim MR, Matsumoto T, Ogawa H, Taniguchi H. A protein preparation method for the high-throughput identification of proteins interacting with a nuclear cofactor using LC-MS/MS analysis. *J Vis Exp* 24(119), e55077, 2017 (査読有)
247. Watanabe Y, Ishizuka Y, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Hoshi R, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Sugito K, Shinohara K, Fukuda N, Nagase H, Soma M, Koshinaga T, Fujiwara K. ZAR1 knockdown promotes the differentiation of human neuroblastoma cells by suppression of MYCN expression. *Med Oncol* 34(9): 158–175. 2017 (査読有)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

248. Matsuda H, Campion CG, Fujiwara K, Ikeda J, Cossette S, Verissimo T, Ogasawara M, Gaboury L, Saito K, Yamaguchi K, Takahashi S, Endo M, Fukuda N, Soma M, Hamet P, Tremblay J. HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget* 8(41): 69559–69576, 2017. (査読有)
249. Kitai M, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Maruyama T, Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K. The effects of a spleen tyrosine kinase inhibitor on the progression of lupus nephritis in mice. *J Pharmacol Sci* 134(1): 29–36, 2017 (査読有)
250. Kobayashi H, Haketa A, Ueno T, Ikeda Y, Hatanaka Y, Tanaka S, Otsuka H, Abe M, Fukuda N, Soma M. Scoring system for the diagnosis of bilateral primary aldosteronism in the outpatient setting before adrenal venous sampling. *Clin Endocrinol* 86(4): 467–472, 2017 (査読有)
251. Okumura H, Noto N, Tanikawa S, Kanezawa K, Hirai M, Shimosawa K, Yagasaki H, Shichino H, Takahashi S. Impact of persistent left ventricular regional wall motion abnormalities in childhood cancer survivors after anthracycline therapy: Assessment of global left ventricular myocardial performance by 3D speckle-tracking echocardiography. *J Cardiol* 70(4): 396–401, 2017 (査読有)
252. Nishikawa E, Yagasaki H, Hama A, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe KI, Yoshida N, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Long-term outcomes of 95 children with moderate aplastic anemia treated with horse antithymocyte globulin and cyclosporine. *Pediatr Blood Cancer* 64(5). doi: 10.1002/pbc.26305, 2017 (査読有)
253. Kobayashi H, Haketa A, Ueno T, Ikeda Y, Hatanaka Y, Tanaka S, Otsuka H, Abe M, Fukuda N, Soma M. Scoring system for the diagnosis of bilateral primary aldosteronism in the outpatient setting before adrenal venous sampling. *Clin Endocrinol* 86(4): 467–472, 2017 (査読有)
254. Kobayashi H, Haketa A, Ueno T, Otsuka H, Tanaka S, Hatanaka Y, Ikeda Y, Abe M, Fukuda N, Soma M. Plasma adrenocorticotropic hormone but not aldosterone is correlated with blood pressure in patients with aldosterone-producing adenomas. *J Clin Hypertens* 19(3): 280–286, 2017 (査読有)
255. Obinata D, Takayama K, Takahashi S, Inoue S. Crosstalk of the androgen receptor with transcriptional collaborators: Potential therapeutic targets for castration-resistant prostate cancer. *Cancers* 9(3): E22, 2017 (査読有)
256. Hoshi R, Watanabe Y, Ishizuka Y, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Ohashi K, Sugito K, Fukuda N, Nagase H, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Fujiwara K. Depletion of TFAP2E attenuates adriamycin-mediated apoptosis in human neuroblastoma cells. *Oncol Rep* 37(4): 2459–2464, 2017 (査読有)
257. Yamada Y, Takayama KI, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Takahashi S, Ikeda K, Kakutani S, Urano T, Fukuhara H, Homma Y, Inoue S. A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in testicular germ cell tumor. *Cancer Sci* 108(1): 32–41, 2017 (査読有)
258. Kashimura T, Soejima K, Kikuchi Y, Nakazawa H. Stability of orbital floor fracture fixation after endoscope-assisted balloon placement. *J Craniofac Surg* 28(7): 669–672, 2017 (査読有)
259. Soejima K, Kashimura T, Yamaki T, Sakurai H, Nakazawa H. Endoscopic endonasal repair of isolated medial orbital wall fracture with balloon technique. *J Craniofac Surg* 28(4): 1013–1016, 2017 (査読有)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 260.屋形有美, 仲沢弘明, 副島一孝, 菊池雄二, 榎村勉, 吉田光徳, 堀米迪生, 竹田昌平. フラクショナル Q スイッチルビーレーザーの展望. 日大医学雑誌 76(6):317-318, 2017 (査読有)
- 261.吉田光徳, 榎村勉, 堀米迪生, 屋形有美, 副島一孝, 菊池雄二, 森岡康祐, 仲沢弘明. 重傷熱傷に合併した眼球熱傷の治療経験. 熱傷 43 (3):145-150, 2017 (査読有)
- 262.中林晋也, 眞田淳太郎, 永井栄一, 齋藤五月, 加瀬武士, 秋田大輔, 大山哲生, 大谷賢二, 月村直樹, 石上友彦. レジン床義歯への磁石構造体に光重合レジンを用いた合着方法に検討 床用レジンの表面処理の違いによる比較検討, 日磁歯誌 26 (1):35-40, 2017 (査読無)
- 263.月村直樹, 好士理恵子, 蕭敬意, 秋田大輔, 加瀬武士, 大久保貴久, 大林美穂, 齋藤五月, 舘野敦. 口腔機能の回復が全身機能に及ぼす影響, 日補綴会誌 9(4):279-284, 2017 (査読無)
- 264.Lloyd JD, Nakamura WS, Maeda Y, Takeda T, Leesungbok R, Lazarchik D, Dorney B, Gonda T, Nakajima K, Yasui T, Iwata Y, Suzuki H, Tsukimura N, Churei H, Kwon KR, Choy MMH, Rock JB. Mouthguards and their use in sports: Report of the 1st International Sports Dentistry Workshop, 2016. Dent Traumatol 33(6): 421-426, 2017 (査読有)
- 265.Moriguchi K, Hasegawa Y, Higuchi N, Murakami Y, Yoshimura F, Nakata K, Honda M. Energy dispersive spectroscopy-scanning transmission electron microscope observations of free radical production in human polymorphonuclear leukocytes phagocytosing non-opsonized *Tannerella forsythia*. Microsc Res Tech 80(6):555-562, 2017 (査読有)
- 266.Kawano E, Toriumi T, Iguchi S, Suzuki D, Sato S, Honda M. Induction of neural crest cells from human dental pulp-derived induced pluripotent stem cells. Biomed Res 38(2): 135-147, 2017 (査読有)
- 267.Honda M, Sato M, Toriumi T. Characterization of coronal pulp cells and radicular pulp cells in human teeth. J Endod 43(9S) :S35-S39. 2017 (査読有)
- 268.Iguchi S, Suzuki D, Kawano E, Mashimo T, Kajiya M, Toriumi T, Kawai T, Kurihara H, Isokawa K, Sato S, Honda M. Effect of local bone marrow stromal cell administration on ligature-induced periodontitis in mice. J Oral Sci 59(4): 629-637, 2017 (査読有)
- 269.Yamada Y, Takayama KI, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Takahashi S, Ikeda K, Kakutani S, Urano T, Fukuhara H, Homma Y, Inoue S. A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in testicular germ cell tumor. Cancer Sci 108(1): 32-41, 2017 (査読有).
- 270.Ashikari D, Takayama KI, Obinata D, Takahashi S, Inoue S. CLDN8, an androgen-regulated gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. Cancer Sci 108(7): 1386-1393, 2017 (査読有)
- 271.Ashikari D, Takayama K, Tanaka T, Suzuki Y, Obinata D, Fujimura T, Urano T, Takahashi S, Inoue S. Androgen induces G3BP2 and SUMO-mediated p53 nuclear export in prostate cancer. Oncogene 36(45): 6272-6281, 2017 (査読有)
- 272.Migita T, Takayama KI, Urano T, Obinata D, Ikeda K, Soga T, Takahashi S, Inoue S. ACSL3 promotes intratumoral steroidogenesis in prostate cancer cells. Cancer Sci 108(10): 2011-2021, 2017 (査読有)
- 273.Obinata D, Takayama K, Takahashi S, Inoue S. Crosstalk of the androgen receptor with transcriptional collaborators: Potential therapeutic targets for castration-resistant prostate cancer. Cancers 9(3), E22, 2017 (査読有)
- 274.Takahashi K, Nagashima K, Okumura Y, Watanabe I, Iso K, Hirayama A. Resolution of the

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- functional retrograde right bundle branch block during antidromic atrioventricular reciprocating tachycardia. *Heart Rhythm Case Rep* 3(11): 519–522, 2017 (査読有)
275. Watanabe Y, Ishizuka Y, Hirano T, Nagasaki–Maeoka E, Hoshi R, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Sugito K, Shinohara K, Fukuda N, Nagase H, Soma M, Koshinaga T, Fujiwara K. ZAR1 knockdown promotes the differentiation of human neuroblastoma cells by suppression of MYCN expression. *Med Oncol* 34: 158, 2017 (査読有)
276. Urushihara N, Hamada Y, Kamisawa T, Fujii H, Koshinaga T, Morotomi Y, Saito T, Itoi T, Kaneko K, Fukuzawa H, Ando H. Classification of pancreaticobiliary maljunction and clinical features in children. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 24: 449–55, 2017 (査読有)
277. Ohashi K, Koshinaga T, Uehara S, Furuya T, Kaneda H, Kawashima H, Ikeda T. Sutureless enterostomy for extremely low birth weight infants. *J Pediatr Surg* 52: 1873–1877, 2017 (査読有)
278. Hoshi R, Watanabe Y, Ishizuka Y, Hirano T, Nagasaki–Maeoka E, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Ohashi K, Sugito K, Fukuda N, Nagase H, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Fujiwara K. Depletion of TFAP2E attenuates adriamycin–mediated apoptosis in human neuroblastoma cells. *Oncol Rep* 37(4): 2459–2464, 2017 (査読有)
279. Karim MR, Haruta T, Matsumoto T, Oda H, Taniguchi H. Imaging of cell shape alteration and cell movement in drosophila gastrulation using DE–cadherin reporter transgenic flies. *J Vis Exp* Dec 29; (118), 2016 (査読有)
280. Nakahara E, Yagasaki H, Shimozawa K, Hirai M, Takahashi S. Severe thrombocytopenia as initial signs of primary sjögren syndrome in a 9–year–old female. *Pediatr Blood Cancer* 63(7): 1312–1313, 2016 (査読有)
281. Katakawa M, Fukuda N, Tsunemi A, Mori M, Maruyama T, Matsumoto T, Abe M, Yamori Y. Taurine and magnesium supplement enhances the function of endothelial progenitor cells through antioxidation in healthy men and spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 39(12): 848–856, 2016 (査読有)
282. Obinata D, Takayama K, Fujiwara K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fukuda N, Nagase H, Fujimura T, Urano T, Homma Y, Aburatani H, Takahashi S, Inoue S. Targeting Oct1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration–resistant prostate cancer growth. *Oncogene* 35(49): 6350–6358, 2016 (査読有)
283. Ishige–Wada M, Kwon AM, Eguchi M, Hozumi K, Iwaguro H, Matsumoto T, Fukuda N, Mughishima H, Masuda H, Asahara T. Jagged–1 signaling in the bone marrow microenvironment promotes endothelial progenitor cell expansion and commitment of CD133+ human cord blood cells for postnatal vasculogenesis. *PLoS One* 11(11): e016660, 2016 (査読有)
284. Maebayashi T, Ishibashi N, Aizawa T, Sakaguchi M, Sato K, Matsui T, Yamaguchi K, Takahashi S. Radiotherapy for muscle–invasive bladder cancer in very elderly patients. *Anticancer Res* 36(9): 4763–4769, 2016 (査読有)
285. Kobayashi H, Haketa A, Ueno T, Suzuki R, Aoi N, Ikeda Y, Tahira K, Hatanaka Y, Tanaka S, Otsuka H, Abe M, Fukuda N, Soma M. Subtype prediction in primary aldosteronism: Measurement of circadian variation of adrenocortical hormones and 24–h urinary aldosterone. *Clin Endocrinol* 84(6): 814–821, 2016 (査読有)
286. Fujimura T, Inoue S, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Ikeda K, Obinata D, Ashikari D, Takahashi S, Homma Y. Increased expression of tripartite motif (TRIM) 47 is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 14(4): 298–303, 2016 (査読有)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

287. Obinata D, Takada S, Takayama KI, Urano T, Ito A, Ashikari D, Fujiwara K, Yamada Y, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Takahashi S, Inoue S. Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Eur J Cancer* 57: 39–49, 2016 (査読有)
288. Saito K, Asai T, Fujiwara K, Sahara J, Koguchi H, Fukuda N, Suzuki-Karasaki M, Soma M, Suzuki-Karasaki Y. Tumor-selective mitochondrial network collapse induced by atmospheric gas plasma-activated medium. *Oncotarget* 7(15): 19910–19927, 2016 (査読有)
289. Kawata N, Yamaguchi K, Igarashi T, Takahashi S. TIMP-1 as well as microvessel invasion and high nuclear grade is a significant determinant factor for extension of tumor diameter in localized RCC. *J Oncol* 2016:5035127, 2016 (査読有)
290. Sato K, Obinata D, Funakoshi D, Saito F, Takada S, Ito A, Murata, Y, Ashikari, D, Ikado, Y, Igarashi, T, Matsui, T, Mochida, J, Yamanaka, Y, Yamaguchi, K, Takahashi S. Efficacies of transurethral prostate enucleation by bipolar system for patients with benign prostatic hyperplasia. *Minerva Urol Nefrol* 68(4): 337–341, 2016 (査読有)
291. Nishikawa E, Matsumoto T, Ishige M, Tsuji T, Mugishima H, Takahashi S. Comparison of capacities to maintain hematopoietic stem cells among different types of stem cells derived from the placenta and umbilical cord. *Regenerative Therapy* 4: 48–61, 2016 (査読有)
292. Li Y, Fuchimoto D, Sudo M, Haruta H, Lin QF, Takayama T, Morita S, Nochi T, Suzuki S, Sembon S, Nakai M, Kojima M, Iwamoto M, Hashimoto M, Yoda S, Kunimoto S, Hiro T, Matsumoto T, Mitumata M, Sugitani M, Saito S, Hirayama A, Onishi A. Development of human-like unstable coronary plaques in low-density lipoprotein receptor knockout pigs and justification for statin treatment before formation of atherosclerotic plaques. *J Am Heart Assoc*, 5(4): e002779, 2016 (査読有)
293. Inami M, Fukushima A, Ueno T, Yamada T, Tsunemi A, Matsumoto Y, Fukuda N, Soma M, Moriyama M. Reduction of dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis by the novel gene regulator PI polyamide targeting transforming growth factor β 1 gene. *Biol Pharm Bull* 38(12): 1836–1842, 2015 (査読有)
294. Hosokawa T, Konuma N, Ikeda T, Hashimoto M, Kaneda H, Ohashi K, Matsumoto T, Koshinaga T. Establishment of new anal sphincter injury model in rats based on cardiotoxin. *J Pediatr Surg* 50(8): 1352–1358, 2015 (査読有)
295. Saito K, Fukuda N, Shinohara K, Masuhiro Y, Hanazawa S, Matsuda H, Fujiwara K, Ueno T, Soma M. Modulation of EMT/MET process by pyrrole-imidazole polyamide targeting human transforming growth factor- β 1. *Int J Biochem Cell Biol* 66: 112–120, 2015 (査読有)
296. Hasegawa R, Fujiwara K, Obinata D, Kawashima H, Shinojima Y, Igarashi J, Wang X, Ghosh S, Nagase, H, Takahashi S. Identification of frequent differentially methylated region in sporadic bladder cancers. *Urol Int* 94: 479–84, 2015 (査読有)
297. Yoshizawa S, Fujiwara K, Sugito K, Uekusa S, Kawashima H, Hoshi R, Watanabe Y, Hirano T, Furuya T, Masuko T, Ueno T, Fukuda N, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Nagase H. Pyrrole-imidazole polyamide-mediated silencing of KCNQ10T1 expression induces cell death in Wilms' tumor cells. *International Journal of Oncology* 47(1): 115–121, 2015 (査読有)
298. Yagasaki H, Shichino H, Shimizu N, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S. Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. *Transpl Infect Dis* 17(1): 160–161, 2015 (査読有)
299. Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Saito K, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Itoh T, Soma M. Preclinical study of novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting human TGF- β promoter for hypertrophic scars in a common marmoset primate model. *PLoS One* 10(5):e0125295. 2015. (査読有)
300. 風間美奈子, 石毛美夏, 辻孝, 松本太郎, 麦島秀雄, 高橋昌里. 骨髄破壊的処置相当の放射線照射によるマウス骨髄ストローマ細胞における SDF-1 発現低下. *日大医学雑誌* 74 (2): 50–56, 2015(査読有)
301. Kaku M, Akiba Y, Akiyama K, Akita D, Nishimura M. Cell-based bone regeneration for alveolar ridge augmentation – Cell source, endogenous cell recruitment and immunomodulatory function. *J Prosthodont Res* 59(2): 96–112, 2015 (査読有)
302. Watarai Y, Ishizawa M, Ikura T, Zacconi FCM, Uno S, Ito N, Mouriño A, Tokiwa H, Makishima M, Yamada S. Synthesis, biological activities and X-ray crystal structural analysis of 25-hydroxy-25(or 26)-adamantyl-17-[20(22),23-diynyl]-21-norvitamin D compounds. *J Med Chem* 58(24): 9510–9521, 2015(査読有)
303. Mishra R, Watanabe T, Kimura M, Koshikawa N, Ikeda M, Uekusa S, Kawashima H, Wang X, Igarashi J, Choudhury D, Grandori C, Kemp C, Ohira M, Verma N, Kobayashi Y, Takeuchi J, Koshinaga T, Nemoto N, Fukuda N, Soma M, Kusafuka T, Fujiwara K, Nagase H. Identification of a novel E-box binding PI polyamide inhibiting MYC-driven cell-proliferation. *Cancer Sci* 106(4): 421–429, 2015 (査読有)
304. Obinata D, Ito A, Fujiwara K, Takayama K, Ashikari D, Murata Y, Yamaguchi K, Urano T, Fujimura T, Fukuda N, Soma M, Watanabe T, Nagase H, Inoue S, Takahashi S. Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in TMPRSS2 and ERG gene fusion represses prostate tumor growth. *Cancer Sci* 105(10): 1272–1278, 2014 (査読有)
305. Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe K, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor versus immunosuppressive therapy. *Haematologica* 99(12): 1784–1791, 2014 (査読有)
306. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Takayama K, Sugihara T, Obinata D, Yamada Y, Kumagai J, Kume H, Ouchi Y, Inoue S, Homma Y. Expression of androgen and estrogen signaling components and stem cell markers to predict cancer progression and cancer-specific survival in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 20(17): 4625–4635, 2014. (査読有)
307. Hirano D, Hasegawa R, Satoh K, Mochida J, Yamanaka Y, Hirakata H, Yamaguchi K, Sugimoto S, Kawata N, Takahashi S. Prospective study on the relationship between clinical efficacy of secondary hormone therapy with flutamide and neuroendocrine differentiation in patients with relapsed prostate cancer after first line hormone therapy. *Scand J Urol* 48(5): 436–444, 2014(査読有)

<図書>

【本事業に直接関連するもの】

- *秋田大輔, 伊藤智加, 月村直樹, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞の臨床応用化に向けた取り組み. *日歯医師会誌* 71(10): 829–839, 2019
- *福田昇, 丸山高史, 松本太郎. 慢性腎不全に対する体性幹細胞療法. *最新医学(特*

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 集号 腎代替療法・機械工学と再生医療), 72(12), p93-97, 最新医学社, 大阪, 2017. 12
3. *細川崇, 池田太郎. 肛門括約筋機能障害に対する再生治療. 小児外科 49(6): 599-602, 2017
 4. *小沼憲祥, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞(DFAT)を細胞源とする再生医療. 小児外科 (特集 小児外科領域の先端的医療の展開(I)) 49(5), 445-448, 東京医学社, 東京, 2017. 5
 5. *丸山高史, 松本太郎. 腎疾患に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療. 臨床免疫・アレルギー科, 65(6): 593-598, 科学評論社, 東京, 2016. 6
 6. *風間智彦. 間葉系幹細胞の基礎と臨床 (特集 再生医療:基礎と臨床). 日大医学雑誌, 75(2): 61-66, 日本大学医学会, 東京, 2016. 4
 7. *松本太郎. 再生医療:基礎と臨床 (特集 再生医療:基礎と臨床). 日大医学雑誌 75(2) 55, 日本大学医学会, 東京, 2016. 4
 8. *副島一孝, 櫻村勉, 地家豊治, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明. 皮膚再建の再生医療 (特集 再生医療:基礎と臨床). 日大医学雑誌 75(2):74-80, 日本大学医学会, 東京, 2016. 4
 9. *村田保貴, 井門祐一郎, 大日方大亮, 咲間隆裕, 山口健哉, 松本太郎, 高橋悟. 脱分化脂肪細胞を用いた下部尿路の再生医療について. 泌尿器外科 (特集 下部尿路機能再生医療の現況), 29(1): 9-13, 医学図書出版株式会社, 埼玉, 2016. 1

【その他】

10. 池田太郎. 第1章「救急医療」四肢外傷(止血法), 今日の小児治療指針(第17版) 医学書院 2019 In press
11. Tsugumichi Koshinaga. Standard surgical procedure for CBD. Pancreaticobiliary Maljunction and Congenital Biliary Dilatation, Springer, Singapore, 2018.
12. 山本新吾, 荒井陽一, 高橋悟, 土谷順彦. Urologic Surgery Next No.3 エンドウロロジー. 株式会社メジカルビュー社, 2018.10
13. 副島一孝. 特集 私はこうしている-鼻科手術編【各種疾患に対する手術】眼窩壁骨折外切開による整復術 JOHNS 34(9):1291-1295, 東京医学社 2018.9.
14. 副島一孝, 仲沢弘明. 特集創傷被覆材-私の選択- われわれが選択している創傷被覆材とその理由 形成外科 61(8):980-990, 克誠堂出版 2018.8.
15. 副島一孝, 櫻村 勉, 仲沢弘明. 形成外科珠玉のオペ 2 -次世代に継承したい秘伝のテクニック- 10. 経上顎洞バルーン法による眼窩底骨折手術 形成外科 61,増刊: S125-S130, 克誠堂出版, 2018
16. 副島一孝, 櫻村 勉, 仲沢弘明. 経上顎洞バルーン法による眼窩底骨折手術. 形成外科 61(増刊):125-130, 2018
17. 高橋悟. 特集 風雲! 膀胱がんの診断・治療(特集・企画). 泌尿器外科 31(9).医学図書出版株式会社. 2018.
18. 高橋悟. 第1章腎臓の働きと病気.17.尿のチェック表.18.尿は健康のバロメーター.19.尿のチェックのポイント. 腎臓病が自分で治せる 101 のワザ pp44-50,主婦の友インフォス, 2018. 7
19. 高橋悟, 斎藤忠則, 他. 精巣腫瘍取扱い規約(作成委員会).金原出版株式会社. 2018. 8
20. 吉澤剛, 高橋悟. VIII.高齢者の症候,頻尿・尿失禁.pp674-680.日本臨床 76 増刊号 5,老年医学(上),株式会社日本臨床社, 2018. 6
21. 吉澤剛, 高橋悟. 第4章腎・排尿機能検査,6.排尿機能検査,1)排尿記録,2)残尿測定,3)尿流動態検査.腎と透析(84)増刊号:158-164, 2018. 5
22. 吉澤剛, 高橋悟. オープンサージェリー 21 骨盤臓器脱の手術(TVM). 後期研修医がお

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

さえておきたい泌尿器手術 TOP30 適応判定と周術期管理. 泌尿器外科第 31 巻特別号 pp262-272, 医学図書出版株式会社.東京,2018.4 (編集委員長)

23. 持田淳一, 高橋悟. エンドウロロジー 4 TURP/TUEB. 後期研修医がおさえておきたい泌尿器手術 TOP30 適応判定と周術期管理. 泌尿器外科第 31 巻特別号 pp76-84, 医学図書出版株式会社.東京,2018.4

24. 高橋悟, 武中篤, 外森直哉, 藤井靖久(特別号編集委員長). 後期研修医がおさえておきたい泌尿器手術 TOP30 適応判定と周術期管理. 泌尿器外科第 31 巻特別号, 医学図書出版株式会社.東京,2018.4

25. 持田淳一, 高橋悟. 骨盤臓器脱.pp103-111, レジデント Vol.11(4),医学出版,2018.4

26. 高橋悟, 吉澤剛. 尿失禁.pp11-22, レジデント Vol.11(4),医学出版,2018.4.1.

27. 荒井陽一, 高橋悟, 山本新吾, 土谷順彦(編集委員). ロボット支援手術. Urologic Surgery Next 2. 株式会社メジカルビュー社, 東京, 2018.4

28. 持田淳一, 高橋悟. 腹腔鏡下腎嚢胞切除術. II. 腎・副腎の手術. 腹腔鏡手術. Urologic Surgery Next 1, pp78-81, 株式会社メジカルビュー社, 東京, 2018.4.1

29. 荒井陽一, 高橋悟, 山本新吾, 土谷順彦(編集委員). 腹腔鏡手術. Urologic Surgery Next 1. 株式会社メジカルビュー社, 東京, 2018.4

30. 吉澤剛, 高橋悟. 特集 高齢者の腎泌尿器疾患治療. 治療各論:尿閉,排尿障害. 腎と透析 84(3):412-414, 2018.3

31. 高橋悟, 飯野靖彦, 佐中孜. 特集 高齢者の腎泌尿器疾患治療. 座談会:高齢者の腎泌尿器疾患治療をどう考える. 腎と透析 84(3):357-368, 2018.3

32. 高橋悟. 前立腺肥大症の代替療法:怪しいのか確かなのか? 特集:前立腺肥大症:あれかこれか. 泌尿器外科 31(3):259-262,2018.3

33. 吉澤剛, 高橋悟. 脳卒中患者の下部尿路機能障害—過活動膀胱を中心に. 特集:下部尿路機能障害に対する支援—その理解から具体的介入まで. 作業療法ジャーナル 52(2):121-128, 2018.2.15.

34. 谷ヶ崎博. 小児の治療指針(小児科臨床 2018 年増刊号) 小児の再生不良性貧血 81: 446-449、診断と治療社, 東京, 2018

35. 谷ヶ崎博. 適切な貧血診療のポイント 小児・思春期の貧血, 日本医師会雑誌, 147: 731-733, 2018

36. 徳橋泰明. 執刀医の心得. 新執刀医のための脊椎サージカルテクニック, pp2-5, メジカルビュー社, 東京, 2018

37. 榎島誠. がんとビタミン D. Clinical Calcium 28(11): 1465-1472, 2018

38. 榎島誠. ビタミン D の作用. Clinical Calcium 28(10): 1319-1326, 2018

39. 榎島誠. ビタミン D の作用. Clinical Calcium 28(10): 1319-1326, 2018

40. 榎島誠. ビタミン D の生理作用と作用メカニズム. 食と医療 5: 20-27, 2018

41. 榎島誠. ビタミン D 受容体と核内受容体. Clinical Calcium 27(11): 1533-1541, 2017

42. 持田淳一, 高橋悟. 腹腔鏡仙骨腔固定術:手術手技のポイント. 実践マニュアル. Urology Today24(4):35-38, 2017.12

43. 高橋悟. 特集:男性下部尿路症状・前立腺肥大症の特徴と病態. 改訂 男性下部尿路症状・前立腺肥大症診療ガイドライン. 排尿障害プラクティス 25(2), pp21-28, 株式会社メディカルレビュー社, 東京, 2017.12

44. 高橋悟. 1. 排尿自立指導料算定の経緯と意義. 排尿自立指導料. 特集:スペシャリストに学ぶ高齢者排尿ケア. 内科系総合雑誌 Modern Physician 37(12):1309-1310, 新興医学出版社, 東京, 2017. 12

45. 大日方大亮, 高橋悟. 【骨盤臓器脱に対する治療の up-to-date】骨盤臓器脱に対する外科的治療の現状.泌尿器外科 31(6). 881-883, 2018

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

46. 高橋悟. 5. 前立腺肥大症診療ガイドライン・ナビ. 第1章 臨床に役立つガイドライン. 泌尿器 Care&Cure Uro-Lo 別冊 泌尿器科診療に役立つガイドライン・ナビー臨床のエッセンスが身につく! チーム医療・在宅医療にも役立つ! pp60-71, 株式会社メディカ出版, 大阪, 2017. 11
47. 高橋悟. CQ109. 過活動膀胱(OAB)に対し HRT は有効か? I. 症状・疾患. Clinical Question(CQ)編. ホルモン補充療法ガイドライン 2017 年度版:108-109, 2017. 10
48. 山口健哉, 高橋悟. 1. 検査・診断の進歩:概論. VII. 膀胱癌の検査・診断. 新腎・泌尿器癌(下)-基礎・臨床研究の進歩-. 日本臨床第 75 巻増刊号 7:109-112, 2017. 10
49. 山口健哉, 高橋悟. 腎後性 AKI. 11. 各種 AKI の特徴と治療. 特集:AKI 診療の進歩 2017.腎と透析 83(3):478-481, 2017. 9
50. 高橋悟. Q5:薬剤で前立腺癌の予防はできますか? I. 疫学・予防. Q&A でスッキリわかる前立腺癌, pp22-23, 株式会社メジカルビュー社, 東京, 2017. 8
51. 高橋悟. これで解決!「頻尿」「尿もれ」の悩み. 早めに解決! からだのトラブル. Health&Life 平成 29 年(2017)年 8 月号:6-11, 2017. 8
52. 徳橋泰明. 仙腸関節仙骨前面へのアプローチ, 第一人者のコメント(菊地臣一編) 脊椎手術解剖アトラス, pp112, 医学書院, 東京, 2017. 5
53. 高橋悟. 前立腺肥大症で尿道が圧迫される. 第 4 章:人に聞きにくい症状. NHK チョイス 病気になったとき 体の中で起きてることが見える本, pp92-93, 株式会社主婦の友社, 東京, 2017. 5
54. 諸橋環, 高橋昌里. 二次性高血圧の病態、診断、治療. 小児腎臓病学. 診断と治療社. 東京, 2017. 5
55. 岡田清己, 一瀬岳人, 蜂矢隆彦, 田中良明, 高橋悟. 第 12 章:古典的泌尿器放射線学の推移. 連載:泌尿器科学を築いたひとびと. 泌尿器外科 30(5):581-588, 2017. 5
56. 大日方大亮, 高山賢一, 高橋悟, 井上聡. 前立腺がんの治療抵抗性のメカニズムと PDX. 細胞 49, (7):333-336, 2017
57. 吉澤剛, 高橋悟. 26.骨盤臓器脱. II 疾患. 後期研修医がおさえておきたい泌尿器疾患 TOP30. 泌尿器外科第 30 巻特別号. pp389-399, 医学図書出版株式会社, 東京, 2017. 4.
58. 高橋悟, 富田善彦, 羽瀧友則, 小川良雄. 後期研修医がおさえておきたい泌尿器疾患 TOP30 2107. 泌尿器外科第 30 巻特別号, 医学図書出版株式会社, 東京, 2017. 4
59. 高橋悟. 女性下部尿路症状. 診療の秘訣. 内科系総合雑誌 Modern Physician 37(4):389,2017.4.
60. 吉澤剛, 高橋悟. 尿失禁. III. 高齢者泌尿器良性疾患の病態と治療. 特集:高齢者の泌尿器疾患-病態に基づく診断・治療上の問題-. 日本臨床 75(4):579-583, 2017.4
61. 越永従道. 腎悪性腫瘍. 標準小児外科学 第 7 版 335-341 医学書院, 東京, 2017
62. 池田太郎, 細川崇, 佐藤洋明, 高木健次郎. 腹部膨満. 周産期医学 47(10):1315-1318, 2017
63. 持田淳一, 高橋悟. 腹腔鏡仙骨腔固定術:手術手技のポイント. 実践マニュアル. Urology Today24(4):35-38, 2017. 12
64. 高橋悟. 特集:男性下部尿路症状・前立腺肥大症の特徴と病態. 改訂 男性下部尿路症状・前立腺肥大症診療ガイドライン. 排尿障害プラクティス 25(2), pp21-28, 株式会社メディカルレビュー社, 東京, 2017.12
65. 高橋悟. 1. 排尿自立指導料算定の経緯と意義. 排尿自立指導料. 特集:スペシャリストに学ぶ高齢者排尿ケア. 内科系総合雑誌 Modern Physician 37(12):1309-1310, 新興医学出版社, 東京, 2017. 12
66. 高橋悟. 5. 前立腺肥大症診療ガイドライン・ナビ. 第 1 章 臨床に役立つガイドライン. 泌

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

尿器 Care&Cure Uro-Lo 別冊 泌尿器科診療に役立つガイドライン・ナビ―臨床のエッセンスが身につく！ チーム医療・在宅医療にも役立つ！ pp60-71, 株式会社メディカ出版, 大阪, 2017. 11

67. 山口健哉, 高橋悟. 1. 検査・診断の進歩: 概論. VII. 膀胱癌の検査・診断. 新腎・泌尿器癌(下)―基礎・臨床研究の進歩―. 日本臨床第 75 巻増刊号 7: 109-112, 2017.10

68. 高橋悟. CQ109. 過活動膀胱(OAB)に対し HRT は有効か? I. 症状・疾患. Clinical Question(CQ)編. ホルモン補充療法ガイドライン 2017 年度版: 108-109, 2017.10

69. 山口健哉, 高橋悟. 腎後性 AKI. 11. 各種 AKI の特徴と治療. 特集: AKI 診療の進歩 2017. 腎と透析 83(3):478-481, 東京医学社, 東京, 2017. 9

70. 高橋悟. Q5: 薬剤で前立腺癌の予防はできますか? I. 疫学・予防. Q&A でスッキリわかる前立腺癌, pp22-23, 株式会社メジカルビュー社, 東京, 2017. 8

71. 高橋悟. これで解決! 「頻尿」「尿もれ」の悩み. 早めに解決! からだのトラブル. Health&Life 平成 29 年(2017)年 8 月号: 6-11, 2017. 8

72. 高橋悟. 前立腺肥大症で尿道が圧迫される. 第 4 章: 人に聞きにくい症状. NHK チョイス 病気になったとき 体の中で起きてることが見える本, pp92-93, 株式会社主婦の友社, 東京, 2017. 5

73. 岡田清己, 一瀬岳人, 蜂矢隆彦, 田中良明, 高橋悟. 第 12 章: 古典的泌尿器放射線学の推移. 連載: 泌尿器科学を築いたひとびと. 泌尿器外科 30(5):581-588, 2017. 5

74. 大日方大亮, 高山賢一, 高橋悟, 井上聡. 前立腺がんの治療抵抗性のメカニズムと PDX. 細胞 49, (7):333-336, 2017

75. 吉澤剛, 高橋悟. 26. 骨盤臓器脱. II 疾患. 後期研修医がおさえておきたい泌尿器疾患 TOP30. 泌尿器外科第 30 巻特別号, 389-399, 医学図書出版株式会社, 東京, 2017. 4.

76. 高橋悟, 富田善彦, 羽瀨友則, 小川良雄. 後期研修医がおさえておきたい泌尿器疾患 TOP30 2107. 泌尿器外科第 30 巻特別号, 医学図書出版株式会社, 東京, 2017. 4

77. 高橋悟. 女性下部尿路症状. 診療の秘訣. 内科系総合雑誌 Modern Physician 37(4):389, 新興医学出版社, 東京, 2017. 4.

78. 吉澤剛, 高橋悟. 尿失禁. III. 高齢者泌尿器良性疾患の病態と治療. 特集: 高齢者の泌尿器疾患―病態に基づく診断・治療上の問題―. 日本臨床 75(4):579-583, 日本臨床社, 東京, 2017. 4

79. 副島一孝, 仲沢弘明. 【実践! よくわかる縫合の基本講座】植皮・皮弁術における縫合法 PEPARS 123:117-124, 全日本病院出版会, 東京 2017

80. 副島一孝, 菊池雄二, 仲沢弘明. 【熱傷診療 up to date】広範囲熱傷患者における人工真皮の使用法 感染への対応 日本外科感染症学会雑誌 14(4):281-286, 2017

81. 副島一孝. ラグビーにおける外傷・障害-予防・評価・治療・復帰- 顔面の外傷・障害 臨床スポーツ医学 34(2):152-157, 株式会社文光堂 2017.2

82. 櫻村 勉, 仲沢弘明. 【形成外科の手術看護パーフェクトマニュアル】(第 2 章)実践編 術式別の術中看護マニュアル 腋臭症手術. オペナーシング 2017 増刊号:205-211, 2017

83. 福田昇. 高血圧病態理解のためのモデル動物. 主治医として診る! 高血圧診療. medicina. 53(11): 1720, 医学書院, 東京, 2016. 10.

84. 平井麻衣子, 谷ヶ崎博. 白血病学(下) X 白血病治療の副作用・合併症対策と支持療法 3 小児白血病の晩期合併症, 日本臨床(増刊号), 74(10): 414-419, 日本臨床社, 東京, 2016. 10

85. 平井麻衣子, 谷ヶ崎博. IV. 骨髄疾患による貧血 5. 小児再生不良性貧血(3) 治療と経過・予後 1) 重症度分類による治療指針, 日本臨床(増刊号)75(1): 390-393, 日本臨床社, 東京, 2016. 10

86. 谷川俊太郎, 谷ヶ崎博. 汎血球減少 鑑別のフローチャート(血球の増加と減少), 小児

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

内科 48(7):1041-1045, 東京医学社, 東京, 2016. 7

87. 山口健哉, 高橋悟. 1. 本邦における前立腺癌の疫学的動向. II. 前立腺癌の疫学. 新前立腺癌学—最新の基礎研究と診断・治療—. 日本臨床 増刊号 74(3):27-33, 日本臨床社, 東京, 2016. 5.

88. 山口健哉, 柴崎真澄. ③尿路ストーマの特徴的な合併症. 第 13 章:ストーマの合併症とその管理. ストーマリハビリテーション基礎と実際(第 3 版)(ストーマリハビリテーション講習会実行委員会編):221-224, 金原出版株式会社, 東京, 2016. 2.

89. 下澤克宜, 谷ヶ崎博. IV. 骨髄疾患による貧血 5. 小児再生不良性貧血(2)検査・診断・鑑別診断. 日本臨床(増刊号), 75(1): 385-389, 日本臨床社, 東京, 2016. 1.

90. 山口健哉, 高橋悟. α 遮断薬は効果や副作用に差 PDE5 阻害薬は排尿症状に推奨. 3 前立腺肥大症. 症例に学ぶ 医師が処方を決めるまで. 日経 DI クイズ 17:16-19, 日経 BP 社, 東京, 2015. 9.

91. 山口健哉. その他の原因疾患. II LUTS の原因疾患を治す. LUTS 診療ロードマップ: 249-266, 株式会社メジカルビュー社, 東京, 2015.4.

92. 山中弥太郎, 大日方大亮, 五十嵐智博, 佐藤克彦, 高橋悟. 経膈メッシュ手術(TVM)と下部尿路機能障害. 臨床泌尿器科(特集 女性下部尿路機能障害のベストマネジメント.) 69(3): 284-290, 医学書院, 東京, 2015. 3.

93. 大熊啓嗣, 竹谷英之, 谷ヶ崎博. インヒビター保有血友病 B 患者の滑膜切除術・人工膝関節置換術. Frontiers in Haemophilia 2(1): 38-41, メディカルレビュー社, 東京, 2015. 1.

94. 山口健哉, 山中弥太郎, 高橋悟. 頻尿に伴う不眠(特集—精神科医が診る睡眠関連障害). 精神科治療学 29(12):1563-1566, 星和書店, 東京, 2014. 12.

95. 福田昇. ライフステージ・タイプ別の高血圧の治療・管理, 二次性高血圧, 遺伝性高血圧. 日本臨床(特集号 最新臨床高血圧学 -高血圧治療の最前線-), 1064: 550-553, 日本臨床社, 東京, 2014. 8.

<学会発表>

【本事業に直接関連するもの】

1. *丸山高史, 宇都宮慧, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀: 免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発(ポスター発表). 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸国際展示場・神戸国際会議場, 神戸市 2019. 3. 23

2. *副島一孝, 櫻村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 自家培養表皮移植時の脱分化脂肪細胞(DFAT)による基底膜構築促進効果(ポスター発表). 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸国際展示場・神戸国際会議場, 神戸市 2019. 3. 22

3. *野呂知加子, 山崎春香, 風間智彦, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞からの骨格筋誘導(ポスター発表). 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸国際展示場・神戸国際会議場, 神戸市 2019. 3. 22

4. *日高綾乃, 植草省太, 加藤礼保納, 土方浩平, 加野浩一郎, 越永従道, 松本太郎: ヒト神経芽腫細胞株におけるヒト脱分化脂肪細胞を用いた分化誘導の検討(ポスター発表). 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸国際展示場・神戸国際会議場, 神戸市 2019. 3. 22

5. *石川三友紀, 松本太郎, 李予昕, 萩倉一博, 風間智彦: マウス皮下欠損治癒過程における成熟脂肪細胞の形質転換に関する検討(ポスター発表). 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸国際展示場・神戸国際会議場, 神戸市 2019. 3. 22

6. *見松はるか, 佐藤義朗, 風間智彦, 西島浩二, 下山芳江, 呉尚治, 上田一人, 北瀬悠磨, 松本太郎, 早川昌弘: 新生児壊死性腸炎モデルにおける脱分化脂肪細胞の治療効

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

果についての検証(ポスター発表). 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸国際展示場, 神戸国際会議場, 神戸市 2019. 3. 21

7. *佐野太一, 李予昕, 風間智彦, 長岡悠紀, 萩倉一博, 山元智衣, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 三角浩司, 大西彰, 加野浩一郎, 松本太郎: 免疫不全ブタを用いたヒト脱分化脂肪細胞移植安全性試験(ポスター発表). 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸国際展示場・神戸国際会議場, 神戸市 2019. 3. 21
8. *土方浩平, 植草省太, 加藤礼保納, 日高綾乃, 小沼憲祥, 越永従道, 松本太郎: 乳癌進展過程における脂肪細胞の形質変換に関する検討(ポスター発表). 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸国際展示場・神戸国際会議場, 神戸市 2019. 3. 21
9. *清水颯太, 松本太郎, 秋田大輔, 野呂知加子: 間葉系幹細胞による細胞治療のための細胞キャリアの開発(ポスター発表). 平成 30 年度 生産工学研究所リサーチ・グループ支援事業「バイオ学際研究による生産工学イノベーション」シンポジウム, 日本大学生産工学部スプリングホール, 習志野市, 2019. 2. 27
10. *野呂 知加子: 野呂研究室における研究～再生医工学(口演発表). 平成 30 年度 生産工学研究所リサーチ・グループ支援事業「バイオ学際研究による生産工学イノベーション」, シンポジウム, 日本大学生産工学部スプリングホール 習志野市, 2019. 2. 27
11. *Kashimura T, Soejima K, Kikuchi Y, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on ischemic tissue of normal and diabetic rat. (ポスター発表), International Federation for Adipose Therapeutics and Science Annual Meeting, Cosmopolitan Hotel, Las Vegas, USA, 2018. 12. 13
12. *松本太郎: 重症下肢虚血に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞治療の実用化(ポスター発表). 平成 30 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム, TKP ガーデンシティ品川, 東京, 2019. 2. 5
13. *Chen Lan, 福田 昇, 常見明子, 片川まゆみ, 松本太郎, 阿部雅紀: Complement 3 induces the dedifferentiation and enhances the tissue RA systems in VSMCs from SHR (ポスター発表). 第 54 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, KKR ホテル熊本, 熊本市, 2018.12. 6
14. *清水颯太 松本太郎 秋田大輔 野呂知加子: 間葉系幹細胞による細胞治療のための細胞キャリアの開発(ポスター発表). 日本大学生産工学部学術講演会, 日本大学生産工学部 39 号館 習志野市, 2018. 12. 1
15. *Kuboki Y, Song Q, Yagami K, Kuroasaki M, Matsumoto T: Anti-gravity mechano-dynamic culture revealed an on-line 3D formation of box matrix (Oral presentation). 66th Japanese division of International Association of Dental research (JADR), Sapporo, Japan 2018. 11. 17
16. *日高綾乃, 上原秀一郎, 植草省太, 土方浩平, 小野賀功, 石塚悦昭, 小沼憲祥, 越永従道. ヒト神経芽腫細胞株における脱分化脂肪細胞を用いた分化誘導の検討(ポスター発表). 第 60 回日本小児血液・がん学会学術集会, ロームシアター京都, 京都市, 2018.11.14
17. *佐野太一, 李予昕, 風間智彦, 長岡悠紀, 萩倉一博, 山元智衣, 鈴木俊一, 淵本大一郎, 三角浩司, 大西彰, 松本太郎: 免疫不全ブタを用いたヒト脱分化脂肪細胞移植安全性試験(口頭発表). 第 6 回日本先進医工学ブタ研究会, 東レ総合研修センター, 三島市, 2018. 10. 20
18. *松本太郎: 脱分化脂肪細胞による細胞治療の実用化(教育講演), 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会, 京王プラザホテル, 東京, 2018. 10. 18
19. *松峯元, 亀井航, 新美陽介: 脂肪由来幹細胞を用いた新しい顔面神経不全麻痺手術法の確立(口頭発表). 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会, 東京, 2018. 10. 19

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

20. *中山瀧志, 小山公行, 風間智彦, 松本太郎, 徳橋泰明: ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植方法による治療効果の検討. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会, 奈良春日野国際フォーラム, 奈良市, 2018.10. 4
21. *谷本浩二, 松本太郎, 長岡悠紀, 風間美奈子, 風間智彦, 山元智衣, 長岡正宏, 斉藤修, 徳橋泰明: 膝蓋下脂肪体に由来する脱分化脂肪細胞の形質および機能分析. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会, 奈良春日野国際フォーラム, 奈良市, 2018. 10. 4
22. *松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた再生医療(シンポジウム). 第 17 回日本大学医療系同窓・校友会学術集会, 日本大学会館, 東京, 2018. 9. 29
23. *Chen Lan, Fukuda N, Tsunemi A, Matsumoto T, Abe M: Complement 3 induces the dedifferentiation and enhances the tissue RA systems in VSMCs from SHR (Poster presentation). 18th International SHR Symposium. Shanhai, China, 2018. 9. 18
24. *Chen Lan, 福田昇, 根岸英理子, 常見明子, 松本太郎, 阿部雅紀: Role of complement 3 in renin expression during the differentiation of mesenchymal stem cells to vascular smooth muscle cells (ポスター発表). 第 41 回日本高血圧学会, 旭川市民文化会館星野リゾート OMO7 旭川, 旭川市, 2018. 9.15
25. *Chen Lan, 福田昇, 常見明子, 松本太郎, 阿部雅紀: Complement 3 induces the dedifferentiation and enhances the tissue RA systems in VSMCs from SHR(ポスター発表). 第 41 回日本高血圧学会, 旭川市民文化会館星野リゾート OMO7 旭川, 旭川市, 2018. 9.15
26. *松本太郎: 重症下肢虚血に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞治療の実用化(ポスター発表). 平成 30 年度 AMED 再生医療研究交流会, TKP ガーデンシティ品川, 東京, 2018. 9. 12
27. *Yoshida-Noro C, Yamazaki H, Inoue K, Shimizu S, Kazama T, Matsumoto T. Skeletal muscle induction from dedifferentiated fat (DFAT) cells (Poster presentation). 5th TERMIS World Congress-2018 Kyoto, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, 2018. 9. 6
28. *Shimizu S, Matsumoto T, Akita D, Yoshida-Noro C. Development of carriers for mesenchymal stem cell (MSC) therapy (Poster presentation). 5th TERMIS World Congress-2018 Kyoto, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, 2018. 9. 6
29. *松本太郎, 渡邊拓史, 後藤俊平, 石川三友紀, 長岡悠紀, 山元智衣, 風間智彦, 萩倉一博: DFAT の血管新生効果と壁細胞分化についての検討(ポスター発表). 第 50 回日本動脈硬化学会・学術集会, 大阪国際会議場, 大阪市, 2018. 7. 13
30. *宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀: ANCA 関連腎炎に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)治療の開発(ポスター発表). 第 61 回日本腎臓病学会学術総会, 朱鷺メッセ・ホテル日航新潟, 新潟市, 2018. 6. 9
31. *松峯元, 松峯真理, 亀井航: 間葉系幹細胞を用いたハイブリッド型人工神経による顔面神経再生(口頭発表). 第 41 回顔面神経学会, 山形テルサ, 山形市, 2018. 6. 7
32. *小野賀功, 小沼憲祥, 土方浩平, 日高綾乃, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 松本太郎, 越永従道. DFAT(dedifferentiated fat cell)由来 exosome の免疫制御能(ポスター発表). 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター, 新潟市, 2018. 5. 30
33. *副島一孝, 櫻村勉, 吉田光徳, 堀米迪生, 竹田昌平, 菊池雄二, 松本太郎, 仲沢弘明: 人工真皮上への自家培養表皮生着率向上のための試み(シンポジウム). 第 44 回日本熱傷学会総会・学術集会, 東京ステーションカンファレンス, 東京, 2018. 5. 18
34. *中山瀧志, 宮方啓行, 風間智彦, 加野浩一郎, 松本太郎, 徳橋泰明: 脱分化脂肪細胞(DFAT)移植による椎間板変性モデルに対する椎間板再生効果(ポスター発表). 第 47

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・国部国際展示場, 神戸市, 2018. 4. 12
35. *副島一孝, 櫻村勉, 風間智彦, 松本太郎, 菊池雄二, 仲沢弘明: 自家培養表皮移植 (CEA)による広範囲熱傷治療の現況と将来展望(シンポジウム). 第 61 回日本形成外科学会総会学術集会, ホテルニューオータニ博多・電気ビル, 福岡市, 2018. 4. 11
 36. *小野賀功, 小沼憲祥, 金澤剛二, 土方 浩, 日高綾乃, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 松本太郎, 越永従道: DFAT(dedifferentiated fat cell)由来 exosome の免疫制御能(ポスター発表). 第 118 回日本外科学会定期学術集会, 東京国際フォーラム, 東京, 2018. 4. 6
 37. *福田昇, Chen L, 松本太郎: 間葉系幹細胞の血管平滑筋細胞への分化過程でのレニン発現に於ける補体 C3 の役割 (口頭発表). 第 17 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2018. 3. 23
 38. *宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 谷口由樹, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀: 免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発(ポスター発表). 第 17 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2018. 3. 23
 39. *長岡悠紀, 風間智彦, 風間美奈子, 山元智衣, 萩倉一博, 李予昕, 松本太郎: 同一ドナー由来 DFAT および ASC の血管新生作用の比較検討(口頭発表). 第 17 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2018. 3. 23
 40. *石川三友紀, 風間智彦, 李予昕, 松本太郎: マウス生体内における成熟脂肪細胞の脱分化現象と組織修復への関与(口頭発表). 第 17 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2018. 3. 22
 41. *松本太郎: 成熟脂肪細胞の脱分化技術を利用した再生医療(シンポジウム). 第 17 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市 2018. 3. 22
 42. *舘野敦, 秋田大輔, 鶴町仁奈, 田村瑛子, 鳥海拓, 風間智彦, 月村直樹, 松本太郎, 本田雅規: 脱分化脂肪細胞とリコンビナントペプチドによる顎骨再生能の検討(ポスター発表). 第 17 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市 2018. 3. 22
 43. *浅居僚平, 風間智彦, 松崎洋海, 大島猛史, 松本太郎: コラーゲンゲル充填シリコンチューブ架橋によるラット反回神経再生モデルの確立(ポスター発表). 第 17 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市 2018. 3. 21
 44. *中野令, 北中卓, 難波信一, 北中菜菜子, 澁川義幸, 加野浩一郎, 松本太郎, 杉谷博士: イヌ脱分化脂肪細胞のレチノイン酸および塩基性線維芽細胞成長因子による神経分化(ポスター発表). 第 17 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市 2018. 3. 21
 45. *久保木芳徳, Parvin Begum, 蔵崎正明, 戸倉清一, 松本太郎: 反重力培養装置は DFAT 細胞の増殖を促進する(口頭発表). 第 30 回代用臓器・再生医学研究会, 北海道大学大学院歯学研究院講堂, 札幌市, 2018. 2. 24
 46. *Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects of matured adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin reconstruction using artificial dermis in wound management (Poster presentation). Stem Cell 2018 Winter Symposium, Miami, USA, 2018. 1. 28
 47. *清水颯太 三浦大輝 風間智彦 萩倉一博 松本太郎 野呂知加子: DFAT 細胞再生移植治療のための細胞キャリアの検討 (ポスター発表). 日本大学学部連携研究推進シンポジウム「次世代女性研究者のためのキャリアウェイ整備～日本大学女性研究者交流シンポジウム」 日本大学生産工学部スプリングホール, 習志野市, 2017. 11. 10
 48. *小山公行, 中山渕志, 風間智彦, 上井浩, 徳橋泰明, 松本太郎: ラット椎間板変性モデ

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- ルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)静脈内投与による効果の検討(ポスター発表). 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾市, 2017. 10. 27
49. *Kashimura T, Soejima K, Kazama T, Kikuchi Y, Matsumoto T, Nakazawa H: The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on ischemic tissue (Poster presentation). 17th European Burns Association Congress, Barcelona, Spain, 2017. 9
50. *Watanabe H, Matsumoto T, Hagikura K. Dedifferentiated fat cells convert to pericyte phenotype and promote neovascularization in mice. (Poster presentation) International Society for Stem Cell Research 2017, Boston, USA, 2017. 6. 14
51. *副島一孝, 檜村勉, 風間智彦, 松本太郎, 菊池雄二, 仲沢弘明: 熱傷創治療における脱分化脂肪細胞(DFAT)の有用性(シンポジウム). 第 43 回日本熱傷学会総会学術集会, 京王プラザホテル, 東京, 2017. 5. 26
52. *檜村勉, 堀米迪生, 屋形有美, 菊池雄二, 副島一孝, 仲沢弘明: microskingraft による自家培養表皮移植の新しい補助療法の開発(シンポジウム). 第 43 回日本熱傷学会総会・学術集会, 京王プラザホテル, 東京, 2017. 5. 25
53. *小野賀功, 小沼憲祥, 後藤俊平, 橋本 真, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 松本太郎, 越永従道. ヒト脱分化脂肪細胞由来 Exosome の免疫抑制能の検討(ポスター発表). 第 54 回日本小児外科学会学術集会, 仙台国際センター, 仙台市, 2017. 5. 12
54. *後藤俊平, 小沼憲祥, 小野賀功, 石塚悦昭, 橋本 真, 星玲奈, 川島弘之, 浅井 陽, 金田英秀, 古屋武史, 加野浩一郎, 松本太郎, 越永従道: 脱分化脂肪細胞のペリサイト分化と TGF- β の関与(ポスター発表). 第 54 回日本小児外科学会学術集会, 仙台国際センター, 仙台市, 2017. 5. 11
55. *石塚悦昭, 日高綾乃, 長崎瑛里, 平野隆幸, 渡辺揚介, 星玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 小沼憲祥, 古屋武史, 越永従道, 藤原恭子, 松本太郎: ヒト神経芽腫における脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated Fat Cell: DFAT)を用いた神経分化誘導の検討(ポスター発表). 第 117 回日本外科学会定期学術集会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2017. 4. 28
56. *小野賀功, 金澤剛二, 後藤俊平, 橋本 真, 小沼憲祥, 加野浩一郎, 松本太郎, 越永従道: DFAT exosome を用いた炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発(ポスター発表). 第 117 回日本外科学会定期学術集会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2017. 4. 27
57. *中山渕志, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ラット椎間板障害モデルにおける椎間板の組織学的・免疫組織化学的観察(ポスター発表). 第 46 回日本脊椎脊髄病学会学術集会, ロイトン札幌, 札幌市 2017. 4. 13
58. *Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin reconstruction in burn wound management (Poster presentation). 11th Asia Pacific Burn Congress, Taipei, Taiwan, 2017. 4. 3
59. *松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた血管再生細胞治療 (シンポジウム). 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 仙台市 2017. 3. 7
60. *副島一孝, 檜村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 皮膚の再生医療における脱分化脂肪細胞(DFAT)の有用性 (シンポジウム). 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 仙台市 2017. 3. 7
61. *松峯元, 佐々木亮, 清水真理, 亀井航, 風間智彦, 松本太郎, 櫻井裕之: 脱分化脂肪細胞(DFAT)含有ハイブリッド型人工神経による顔面神経再建 (シンポジウム). 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 仙台市 2017. 3. 7
62. *丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 東龍英, 深澤みゆき, 遠藤守人, 岡田一義, 河内裕,

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 阿部雅紀:免疫性腎炎に対する脱分化成熟脂肪細胞(DFAT)移植による改善効果(口頭発表). 第16回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 仙台市 2017. 3. 8
63. *風間智彦, 山元智衣, 風間美奈子, 長岡悠紀, 谷口浩章, 萩倉一博, 加野浩一郎, 相川佳之, 松本太郎: ヒト吸引脂肪組織からの脱分化脂肪細胞の調製(口頭発表). 第16回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 仙台市 2017. 3. 8
64. *野呂知加子, 三浦大輝, 風間智彦, 萩倉一博, 松本太郎: 幹細胞再生移植治療のための細胞キャリアの検討(ポスター発表). 第16回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 仙台市 2017. 3. 8
65. *小野賀功, 小沼憲祥, 金澤剛二, 後藤俊平, 橋本真, 越永従道, 松本太郎: ヒト脱分化脂肪細胞(hDFAT)由来 exosome の免疫抑制能の検討(口頭発表), 第16回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 仙台市 2017. 3. 7
66. *副島一孝, 櫻村勉, 屋形有美, 堀米迪生, 菊池雄二, 仲沢弘明: 培養表皮による熱傷創治療のこだわり(ワークショップ). 第25回日本熱傷学会関東地方会, 慶応大学信濃町キャンパス, 東京, 2017. 2. 11
67. *三浦大輝, 風間智彦, 萩倉一博, 松本太郎, 野呂知加子: 間葉系幹細胞による移植治療のための細胞キャリアの開発(ポスター発表). 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2016.12. 2
68. *加野浩一郎: 成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞 DFAT の開発とその特性 ~ 獣医領域における再生医療への応用~(シンポジウム). 第159回日本獣医学会学術集会, 藤沢市, 2016. 9. 8
69. *渡辺真平, 沖 嘉尚, 松本太郎, 加野浩一郎: 成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞のセロトニン作動性神経細胞様細胞への分化(ポスター発表). 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2016. 12. 1
70. *石澤通康: 脂肪細胞の分化、脱分化におけるビタミン D 受容体の役割(シンポジウム). 日本レチノイド研究会第27回学術集会, 昭和薬科大学, 東京, 2016. 10. 23
71. *金澤剛二, 小野賀功, 谷川俊太郎, 下澤克宜, 小沼憲祥, 谷ヶ崎博, 松本太郎: 胎児付属物由来幹細胞の免疫抑制能の検討(ポスター発表). 第78回日本血液学会学術集会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2016. 10. 13
72. *副島一孝, 櫻村勉, 風間智彦, 松本太郎, 菊池雄二, 仲沢弘明: 自家培養表皮移植時の脱分化脂肪細胞(DFAT)併用療法による基底膜構築促進効果(シンポジウム). 第25回日本形成外科学会基礎学術集会, ナレッジキャピタルコングレ・コンベンションセンター, 大阪市, 2016. 9. 15
73. *石澤 通康, 水島 優介, 風間 智彦, 松本 太郎, 榎島 誠: 脂肪脱分化過程におけるビタミン D の役割(ポスター発表). 第2回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会, 東京, 2016. 8. 26
74. *Matsumoto T. Dedifferentiated fat cells as a new cell source for therapeutic angiogenesis and regenerative medicine (Symposium). The 22nd Annual Meeting of Japan Society of gene and Cell Therapy, Toranomon Hills Forum, Tokyo, Japan 2016. 7. 30
75. *加野浩一郎: 終末分化した体細胞から多能性細胞をつくる ~ 自発的な脱分化と多能性獲得~ (招待講演). 第8回日本創傷外科学会総会・学術集会, ホテルメトロポリタン東京池袋, 東京, 2016. 7. 21
76. *秋田大輔, 月村直樹, 館野 敦, 大谷賢二, 永井栄一, 石上友彦: DFAT細胞と乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)による歯周組織再生能の検討(口頭発表). 第125回日本補綴歯科学会, 石川県立音楽堂, 金沢市, 2016. 7. 10
77. *丸山高史, 福田昇, 阿部雅紀, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の TSG-6 を介した腎症改善効果. (口頭発

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 表). 第 59 回日本腎臓学会学術総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2016. 6. 18
78. *副島一孝, 檜村勉, 藤原英樹, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: アログラフトにより再構築した真皮への培養表皮生着促進のための試み(シンポジウム). 第 42 回日本熱傷学会総会・学術集会, シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル, 浦安市, 2016. 6. 2
79. *後藤俊平, 小沼憲祥, 加藤礼保納, 土方浩平, 日高綾乃, 小野賀功, 橋本真, 星玲奈, 植草省太, 浅井陽, 金田英秀, 古屋武史, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の血管壁細胞への分化(ポスター発表). 第 53 回日本小児外科学会学術集会, ヒルトン福岡シーホーク, 福岡市, 2016. 5. 24
80. *後藤俊平, 小沼憲祥, 小野賀功, 橋本真, 渡邊拓史, 萩倉一博, 越永従道, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の血管壁細胞分化. 第 37 回日本炎症・再生医学会(ポスター発表), 京都市勧業館みやこめっせ, 京都市, 2016. 6. 16
81. *中山渕志, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植の効果(口頭発表). 第 45 回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 幕張メッセ国際会議場・国際展示場, 千葉市, 2016. 4. 15
82. *宮方啓行, 松本太郎, 風間智彦, 小山公行, 上井浩, 徳橋泰明: 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける脱分化脂肪細胞(DFAT)静脈内投与の治療効果. (口頭発表). 第 45 回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 幕張メッセ国際会議場・国際展示場, 千葉市, 2016. 4. 15
83. *沖嘉尚, 渡辺真平, 松本太郎, 加野浩一郎: 成熟脂肪細胞由来の DFAT 細胞はセロトニンおよびグルタミン酸作動性神経細胞へと分化する(口頭発表). 日本畜産学会第 122 回大会, 神戸大学鶴甲第一キャンパス, 神戸市, 2016. 3. 28
84. *Mikrogeorgiou A, 佐藤義朗, 杉山祐一朗, 鈴木俊彦, 北瀬悠磨, 近藤大貴, 中西圭子, 辻雅弘, 風間智彦, 松本太郎, 加野浩一郎, 早川昌弘: Dedifferentiated fat cell, a novel source for cell therapy to target neonatal hypoxia-ischemia. (ポスター発表). 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場, 大阪市, 2016. 3. 18
85. *Kinoshita G, Kikuta S, Kazama T, Matsumoto T: Effect of parathyroid hormone on osteogenic differentiation ability in dedifferentiated fat cells. (Poster presentation). 62th Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Florida, USA, 2016. 3. 14
86. *丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: 腎障害モデルに対する DFAT 細胞移植の効果と TSG-6 を介したその機序の考察. (口頭発表). 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場, 大阪市, 2016. 3. 17
87. *福田昇, 根岸英里子, 片川まゆみ, 上野高浩, 松本太郎: 補体 C3 は間葉系細胞脱分化および上皮間葉化現象(EMT)により心血管腎リモデリングを起こす(口頭発表). 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場, 大阪市, 2016. 3. 17
88. *橋本真, 小沼憲祥, 小野賀功, 後藤俊平, 古屋武史, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞を用いた iPS 細胞への誘導検討(口頭発表). 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場, 大阪市, 2016. 3. 17
89. *小山公行, 宮方啓行, 上井浩, 風間智彦, 松本太郎, 徳橋泰明: 受動喫煙ラット椎間板変性への脱分化脂肪細胞(DFAT)静脈内投与の治療効果(ポスター発表). 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場, 大阪市, 2016. 3. 17
90. *松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の血管新生能と臨床応用に向けた開発. (ワークショップ). 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
91. *檜村勉, 副島一孝, 菊池雄二, 仲沢弘明, 風間智彦, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)による血流不全に陥った皮膚南部組織の救済法(口頭発表). 平成 27 年度日本

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
92. *萩倉一博, 渡邊拓史, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の血管新生能の検討 (ポスター発表). 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
93. *小沼憲祥, 石岡茂樹, 橋本真, 後藤俊平, 小野賀功, 加野浩一郎, 松本太郎: マウス炎症性腸疾患モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)の治療効果 (ポスター発表). 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
94. *中山渕志, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植の効果 (ポスター発表). 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
95. *風間智彦, 副島一孝, 加野浩一郎, 松本太郎: 吸引脂肪組織を用いた脱分化脂肪細胞(DFAT)の調製法の確立. (ポスター発表), 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
96. *橋本真, 小沼憲祥, 小野賀功, 後藤俊平, 古屋武史, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた iPS 細胞の樹立. (ポスター発表), 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
97. *谷口浩章, 山元智衣, 風間美奈子, 長岡悠紀, 風間智彦, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用細胞製造と細胞治療への応用. (口頭発表), 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
98. *木下豪紀, 風間智彦, 新井嘉則, 長岡正宏, 徳橋泰明, 加野浩一郎, 松本太郎: ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞(DFAT)と副甲状腺ホルモン間歇投与による効果. (ポスター発表), 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
99. *三浦大輝, 松本太郎, 野呂知加子: 幹細胞移植治療のための細胞キャリアの開発. (口頭発表), 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
100. *丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: 免疫性腎炎に対する DFAT 細胞移植による TSG-6 を介した免疫抑制作用. (ポスター発表), 平成 27 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 9 回日本大学先端バイオフィォーラム, 日本大学会館, 東京, 2016. 1. 27
101. *松本太郎: 脂肪細胞の脱分化機構と再生医療への応用.(特別講演), 第 21 回美容・アンチエイジング食品研究会, 大阪国際会議場, 大阪市, 2016. 2. 23
102. *鶴町仁奈, 田村瑛子, 磯川桂太郎, 清水典佳, 本田雅規: ヒト頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞の大きさの違いにより獲得した脱分化脂肪細胞の特性の比較解析. (口頭発表), 第 74 回日本矯正歯科学会, 福岡国際会議場, 福岡市, 2015. 11. 20
103. *松本太郎: 脂肪細胞を用いた再生医療(特別講演), 第 19 回日本内分泌病理学会学術総会, アバンセ佐賀, 佐賀市, 2015.10. 25
104. *小山公行, 宮方啓行, 風間智彦, 徳橋泰明, 松本太郎: 受動喫煙ラット椎間板モデルにおける脱分化脂肪細胞(DFAT)静脈内投与の治療効果 (口頭発表), 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 富山国際会議場, 富山市, 2015. 10. 22
105. *副島一孝, 櫻村勉, 藤原英紀, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 皮膚再生医療におけ

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- る脱分化脂肪細胞(DFAT)細胞の有用性に関する検討 (シンポジウム), 第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会, 岩手県民会館, 岩手市, 2015. 10. 9
- 106.*丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 阿部雅紀, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の全身投与は TSG-6 を介して免疫性糸球体腎炎を改善した. (口頭発表), 第 38 回日本高血圧学会総会, ひめぎんホール, 松山市, 2015. 10. 9
- 107.*石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 榎島誠: マウス脱分化脂肪細胞の誘導におけるビタミン D シグナルの影響(口演). 第 348 回脂溶性ビタミン総合委員会, 東京, 2015. 9. 18
- 108.*谷川俊太郎, 大熊啓嗣, 金沢剛二, 西川英里, 下澤克宜, 平井麻衣子, 谷ヶ崎博, 高橋昌里, 風間智彦, 松本太郎: 臍帯血生着不全モデルマウスに対する胎児付属物由来幹細胞移植の生着促進効果の検討. (ポスター発表), 第 36 回日本炎症・再生医学会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 東京, 2015. 7. 21
- 109.*鶴町仁奈, 秋田大輔, 松本太郎, 加野浩一郎, 外木守雄, 磯川桂太郎, 本田雅規: ヒト類脂肪体から単離した各種成熟脂肪細胞分画から得られた脱分化脂肪細胞の特性の解析. (ポスター発表), 第 36 回日本炎症・再生医学会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 東京, 2015. 7. 21
- 110.*風間智彦, 副島一孝, 加野浩一郎, 松本太郎: 吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞 DFAT の調製と機能評価. (ポスター発表), 第 36 回日本炎症・再生医学会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 東京, 2015. 7. 21
- 111.*遠山一人, 風間智彦, 松本太郎, 加野浩一郎, 平山篤志: ブタ脱分化脂肪細胞の心筋分化指向性の検討. (ポスター発表), 第 36 回日本炎症・再生医学会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 東京, 2015. 7. 21
- 112.*宮方啓行, 松本太郎, 風間智彦, 小山公行, 上井浩, 徳橋泰明: 受動喫煙によるラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植の効果. (ポスター発表), 第 36 回日本炎症・再生医学会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 東京, 2015. 7. 21
- 113.*秋田大輔, 加野浩一郎, 田村瑛子, 真下貴之, 鶴町仁奈, 新井嘉則, 山中克之, 金子正, 塩野目桃子, 月村直樹, 松本太郎, 磯川桂太郎, 石上友彦, 本田雅規: DFAT 細胞による歯周組織再生. (ポスター発表), 第 36 回日本炎症・再生医学会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 東京, 2015. 7. 21
- 114.*副島一孝, 櫻村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 脱分化脂肪(DFAT)細胞の再建真皮上への自家培養表皮生着促進効果に関する検討 (シンポジウム) 第 41 回日本熱傷学会総会・学術, 名古屋観光ホテル, 名古屋市, 2015. 6. 18
- 115.*石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 榎島誠: 成熟脂肪細胞の脱分化過程及び脱分化後におけるビタミンD受容体の関与(口頭発表). 日本ビタミン学会第 67 回大会, 近畿大学農学部, 奈良市, 2015. 6. 6
- 116.*松本太郎: 脱分化脂肪細胞による再生医療(シンポジウム), 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 海峡メッセ下関, 下関市, 2015. 5. 22
- 117.*副島一孝, 松本太郎, 櫻村勉, 風間智彦, 加野浩一郎, 仲沢弘明: 文科省大学発新産業創出拠点(START)プロジェクト 脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用細胞製造と細胞治療への応用.(シンポジウム), 第 58 回日本形成外科学会総会・学術集会, ウェスティン都ホテル京都, 京都市, 2015. 4. 10
- 118.*Kinoshita G, Kikuta S, Kazama T, Matsumoto T: Effect of dedifferentiated fat cell transplantation combined with parathyroid hormone administration on bone formation in a rat nonunion model. (Poster presentation), 61th Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Las Vegas, USA, 2015. 3. 28

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 119.*風間智彦, 副島一孝, 加野浩一郎, 松本太郎: 吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析. (ポスター発表), 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2015. 3. 21
- 120.*遠山一人, 松本太郎, 風間智彦, 加野浩一郎, 平山篤志: 心膜脂肪由来脱分化脂肪細胞の心筋分化能の検討. (ポスター発表), 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2015. 3. 21
- 121.*丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: TSG-6 を介した DFAT 細胞移植の免疫性腎炎に対する改善効果. (口頭発表), 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2015. 3. 21
- 122.*鶴町仁奈, 秋田大輔, 松本太郎, 加野浩一郎, 外木守雄, 河野英輔, 鳥海拓, 磯川桂太郎, 清水典佳, 本田雅規: ヒト類脂肪体から脱分化脂肪細胞を獲得する酵素処理条件の検討. (口頭発表), 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2015. 3. 19
- 123.*下澤克宜, 松本太郎, 大熊啓嗣, 谷川俊太郎, 金沢剛二, 西川英里, 風間智彦, 谷ヶ崎博, 麦島秀雄: ヒト胎児付属物由来幹細胞の免疫制御能の差異とそのメカニズムに関する検討. (口頭発表), 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2015. 3. 19
- 124.*橋本真, 小沼憲祥, 後藤俊平, 風間智彦, 加野浩一郎, 益子貴行, 大橋研介, 越永従道, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞を細胞源とした iPS 細胞誘導の検討. (ポスター発表), 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2015. 3. 19
- 125.*大熊啓嗣, 谷川俊太郎, 金沢剛二, 西川英里, 下澤克宜, 平井麻衣子, 谷ヶ崎博, 高橋昌里, 風間智彦, 松本太郎: 臍帯血生着不全モデルマウスを用いたヒト胎児付属物由来幹細胞の造血幹細胞生着促進効果の検討. (ポスター発表), 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2015. 3. 19
- 126.*副島一孝, 榎村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 脱分化脂肪(DFAT)細胞の自家培養表皮生着促進効果に関する検討. (ポスター発表), 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2015. 3. 19
- 127.*篠原千裕, 沖嘉尚, 加野浩一郎: ブタ卵胞顆粒層細胞の体外培養過程における細胞形態および遺伝子発現プロファイルの変化. (口頭発表), 2015 年度農芸化学学会大会, ホテルグランヴィア岡山, 岡山市, 2015. 3. 28
- 128.*酒井智康, 沖嘉尚, 加野浩一郎: 脱分化卵胞顆粒層細胞の脂肪細胞への分化転換. (口頭発表), 日本畜産学会大会第 119 回, 宇都宮大学農学部, 宇都宮市, 2015. 3. 27
- 129.*Tsurumachi N, Akita D, Matsumoto T, Kano K, Tonoki M, Toriumi T, Kawano E, isokawa K, Shimizu N, Honda M. Dedifferentiated fat cells isolated from the human buccal fat pad. (Poster presentation), General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, Boston, USA, 2015. 3. 12
- 130.*松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用細胞製造と細胞治療への応用. (シンポジウム), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2015. 1. 13
- 131.*野呂知加子, 松本太郎: 間葉系幹細胞による細胞治療のための細胞移植カプセル開発. (シンポジウム), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2015. 1. 13
- 132.*榎村勉, 副島一孝, 浅見崇, 下田勝巳, 仲沢弘明, 風間智彦, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)皮下注入によるラット背部皮弁の生着域拡大についての検討. (口頭発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォー

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- ーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 133.*山田宏美, 伊藤大介, 沖嘉尚, 北川勝人, 松本太郎, 亘敏広, 加野浩一郎: 外傷性脊髄損傷モデルマウスの運動機能回復に及ぼす脱分化脂肪細胞移植の影響. (口頭発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 134.*木下豪紀, 風間智彦, 新井嘉則, 長岡正宏, 徳橋泰明, 加野浩一郎, 松本太郎: ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞と副甲状腺ホルモン投与による治療効果. (口頭発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 135.*鶴町仁奈, 秋田大輔, 松本太郎, 加野浩一郎, 外木守雄, 鳥海拓, 磯川桂太郎, 清水典佳, 本田雅規: ヒト類脂肪体からの脱分化脂肪細胞調製時の酵素濃度至適化について. (口頭発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 136.*下澤克宜, 谷川俊太郎, 金沢剛二, 大熊啓嗣, 石毛美夏, 風間智彦, 麦島秀雄, 松本太郎: ヒト胎児付属物由来幹細胞の免疫制御能の差異とそのメカニズムに関する検討. (口頭発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 137.*副島一孝, 櫻村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 脱分化脂肪(DFAT)細胞の再建真皮上への自家培養表皮生着促進効果. (口頭発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 138.*中山渕志, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ラット椎間板変性モデルにおける脱分化脂肪細胞移植による椎間板再生. (口頭発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 139.*萩倉一博, 渡邊拓史, 松本太郎: Mature adipocyte derived multipotent cells differentiate into mural cells. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 140.*石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 槇島誠: 成熟脂肪細胞の脱分化過程におけるビタミン D 受容体の関与. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 141.*秋田大輔, 加野浩一郎, 田村瑛子, 真下貴之, 鶴町仁奈, 新井嘉則, 山中克之, 金子正, 塩野目桃子, 月村直樹, 松本太郎, 磯川桂太郎, 石上友彦, 本田雅規: 脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)応用した歯周組織再生能の検討. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 142.*大熊啓嗣, 谷川俊太郎, 金沢剛二, 西川英里, 下澤克宜, 平井麻衣子, 谷ヶ崎博, 高橋昌里, 風間智彦, 松本太郎: 臍帯血生着不全モデルマウスを用いたヒト胎児付属物由来幹細胞の造血幹細胞生着促進効果の比較検討. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 143.*風間智彦, 副島一孝, 加野浩一郎, 松本太郎: 吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 144.*風間智彦, 菊田晋祐, 田中伸明, 風間美奈子, 徳橋泰明, 加野浩一郎, 松本太郎: 骨

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

- 欠損および骨粗鬆症に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)自家移植の効果. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 145.*澤田浩克, 風間智彦, 新井嘉則, 本田雅規, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: 免疫不全マウス大腿骨骨折モデルにおけるヒト脱分化脂肪細胞の骨再生効果の検討. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 146.*遠山一人, 風間智彦, 加野浩一郎, 平山篤志, 松本太郎: 心膜脂肪由来脱分化脂肪細胞の心筋分化能の検討. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 147.*丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: DFAT 細胞移植の TSG-6 を介した単クローン抗体 1-22-3 誘発腎炎の改善効果. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 148.*橋本真, 小沼憲祥, 後藤俊平, 益子貴行, 大橋研介, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞を用いた iPS 細胞への誘導検討. (ポスター発表), 平成 26 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第 3 回日本大学幹細胞研究フォーラム, 日本大学会館, 東京, 2015. 1. 13
- 149.*加野浩一郎: 成熟脂肪細胞から多能性細胞をつくる～自発的な脱分化と多能性獲得～.(招待講演), 第 59 回日本唾液腺学会総会・学術集会, 文京学院大学本郷キャンパス, 東京, 2014. 12. 6
- 150.*加野浩一郎, 松本太郎: 終末分化した体細胞の自発的な脱分化および多能性獲得.(口頭発表), 関東畜産学会第 69 回大会, 東京大学農学部, 東京, 2014.11. 14
- 151.*加野浩一郎: 成熟脂肪細胞から多能性細胞をつくる ～自発的な脱分化と多能性獲得～.(招待講演), 再生医療研究セミナー, 那覇市, 2014. 11. 13
- 152.*加野浩一郎: 終末分化した体細胞から多能性細胞をつくる -自発的な脱分化と多能性獲得-. (招待講演), 第 5 回 SKIP セミナー, 東京, 2014. 10. 29
- 153.*松本太郎: 脱分化脂肪細胞による再生医療. (シンポジウム), 第 35 回日本肥満学会, フェニックスシーガイアリゾートコンベンションセンター, 宮崎市, 2014. 10. 25
- 154.*松本太郎, 風間智彦, 萩倉一博, 渡邊拓史, 小宮山翔吾, 加野浩一郎, 福田昇: 脱分化脂肪細胞の血管新生作用と治療用細胞としての効果評価.(口頭発表), 第 37 回日本高血圧学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2014. 10. 17
- 155.*丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の全身投与は TSG-6 を介して免疫性糸球体腎炎を改善した. (ポスター発表), 第 37 回日本高血圧学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2014. 10. 17
- 156.*石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 榎島誠: 脱分化脂肪細胞の形成におけるビタミン D シグナルの影響.(口頭発表), 日本レチノイド研究会第 25 回学術集会, 秋田市, 2014. 10. 11
- 157.*副島一孝, 櫻村勉, 山本 改, 風間智彦, 松本太郎, 今田正人, 仲沢弘明: 脱分化脂肪(DFAT)細胞の自家培養表皮移植時の生着促進効果に関する実験的検討. (シンポジウム), 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会, キッセイ文化ホール, 松本市, 2014. 10. 10
- 158.*木下豪紀, 風間智彦, 新井嘉則, 長岡正宏, 徳橋泰明, 加野浩一郎, 松本太郎: ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞と副甲状腺ホルモン投与による治療効果.(口頭発表), 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 城山観光ホテル, 鹿児島市,

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

2014.10.9

- 159.*澤田浩克, 風間智彦, 新井嘉則, 本田雅規, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ヒト脱分化脂肪細胞移植による骨折治癒促進効果の検討.(口頭発表), 第29回日本整形外科学会基礎学術集会, 城山観光ホテル, 鹿児島市, 2014.10.9
- 160.*中山渕志, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ラット変性椎間板モデルに対する脱分化脂肪細胞移植および再生医療への展望.(口頭発表), 第29回日本整形外科学会基礎学術集会, 城山観光ホテル, 鹿児島市, 2014.10.9
- 161.*石澤通康, 高野真史, 橋高敦史, 坂根里枝, 須原義智, 山田幸子, 榎島誠: 細胞選択的及び遺伝子選択的活性を有するビタミン D 誘導体の生物活性評価.(口演発表), 第344回脂溶性ビタミン総合研究委員会, 東京, 2014.9.26
- 162.*信末博行, 沖嘉尚, 佐谷秀行, 加野浩一郎: アクチン細胞骨格動態による脂肪分化を誘導するメカニズムの解明とがん治療への応用.(口頭発表), 第73回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 横浜市, 2014.9.25
- 163.*Kashimura T, Soejima K, Asami T, Shimoda K, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells on a dorsal skin flap model. (Poster presentation) 17th ASEAN Congress of Plastic Surgery, Singapore, 2014.8.1
- 164.*鶴町仁奈, 秋田大輔, 松本太郎, 加野浩一郎, 外木守雄, 齋藤瑛子, 秋山祐子, 鳥海扨, 磯川桂太郎, 清水典佳, 本田雅規: ヒト頬脂肪体の成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞.(ポスター発表), 第35回日本炎症・再生医学会, 万国津梁館, 名護市, 2014.7.2
- 165.*大熊啓嗣, 西川英里, 谷川俊太郎, 金澤剛二, 下澤克宜, 風間智彦, 松本太郎, 高橋昌里: 臍帯・胎盤羊膜由来 MSC の造血細胞支持能の比較検討.(ポスター発表), 第35回日本炎症・再生医学会, 万国津梁館, 名護市, 2014.7.1
- 166.*下澤克宜, 大熊啓嗣, 谷川俊太郎, 金澤剛二, 西川英里, 風間智彦, 麦島秀雄, 松本太郎: ヒト臍帯・胎盤組織由来幹細胞の免疫原性および免疫制御能の解析.(ポスター発表), 第35回日本炎症・再生医学会, 万国津梁館, 名護市, 2014.7.1
- 167.*澤田浩克, 風間智彦, 新井嘉則, 本田雅規, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: 免疫不全マウス大腿骨骨折モデルにおけるヒト脱分化脂肪細胞の骨再生効果検討.(ポスター発表), 第35回日本炎症・再生医学会, 万国津梁館, 名護市, 2014.7.1
- 168.*風間智彦, 木下豪紀, 新井嘉則, 長岡正宏, 徳橋泰明, 加野浩一郎, 松本太郎: ラット難治性骨折モデルに対する脱分化脂肪細胞と副甲状腺ホルモン投与による骨折治癒効果の検討.(ポスター発表), 第35回日本炎症・再生医学会, 万国津梁館, 名護市, 2014.7.1.

<研究成果の公開状況>(上記以外)

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

<既に実施しているもの>

【公開シンポジウム】

1. *文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」平成 30 年度研究成果公開シンポジウム, 東京, 2019. 3. 16
2. AMED 平成 30 年度再生医療実用化研究事業「重症下肢虚血に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた再生医療の実用化」キックオフ公開シンポジウム, 東京, 2018. 7. 19
3. *文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」平成 29 年度研究成果公開シンポジウム, 東京, 2018. 3. 3
4. *文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」平成 28 年度研究成果公開シンポジウム, 東京, 2017. 3. 11
5. *文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」平成 27 年度研究成果公開シンポジウム, 東京, 2016. 3. 5
6. 日本大学医学部細胞再生・移植医学分野公開シンポジウム「幹細胞移植による免疫制御の臨床応用」東京, 2015. 8. 29
7. *文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」平成 26 年度研究成果公開シンポジウム, 東京, 2015. 1. 31

【インターネット】

1. *日本大学医学部総合医学研究所紀要「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業報告」. 中山渕志, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎. ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果. 6: 32-34, 2017, URL: www.med.nihon-u.ac.jp/research_institute/bulletin/2018/2018_009
2. *日本再生医療学会ホームページ 第 1 回再生医療産学連携テクノオクシオン. 松本太郎. 「成熟脂肪細胞の脱分化技術を利用した再生医療」 2018. 3. 22, URL: <https://www.jsrm.jp/cms/uploads/2/2018/04/61a49e75b3ca28c9395c122d09071986.pdf>
3. *日本大学医学部総合医学研究所紀要「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業報告」. 村井建美, 石毛美夏, 風間智彦, 加野浩一郎, 高橋昌里, 麦島秀雄, 松本太郎. マウス急性移植片宿主病モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果. 5: 46-48, 2017, URL: www.med.nihon-u.ac.jp/research_institute/bulletin/2017/2017_013
4. *日本大学医学部総合医学研究所紀要「創立 50 周年記念研究奨励金(共同研究)研究報告」. 風間智彦. 脱分化脂肪細胞 DFAT における新規マーカーの探索. 4: 25-27, 2017, URL: www.med.nihon-u.ac.jp/research_institute/bulletin/2016/2016_007
5. *日本大学医学部総合医学研究所紀要「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業報告」. 遠山一人, 風間智彦, 加野浩一郎, 平山篤志, 松本太郎. ブタ心外膜下脂肪組織に由来する脱分化脂肪細胞の特性解析. 4: 51-53, 2016, URL: www.med.nihon-u.ac.jp/research_institute/bulletin/2016/2016_015
6. *日本大学産官学連携知財センター(NUBIC)ホームページ. 松本太郎. 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞治療. 2016, URL: https://www.nubic.jp/08seeds/pdf/nubic10023_201601.pdf

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

7. *日本大学産官学連携知財センター(NUBIC)ホームページ. 松本太郎. 実用性の高い治療用細胞 -脱分化脂肪細胞(DFAT)- GLP 製造を目指した DFAT 製造用培養容器の開発 2016, URL: https://www.nubic.jp/08seeds/pdf/nubic10029_201601.pdf
8. *Denwave.com (歯科医師従事者のための総合情報サイト). 本田雅規. 「ヒト頬脂肪体からの脱分化脂肪細胞(DFAT)が入手可能に」【後半】 2016, 5. 13 URL: <https://www.dentwave.com/article/honda42-2/>
9. *Denwave.com (歯科医師従事者のための総合情報サイト). 本田雅規. 「ヒト頬脂肪体からの脱分化脂肪細胞(DFAT)が入手可能に」【前半】 2016, 4. 28 URL: <https://www.dentwave.com/article/honda42/>
10. *日本大学ホームページ. 加野浩一郎, 松本太郎. 日本大学の研究 インタビュー 「学部を横断して取り組む DFAT=ディーファットの研究が期待の再生医療の発展に貢献」 2016, URL: <https://www.nihon-u.ac.jp/research/about/interview/>
11. *日本大学医学部総合医学研究所紀要 「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業報告」. 渡邊拓史, 萩倉一博, 風間智彦, 高橋昌里, 松本太郎. マウス脱分化脂肪細胞の血管新生作用に関する研究 3: 71-76, 2015, URL: www.med.nihon-u.ac.jp/research_institute/bulletin/2015/2015_019
12. *日本大学医学部機能形態学系 細胞再生・移植医学分野ホームページ. 松本太郎, 風間智彦. 「脱分化脂肪細胞(DFAT)を細胞源とする再生医療」 2015, URL: www.med.nihon-u.ac.jp/department/saisei/dfat.html

<これから実施する予定のもの>
なし

14 その他の研究成果等

【新聞・テレビ報道】

1. 福田昇:「遺伝子制御、創薬の潮流に がん・腎臓病で」日本経済新聞 電子版 2019. 2. 3
2. *松本太郎:「再生医療シンポ開く DFAT、臨床応用の道探る」. 日本大学新聞 第 1337 号 2018. 8. 20
3. *加野浩一郎, 松本太郎: NHKスペシャル「人体 神秘の巨大ネットワーク第2集 驚きのパワー！”脂肪と筋肉”が命を守る」. NHK, 2017. 11. 5
4. *松本太郎:「医学部リサーチセンター」. 日本大学広報特別版, NU excellence 研究者だより 第 40 号 2016. 10. 1
5. *松本太郎:「DFAT, iPS 細胞など本学の3研究室が発表」. アカデミックフォーラム. 日本大学広報 第 697 号, 2016. 6. 15
6. *松本太郎:「基盤形成支援事業の研究発表 DFAT など5件実施」. 日本大学広報 第 692 号 2016. 3. 15
7. *松本太郎:「3年後には臨床試験へ 脱分化脂肪細胞(DFAT)」日本大学広報第 676 号 2015. 2. 15
8. *副島一孝:「皮膚再建時の DFAT の有用性を動物実験で確認」 Medical Tribune 2015. 5. 15
9. *松本太郎, 加野浩一郎:「DFAT 研究に熱い視線 バイोजアパン 2015」日本大学広報 第 687 号 2015.11.15
10. *松本太郎:「足の血流改善狙い脂肪から細胞育成」. 日本経済新聞 2015. 12. 21

【展示会等】

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

1. *松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)による再生医療(出展者プレゼンテーション), 再生医療 JAPAN2018, パシフィコ横浜, 横浜市, 2018. 10. 12
2. 福田 昇: 皮膚癒痕に対するヒト TGF- β に対する PI ポリアミドの創薬開発 (口頭発表とポスター展示) アカデミックフォーラム, 東京, 2018. 1. 24
3. *松本太郎: 日本大学における再生医学研究 (講演), 日本大学医学部オープンキャンパス, 東京, 2015. 7. 23-24
4. *松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞治療 (出展者プレゼンテーション), BioJapan2015, 横浜, 2015.10.16
5. *松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞治療 (出展者プレゼンテーション), メディカルジャパン 2016 アカデミックフォーラム, 大阪, 2016. 2. 24
6. *松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)による細胞治療 (出展者プレゼンテーション), ライフサイエンスワールド 2016 第 13 回アカデミックフォーラム, 東京, 2016. 5.13
7. *松本太郎: 日本大学における再生医学研究 (講演), 日本大学医学部オープンキャンパス, 東京, 2016. 7. 28-29
8. *松本太郎: 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞治療 (出展者プレゼンテーション), BioJapan2016 再生医療 Japan2016, 東京, 2016.10.14

【本研究プロジェクトに係わる受賞】

1. *萩原玲子, 沖嘉尚, 加野浩一郎: 成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞 DFAT の肝細胞への分化.(優秀演題賞), 日本畜産学会第 124 回大会, 東京大学弥生キャンパス, 東京, 2018. 3. 28
2. *Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularization of dermis like tissue after artificial dermis grafting. J Plast Surg Hand Surg 49(1): 25-31, 2015 (第 59 回日本形成外科学会学術奨励賞 2016 年)
3. *秋田大輔, 加野浩一郎, 田村瑛子, 真下貴之, 鶴町仁奈, 新井嘉則, 山中克之, 金子正, 塩野目桃子, 月村直樹, 松本太郎, 磯川桂太郎, 石上友彦, 本田雅規: DFAT 細胞による歯周組織再生. (優秀演題賞), 第 36 回日本炎症・再生医学会, 虎ノ門ヒルズフォーラム, 東京, 2015. 7. 21

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

<「選定時」に付された留意事項>

なし

<「選定時」に付された留意事項への対応>

なし

<「中間評価時」に付された留意事項>

なし

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

なし

法人番号	131075
プロジェクト番号	S1411018

16 施設・装置・設備・研究費の支出状況(実績概要)

(千円)

年度・区分	支出額	内 訳						備 考
		法 人 負 担	私 学 助 成	共同研 究機関 負担	受託 研究等	寄付金	その他()	
平成 26 年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	11,900	4,558	7,342				
	研究費	36,905	19,421	17,484				
平成 27 年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	41,824	23,164	18,660				
平成 28 年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	44,565	28,580	15,985				
平成 29 年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	45,534	29,155	16,379				
平成 30 年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	45,662	21,639	24,023				
総 額	施設	0	0	0	0	0	0	0
	装置	0	0	0	0	0	0	0
	設備	11,900	4,558	7,342	0	0	0	0
	研究費	214,490	121,959	92,531	0	0	0	0
総 計	226,390	126,517	99,873	0	0	0	0	

法人番号

131075

17 施設・装置・設備の整備状況 (私学助成を受けたものはすべて記載してください。)

《施設》(私学助成を受けていないものも含め、使用している施設をすべて記載してください。) (千円)

施設名称	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費	補助金額	補助主体
医学部創設70周年記念館(リサーチセンター)	H12年度	5,722 m ²	8	20	-----	-----	日本大学
実験医学研究所	S41年度	1,331 m ²	4	13	-----	-----	日本大学

※ 私学助成による補助事業として行った新增築により、整備前と比較して増加した面積

0 m²

《装置・設備》(私学助成を受けていないものは、主なもののみを記載してください。)

(千円)

装置・設備の名称	整備年度	型番	台数	稼働時間数	事業経費	補助金額	補助主体
(研究装置) 該当なし				h h h h h			
(研究設備) FACS Aria II uセルソーター	H26年度	BD, Facs Aria	1	466.5 h	11,900	7,342	私学助成
(情報処理関係設備) 該当なし				h h h h h			

法人番号

131075

18 研究費の支出状況

(千円)

年 度	平成 26 年度			
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳		
		主 な 使 途	金 額	主 な 内 容
教 育 研 究 経 費 支 出				
消 耗 品 費	11,588	研究用消耗品	11,588	試薬、実験動物、プラスチック製品
光 熱 水 費	0		0	
通 信 運 搬 費	12	研究試料送付	12	研究試料運搬
印 刷 製 本 費	0		0	
旅 費 交 通 費	97	学会旅費	97	学会旅費(仙台、神戸、和歌山)
報 酬・委 託 料	833	業務委託	833	検査委託料
(修 繕 費)	977	機器修繕	977	超低温槽修理
(雑 費)	42	学会参加	42	学会参加費
計	13,549		13,549	
ア ル バ イ ト 関 係 支 出				
人 件 費 支 出	896	研究補助	896	時給 950円、年間時間数 941.5時間、実人数1人
(兼 務 職 員)	2,079	研究補助	2,079	時給 1,050円、年間時間数 1,576時間、実人数1人
	3,817	研究補助	3,817	月給 280,000円、年間時間数 1,464時間、実人数 1人 ※所定福利費等を含む
教 育 研 究 経 費 支 出	0		0	
計	6,792		6,792	
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)				
教 育 研 究 用 機 器 備 品	16,051	研究用機器	16,051	CO2インキュベーター、極微量分光光度計 他
図 書	0		0	
計	16,051		16,051	
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出				
リサーチ・アシスタント	513	リサーチ・アシスタント	513	学内1人
ポスト・ドクター	0		0	
研究支援推進経費	0		0	
計	513		513	学内1人

年 度	平成 27 年度			
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳		
		主 な 使 途	金 額	主 な 内 容
教 育 研 究 経 費 支 出				
消 耗 品 費	15,190	研究用消耗品	15,190	試薬、実験動物、プラスチック製品
光 熱 水 費	0		0	
通 信 運 搬 費	0		0	
印 刷 製 本 費	0		0	
旅 費 交 通 費	316	学会旅費	316	学会旅費(福岡、富山、名古屋、大阪)
報 酬・委 託 料	512	業務委託	512	検査委託料
(修 繕 費)	4,348	機器修繕	4,348	X線照射装置修理
(雑 費)	61	学会参加	61	学会参加費
計	20,427		20,427	
ア ル バ イ ト 関 係 支 出				
人 件 費 支 出	1,881	研究補助	1,881	時給 950円、年間時間数 1,526時間、実人数1人
(兼 務 職 員)	904	研究補助	904	時給 1,000円、年間時間数 804時間、実人数1人
	3,650	研究補助	3,650	時給 1,100円、年間時間数 2,541時間、実人数 2人 ※所定福利費等を含む
教 育 研 究 経 費 支 出	0		0	
計	6,435		6,435	
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)				
教 育 研 究 用 機 器 備 品	11,229	研究用機器	11,229	iMarkマイクロプレートリーダー 他
図 書	0		0	
計	11,229		11,229	
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出				
リサーチ・アシスタント	3,733	リサーチ・アシスタント	3,733	学内2人
ポスト・ドクター	0		0	
研究支援推進経費	0		0	
計	3,733		3,733	学内2人

年度		平成 28 年度		法人番号	131075
小科目	支出額	積算内訳			
		主な使途	金額	主な内容	
教育研究経費支出					
消耗品費	20,851	研究用消耗品	20,851	試薬、実験動物、プラスチック製品	
光熱水費	0		0		
通信運搬費	0		0		
印刷製本費	0		0		
旅費交通費	66	学会旅費	66	学会旅費(仙台)	
報酬・委託料	1,634	業務委託	1,634	検査委託料、パラフィンブロック作製	
(修繕費)	1,731	機器修繕	1,731	ビペットマン修理、ディーブリーザー修理	
(雑費)	15	学会参加	15	学会参加費	
計	24,297		24,297		
アルバイト関係支出					
人件費支出 (兼務職員)	4,944	研究補助	969	時給 1,000円, 年間時間数 951時間, 実人数 1人	
		研究補助	2,425	時給 1,250円, 年間時間数 1,605時間, 実人数 1人	
		研究補助	1,550	時給 1,100円, 年間時間数 1,128時間, 実人数 1人	
				※所定福利費等を含む	
教育研究経費支出	0		0		
計	4,944		4,944		
設備関係支出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)					
教育研究用機器備品	7,214	研究用機器	7,214	全自動セルカウンター 他	
図書	0		0		
計	7,214		7,214		
研究スタッフ関係支出					
リサーチ・アシスタント	3,478	リサーチ・アシスタント	3,478	学内2人	
ポスト・ドクター	4,632	ポスト・ドクトラル・フェロー	4,632	学内1人	
研究支援推進経費	0		0		
計	8,110		8,110	学内3人	

年度		平成 29 年度			
小科目	支出額	積算内訳			
		主な使途	金額	主な内容	
教育研究経費支出					
消耗品費	13,868	研究用消耗品	13,868	実験動物用飼料, 試薬, 実験動物, プラスチック製品等	
光熱水費	0		0		
通信運搬費	3	輸送	3	サンプル輸送のための宅配代金	
印刷製本費	0		0		
旅費交通費	283	学会旅費	283	学会参加旅費(沖縄等)	
報酬・委託料	5,408	業務委託	5,408	検査委託料	
(修繕費)	1,569	機器修繕	1,569	オートクレープ処理, 遠心機修理, ビペットマン修理等	
(雑費)	27	学会参加費	27	学会参加費等	
計	21,158		21,158		
アルバイト関係支出					
人件費支出 (兼務職員)	3,987	研究補助	938	時給 1,000円, 年間時間数 917時間, 実人数 1人	
		研究補助	2,664	時給 1,400円, 年間時間数 1432時間, 実人数 1人	
		研究補助	385	時給 1,100円, 年間時間数 297時間, 実人数 1人	
				※所定福利費等を含む	
教育研究経費支出	0		0		
計	3,987		3,987		
設備関係支出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)					
教育研究用機器備品	9,061	研究用機器	9,061	オールインワン蛍光顕微鏡等	
図書	0		0		
計	9,061		9,061		
研究スタッフ関係支出					
リサーチ・アシスタント	0		0		
ポスト・ドクター	11,328	ポスト・ドクトラル・フェロー	11,328	学内3人	
研究支援推進経費	0		0		
計	11,328		11,328	学内3人	

法人番号

131075

年 度	平成 30 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	16,640	研究用消耗品	16,640
光 熱 水 費	0		0
通 信 運 搬 費	152	輸送	152
印 刷 製 本 費	0		0
旅 費 交 通 費	387	学会旅費	387
報 酬・委 託 料	852	業務委託	852
(修繕費)	3,254	機器修繕	3,254
(雑費)	24	学会参加	24
計	21,309		21,309
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人 件 費 支 出 (兼務職員)	3,454	研究補助	831
		研究補助	2,623
教育研究経費支出			
計	3,454		3,454
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	12,767	研究用機器	12,767
図 書	0		0
計	12,767		12,767
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	0		0
ポスト・ドクター	8,132	ポスト・ドクトラル・フェロー	8,132
研究支援推進経費	0		0
計	8,132		8,132

3. 研究成果の概要

マウス脱分化脂肪細胞の血管新生作用に関する研究

Study on angiogenic activity in mouse dedifferentiated fat cells

渡邊拓史¹⁾, 萩倉一博²⁾, 風間智彦²⁾, 高橋昌里¹⁾, 松本太郎²⁾

Hirofumi WATANABE¹⁾, Kazuhiro HAGIKURA²⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Shori TAKAHASHI¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

¹⁾日本大学医学部小児科学系小児科学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: ASC) は高い血管新生能を有し、虚血性疾患に対する細胞治療に用いられている。一方、ASC に類似した多能性をもつ脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) の血管新生メカニズムは十分に解明されていない。本研究では、マウス脂肪組織より DFAT と ASC を調製し、それぞれ血管内皮細胞と共培養する事により、血管内皮細胞の遊走能や増殖能、管腔形成能の変化を比較検討し、さらに血管構成細胞の1つであるペリサイトへの分化を検討した。その結果、DFAT は血管内皮細胞の細胞増殖能、遊走能、管腔形成能を促進した。また、血管内皮細胞との直接および間接的共培養によりペリサイトへ分化した。一方、ASC は血管内皮細胞に対し DFAT と同等の細胞増殖能・管腔形成能を示すが、細胞遊走能や ASC のペリサイトへの分化能は、DFAT に比べ低いことが示された。DFAT は ASC と同様に血管新生細胞治療の有用な細胞ソースとなりうる可能性がある。

【はじめに】

既存の血管より生理的・病的条件下に新たな血管が発生する現象を血管新生という。この血管新生に関与している分子機序や細胞動態を応用して、虚血組織の血流を確保し、組織障害や壊死を軽減させようとする治療法は、治療的血管新生と呼ばれている。その歴史は血管新生因子の遺伝子治療から始まり、現在は骨髄単核球細胞や間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) などの移植による細胞治療が期待され、臨床研究も開始されている²⁻⁵⁾。

Matsumoto ら⁶⁾ は脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法を用いて、体外で脱分化培養する事により生じてくる繊維芽細胞様の形態をした細胞群が高い増殖能と MSC と同等の多分化能を示すことを明らかにした。この成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞は、脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) と呼ばれている。DFAT を虚血部位へ移植するとパラクライン的に種々の血管新生因子が放出され、血管新生が誘導されることが確認されている⁷⁾。DFAT は遺伝子操作やウイルスベクターを用いない安全かつ簡便な方法で短期間に大量調製が可能であるため、治療用細胞ソースとして早期の臨床応用が期待できる。

末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease : PAD) や Buerger 病、虚血性心筋症などの難治性虚血性疾患において、DFAT を用いた細胞治療は有効な治療法となる可能性がある。一方で、DFAT の血管新生メカニズムに関しては十分に解明されていない。本研究は、DFAT と血管内皮細胞を共培養する事により、細胞間相互作用による血管内皮細胞の遊走能や増殖能、管腔形成能の変化を脂肪組織に存在する MSC である脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) と比較して検討した。さらに血管内皮細胞との共培養により、DFAT が血管構成細胞

の1つであるペリサイトへ分化する可能性について ASC と比較して検討した。

【対象及び方法】

DFAT・ASC の調製

Green fluorescent protein (GFP)標識 DFAT および ASC は、GFPトランスジェニックマウス皮下脂肪組織から調製され、凍結保存された細胞を解凍、培養して実験に使用した。DFAT および ASC 調整法の概略を図1に示す。増殖培地は 20% 胎児ウシ血清含有 CSTI303-MSC (Cell Science & Technology Institute)を用い、3-4 日毎に培地交換を行った。

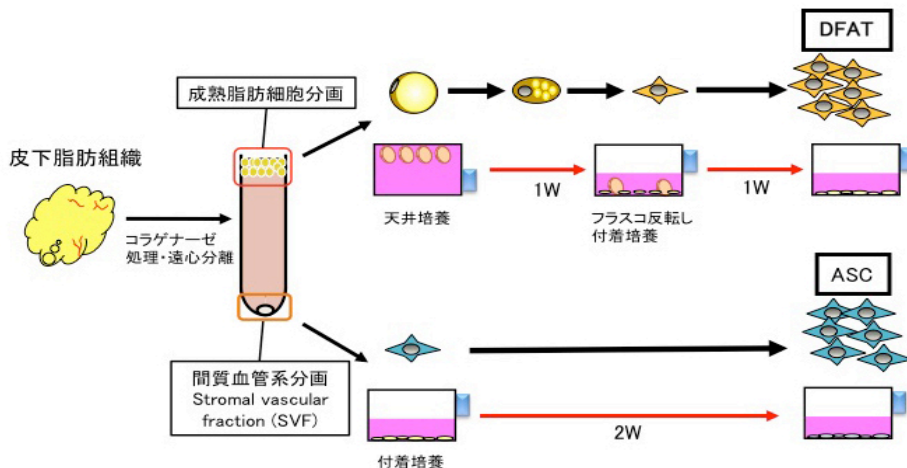


図1. 脱分化脂肪細胞(DFAT)、脂肪組織由来幹細胞(ASC)の調製法

血管内皮細胞の増殖に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

セルカルチャーインサート(BD Falcon)内にマウス DFAT あるいは ASC を 1×10^4 、プレート底面にマウス血管内皮細胞 (MS1) 5×10^3 を播種し、48 時間共培養した。血管内皮細胞の核染色を行い、蛍光顕微鏡にて撮影し、ランダム 5 視野内にある血管内皮細胞数をカウントし、MS1 単独 (Control 群)、DFAT 共培養 (DFAT 群)、ASC 共培養 (ASC 群) で比較した。実験は triplicated dish で行った。

血管内皮細胞(MS1)の遊走に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

セルカルチャーインサート内に血管内皮細胞 (MS1) 5×10^3 、プレート底面に DFAT あるいは ASC 2×10^4 を播種し、8時間共培養した。セルカルチャーインサート裏面に遊走した血管内皮細胞の核染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。ランダム 5 視野にある血管内皮細胞数をカウントし、非共培養群と共培養群で比較した。実験は triplicated dish で行った。

血管内皮細胞管腔形成に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

コラーゲンボール (Cytodex3, GE Healthcare) 3,000 個を含む 10%胎児ウシ血清含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen)内に MS1 を 8×10^5 播種し、震とうすることによりコラーゲンボールに MS1 を付着させた。この MS1 の付着したコラーゲンボール 50 個を DFAT または ASC 5×10^3 を含浸させたコラーゲンゲル (Collagen I rat tail, BD Bioscience)、またはコラーゲンゲルのみで 7 日間三次元培養し、MS1 の管腔形成を経時的に位相差顕微鏡を用いて観察した。以上の実験は triplicated dish で行った(図2)。

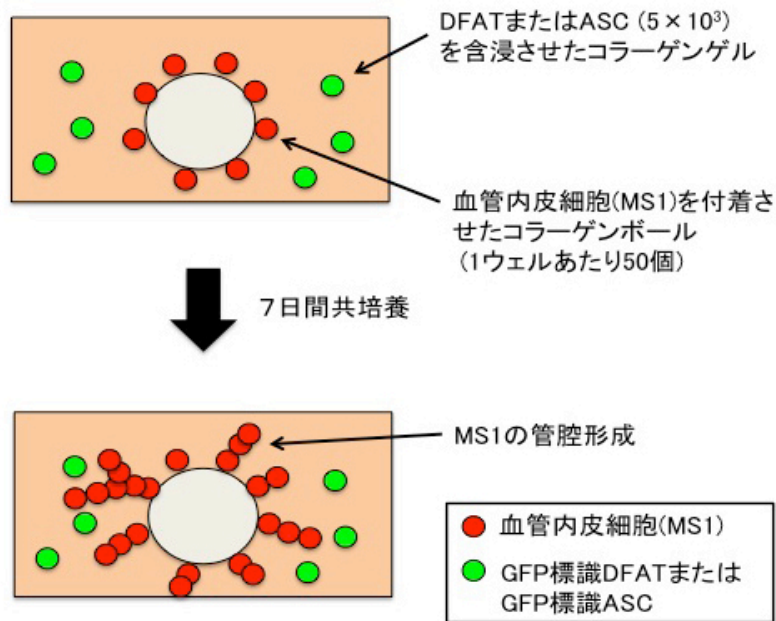


図2. コラーゲンボールを用いた血管内皮細胞管腔形成アッセイ

血管内皮細胞との共培養によるペリサイトマーカー(NG2)の免疫組織染色を用いた発現解析

GFP-DFAT あるいは GFP-ASC と MS1 を間接的または直接的に 72 時間共培養を行い、4% パラホルムアルデヒドにより固定した。固定した DFAT あるいは ASC を、マウス抗 NG2 抗体 (1:200, Millipore)、マウス抗 CD31 抗体(1:200, BD Pharmingen)を用いて免疫染色を行った。Hoechst33342 で核染色を行った後に、作成した標本を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV10i-DOC, Olympus)を用いて観察した(図3)。また GFP-DFAT あるいは GFP-ASC と MS1 を間接的または直接的に 72 時間共培養を行った後、Total RNA を抽出し、ペリサイトマーカー遺伝子の発現をリアルタイム RTPCR 法を用いて解析した。ペリサイトマーカー遺伝子として NG2 (MM_00507257)、RGS5(MM_00654112)、PDGFR β (MM_00435546)を検討した。 β アクチン (MM_00607939)の発現を同様に測定し、内部標準とした。各サンプルは triplicate で測定し、 β アクチン mRNA に対する相対的定量解析 (Comparative Ct 法)を行った。

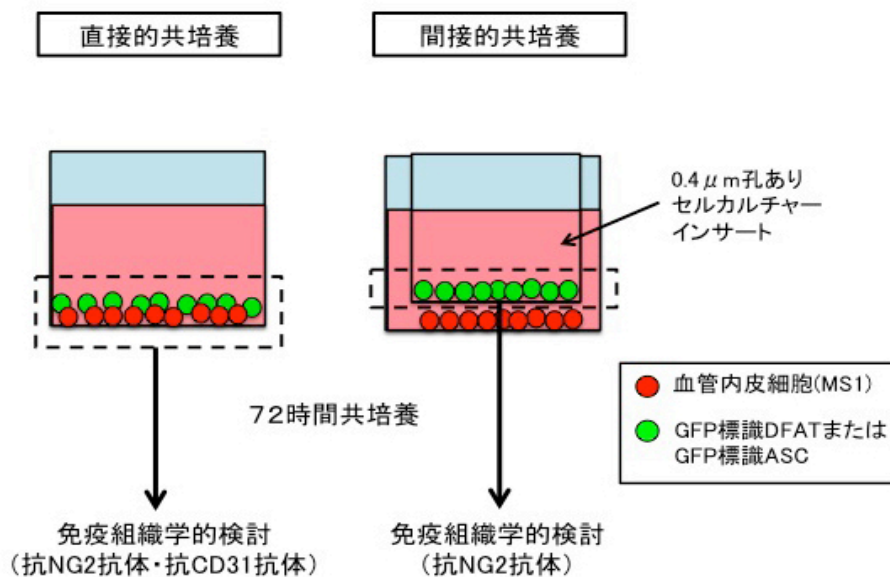


図3. 血管内皮細胞との共培養によるペリサイト分化能の検討

統計処理

実験により得られた定量結果は mean ± SD にて表した。2 群間の比較には Mann-Whitney U test、3 群間の比較には one-way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison にて統計解析を行った。P < 0.05 を統計学的有意差とした。統計処理は PRISM5 (GraphPad Software) を用いて行った。

【結果】

血管内皮細胞の増殖に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

DFAT 群、ASC 群は Control 群に比べてそれぞれ 3.2 倍、2.6 倍と有意に MS1 の細胞数が増加した(p<0.05)。一方、DFAT 群と ASC 群との間には有意差は認められなかった。以上の結果より、DFAT・ASC は血管内皮細胞の増殖を刺激する事が明らかになった。

血管内皮細胞の遊走に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

DFAT 非共培養群と比較して DFAT 共培養群では MS1 の遊走能が 1.5 倍と有意に高まった(p<0.05)。一方、ASC 非共培養群と ASC 共培養群との比較では有意差が認められなかった。以上の結果より、DFAT は血管内皮細胞の遊走を刺激するが、ASC ではその効果は認められなかった。

血管内皮細胞管腔形成に対する DFAT・ASC の共培養の影響の検討

コラーゲンボールに付着させた MS1 管腔形成アッセイでは、DFAT 群、ASC 群は Control 群に比べ明らかにコラーゲンボールから派生する発芽的管腔形成が促進する所見が認められた。この結果より DFAT および ASC は血管内皮細胞の管腔形成を促進することが明らかになった。

血管内皮細胞との共培養によるペリサイトマーカー(NG2)の発現解析

① 免疫組織学的検討

DFAT 単独培養では全ての DFAT が GFP を発現しており、NG2 は陰性であった。MS1 との 72 時間の間接的共培養により、約 10% の DFAT が NG2 を発現した。MS1 との 72 時間の直接的共培養では NG2 陽性を示す DFAT が高頻度(約 20%)に認められた(図4)。NG2 陽性を示す細胞はすべて内皮細胞マーカー CD31 陰性であり、内皮細胞はペリサイトに分化しない事を確認した。一方、ASC 単独培養では全ての ASC が GFP 陽性であり、共培養前より一部の細胞に NG2 陽性細胞が認められた。MS1 との 72 時間の間接的および直接的共培養にて GFP 陽性かつ NG2 陽性細胞が検出されたが、その出現率は共培養前に比べ明らかな差は認められなかった。

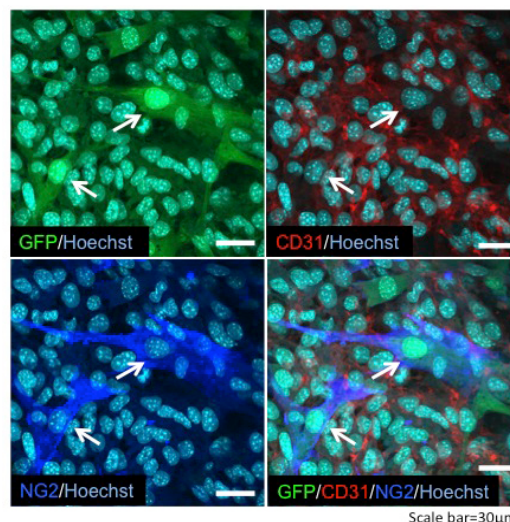


図4. 血管内皮細胞との直接的共培養による GFP-DFAT のペリサイトマーカーNG2 の発現
(矢印は NG2 を発現した GFP-DFAT を示す。)

② リアルタイム RT-PCR

DFAT における NG2 の mRNA の発現は Control と比較し間接的および直接的共培養において有意に増加した ($p < 0.05$)。間接的共培養と直接的共培養間の比較においては直接的共培養のほうが有意に NG2 発現が増加していた ($p < 0.05$)。RGS5 の mRNA の発現は Control と比較し、間接的および直接的共培養において有意に低下した ($p < 0.05$)。間接的、直接的共培養間の比較においては RGS5 発現に有意差は認められなかった。PDGFR β mRNA の発現は Control と比較し間接的および直接的共培養において有意に増加した ($p < 0.05$)。間接的、直接的共培養間の比較においては直接的共培養のほうが有意に PDGFR β 発現が増加していた ($p < 0.05$)。ASC においては、全体的に NG2、RGS5、PDGFR β の発現は DFAT と比較すると低い傾向が認められた。以上の結果より血管内皮細胞との共培養により、DFAT がペリサイトの形質を獲得する事が示された。一方、ASC はその一部にペリサイトの混入が疑われ、内皮細胞との共培養による明らかなペリサイト分化の所見は得られなかった。

【考察】

DFAT、ASC とともに細胞間相互作用による血管内皮細胞の増殖能、管腔形成能を増加させる事が明らかになった。一方、血管内皮細胞に対する遊走能においては DFAT が ASC に比べ有意に高い事が明らかになった。DFAT と ASC のサイトカイン発現プロファイルは類似している事が報告されている⁸が、遊走活性を制御する因子において何らかの差異があると思われる。

また DFAT は内皮細胞との共培養によりペリサイトへの分化の可能性が示された。一方、ASC は内皮細胞との共培養にてペリサイト分化の傾向を示さなかった。ASC がペリサイトへの分化傾向を示さなかった理由として、ASC では DFAT に比べ未分化ペリサイトマーカー⁹である RGS5 の基礎発現が低く、またペリサイト分化に重要なシグナルを伝達する PDGFR β の発現誘導が低いという形質に起因している可能性がある。ASC は in vitro および in vivo において高い血管新生作用¹⁰⁻¹²が知られており、虚血性疾患に対する血管新生を目的とした臨床研究も始まっている。今後、ASC と DFAT の in vivo における血管新生効果を直接比較する前臨床試験を行い、両者の治療用細胞としての有用性を評価する必要がある。

【結語】

DFAT は血管内皮細胞に作用し、その細胞増殖能、遊走能、管腔形成能を促進する事が明らかになった。また、血管内皮細胞との直接的および間接的共培養によりペリサイトへ分化する可能性が示唆された。一方、ASC は血管内皮細胞に対し DFAT と同等の細胞増殖能・管腔形成能を示すが、細胞遊走能は低い事が明らかになった。また、ASC のペリサイトへの分化能は、DFAT に比べ高くないことが示された。DFAT は ASC と同様に治療的血管新生における有用な治療用細胞ソースとなりうる可能性がある。

【参考文献】

1. Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), 389–395. doi:10.1038/74651
2. Matoba, S., Tatsumi, T., Murohara, T., Imaizumi, T., Katsuda, Y., Ito, M., et al. (2008). Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *American Heart Journal*, 156(5), 1010–1018. doi:10.1016/j.ahj.2008.06.025

3. Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S., Arnesen, H., Abdelnoor, M., Egeland, T., et al. (2006). Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 355(12), 1199–1209. doi:10.1056/NEJMoa055706
4. Rosenzweig, A. (2006). Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells. *The New England Journal of Medicine*, 355(12), 1274–1277. doi:10.1056/NEJMe068172
5. Schächinger, V., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Hölschermann, H., et al. (2006). Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 355(12), 1210–1221. doi:10.1056/NEJMoa060186
6. Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., Fukuda, N., Iribe, Y., Tanaka, N., et al. (2008). Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology*, 215(1), 210–222. doi:10.1002/jcp.21304
7. Jumabay, M., Matsumoto, T., Yokoyama, S.-I., Kano, K., Kusumi, Y., Masuko, T., et al. (2009). Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(5), 565–575. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.004
8. Kikuta, S., Tanaka, N., Kazama, T., Kazama, M., Kano, K., Ryu, J., et al. (2013). Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Engineering Part A*, 19(15-16), 1792–1802. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0380
9. Arnold, C., Feldner, A., Pfisterer, L., Hödebeck, M., Troidl, K., Genové, G., et al. (2014). RGS5 promotes arterial growth during arteriogenesis. *EMBO Molecular Medicine*, 6(8), 1075–1089. doi:10.15252/emmm.201403864
10. Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., & Bouloumié, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, 110(3), 349–355. doi:10.1161/01.CIR.0000135466.16823.D0
11. Piccinno, M. S., Veronesi, E., Loschi, P., Pignatti, M., Murgia, A., Grisendi, G., et al. (2013). Adipose stromal/stem cells assist fat transplantation reducing necrosis and increasing graft performance. *Apoptosis : an International Journal on Programmed Cell Death*, 18(10), 1274–1289. doi:10.1007/s10495-013-0878-7
12. Yoo, J. H., Shin, J. H., An, M. S., Ha, T. K., Kim, K. H., Bae, K. B., et al. (2012). Adipose-tissue-derived Stem Cells Enhance the Healing of Ischemic Colonic Anastomoses: An Experimental Study in Rats. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*, 28(3), 132–139. doi:10.3393/jksc.2012.28.3.132

ブタ心外膜下脂肪組織に由来する脱分化脂肪細胞の特性解析

Characteristic analysis of porcine epicardial adipose tissue-derived
dedifferentiated fat cells

遠山一人¹⁾, 風間智彦²⁾, 加野浩一郎³⁾, 平山篤志¹⁾, 松本太郎²⁾
Kazuto TOYAMA¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Koichiro KANO³⁾,
Atsushi HIRAYAMA¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

¹⁾ 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野, ²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ³⁾ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科

【要旨】

脱分化脂肪細胞(DFAT)は成熟脂肪細胞より調製される多能性細胞である。本研究では、ブタから心外膜下脂肪由来 DFAT (EC-DFAT)、および皮下脂肪由来 DFAT(SC-DFAT)を調製し、心筋細胞などへの分化能を比較検討した。遺伝子発現解析では、EC-DFAT は SC-DFAT に比べ、心筋初期分化マーカーGATA4 の発現が有意に高かった。ラット心筋細胞との共培養による心筋分化誘導の結果、EC-DFAT は SC-DFAT に比べ、心筋特異的転写因子 Nkx2.5 やトロポニンI 陽性細胞の出現率が高く、心筋細胞と協調的拍動を示す細胞が多く観察された。以上より EC-DFAT が心筋細胞への分化指向性が高いことが明らかとなった。EC-DFAT は心筋再生を目的とした細胞治療の新たな細胞ソースとなり得る可能性がある。

【背景および目的】

薬物治療に抵抗性を示す重症心不全に対して、近年、細胞治療が注目されており、自家骨髄単核球や骨格筋芽細胞などを用いた臨床研究が開始されている。これら細胞治療の作用機序は移植細胞から分泌される液性因子のパラクライン効果によるものであることが明らかになっている。心筋症など心筋自体の変性に起因する病態の場合、心筋細胞に直接分化し心機能を改善させるポテンシャルをもつ治療用細胞が望まれる。Matsumoto ら¹⁾は、成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することにより調製される脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)が、高い増殖能と間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)に類似した多分化能を獲得することを明らかにした。DFAT は少量の脂肪組織より大量調製することが可能であることから再生医療の細胞資源として期待される。また DFAT は心筋への分化能を有することが報告されている²⁾。脂肪細胞はその局在部位により機能が異なることが知られていることから、DFAT の分化指向性も脂肪組織の局在部位により異なることが示唆される。本研究では、ブタの心外膜下脂肪組織、及び皮下脂肪組織からそれぞれ脂肪細胞を単離し DFAT を調製した。そして、心外膜下脂肪由来 DFAT (Epicardial fat-derived DFAT: EC-DFAT)、および皮下脂肪由来 DFAT (Subcutaneous fat-derived DFAT : SC-DFAT)の心筋細胞などの分化能を比較検討した。

【方法および結果】

ブタの皮下脂肪組織および心外膜下脂肪組織より SC-DFAT と EC-DFAT を既報³⁾に従い調製し、脂肪、骨、軟骨、平滑筋へ分化誘導実験を行った。その結果、SC-DFAT、EC-DFAT 共に脂肪、骨、軟骨、平滑筋への多分化能を有することが確認された。次に EC-DFAT および SC-DFAT における心筋、脂肪、軟骨初期分化マーカーの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法で

検討した。その結果、EC-DFAT は SC-DFAT に比べ、心筋初期分化マーカーGATA4 の発現が高く、脂肪初期分化マーカーPPAR α や軟骨初期分化マーカーSOX9 の発現は低いことが明らかとなった。次に PKH で蛍光標識した EC-DFAT、SC-DFAT をラット心筋細胞とともに7日間直接的共培養を行い、心筋特異的タンパク質の発現を免疫組織学的に検討した。心筋特異的転写因子 Nkx2.5 に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT の一部に核に一致して Nkx2.5 を発現している細胞が認められた。心筋のギャップ結合タンパク質コネクシン 43 に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT 間の細胞境界領域または EC-DFAT とラット心筋細胞との細胞境界領域にコネクシン 43 が顆粒状に発現している所見が認められた。また心筋特異的収縮蛋白トロポニン I に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT の一部にトロポニン I 陽性の横紋構造を示す細胞が認められた (図 1)。

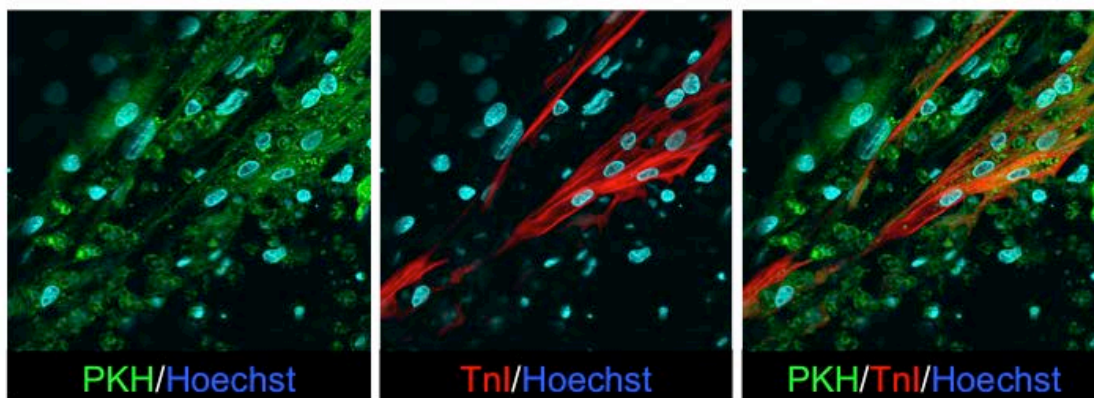


図 1. ラット心筋細胞との共培養による EC-DFAT のトロポニン I 発現

また EC-DFAT では、共培養3日目頃より隣接するラット心筋細胞と同期して PKH 陽性の EC-DFAT が協調的拍動する所見がしばしば観察された(図2)。これに対し SC-DFAT では、Nkx2.5 発現細胞や、協調的拍動所見はまれにしか観察されなかった。

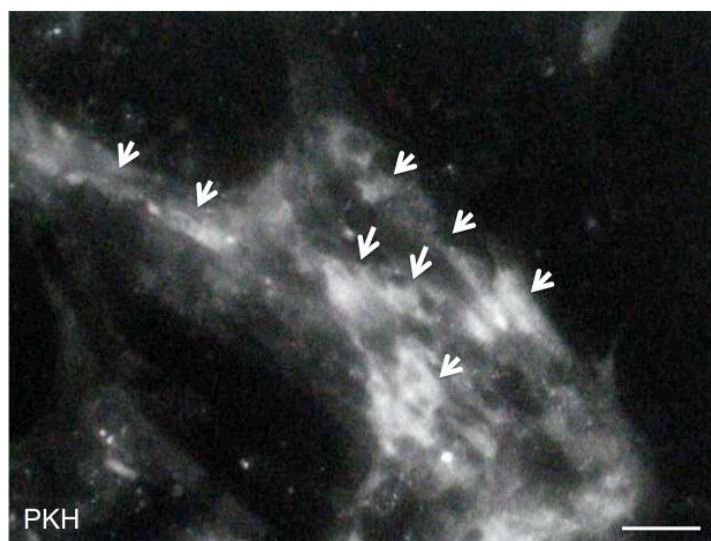


図 2. ラット心筋細胞との共培養による EC-DFAT の協調的拍動像 (矢印は動画にて拍動を認める DFAT を示す。Scale bar 20 μ m)

【考察】

本研究では DFAT は MSC に共通の多分化を有しながら、採取部位近傍の間葉系組織への分化指向性を示すことが示唆された。Kim ら⁴⁾は、皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞では、血球細胞由来 iPS 細胞に比べ、造血関連遺伝子の DNA 脱メチル化の程度が弱いことを示し、元の細胞のエピジェネティック修飾が初期化されても記憶されていることを報告した。DFAT の採取組織による分化指向性の差異も、このようなエピジェネティック・メモリーが関与している可能性がある。

本研究では EC-DFAT は、心筋分化誘導にて心筋特異的転写因子 Nkx2.5 の発現やギャップ結合タンパク質であるコネキシン 43 の発現、トロポニンIを含むサルコメア構造の出現、心筋細胞との協調的拍動が確認された。これらの所見は EC-DFAT が構造的、機能的に高い成熟度を示す心筋細胞へと分化する能力を有することを示唆している。現在、重症心不全患者に対しては、補助人工心臓や心臓移植が考慮されるが、いずれも経済的負担、厳しい適応基準と加療後の安全性が課題として存在する。EC-DFAT は、高い心筋細胞への分化能に加え、少量の脂肪組織から安価に大量調製できるため、重症心不全に対する新たな細胞治療用ソースとして期待できる。

【参考文献】

1. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, et al. (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology*, 215(1): 210–222.
2. Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama SI, Kano K, Kusumi Y, et al. (2009). Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47(5): 565–575.
3. Sugihara H, Yonemitsu N, Miyahara S, Toda S. (1987) Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *Journal of Lipid Research* 28(9):1038-1045.
4. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, et al. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313): 285-290.

ヒト頬脂肪体から単離・調製した脱分化脂肪細胞の特性

Characterization of dedifferentiated fat (DFAT) cells derived from size-dependent adipocytes

鶴町仁奈¹⁾, 秋田大輔²⁾, 加野浩一郎³⁾, 松本太郎⁴⁾, 鳥海 拓⁵⁾, 風間智彦⁴⁾, 沖 嘉尚³⁾, 田村瑛子¹⁾, 外木守雄⁶⁾, 磯川桂太郎⁷⁾, 清水典佳¹⁾, 本田雅規⁵⁾
Niina TSURUMACHI¹⁾, Daisuke AKITA²⁾, Koichiro KANO³⁾, Taro MATSUMOTO⁴⁾, Taku TORIUMI⁵⁾, Tomohiko KAZAMA⁴⁾, Yoshinao OKI³⁾, Yoko TAMURA¹⁾, Morio TONOIGI⁶⁾, Keitaro ISOKAWA⁷⁾, Noriyoshi SHIMIZU¹⁾, Masaki J. HONDA⁵⁾

¹⁾ 日本大学歯学部歯科矯正学講座, ²⁾ 日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座, ³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ⁴⁾ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科, ⁵⁾ 愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座, ⁶⁾ 日本大学歯学部口腔外科学講座, ⁷⁾ 日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座

【要旨】

脂肪組織から単離できる成熟脂肪細胞を天井培養することで非対称分裂にて現われる脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)は高い増殖能と多分化能を有することが報告されている。従来, 成熟脂肪細胞の大きさは約 60~100 μm ととらえられていたが, 近年, 40 μm 未満の大きさの脂肪細胞の存在も確認された。しかしながら, 成熟脂肪細胞の大きさと脱分化脂肪細胞への脱分化について検討した報告はこれまでにない。そこで本研究では, 脂肪細胞の大きさに着目し, 大きさの異なる成熟脂肪細胞分画から出現した DFAT 細胞の特性について検討した。

その結果, ヒト頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞には 40 μm 未満の大きさの S-adipocytes (small adipocytes) が多く存在し, S-adipocytes は L-adipocytes (Large adipocytes) に比較して有意に早く DFAT 細胞へと脱分化することが明らかとなった。

【背景および目的】

成熟脂肪細胞は長年, 終末分化し増殖能を失った細胞と考えられていたが, 天井培養法により非対称分裂に生じる線維芽細胞様細胞が間葉系幹細胞に類似した性質を持つことが明らかにされ, 脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)と名付けられている。DFAT 細胞は高い増殖能と, 脂肪細胞, 骨芽細胞, 軟骨細胞, 平滑筋細胞, 血管内皮細胞, 心筋細胞, 神経細胞等への多分化能を有していることから組織工学や再生医療の細胞源として有用である¹⁾。また, この DFAT 細胞は同じく脂肪組織を構成する細胞中に存在する脂肪組織由来の間葉系幹細胞(以下, ASC)に比較して骨芽細胞への分化能が高く, 口腔領域の骨組織や歯周組織の再生にも有用であることが報告され, 再生医療における移植細胞源として広く注目されている。咬筋の前縁と頬筋の表面に存在する頬脂肪体は, 局所麻酔と極小切開で口腔内から採取できる唯一の脂肪組織であり, DFAT 細胞が単離できることが報告されている。また, 従来, 成熟脂肪細胞の直径は 60-110 μm ととらえられていたが, 近年 20 μm 以下の成熟脂肪細胞が増殖能を持つことが報告されている²⁾。しかしながら, 成熟脂肪細胞の大きさと DFAT 細胞への脱分化の効率の関係性については明らかではない。

そこで本研究では, ヒト頬脂肪体から採取した成熟脂肪細胞を直径により2つのグループに分取し, それぞれの大きさの成熟脂肪細胞分画から脱分化した DFAT 細胞数を経日的に比較検討

した。さらに、それぞれの大きさの成熟脂肪細胞分画から出現した DFAT 細胞の特性についても比較検討を行った。

【方法】

日本大学歯学部付属歯科病院に来院した顎変形症の患者 5 名から顎骨移動手術時に余分な脂肪組織として採取した頬脂肪体を用いた。ヒト頬脂肪体を細切後、0.1%のコラゲナーゼ溶液にて 60 分間酵素処理を行い、濾過および遠心分離、成熟脂肪細胞分画を単離した。酵素処理後に得られた成熟脂肪細胞分画 1 ml あたりに含まれる成熟脂肪細胞の直径をコールターカウンタにて測定し、20-39 μm , 40-59 μm , 60-79 μm , 80-99 μm , 100-130 μm の直径毎の細胞数を比較した。酵素処理後の成熟脂肪細胞に対してセルストレナーを用いて 40 μm 未満の細胞分画 (small adipocytes; S-adipocytes) および 40-100 μm の細胞分画 (Large adipocytes; L-adipocytes) の 2 種類に分取し、Nile Red および Hoechst を用いて蛍光染色を行った。次に、S-adipocytes および L-adipocytes から DFAT 細胞を単離できるか検討を行うため、両細胞分画を 12.5 cm^2 のフラスコに 1.0×10^4 個ずつ播種し天井培養を行い、7 日後にフラスコを反転した。S-adipocytes から出現した DFAT 細胞を S-DFAT 細胞、L-adipocytes から出現した DFAT 細胞を L-DFAT 細胞とし、天井培養開始から 6, 10, 14, 18 日目の DFAT 細胞数をそれぞれ測定した。

次に、細胞表面抗原発現解析、遺伝子発現解析、細胞増殖能、コロニー形成能、細胞周期および多分化能を検討し、S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞の特性を比較した。

【結果】

頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞の直径は 40 μm 未満の細胞分画が他の直径の細胞分画に比較して 5 倍以上の細胞数を示した。S-adipocytes および L-adipocytes 共に Nile Red および Hoechst 陽性を示し、両細胞分画共に成熟脂肪細胞であることが確認された。フラスコ反転時には S-adipocytes および L-adipocytes 共にフラスコ底面に線維芽細胞様の DFAT 細胞がコロニーを形成が確認され、天井培養開始 6, 10, 14 日目における S-DFAT 細胞数は L-DFAT 細胞数よりも有意に多かった。このことから、S-adipocytes は L-adipocytes に比較して有意に早く DFAT 細胞へと脱分化することが示唆された。

細胞表面抗原発現解析の結果、間葉系幹細胞のマーカーである CD146 陽性細胞の割合は S-DFAT 細胞では L-DFAT 細胞に比較して約 2 倍多かった。遺伝子発現解析の結果、ES 細胞マーカーである c-MYC, KLF4, OCT3/4, および SOX2, また骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞の転写因子である RUNX2, PPAR γ 2, SOX9 の発現は両細胞間で同等であった。細胞増殖能、コロニー形成能および細胞周期についても両細胞間で有意な差は認めなかった。

多分化能については、in vitro における骨芽細胞への分化能をアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、石灰化 nodule のアリザリン赤染色および nodule 中の Ca 定量にて評価した。脂肪細胞への分化能はオイルレッド O 染色で脂肪滴をもつ細胞数により評価した。骨芽細胞への分化誘導実験において、分化誘導開始 3, 5 および 7 日目における ALP 活性は S-DFAT 細胞が L-DFAT 細胞に比較して有意に高く、さらに誘導開始 7 日目に S-DFAT 細胞の方が L-DFAT 細胞に比較してアリザリン赤染色に濃染した石灰化 nodule を顕著に認めた。また、石灰化 nodule 中の Ca 沈着量も誘導開始 7 日目および 21 日目において、S-DFAT 細胞では L-DFAT 細胞と比べて有意に高値を示した。脂肪細胞への分化誘導実験において、S-DFAT 細胞および L-DFAT 細胞共に誘導開始 7 日目から約 5%の細胞がオイルレッド O 陽性を示し、誘導開始 21 日目には約 65%の細胞が陽性を示した。両細胞間のオイルレッド O 陽性細胞の割合に有意な差は認めなかった³⁾。

【結語】

ヒト頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞には40 μ m未満の大きさの細胞集団が多く存在し、早くDFAT細胞へと脱分化することと、高い骨芽細胞分化能を有することから歯科口腔領域における骨組織や歯周組織の再生⁴⁾に有用であることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 2) Kajita K, Mori I, Hanamoto T, et al. Pioglitazone enhances small-sized adipocyte proliferation in subcutaneous adipose tissue. *Endocr J* 2012; **59**: 1107-14.
- 3) Tsurumachi N, Akita D, Kano K, et al. Small Buccal Fat Pad Cells Have High Osteogenic Differentiation Potential. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016; **22**: 250-9.
- 4) Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, et al. Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol* 2016; **7**: 50.

脱分化脂肪細胞形成及び骨芽細胞への再分化における

ビタミン D シグナルの影響

Vitamin D signaling in dedifferentiated fat cell formation and osteoblastic re-differentiation

石澤通康¹⁾, 風間智彦²⁾, 萩倉一博²⁾, 松本太郎²⁾, 槇島 誠¹⁾

Michiyasu ISHIZAWA¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Kazuhiro HAGIKURA²⁾ Taro MATSUMOTO²⁾, Makoto MAKISHIMA¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野, ²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

活性型ビタミン D₃ は、核内受容体であるビタミン D 受容体 (VDR) に作用することで、カルシウム代謝を調節するが、脂肪細胞の分化を含めた多彩な作用が報告されている。しかし、脱分化脂肪細胞 (DFAT) の形成過程や再分化における VDR シグナルの役割は明らかではないので、本研究で解析を実施した。天井培養によるマウス脂肪細胞の脱分化過程において、活性型ビタミン D₃ 添加は脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現低下を減弱させたが、Fibronectin (*Fn1*) 等細胞骨格に関与する遺伝子の発現増加を促進した。VDR 欠損マウス由来の脂肪細胞の脱分化過程において、脂肪細胞マーカー遺伝子の発現低下と *Fn1* 遺伝子の発現増加を認めた。よって、ビタミン D シグナルは脱分化に関連する遺伝子発現に部分的に影響を与えることが明らかになった。一方、ヒト DFAT の骨芽細胞への再分化誘導実験において、活性型ビタミン D₃ 及び合成ビタミン D 誘導体は骨分化誘導を促進した。DFAT を局所に投与するタイプの骨損傷治療戦略において、ビタミン D 誘導体と併用することで治療効果の増強が期待できる。

【背景および目的】

活性型ビタミン D₃ は、核内受容体であるビタミン D 受容体 (Vitamin D receptor ; VDR) に作用することで、カルシウム代謝の調節を行う。また、活性型ビタミン D₃ やその誘導体には、骨芽細胞や破骨細胞を介する骨の恒常性維持、自然免疫の増強、自己免疫疾患や心血管病の改善効果、白血病細胞や大腸癌などの抗腫瘍作用が報告されている¹⁾。また、活性型ビタミン D₃ が前駆脂肪細胞の分化を促進すること²⁾、VDR 欠損マウスでは脂肪蓄積が少ないこと³⁾、脂肪組織特異的 VDR 強発現トランスジェニックマウスでは肥満になりやすいといった特徴が報告され⁴⁾、ビタミン D-VDR シグナルの脂肪分化促進作用が示されている。しかし、脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells; DFAT cells) の形成過程や再分化におけるビタミン D-VDR シグナルの影響はまだ明らかになっていない。

本研究では成熟脂肪細胞の脱分化過程及び DFAT の骨芽細胞への再分化におけるビタミン D シグナルの影響を検討した。

【方法】

実験①: 8 週齢から 10 週齢の C57BL6/J 系統 *Vdr*(+/+) (野生型) 又は *Vdr*(-/-) (VDR 欠損) オスマウス皮下脂肪組織より成熟脂肪細胞を単離後、全自動セルカウンターにてトリパンブルー

染色及び細胞数の測定を行い、生細胞 8,000 個/cm² を 25 cm² フラスコに播種した。天井培養に用いる細胞培養液中又は天井培養から 1 週間後の転地する際に用いる交換用培地中に 100 nM になるように活性型ビタミン D₃、或いは新規ビタミンD誘導体を混和し、それぞれ 1 週間後に細胞を回収して遺伝子発現解析を行った。

実験②: ヒト DFAT は 25,000 個/cm² にて細胞を 12 well plate 又は 24 well plate に播種し、StemMACS™ OsteoDiff Media (Miltenyi Biotec 社製) 又は分化誘導混合培地(100 nM dexamethasone, 50 μM L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate)にて骨芽細胞分化を誘導した⁵⁾。培地は 3 日ごとに交換し、7 日目にアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性染色又は RNA 抽出を行い、骨芽細胞マーカー分子の遺伝子発現解析を行った。

【結果】

実験①: 天井培養 1 週間後の成熟脂肪細胞において、脂肪細胞のマーカー分子である peroxisome proliferator activated receptor γ2 (*Pparg2*)、CCAAT-enhancer-binding protein α (*Cebpa*)、*Cebpb* の mRNA レベルが減少した。活性型ビタミン D₃ 添加培地ではこれら脂肪細胞マーカー分子の発現減少が軽減された。VDR 欠損マウスにおいても、天井培養 1 週間後で、野生型マウスと同様に脂肪分化マーカーの発現レベルが減少したが、脂肪分化マーカーの発現レベルは野生型よりも低かった。ブタの成熟脂肪細胞の脱分化過程で発現増加する Fibronectin 1 (*Fn1*) やその受容体である Integrin α5 (*Itga5*) は⁶⁾、マウス成熟脂肪細胞の脱分化過程でも発現増加するが、活性型ビタミン D₃ 添加により、更に発現が増加した。組織選択的 VDR 活性化能を有する新規ビタミン D 誘導体 ADRO1⁷⁾ と、ビタミン D 代謝酵素による影響を受けにくい安定型ビタミン D 誘導体 O2C3⁸⁾ は、いずれも活性型ビタミン D₃ と同程度に *Fn1* mRNA 誘導を促進した。VDR 欠損マウスの成熟脂肪細胞では、天井培養による *Fn1* mRNA 発現増加は認められたが、活性型ビタミン D₃ による発現増強は認められなかった。野生型マウスと VDR 欠損マウスより得られた DFAT を継代培養した際、各継代時に得られる細胞数の総数(accumulating cell number)に相違は認められなかった。

実験②: ヒト DFAT における骨分化誘導刺激を行う際、活性型ビタミン D₃ 或いは組織選択的ビタミン D 誘導体、代謝抵抗性誘導体、これらの類縁体を同時添加したところ、分化誘導から 7 日目に、骨芽細胞の分化マーカーである ALP 活性は増強された。更に、分化誘導 7 日目における Osteopontin (*Spp1*) mRNA 及び Osteocalcin (*Bglap*) mRNA の発現増加もこれら VDR アゴニストによって発現が増強した。

【考察】

実験①: マウス成熟脂肪細胞の脱分化過程において、活性型ビタミン D₃ は成熟脂肪細胞のマーカー遺伝子 *Pparg2*, *Cebpa* 及び *Cebpb* の発現低下を減弱し、脱分化関連遺伝子 *Fn1* 及び *Itga5* の発現は増強した。VDR 欠損マウスでは、成熟脂肪細胞のマーカー分子の発現低下、*Fn1* の発現増加が認められることから、VDR 欠損において脱分化が促進することが示唆される。VDR シグナルは、脂肪細胞分化の促進というこれまでの報告から考えると、脱分化に対しては抑制的に働くことが考えられ、*Pparg2*, *Cebpa* 及び *Cebpb* の発現変化は合致する。一方、*Fn1* と *Itga5* は VDR 標的遺伝子であるため^{9), 10)}、VDR シグナルと脱分化に伴う別の因子の両方の影響を受けることが考えられる。VDR 欠損マウスの脂肪細胞でも、DFAT 形成は可能であり、得られた DFAT 細胞数は野生型と差が見られなかった。遺伝子の変化は見られるが、VDR シグナルの DFAT 化における影響は限定的なものであろう。

実験②: 活性型ビタミン D₃ は骨芽細胞への分化を誘導することが他の幹細胞において報告されている¹¹⁾。本研究によって、ヒト DFAT を用いた骨分化誘導実験でも同様の結果を得た。また、組織選択的 VDR アゴニストや代謝抵抗性 VDR アゴニストでも同様の結果を得た。ビタミン D 製剤の過剰投与は高カルシウム血症を呈するため、臨床的な利用は骨粗しょう症と皮膚病乾癬に

限定されている。DFAT の局所投与治療法が現在臨床応用に向けて開発中であるが、組織選択的 VDR 活性化能を有する ADRO1 や代謝抵抗性を示す O2C3 を低容量用いることで、骨損傷に対する DFAT の骨再生治療効果(歯周組織再生能など¹²⁾)の増強が期待できる。

【結語】

- ① ビタミン D シグナルは、脱分化に関連する遺伝子変化を誘導する。
- ② 活性型ビタミン D₃ 及びビタミン D 誘導体は DFAT の骨芽細胞への再分化能を促進する。

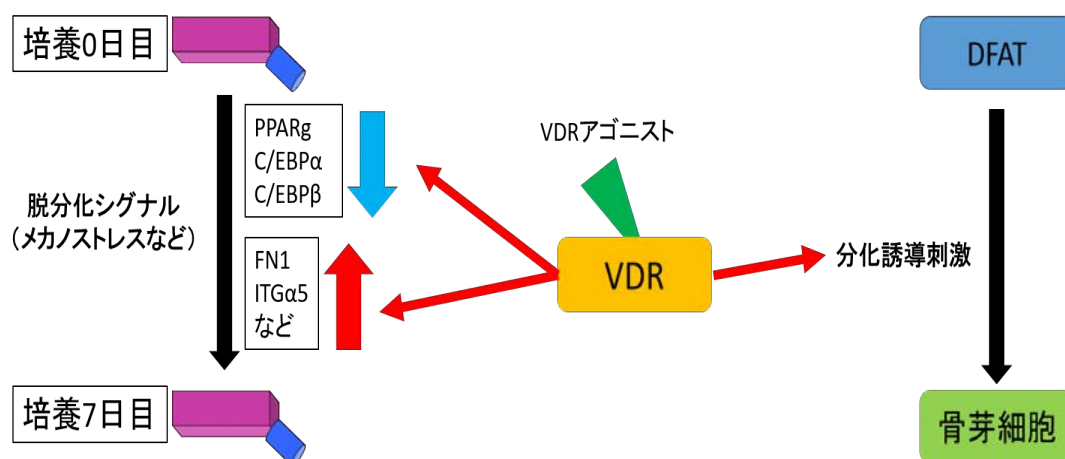


図1. 結果のまとめ

【参考文献】

- 1) Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, Murad MH, Kovacs CS. The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2012; **33**(3):456-92
- 2) Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ. 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One.* 2012; **7**(12):e52171.
- 3) Wong KE, Szeto FL, Zhang W, Ye H, Kong J, Zhang Z, Sun XJ, Li YC. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; **296**(4):E820-8.
- 4) Wong KE, Kong J, Zhang W, Szeto FL, Ye H, Deb DK, Brady MJ, Li YC. Targeted expression of human vitamin D receptor in adipocytes decreases energy expenditure and induces obesity in mice. *J Biol Chem.* 2011; **286**(39):33804-10
- 5) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008; **215**(1):210-22.
- 6) Ono H, Oki Y, Bono H, Kano K. Gene expression profiling in multipotent DFAT cells derived from mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; **407**(3):562-7.
- 7) Otero R, Ishizawa M, Numoto N, Ikura T, Ito N, Tokiwa H, Mouriño A, Makishima M, Yamada S. 25 S- Adamantyl- 23- yne- 26,27- dinor- 1 α ,25- dihydroxyvitamin D₃: Synthesis, Tissue Selective Biological Activities, and X-ray Crystal Structural Analysis of Its Vitamin D Receptor

Complex. *J Med Chem.* 2018; **61(15)**:6658-6673.

- 8) Yasuda K, Ikushiro S, Kamakura M, Takano M, Saito N, Kittaka A, Chen TC, Ohta M, Sakaki T. Human cytochrome P450-dependent differential metabolism among three 2 α -substituted-1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013; **133**:84-92.
- 9) Polly P, Carlberg C, Eisman JA, Morrison NA. Identification of a vitamin D3 response element in the fibronectin gene that is bound by a vitamin D3 receptor homodimer. *J Cell Biochem.* 1996; **60(3)**:322-33.
- 10) Medhora MM, Teitelbaum S, Chappel J, Alvarez J, Mimura H, Ross FP, Hruska K. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 up-regulates expression of the osteoclast integrin alpha v beta 3. *J Biol Chem.* 1993; **268(2)**:1456-61.
- 11) Kato H, Ochiai-Shino H, Onodera S, Saito A, Shibahara T, Azuma T. Promoting effect of 1,25(OH)₂ vitamin D3 in osteogenic differentiation from induced pluripotent stem cells to osteocyte-like cells. *Open Biol.* 2015; **5(2)**:140201.
- 12) 秋田大輔, 伊藤智加, 月村直樹, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞の臨床応用化に向けた取り組み. *日歯医師会誌.* 2019; **71(10)**: 829-839

脱分化脂肪細胞による移植治療のための細胞キャリアの開発

Development of cell carrier for cell therapy
using dedifferentiated fat cells

野呂知加子^{1, 2, 4)}, 三浦大輝²⁾, 清水颯太²⁾, 秋田大輔³⁾, 風間智彦⁴⁾, 萩倉一博⁴⁾, 松本太郎⁴⁾

Chikako YOSHIDA-NORO^{1) 2) 4)}, Daiki MIURA²⁾, Souta SHIMIZU²⁾, Daisuke AKITA³⁾, Tomohiko KAZAMA⁴⁾, Kazuhiro HAGIKURA⁴⁾, Taro MATSUMOTO⁴⁾

¹⁾日本大学生産工学部応用分子化学科, ²⁾日本大学大学院生産工学研究科応用分子化学専攻, ³⁾日本大学歯学部歯学部歯科補綴学, ⁴⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

脱分化脂肪細胞 DFAT (dedifferentiated fat) は、間葉系幹細胞(MSC)特有の高い増殖能、多分化性および増殖因子等サイトカインの分泌活性が備わっている均一性の高い幹細胞集団である。閉塞性下肢虚血症モデルにおいて、DFAT 細胞移植は、サイトカイン分泌により患部の血管新生を促し、有効な治療となることが示唆されている。従来、細胞懸濁液を注射器で局所に複数回打つ方法がとられているが、この方法では移植後の細胞の挙動が不明のため、何らかのキャリアに細胞を結合させて移植し、局所に導入細胞を一定期間留め、サイトカインを産生させる方法がより効率的と考えられる。そこで、我々は細胞移植治療のための細胞キャリアの検討と評価を行っている。

本研究では、DFAT 細胞を生体適合性および生分解性のある素材に接着・増殖させ、損傷局所に移植して、一定期間サイトカイン産生させる方法について検討を行った。2 種類の細胞キャリア上で培養した DFAT 細胞について、細胞接着度、細胞増殖度、細胞死について検討し、サイトカイン産生など、細胞特性について解析した。

【背景および目的】

動脈硬化や糖尿病などの合併症として起こる閉塞性下肢虚血症において、幹細胞移植による血管新生誘導は有効な治療となる。体性幹細胞のひとつである間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell :MSC)は、自身が骨、軟骨、平滑筋、脂肪等に分化するだけでなく、組織の再生力を高める効果をもつサイトカインを分泌することから、細胞再生移植治療の材料として注目されている。現在多くの臨床試験等で行われている方法は、MSC を静脈注射し、その細胞の多くは肺に集まってサイトカイン等を分泌するので、全身の再生能力が高まるという方法である。しかし、移植後の細胞の挙動は不明で、体内のどこに分布し、どの程度の期間サイトカインを分泌し続けるかについて追跡が困難である。また、細胞数を多く注射すると、肺塞栓になる副作用が報告されている。従って、MSC を再生が必要な損傷部位付近に導入し、局所に留めた方が、効果的な治療が期待できる。

MSC は骨髄由来の細胞が多く使われているが、ドナーへの侵襲性が高いため、他の細胞源として、脂肪組織由来幹細胞 (Adipose tissue-derived Stem Cells:ASC) がよく用いられている。ASC は脂肪組織をプロテアーゼ等で解離し、遠心分離して得られた沈殿細胞由来の培養細胞であり、血管細胞等他の細胞種が混在している可能性がある。これに対して、脱分化脂肪細胞

DFAT (dedifferentiated fat) 細胞¹⁾は、脂肪量が多いため遠心分離で上に浮いてくる成熟脂肪細胞を脱分化させて得られる幹細胞であり、細胞の均一性が高い。ドナーの年齢性別にかかわらず樹立可能であり、増殖性が高いところから多くの細胞が得られ、移植細胞源として適している。培養下では脂肪、軟骨、骨、血管、平滑筋、肝臓、神経等、様々な組織に分化することが確認されている。さらに、MSCと同様のサイトカイン放出・免疫抑制・組織分化能等の性質を持つことが、これまでの研究より判明している。マウスの下肢虚血モデルに DFAT 細胞を移植する(局所への細胞懸濁液の複数回の注射)と、血流改善が起こることが確かめられている。移植細胞の一部は血管新生に参加するが、ほとんどの効果は DFAT 細胞の産生するサイトカインによるレシピエントの血管再生によるものと考えられた。

本研究では、DFAT 細胞を再生が必要な損傷部位付近に導入して局所に留めるための細胞保持担体(マイクロキャリア)について検討した。2種類の細胞キャリア上で培養した DFAT 細胞について、キャリア表面上細胞の増殖・生存状態およびサイトカイン産生能等の細胞特性を解析、評価することにより、キャリア移植法を確立することを目的とする。

【方法】

本研究では、2種類の細胞キャリアについて検討を行った。

1) デキストランビーズ

幹細胞移植治療を想定したマイクロキャリアとして、Cytodex 1、Cytodex 3(GE Healthcare 社製)の2種を用いた(図1)。Cytodex は 100~300 μm の球形状の架橋デキストランビーズである。Cytodex 1 は、表面に N-N-diethyl amino ethyl group の試薬がコーティングされ、軽度の正電荷を帯びている。また、Cytodex 3 は、Cytodex 1 の表面にコラーゲンがコーティングされている。いずれも粉末形状であり、使用時に生理食塩水で膨潤させて用いる。細胞懸濁液 1-4x10⁵を /2ml を Cytodex 0.002-0.01g/2ml と共に培養すると、キャリアに細胞が接着し増殖する。20~60rpm の攪拌下、インキュベータ内(37°C、CO₂ 濃度5%)で7日間培養(DMEM+10%牛血清FBS+1%PS)し、Cytodex 1 および Cytodex 3 の細胞保持能力(核染色 Hoechst33342)、細胞の増殖活性(Ki67)、アポトーシスの有無(Tunel 法)について検討した。また、Cytodex 上の細胞のサイトカイン遺伝子発現について解析した。2時間、1日、2日、4日間培養したキャリア接着培養細胞をキャリアごと回収し、RNA を抽出した。この RNA を鋳型に cDNA を合成し、qPCR にて5種類の血管新生因子の(HGF, VEGF, PDGF-B, TGF-β, hbFGF) 遺伝子発現を測定した。DFAT は主としてヒト DFAT を用いた。

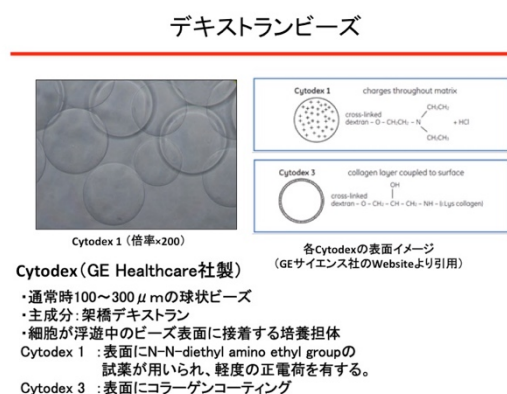


図 1. デキストランビーズ

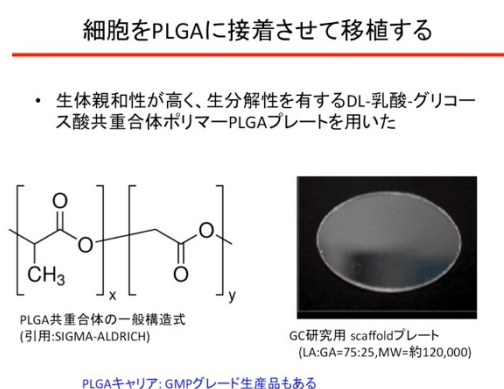


図 2. PLGA

2) PLGA (DL-乳酸 -グリコール酸共重合体)

生体適合性と生分解性があり、GMP グレードで製造されている PLGA (DL-乳酸-グリコール酸共重合体) (GC 研究用 scaffold プレート, LA:GA=75:25, MW=約 120,000 直径 5mm の透

明プレート)について細胞キャリアとしての適性を検討した(図2)。まず、培養皿(直径 3 cm)にオートクレーブ滅菌済ろ紙を敷き、その上に PLGA プレート (ほぼ透明) を置いて、70 %エタノールと滅菌水、培地の順に親水処理をした。次に PLGA プレート上に DFAT 細胞懸濁液を滴下し、数分放置して浸透させた。細胞を播種したプレートを別の培養皿に移して、7 日間培養(DMEM 培養液+10%FCS)を行い、細胞親和性や増殖性について検討した。さらに、PLGA プレート表面にゼラチンやポリ L リジン(PLL)等でコーティングをすることにより、DFAT の接着性・増殖性やサイトカイン産生能がどのように変化するかについて検討を行った。細胞接着性・増殖度は、位相差顕微鏡下および蛍光核染色色素 (NucBlue® Live Ready Probes® Reagent, Thermo Fisher) で処理した蛍光顕微鏡画像から細胞数をカウントして判定した。また、対象としたサイトカイン遺伝子は Vegfa, Vegfb, Hgf, Pdgfa, Tgfa 等であり、培養 3 日の細胞から RNA を抽出し、qPCR により遺伝子発現を判定した。DFAT はマウス DFAT-D1 を用いた。

【結果】

1) デキストランビーズ

ヒト DFAT を、Cytodex 1 と Cytodex 3 それぞれとに混合培養を行ったところ、どちらのキャリアにも細胞が接着し、増殖した。細胞を 7 日間培養し、3 種類の方法で染色(アポトーシス染色、Ki67 増殖指標免疫染色、核染色)した。まず、3 日目の細胞を核染色し、生細胞の確認をしたところ(図 1)、どちらのキャリアにおいても細胞の生存が確認された。培養 5 日目、7 日目の細胞も同様に核染色、更にアポトーシス染色、および増殖状態を確認するために Ki67 抗体を用いた染色を行った(図 2)。5 日目と 7 日目のどちらのキャリアにも生細胞が存在しており、ヒト DFAT 細胞は 7 日間 Cytodex 1 と Cytodex 3 で接着・増殖することがわかった。しかし、キャリア培養 7 日目の染色結果を詳細に検討したところ、生細胞の減少がみられた。ただ、アポトーシス染色の陽性がみられていないため、細胞は死滅したのではなく、キャリア培養 5 日目から 7 日目にかけてキャリアを離脱したと考えられた。また、Ki67 抗体を利用した増殖細胞の免疫染色の結果においても陽性が確認されたが、培養日数が進むにつれて陽性細胞は減少した。

一方、7 日目のキャリア表面の生細胞の数を比べたところ、Cytodex 3 の方が Cytodex 1 よりも、多く細胞を保持していた。この結果から、コーラゲンコートした Cytodex3 方がより細胞保持能力が高いことがわかった。

以上の結果から、Cytodex に DFAT 細胞が接着・増殖することが明らかとなり、また、細胞が十分に接着した期間が 5 日ということがわかった。そこで、それぞれのキャリアで 2 時間、1 日、2 日、4 日間培養した細胞が、血管新生因子の産生を行っているのかについて、RNA 抽出と qPCR から測定した。その結果 4 種類(VEGF、HGF、hbFGF、TGF-β)の遺伝子発現が認められた(図 5)が、PDGF-B は本実験における培養環境と PCR のサイクル数では観測されなかった。

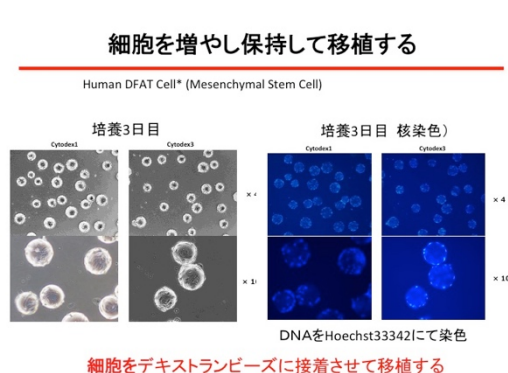


図 3 ビーズ上の細胞増殖

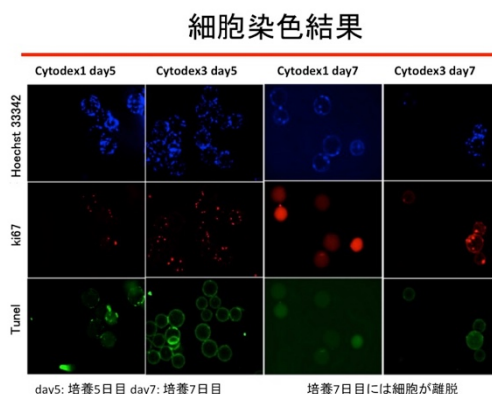


図 4 細胞染色結果

遺伝子発現解析

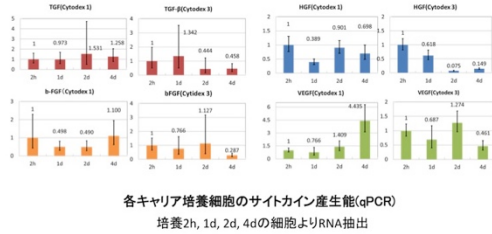


図 5 遺伝子発現解析結果

Cytodex1上に培養したDFATの コラーゲンゲル内挙動

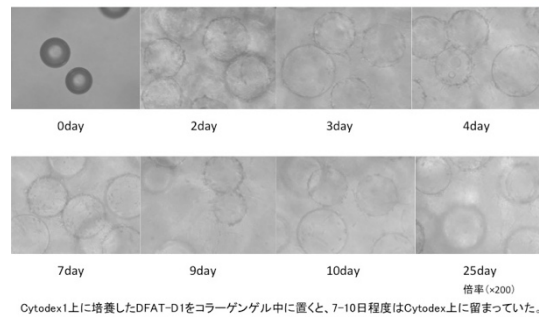


図 6 ビーズをコラーゲンゲルに移植

一方、生体への移植のモデルとして、十分に DFAT 細胞が接着した状態の Cytodex1 を、コラーゲンゲル内に埋め込んだ実験では (図 6)、細胞は 7-10 日程度 Cytodex 上に保持されていたが、その後は脱出してコラーゲンゲル内に遊走、散逸した。従ってこの方法では、生体内でビーズ上に細胞を保持できる時間は、10 日程度と考えられた。

2) PLGA (DL-乳酸 -グリコール酸共重合体)

PLGA プレート上に培養した DFAT 細胞を蛍光核染色色素 (NucRed® Live 647 ReadyProbes® Reagent, ThermoFisher) で処理し、蛍光顕微鏡 (キーエンス社 BZ-X700 オールインワン蛍光顕微鏡) 画像からセルカウントをしたところ (図7)、培養日数増加により細胞数が増加した (図8)。細胞接着性は、ゼラチンやPLLでコーティングを行った方がコーティング無よりも向上していた (図9)。細胞増殖度に関しても、同じくゼラチンやPLLでコーティング処理すると上昇することが分かった。サイトカイン産生に関しては、培養 3 日目の細胞から RNA を抽出して、qPCR を行った結果 (図 10)、Vegfa 及び Vegfb はゼラチンおよび PLL コーティングのどちらについても、コーティング無よりも高い発現が得られた。特にゼラチンコーティングについては両遺伝子の発現量が他より顕著であり、Hgf についてもゼラチンコートが優位であった。一方、Tgfa については PLL の方がゼラチンコートよりも有意に高い発現量を示した。

PLGAプレート上での培養結果

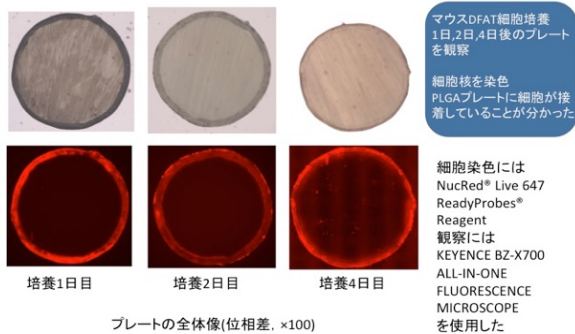


図 7. PLGA プレート上での培養

PLGAプレート上での細胞増殖

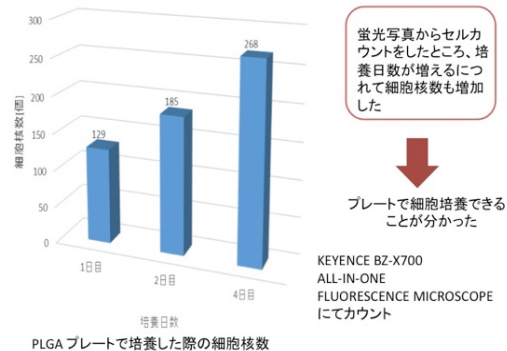


図 8. PLGA プレート上での細胞増殖

コーティングの効果

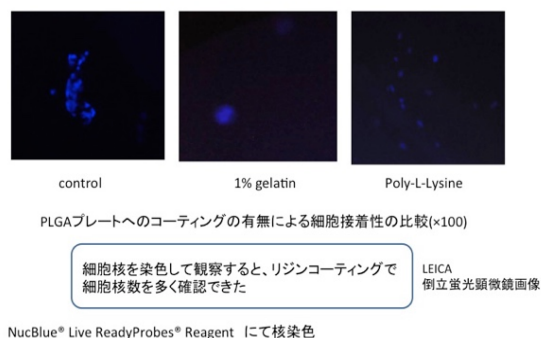


図 9. コーティングの効果(増殖)

コーティングの効果

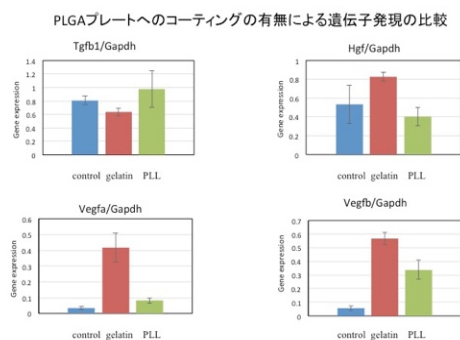


図 10. コーティングの効果(遺伝子発現)

以上の結果より、総合的には PLL よりもゼラチンの方がコーティング材として優れていることが示唆された。

【考察】

上記の結果から、ヒト DFAT 細胞は Cytodex 1 と Cytodex 3 上に 7 日間、接着/増殖することがわかった。7 日目になると脱落する細胞もあることから、初期に導入する細胞数にも依存するが、Cytodex 表面の培養は 5 日程度が至適であることが示唆された。コラーゲンコート処理の Cytodex 3 の方が Cytodex 1 よりも、多く細胞を保持していた。また、大量培養などに Cytodex を利用した文献においても、Cytodex 3 を利用した論文が多く、細胞保持を目的とした場合、Cytodex 3 の方が優れていると考えられた。

血管新生因子の産生については、qPCR の結果、VEGF, HGF, bFGF, TGF- β の遺伝子発現が認められた(図 5)が、PDGF-B の発現は観測されなかった。この結果は、通常培養時における Hunam-DFAT の結果と同様の傾向であった。移植下組織中など低酸素下では、これらのサイトカインの産生が増強することが知られているので、低酸素培養下の検討がさらに必要である。

生体移植のモデルとして、十分に DFAT 細胞が接着した状態の Cytodex1 を、コラーゲンゲル内に埋め込んだ実験から、生体内でビーズ上に DFAT 細胞を保持できる時間は、10 日程度と考えられた。別の実験でウシ血管内皮細胞を同様に Cytodex 上で培養し、Cytodex をコラーゲンゲル内包埋した場合は、細胞は Cytodex 上に留まり、コラーゲンゲル内へ移動しなかったところから、間葉系幹細胞はコラーゲンゲルに親和性が高いと考えられた。

先行研究によれば 移植のための大量の細胞を得るために、Cytodex による MSC 増幅は多く行われている²⁾³⁾。デキストラン自体は生体適合性であるが、残念ながら Cytodex 製造業者は、今のところこれをヒトへの移植に適合する基準 (GMP grade) で作成する予定がないということである。

そこで次に、すでに GMP grade で製造している例がある細胞キャリアについて検討を行った。ゼラチンベースの MedGel、アルギン酸ナトリウム、ポリ乳酸 Poly (D,L-lactide-co-glycolide; PLGA)) などである。このうち PLGA について、詳細な実験を行った。

PLGA プレート上に培養した DFAT を核染色し、画像からセルカウントをしたところ、培養日数が増えるにつれて細胞核数も増加した。また、プレートをゼラチンやポリリジンでコーティング処理により細胞が接着しやすくなることが分かった。さらに、培養後のプレートから RNA を抽出し、RT-PCR により細胞分化や増殖因子の遺伝子発現について検討した。Vegfa 及び Vegfb はコーティング無よりも有の方が高い発現が得られた。特にゼラチンコーティングが優位であった。

用いた GC 社の PLGA は GMP grade 製造ではないが、別の Evonik Röhm GmbH (Sigma-Aldrich) 社の製品には GMP grade 製造のものがあるので、こちらの方も検討を行う予定である。

さらに、プレートという平板ではなく、3D の PLGA 足場を準備中であり、3D プリンターによる成型、金型を用いた成型について、検討中である。また、Cytodex1 と同様に生体移植モデル実験(コラーゲンゲル内への移植)も検討している。

【結語】

ヒト DFAT は Cytodex 表面で培養が可能なが示された。細胞は 5 日間キャリア表面上で増殖したが、播種細胞数にもよるが、7 日目には細胞の離脱と細胞死が観察された。

サイトカイン産生について、VEGF、HGF、hbFGF、TGF- β の4つの血管新生関連因子の遺伝子発現がみとめられた。血管を誘発する VEGF の産生は培養日数(4 日目まで)に伴い、増加傾向がみられた。長期培養下、および組織内を想定した低酸素下における産生について検討する必要がある。

Cytodex1 上に培養した DFAT をコラーゲンゲル内包埋すると、DFAT のゲル内への遊走が観察されたが、包埋後 10 日程度までは細胞が Cytodex 上に残っていた。

以上の結果から、DFAT を Cytodex 上で増殖させ、細胞数を確保した上で、Cytodex ごと体内局所に移植すれば、細胞懸濁液をそのまま注射するよりも、局所に長い時間留まり、サイトカインを産生する可能性が高いと考えられた。

一方、PLGA に関しては、マウス DFAT は PLGA プレートに接着し、培養日数が増えるにつれて細胞核数も増加した。また、プレートをゼラチンやポリリジンでコーティング処理により細胞が接着しやすくなることが分かった。さらに、培養 3 日後の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により細胞分化や増殖因子の遺伝子発現について検討した。Vegfa 及び Vegfb はコーティング無よりも有の方が高い発現が得られた。特にゼラチンコーティングが優位であった。

【参考文献】

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, *et al.* Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 2) Schop D *et al.* Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Mar-Apr;2(2-3):126-35. doi: 10.1002/term.73
- 3) Panchalingam KM *et al.* Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Mar-Apr;2(2-3):126-35. doi: 10.1002/term.73.
- 4) Lee YS *et al.* Development of porous PLGA/PEI_{1.8k} biodegradable microspheres for the delivery of Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *J Control Release.* 2015 May 10; 205: 128–133
- 5) Akita D *et al.* Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol.* 2016; 7:50. Published online 2016 Feb 23. doi: 10.3389/fphys.2016.00050

マウス皮膚欠損治癒過程における成熟脂肪細胞の形質転換

Transformation of mature adipocytes during the healing process in a mouse skin full-thickness defect model

石川三友紀, 萩倉一博, 風間智彦, 李予昕, 松本太郎
Miyuki ISHIKAWA, Kazuhiro HAGIKURA, Tomohiko KAZAMA, Yuxin LI,
Taro MATSUMOTO

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

遺伝子改変技術の進歩により、生体内で特定の細胞の運命追跡が可能となった。その結果、マウスなどのほ乳類においても組織障害後の組織再生過程で成熟細胞の脱分化現象が起こることが明らかとなり、生体内の一部の成熟細胞が脱分化し組織再生に関わることが示されている。一方、成熟脂肪細胞が組織再生に関与しているかは明らかになっていない。本研究では、成熟脂肪細胞の運命追跡が可能で遺伝子改変マウスを用いて全層皮膚欠損モデルマウスを作製し、治癒過程における成熟脂肪細胞の関与及び形質転換の可能性を検討した。その結果、傷害部位に成熟脂肪細胞由来の線維芽細胞様形態を示すfibroblast-like cell(FLC)の出現を認め、その一部の細胞は前駆脂肪細胞マーカーや間葉系幹細胞(MSC)マーカー、ペリサイトマーカー陽性であることから、皮膚欠損後の治癒過程で成熟脂肪細胞に由来する線維芽細胞様細胞が出現し、その一部は肉芽組織内でMSC、前駆脂肪細胞、ペリサイトなどの形質を獲得していることが示唆された。

【背景および目的】

近年、Genetic- lineage tracingにより、生体内で特定の細胞の運命追跡が可能となった。その結果、マウスなどのほ乳類においても組織障害後の組織再生過程で成熟細胞の脱分化現象が起こることが明らかとなり、生体内の一部の成熟細胞が脱分化し組織再生に関わることが示されている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾(表 1)。一方、成熟脂肪細胞が組織再生に関与しているかは明らかになっていない。そこで今回、成熟脂肪細胞の運命追跡が可能で遺伝子改変マウスに皮膚全層欠損を作製し、治癒過程における成熟脂肪細胞の形質変換および組織再生への関与を検討した。生体内における成熟脂肪からの脱分化が証明されることで、組織修復に成熟脂肪細胞の関与が明らかとなれば、組織修復に対する脂肪細胞の有用性を見出すことが可能となる。

表 1. 哺乳類における脱分化メカニズムによる組織再生の報告

生物名	組織傷害	脱分化する成熟細胞	分化転換する細胞	文献
マウス	尿管急性虚血再灌流	尿管上皮細胞	尿管上皮細胞	Humphreys BD et al. Cell Stem Cell 2:284, 2008
ラット	膵部分切除	膵管上皮細胞	膵管上皮、インスリン産生細胞	Li WC et al. J Cell Sci 123:2792, 2010
マウス	肺傷害(インフルエンザウイルス)	クララ細胞	I型・II型肺胞上皮細胞	Kumar PA et al. Cell 147: 525, 2011
マウス	気道傷害 (SO ₂ , インフルエンザウイルス)	気道分泌細胞	基底細胞、分泌細胞、繊毛細胞	Tata PR et al. Nature 503:218, 2013
マウス	心筋梗塞	心筋細胞	心筋細胞	Senyo SE et al. Nature 493:433, 2013

【方法】

tamoxifen 投与により成熟脂肪細胞特異的に cre リコンビナーゼを発現するマウス (Adiponectin-Cre-ERT2 マウス)と、cre 存在下に tdTomato を発現するマウス(ROSA26-LSL-td Tomato マウス)を交配し、脂肪細胞の運命追跡を可能とするレポーターマウス(Adipoq-CreERT2/tdT マウス)を作製した。このマウスに tamoxifen 1mg を 5 日間腹腔内投与後⁶⁾、背部に 1cm×1cm の皮膚全層欠損創を作製した。創部保護のため、ハイドロコロイドドレッシング剤で創部を被蓋した。欠損作製時、欠損作製後 1 週間、2 週間、3 週間のタイムポイントで欠損部の組織標本作製し、tdTomato の発現を組織学的に評価した(図 1)。形質転換の指標として tdTomato 陽性で成熟脂肪細胞マーカーperilipin 陰性を示す細胞の同定と定量を行った。また、Ki-67(増殖細胞マーカー)、CD31(血管内皮細胞マーカー)、ASMA(平滑筋・筋線維芽細胞マーカー)、DLK1(脂肪前駆細胞マーカー)、Sca-1(間葉系幹細胞マーカー)、PDGFRα(間葉系幹細胞マーカー)、NG2(ペリサイトマーカー) の抗体を用いて tdTomato 陽性細胞の増殖性や細胞形質を評価した。

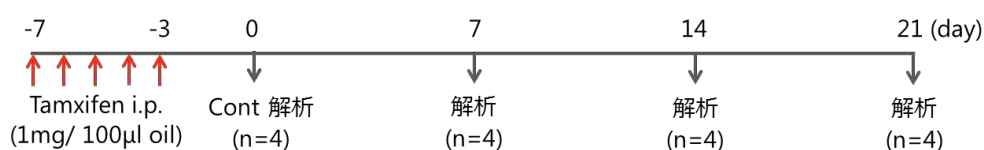


図 1. 実験プロトコール

【結果】

tdTomatoの蛍光はtamoxifen投与後のマウスの腸間膜や結合組織中の脂肪組織にのみ認められ、肝臓、腎臓、肺といった実質臓器はすべてtdTomato陰性であった。皮下組織にはtdTomato陽性を示す2層の脂肪組織が存在し、これらはPerilipinの局在と完全にマージすることから、tdTomatoが脂肪細胞のみに発現していることが確認できた。また、脂肪組織中の微小血管や間質細胞はtdTomato陰性であり、脂肪滴をもつ成熟脂肪細胞のみがtdTomatoを発現していることを確認した。皮膚欠損作製後1週間で、欠損部の脂肪組織周囲に成熟脂肪細胞マーカーperilipin陰性で線維芽細胞様形態を示すtdTomato陽性 fibroblast-like cell(FLC)の出現を認め、皮膚欠損作製後2週間でピークに肉芽組織内でも確認された。欠損部中のtdTomato陽性FLCの細胞数をカウントしたところ皮膚欠損作製後1週間、2週間で急激に増加した後、皮膚欠損作製後3週間で減少していくことが明らかとなった。tdTomato陽性FLCの一部は脂肪前駆細胞

胞マーカーDLK1や間葉系幹細胞マーカーSca-1及びPDGFR α 、ペリサイトマーカーNG2、細胞増殖マーカーKi-67を発現していた。一方、血管内皮マーカーCD31や筋線維芽細胞マーカーASMAを発現している細胞は確認できなかった。

【考察】

本研究では、マウスにおける皮膚全層欠損作製により、欠損部の肉芽組織に成熟脂肪細胞由来の tdTomato 陽性 FLC の出現を確認した。欠損部中の tdTomato 陽性 FLC の細胞数をカウントしたところ、皮膚欠損作製後 1 週間、2 週間で急激に増加した後、皮膚欠損作製後 3 週間で減少していくことから、tdTomato 陽性 FLC は組織障害により出現し組織の修復に伴って減少していくことが示された。tdTomato 陽性 FLC の一部は DLK1、Sca-1 及び PDGFR α 、NG2 を発現していたことから MSC、前駆脂肪細胞、ペリサイトへの形質転換の可能性が示された⁷⁾。しかし、Marangoni らによる報告⁸⁾とは異なり、平滑筋や血管への分化は確認できず組織修復への直接的な関与は確認できなかった。今後、肉芽組織がより発達するスプリントを使用した創傷治癒遅延のモデル⁹⁾等を作製し、tdTomato 陽性 FLC の形質や役割を詳細に検証することが望まれる。

【結語】

皮膚欠損後の治癒過程で成熟脂肪細胞に由来する線維芽細胞様細胞が出現し、その一部は肉芽組織内でMSC、前駆脂肪細胞、ペリサイトなどの形質を獲得していることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell*. 2008 Mar 6;2(3):284-91.
- 2) Li WC, Rukstalis JM, Nishimura W, et al. Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. *J Cell Sci*. 2010 Aug 15;123(Pt 16):2792-802.
- 3) Kumar PA, Hu Y, Yamamoto Y, et al. Distal airway stem cells yield alveoli in vitro and during lung regeneration following H1N1 influenza infection. *Cell*. 2011 Oct 28;147(3):525-38.
- 4) Tata PR1, Mou H, Pardo-Saganta A, et al. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*. 2013 Nov 14;503(7475):218-23.
- 5) Senyo SE1, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013 Jan 17; 493 (7432):433-6.
- 6) Sassmann A1, Offermanns S, Wettschureck N. Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis*. 2010 Oct 1;48(10):618-25.
- 7) Di Carlo SE, Peduto L. The perivascular origin of pathological fibroblasts. *J Clin Invest*. 2018 Jan 2;128(1):54-63.
- 8) Marangoni RG, Korman BD, Wei J, et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Apr;67(4):1062-73.
- 9) Jimi S, De Francesco F, Ferraro GA, et al. A Novel Skin Splint for Accurately Mapping Dermal Remodeling and Epithelialization During Wound Healing. *J Cell Physiol*. 2017 Jun;232(6):1225-1232.

吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析

Preparation method and functional analysis of dedifferentiated fat cell using
liposuctioned fat tissue

風間智彦¹⁾, 山元智衣¹⁾, 長岡悠紀¹⁾, 萩倉一博¹⁾, 加野浩一郎²⁾, 相川佳之³⁾, 松本太郎¹⁾
Tomohiko KAZAMA¹⁾, Chii YAMAMOTO¹⁾, Yuki NAGAOKA¹⁾,
Kazuhiro HAGIKURA¹⁾, Koichiro KANO²⁾, Yoshiyuki AIKAWA³⁾,
Taro MATSUMOTO¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ²⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科, ³⁾湘南美容クリニック

【要旨】

我々は成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)が間葉系幹細胞(MSC)に類似した多能性を示すことを報告してきた。今回、ヒト吸引脂肪サンプルを用いて DFAT を調製し、調製に必要な至適組織量、細胞純度、造腫瘍性の有無などについて検討を行った。2ml の吸引脂肪組織から平均 2×10^6 個の成熟脂肪細胞が単離され、少量の吸引脂肪組織量で大量に成熟脂肪細胞を得られることを示した。調製された DFAT の FACS 解析では、P0~P3まで MSC 陽性マーカーの陽性率は90%以上であった。また、陰性マーカーの陽性率は0.1%未満であり、同一サンプルから調製した脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)に比べて低い傾向を示した。多分化能解析にて、調製された DFAT は、脂肪、骨、軟骨への多分化能を示すことを明らかにした。また軟寒天コロニー形成試験や NOG マウス造腫瘍試験を行った結果、DFAT は造腫瘍性を認めなかった。以上の結果より、吸引脂肪組織から高純度の多分化能を有する DFAT を大量調製できることが明らかにした。また、調製された DFAT は造腫瘍性を示さなかったことから、DFAT は低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できる。

【背景および目的】

我々は、成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる DFAT が、高い増殖能と MSC と類似する多分化能を示すことをこれまで明らかにしてきた^{1),2)}。通常、成熟脂肪細胞の由来となる皮下脂肪組織は、結合組織や神経、血管を豊富に含んだ状態の組織である。そのため、皮下脂肪組織をハサミで細切し酵素処理にて消化し、成熟脂肪細胞を単離する。単離した成熟脂肪細胞を、培地で満たしたフラスコで培養するとフラスコ天井面に集まり、ここで徐々に接着性を獲得していき、培養約1週間後で DFAT のコロニーが得られる。我々は、成熟脂肪細胞のより簡便な単離方法を模索し、痩身法などで行なわれる脂肪吸引にて採取される吸引脂肪組織に着目し、吸引脂肪組織を DFAT の細胞源として用いることが可能か検討した。脂肪吸引による脂肪組織採取の利点は、採取に伴う皮膚切開が3~4 mm 径と小さく、低侵襲な手術で採取可能である。また、吸引前にチュメセント液を脂肪組織へ注入することで、組織が膨潤し、成熟脂肪細胞の単離が容易になることである。

これまで我々は、吸引脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞と臨床グレードである調製試薬を用いて DFAT が調製可能であることを明らかにしてきた。本研究の目的として、臨床応用可能なヒト吸引脂肪組織を用いた DFAT 調製方法を確立化し、吸引脂肪組織の必要最小量、細胞特性

解析、造腫瘍性の有無などについて検討を行なった。

【方法】

湘南美容クリニックにてインフォームドコンセントの得られた患者より吸引脂肪組織の提供を受け、DFAT 調製に用いた。天井培養過程で単離された成熟脂肪細胞層 5 μ l 中の成熟脂肪細胞数を計測した。同一ヒト吸引脂肪組織より調整した DFAT ならびに ASC の P0~P3 を対象に、MSC 陽性マーカー(CD73, CD90, CD105)ならびに陰性マーカー(CD31, CD45, HLA-DR)の陽性率をフローサイトメトリーにて計測した。また、各種分化誘導培地にて脂肪細胞、骨細胞そして軟骨細胞への分化誘導を行ない、多分化能解析を行なった。DFAT の足場非依存性増殖能をみるため、軟寒天コロニー形成試験を実施した。DFAT を含めた各種細胞と 0.2%アガー含有専用培地をそれぞれ混合し、96 穴マイクロプレートに播種し、14 日間培養後、コロニー数を計測した。NOG マウス皮下移植による造腫瘍性試験では、DFAT と陰性対照である ASC を、オスの NOG マウスの右側腹部皮下に1頭当たり 1×10^7 個移植した。評価項目は、①体重測定②皮下腫瘍の有無③ヘマトキシリン・エオジン染色により腫瘍性変化の有無を、ビメンチン染色によりヒト由来細胞の有無を評価した。

【結果】

吸引脂肪組織はコラゲナーゼ溶液による酵素処理のみにて組織消化が可能であり、容易に成熟脂肪細胞の単離が可能であった。単離された成熟脂肪細胞を用いて天井培養すると、培養4日後に成熟脂肪細胞はフラスコ天井面に接着し、培養 10 日後には成熟脂肪細胞より非対称性に分裂した DFAT がコロニーを形成した(図1)。成熟脂肪細胞層 5 μ l 中の細胞直径 15 μ m 以上の成熟脂肪細胞数を計測した結果、約 5,000 個存在した。次に、細胞表面抗原の解析結果は、DFAT ならびに ASC の MSC 陽性マーカーの陽性率は 90%以上であった。また、DFAT の MSC 陰性マーカーの陽性率は 0.1%以下であったが、ASC では初代培養にて陰性マーカーの陽性率が DFAT に比べて高い傾向にあった。多分化能解析において、脂肪細胞ならびに骨細胞への分化誘導 3 週間後にオイルレッドO染色陽性、アルカリフォスファターゼ染色陽性かつアルザリンレッドS染色陽性細胞を認め、ペレット培養 3 週間後において軟骨ペレット細胞塊を形成すること明らかにし、多分化能を有することを明らかにした(図2)。軟寒天コロニー形成試験では、コロニーが観察された陽性対照とは対照的に、陰性対照と同様に DFAT を播種したいずれのウェルにおいてもコロニーは観察されなかった。NOG マウス皮下移植による造腫瘍性試験では、体重は DFAT ならびに ASC 両群とも増加傾向にあり、一般状態にも異常は認められなかった。皮下腫瘍の有無については、移植 1-2 週後は全ての個体において移植細胞の残存と思われる皮下腫瘍が確認されたが、その後段階的に減数し、観察期間終了時には全個体において腫瘍は認めなかった。また、両群ともに全ての個体で抗ヒトビメンチン抗体陽性細胞が確認されたが、腫瘍性変化は認めなかった。

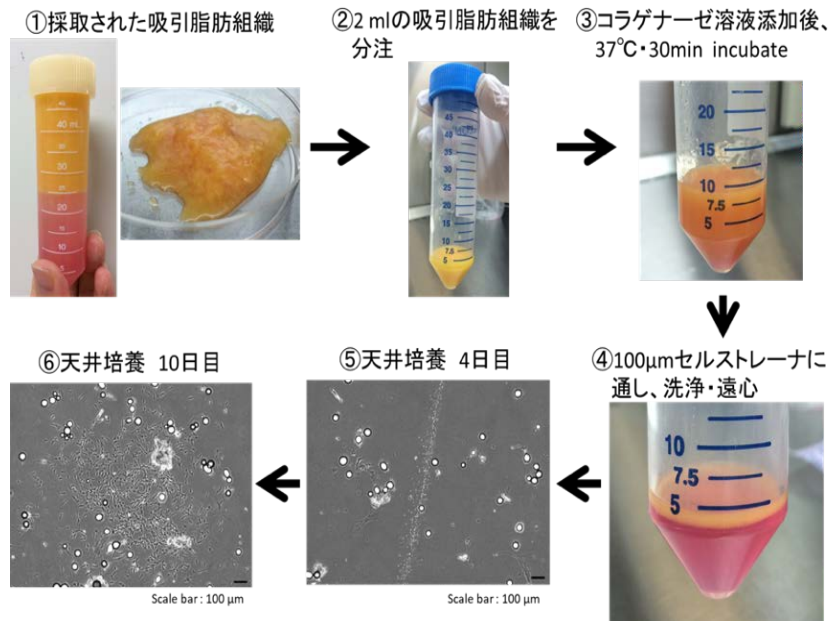


図1. ヒト吸引脂肪組織由来 DFAT の調整工程

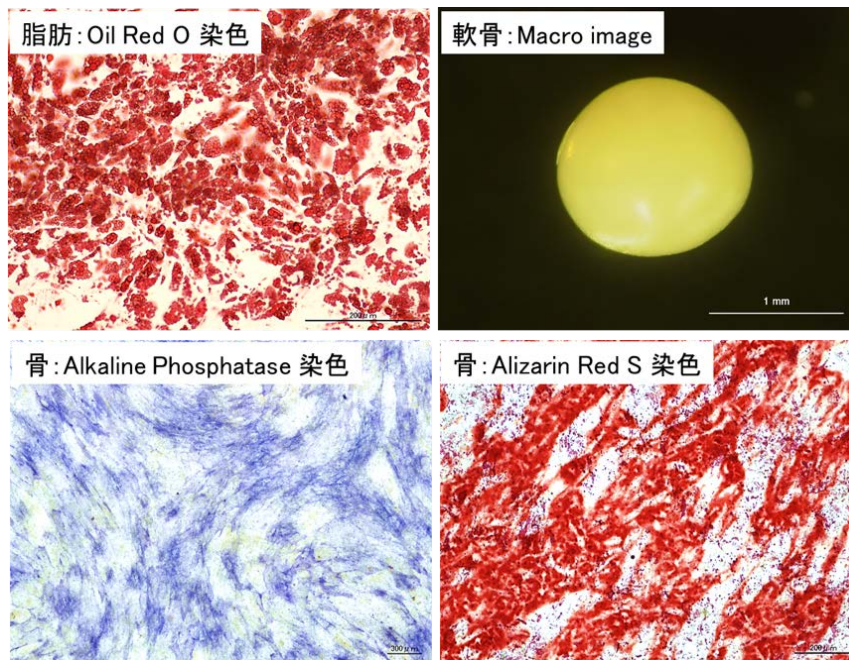


図2. ヒト吸引脂肪組織より調整した DFAT の多分化能解析

【考察】

本研究では、吸引脂肪組織はコラゲナーゼ溶液による酵素処理のみにて組織消化が可能であり、ハサミでの組織細切を行なうことなく容易に成熟脂肪細胞の単離が可能であった。成熟脂肪細胞層 5 μl 中の細胞直径 15 μm 以上の成熟脂肪細胞数を計測すると約 5,000 個存在しており、成熟脂肪細胞層 2 ml に換算すると成熟脂肪細胞が約 2×10^6 個得られる計算となり、初代培養に用いる 12.5 cm² フラスコに換算して 40 枚分にもなることから、少量の吸引脂肪組織で大量に DFAT を調整可能であることを示している。ヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT の性能解析した結果、MSC 陽性マーカーの陽性率が 90% 以上であり、MSC 陰性マーカーの陽性率は 0.1% 以下であった。そして、対照区である ASC では初代培養における陰性マーカーの陽性率が DFAT に比べて高い傾向にあり、DFAT は ASC と比較して純度が高く調整できることを示した。また、多分化能解析においてもヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT は脂肪細胞、骨細胞

そして軟骨細胞へ分化誘導可能であった。これらの性能解析の結果は、これまで皮下脂肪組織より調整された DFAT と同様に、国際細胞治療学会 (International Society for Cellular Therapy : ISCT) で定義されているヒト MSC の基準を満たすものであった³⁾。再生医療・幹細胞技術の産業化においては、臨床応用に向けて効果・安全性をともに担保した有用な幹細胞の供給が待たれている。ヒト細胞加工製品の安全性指標としては、特に腫瘍原性に関する安全性評価が重要であり、造腫瘍性否定試験の実施が求められている。そこでヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT の臨床応用に向けた重要課題である造腫瘍性について評価するため軟寒天コロニー形成試験ならびに NOG マウス皮下移植による造腫瘍性試験を行なった結果、足場非依存性のコロニー形成能を有さず、DFAT 移植に伴う腫瘍性変化を認めなかったことから、ヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT に造腫瘍性はないと判定した。今後ヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT を用いた前臨床試験を行い、有効性や安全性を検証することが望まれる。

【結語】

約2 mlという少量の吸引脂肪組織から高純度かつ多分化能を有するDFATを大量調製できることが明らかとなった。また、ヒト吸引脂肪組織より調製されたDFATは造腫瘍性を認めず、安全に移植できることが示唆された。DFATは低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できると考える。

【参考文献】

- 1) Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; **321**: 967-974.
- 2) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008; **215**: 210-222.
- 3) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; **8**: 315-317.

ヒト頬脂肪体から脱分化脂肪細胞を獲得する酵素処理条件の検討

Effect of collagenase concentration on the isolation of small adipocytes from buccal fat pad

鶴町仁奈¹⁾, 秋田大輔²⁾, 加野浩一郎³⁾, 松本太郎⁴⁾, 鳥海 拓⁵⁾, 風間智彦⁴⁾, 沖 嘉尚³⁾, 田村瑛子¹⁾, 外木守雄⁶⁾, 清水典佳¹⁾, 本田雅規⁵⁾
Niina TSURUMACHI¹⁾, Daisuke AKITA²⁾, Koichiro KANO³⁾, Taro MATSUMOTO⁴⁾, Taku TORIUMI⁵⁾, Tomohiko KAZAMA⁴⁾, Yoshinao OKI³⁾, Yoko TAMURA¹⁾, Morio TONOGI⁶⁾, Keitaro ISOKAWA⁷⁾, Noriyoshi SHIMIZU¹⁾, Masaki J. HONDA⁵⁾

¹⁾ 日本大学歯学部歯科矯正学講座, ²⁾ 日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座, ³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ⁴⁾ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科, ⁵⁾ 愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座, ⁶⁾ 日本大学歯学部口腔外科学講座

【要旨】

成熟脂肪細胞を天井培養することで産生される線維芽細胞様細胞は、間葉系幹細胞に類似した性質を持ち、脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)と呼ばれている。また、ヒト頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞には 40 μm 未満の大きさの細胞が多く存在し、天井培養法で調製された DFAT 細胞は高い骨芽細胞分化能を有することが示唆されている。しかしながら、この小さな成熟脂肪細胞を調整する際の適切な酵素条件に関する報告はこれまでにない。そこで、本研究では、コラゲナーゼ濃度による差異が脱分化脂肪細胞の調整に及ぼす影響について検討した。その結果、0.02%の酵素処理したグループが小さな成熟脂肪細胞を多く獲得できるだけでなく、0.1%で調整した DFAT 細胞と差異がなかったことから、至適酵素濃度は 0.02%であることが示唆された。

【背景および目的】

歯科口腔領域では、古来より口腔内器官の欠損に対して人工材料を補填することで機能の回復を図る治療がおこなわれてきた。近年、疾病や外傷によって損傷を受けた器官・組織に対して機能回復を目指す再生医学が飛躍的に発展し、歯科領域においても口腔機能の向上に対してその有用性が着目されている。現在では、骨造成や歯周組織の再生を代表的に臨床応用されているだけでなく、効果の向上を目指した基礎研究も盛んに行われている。現在の再生医療では、特に幹細胞や前駆細胞を用いた組織再生や機能回復を目指すことに重点がおかれ、骨髄以外の口腔内組織にも間葉系幹細胞が存在することが明らかとなっている。口腔内には骨髄や歯髄・歯根膜・骨膜などに間葉系幹細胞が存在し、組織再生のための現実的な細胞源となりうるが、どの組織も採取に制限があると考えられる。

脂肪組織は腹部のみならず人体の至るところに存在し、頬脂肪体(buccal fat pad: BFP)は歯科医師が局所麻酔下で比較的簡便に採取可能なため、再生医療に用いる細胞源として注目されている。BFP は、上顎突起と下顎骨・頬骨の間に存在する脂肪塊であり、成人になっても個体差や栄養状態に関係なくほぼ一定量存在すると報告されている¹⁾。また、前腕皮弁と比較して、感染・脱落などの合併症が少なく、良好な組織生着性を示すことから、口腔腫瘍の切除後に生じた上顎欠損部への移植弁として再建に利用されている²⁾。成熟脂肪細胞は長年、終末分化し増殖能を失った細胞と考えられていたが、天井培養法により非対称分裂に生じる線維芽細胞様細

胞が間葉系幹細胞に類似した性質を持つことが明らかにされ、脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)と名付けられている。DFAT 細胞は高い増殖能と、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞等への多分化能を有していることから組織工学や再生医療の細胞源として有用である³⁾。また、BFP から単離した成熟脂肪細胞には 40 μm未滿の小さな細胞集団が多く存在し、早期に DFAT 細胞へと脱分化することと、高い骨芽細胞分化能を有する細胞集団が調製されることが報告されており⁴⁾、歯科口腔領域における骨組織や歯周組織の再生⁵⁾に有用な細胞源であることが示唆されているが、この小さな成熟脂肪細胞を調製する際の適切な酵素条件に関する検討はこれまでにない。そこで、本研究では、コラゲナーゼ濃度による差異が脱分化脂肪細胞の調整に及ぼす影響について比較検討を行った。

【方法】

日本大学歯学部附属歯科病院に来院した健常な顎変形症患者 10 名の下顎枝矢状分割術時に摘出される BFP を用いた。0.01%、0.02%、0.1%、0.5%コラゲナーゼ溶液に分けて酵素処理後、遠沈管上部に浮遊した脂肪細胞数と直径をコールターカウンターを用いて測定した。その後、単離された成熟脂肪細胞を天井培養し、1 週間後にフラスコを反転した。さらに 3 日後に継代した際の細胞数の測定を行った。さらに 0.1%と 0.02%で酵素処理して調整した DFAT 細胞の遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能について検討し、特性を比較した。

【結果】

0.02%コラゲナーゼ濃度で酵素処理したグループが他のグループと比較して 2.5 倍以上の脂肪細胞数が計測され、その多くの直径は 30μm 以下であった。また、成熟脂肪細胞分画を天井培養に反転して 3 日後に継代を行った際には、0.02%の濃度で酵素処理したグループが 0.1%で酵素処理したグループよりも 1.6 倍ほど多くの細胞数が測定された。さらに、0.02%と 0.1%の濃度で調整した DFAT 細胞の遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期および脂肪細胞への分化能を検討した結果、CD271 以外の 7 種の細胞表面抗原については陽性細胞の割合はほぼ同等の値を示した。遺伝子発現解析の ES 細胞マーカーである c-MYC, KLF4, OCT3/4, SOX2 の遺伝子発現は同様の発現パターンを示した。また、コロニー形成能、細胞増殖能および細胞周期に関しては、有意な差は認められなかったが、骨芽細胞誘導開始 3 日目におけるアルカリホスファターゼ活性は 0.02%で調整したグループが高い傾向を示した。しかしながら、アリザリンレッド S 染色やカルシウム沈着量は両群で有意な差は認めませんでした。さらに、脂肪細胞分化誘導能は同程度であった。

【結語】

本研究より、0.02%の酵素処理したグループが小さな成熟脂肪細胞を多く獲得できるだけでなく、0.1%で調整した DFAT 細胞と差異がないことから、至適酵素濃度は 0.02%であることが示唆された⁶⁾。一連の結果から DFAT 細胞を口腔領域に臨床応用する際の具体的な酵素処理条件が確立された。

【参考文献】

- 1) Baumann A, Ewers R. Application of the buccal fat pad in oral reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; **58**: 389-392, 2000.
- 2) 松井祐興, 小池修治, 那須隆ら. 頬脂肪体を用いて再建を行った口腔癌の 2 症例. *頭頸部外科*; 2017;**27**:37-43.

- 3) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 4) Tsurumachi N, Akita D, Kano K, et al. Small Buccal Fat Pad Cells Have High Osteogenic Differentiation Potential. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016; **22**: 250-9.
- 5) Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, et al. Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol* 2016; **7**: 50.
- 6) Tsurumachi N, Akita D, Kano K, et al. Effect of collagenase concentration to isolate small adipocytes from human buccal fat pad. *J Oral Sci*. 2018; **60**:14-23.

ラット人工真皮移植モデルにおける脱分化脂肪細胞の効果に関する研究

Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting

副島一孝¹⁾、櫻村 勉¹⁾、浅見 崇¹⁾、風間智彦²⁾、松本太郎²⁾、仲沢弘明¹⁾
Kazuatak SOEJIMA¹⁾, Tsutom KASHIMURA¹⁾, Takashi ASAMI¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾,
Taro MATSUMOTO²⁾, Hiroaki NAKAZAWA¹⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

コラーゲンスポンジとシリコーン膜から成る2層性人工真皮(artificial dermis)は、真皮の欠損した全層皮膚欠損層に移植されると、移植床より宿主の細胞や毛細血管が侵入して真皮様組織が構築される。健常な創傷に移植された場合、約2~3週間の経過で真皮様組織が構築され、その上に薄い分層植皮を行って皮膚再建を完了する¹⁾。人工真皮の臨床使用上の課題は、真皮様組織構築に要する期間待機しなければならない点であり、その期間短縮が求められている²⁾。本研究³⁾では、ラットを用いた人工真皮移植モデルにおいて、人工真皮移植時に移植床に脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)を投与して真皮様組織構築に対する影響を検討した。尚、臨床で用いられているbFGF製剤の併用効果についても併せて検討した。その結果、DFAT投与により、人工真皮内への血管侵入および真皮様組織構築が促進され、bFGFとの併用によりその効果は有意に促進されることが認められた。人工真皮を用いた皮膚再建において、DFAT投与による待機期間短縮の可能性が示唆された。

【背景および目的】

1980年にYannas⁴⁾らにより報告されたartificial skinを基礎として開発された2層性人工真皮(artificial dermis: AD)はdermal regeneration templateとして機能するコラーゲンスポンジ層と細胞の侵入と水分喪失を防ぐ目的で表面に貼られたシリコーン膜の2層構造を成している。真皮の欠損した全層皮膚欠損創にADが移植されると、移植床より宿主の線維芽細胞が侵入し、細胞外マトリックスを産生して真皮様組織を構築するとともに、血管内皮細胞により毛細血管網が構築される。健常な創傷に移植された場合、約2~3週間の経過で真皮様組織が構築され、その上に薄い分層植皮を行って皮膚再建を完了する。すなわち、ADを用いた全層皮膚再建はAD移植と、真皮様組織構築を待つ2次的に行う分層皮膚移植の2回の手術を要する。ADの臨床使用上の課題は真皮様組織構築に要する期間待機しなければならない点であり、その期間短縮が求められている。現状では、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF製剤、トラフェルミン、フィブラスト、科研製薬)が臨床で使用されており、その血管新生促進効果を期待してAD移植時に併用されている。

本研究⁴⁾では、脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)の真皮様組織構築に対する効果を検討した。また、臨床で用いられているbFGF製剤の併用効果についても併せて検討した。

【方法】

1)DFAT の調整 Sprague-Dawley(SD)系ラット(8 週齢、雄)の腹腔内脂肪から単離した成熟脂肪細胞を天井培養法で調整し、実験に使用するまで凍結保存した⁵⁾。

2)ラット実験モデルの作成

同種同系ラットの背部に 1X1cm 大の全層皮膚欠損創を 4 カ所作成して人工真皮(Pelnac®、通常タイプ、グンゼ社製)を移植し人工真皮移植モデルとした。その際に

- ・対照群 (人工真皮のみを移植, n=8)
- ・DFAT 群:(DFAT 細胞(0.5×10^5 cells/cm²)を移植床に投与, n=8)
- ・bFGF 群:(bFGF 製剤 (30µg/ cm²)を移植床に投与, n=8)
- ・併用群:(DFAT 細胞(0.5×10^5 cells/cm²)および bFGF 製剤(30µg/ cm²)を移植床に投与する群, n=8)

を作成した。

移植後 2, 7 日目に組織学的に検討を行った。組織標本は屠殺後に体循環内に墨汁を注入し、毛細血管内を染色して作成した。そして、移植後 7 日目の標本を用いて、その中央の 200 x 200 µm の単位面積あたりの血管断面数および構築された真皮様組織の厚さにより定量的に評価を行った。真皮様組織の厚さの計測は digital photography analysis software (NIH image J, image processing program, Version 1.47n, National Institutes of Health)を用いて行った。統計処理は Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction により行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

【結果】

移植後 2 日目では対照群ではコラーゲンスポンジ層の真皮様組織構築、毛細血管侵入は全く見られなかった。DFAT 群、bFGF 群ではスポンジ層下層にわずかに真皮様組織構築が見られたものの、血管侵入は見られなかった。それらと比較して、併用群ではコラーゲンスポンジ層中層まで真皮様組織が構築されており、下層には毛細血管の侵入が認められた。移植後 7 日目では対照群ではまたスポンジ構造が残存しており血管侵入は殆ど見られなかったが、DFAT 群では真皮様組織構築、毛細血管侵入のいずれもが確認され、それらは、bFGF 群、併用群ではさらに促進されていた。

血管断面の定量結果は

group	血管数(per unit (200X200µm))
対照群	1.4 ± 1.3
DFAT 群	2.8 ± 1.3*
bFGF 群	5.8 ± 0.8 *
併用群	10.2 ± 1.3*

(*: $p < 0.05$ from control group)

bFGF 群、DFAT 群間にも有意差を認め、更に bFGF 群、併用群間にも有意差を認めた。

真皮様組織の厚さの定量結果は

group	真皮様組織厚(µm)
対照群	516.6.4 ± 33.7
DFAT 群	570.4 ± 68.5
bFGF 群	977.2 ± 231.2 *
併用群	1235.6 ± 99.8*

(*: $p < 0.05$ from control group)

対照群、DFAT 群間には有意差は認められなかったが、bFGF 群、DFAT 群間にも有意差を認

め、更に bFGF 群、併用群間にも有意差を認めた。

【考察】

今回の実験結果により、DFAT 群と対照群間に血管数に有意差を認めたことから、DFAT 自体が血管新生促進効果を有することが明らかとなった。また、bFGF との併用により bFGF 群よりも有意に血管新生促進、真皮様組織構築促進が認められたので、bFGF との併用による相乗効果も明らかとなった。

併用群では移植後 2 日目に既に真皮様組織内への血管侵入が確認された。皮膚の生着には移植床からの血管侵入による血行再開が必要であり、移植された皮膚は血行再開までの期間、創面からの漿液で栄養される。皮膚が漿液でどれくらいの期間保たれるかの検討報告は無いが、今後人工真皮と分層皮膚の同時移植の可能性も検討すべき課題と考えられた。

【結語】

人工真皮による皮膚再建時に移植床に DFAT を投与することにより血管新生促進効果が得られ、bFGF と併用すると真皮様組織構築、血管新生のいずれもが有意に促進されることが示された。

【参考文献】

- 1) Yannas IV, Orgill DP, Burke JF. Template for skin regeneration. *Plast Reconstr Surg*. Jan 2011;127 Suppl 1:60S-70S.
- 2) Soejima K, Chen X, Nozaki M, et al. Novel application method of artificial dermis: One-step grafting procedure of artificial dermis and skin, rat experimental study. *Burns*. 2006;32(3):312-318.
- 3) Soejima K, Kashimura T, Asami T, et al. Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. *Journal of plastic surgery and hand surgery*. Jun 9 2014;49(1):25-31.
- 4) Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res*. 1980;14(1):65-81.
- 5) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*. Apr 2008;215(1):210-222.

脱分化脂肪細胞による血流不全組織の救済効果に関する検討

The effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on ischemic tissue

樫村 勉¹⁾, 副島一孝¹⁾, 松本太郎²⁾, 仲沢弘明¹⁾
Tsutomu KASHIMURA¹⁾, Kazutaka SOEJIMA¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾, Hiroaki
NAKAZAWA¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野, ²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

形成外科領域では、皮膚軟部組織欠損に対する再建の一方法として皮弁移植や阻血性皮膚潰瘍治療や熱傷治療など局所の血流を念頭においた診療を日常的に行っている。本学では、高い増殖能と間葉系幹細胞と同等の多分化能を示す脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated Fat Cells 以下、DFAT) を調製する培養法を確立した。これまでにわれわれは、同種同系のラットから得られた DFAT を投与することでラットの背部皮弁の生着域拡大効果が得られることを報告してきた。今回、Wistar 系ラットから得られた DRAT を Sprague-Dawley 系ラットの背部皮弁に投与し、生着域を拡大しうるか検討し、一定の皮弁の生着域拡大効果が得られることが明らかとなったため報告する。

【はじめに】

近年、骨髄や脂肪を細胞ソースとした多分化能を有する間葉系幹細胞が開発され血流不全に起因する病態への治療が模索されている。その中で、幹細胞の血管新生作用による皮弁の生着域拡大に関する研究が行われており、一定の効果が得られることが報告されている (1-2)。

われわれはブタの皮下脂肪組織を体外で脱分化させることにより、高い増殖能と間葉系幹細胞と同等の多分化能を示す細胞群 (脱分化脂肪細胞 dedifferentiated fat cells, DFAT) を調製する培養法を確立した (3)。これまでにわれわれは、同種同系ラットに由来する DFAT をラット背部の乱走型皮弁に投与し皮弁生着域拡大効果についての検討を行い、皮弁の基部に DFAT を投与することで高い血管新生効果と生着域拡大効果が得られることを報告してきた (4)。今回、同種異系ラットに由来する DFAT を用いて同様にラット背部の乱走型皮弁に投与し皮弁生着域を拡大しうるか検討したため報告する。

【対象及び方法】

Wistar 系ラットの腹腔内脂肪を天井培養することで DFAT を単離培養した。SD (Sprague-Dawley) 系ラットの背部に乱走型皮弁 (2×9cm) を挙上した。対照群 (未治療: Group I) (n=10) と DFAT 投与群: (DFAT (1×10⁶ cells/0.1ml) を作製した。DFAT 投与群は、皮弁中央投与群: Group II (n=10) と皮弁基部より 2cm に投与する皮弁基部投与群: Group III (n=10) の 2 群を作製した。挙上した皮弁は下床にシリコンシートを埋入し再縫合した。術後 14 日目に生着域を

測定し組織を採取した。H-E 染色、墨汁染色により組織学的検討を行った。(図1)

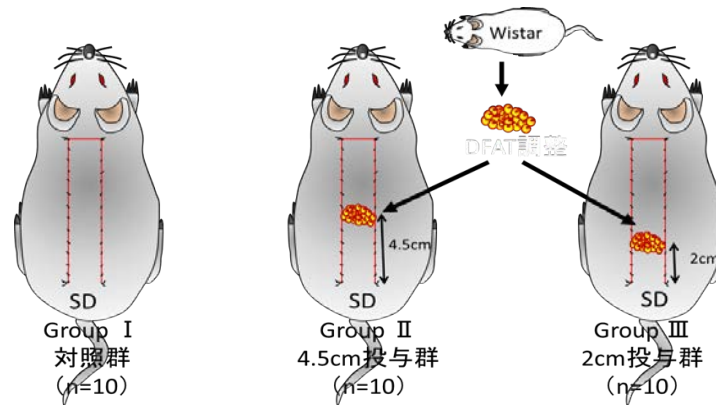


図1. 各実験群

【結果】

術後 14 日目に皮弁の生着域と壊死部分の境界は明瞭であった。皮弁の平均生着率は対照群: $53.8 \pm 6.5\%$ 、皮弁中央投与群: $53.5 \pm 4.9\%$ 、皮弁基部投与群: $62.8 \pm 5.9\%$ であり、皮弁基部投与群で皮弁生着域は有意に拡大した(図2)。H-E 染色では、DFAT を移植し皮膚筋層下の結合組織が肥厚していた。墨汁染色でも同様に皮膚筋層下の結合組織の肥厚が確認でき、内部には墨汁で染色される著明な血管増加を認めた(図 3, 4)。

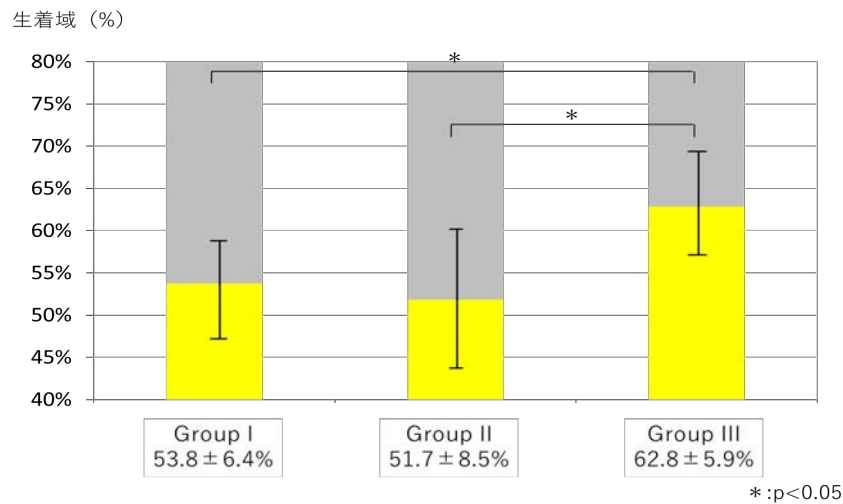


図2 各実験群の皮弁生着域

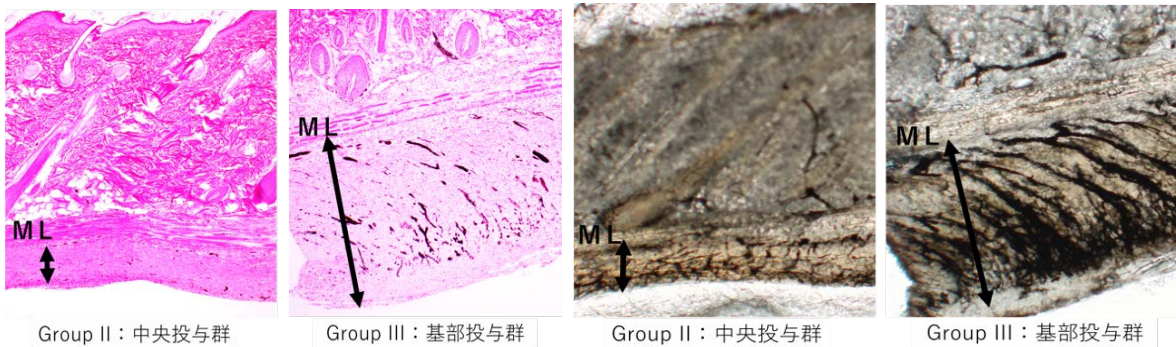


図3. H-E 染色

図4. 墨汁染色

(ML:皮膚筋層)

【考察】

これまでにわれわれは、同系 DFAT をラット背部の乱走型皮弁に投与し皮弁生着域拡大効果についての検討を行い、皮弁の基部に DFAT を投与することで 12%の皮弁生着域の拡大効果が得られることを報告してきた。DFAT の調整には、通常 3 週間程度を要する。したがって、同種同系 DFAT の投与による皮弁生着域拡大効果を得るためには、治療の 3 週間前に脂肪を採取し DFAT の調整を行う必要がある。DFAT による血流不全組織の救済は、剝脱創や熱傷などの外傷治療においても応用可能と考える。しかしながら、外傷や緊急手術などの治療においては同種同系 DFAT を調整する時間的な猶予がない。したがって、これら緊急の場合にはあらかじめ凍結保存しておいた同種異系 DFAT による治療が必要となる。そこで、今回われわれは同種異系 DFAT による皮弁生着域拡大効果についての検討を行った。同種異系 DFAT の皮弁基部への投与により9%の皮弁生着域拡大効果が得られた。同種同系 DFAT の投与に比較して拡大効果はやや劣るものの両群で有意差は認めなかった。皮弁中央部への投与は、同種同系 DFAT の投与と同様に壊死部近傍への投与であったため DFAT が生着せずに生着域の拡大効果が得られなかったと考える。(図5)

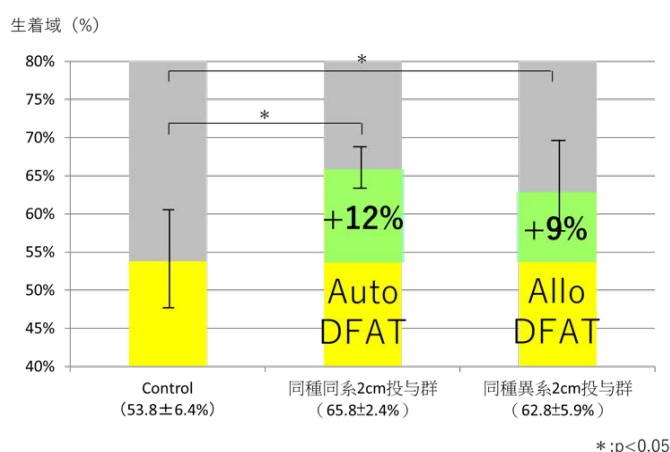


図5. 同種同系 DFAT と同種異系 DFAT の投与による皮弁生着域

【結語】

同種異系に由来する DFAT においても、一定の皮弁生着域拡大効果が得られた。自家脂肪細胞による待機的な治療に加え、凍結保存された同種異系 DFAT による緊急時の使用の有効性が示唆された。外傷など DFAT の調整に要する時間的な猶予がない場合に、同種異系 DFAT の投与は有効な治療のオプションになりうると考えられた。

【参考文献】

- 1) Gong L, Wang C, Li Y, Sun Q, Li G, Wang D. Effects of human adipose-derived stem cells on the viability of rabbit random pattern flaps. *Cytotherapy*. 2014;16(4):496-507.
- 2) Yang M, Sheng L, Li H, Weng R, Li QF. Improvement of the skin flap survival with the bone marrow-derived mononuclear cells transplantation in a rat model. *Microsurgery*. 2010;30(4):275-81.
- 3) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*. 2008;215(1):210-22.
- 4) Kashimura T, Soejima K, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. The Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on a Dorsal Skin Flap Model. *J Invest Surg*. 2015:1-7.

脱分化脂肪細胞による自家培養表皮移植時の基底膜構築

促進効果に関する研究

Effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on formation of basement membrane after cultured epithelial autograft on artificial dermis

副島一孝¹⁾、樫村 勉¹⁾、浅見 崇¹⁾、風間智彦²⁾、松本太郎²⁾、仲沢弘明¹⁾
Kazuataka SOEJIMA¹⁾, Tsutomu KASHIMURA¹⁾, Takashi ASAMI¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾,
Taro MATSUMOTO²⁾, Hiroaki NAKAZAWA¹⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

培養表皮は移植床真皮との共同作業により基底膜を再構築して生着するので、真皮成分の存在しない移植床には著しく生着が不良である。重症熱傷症例に移植するためには、凍結保存同種皮膚や人工真皮で予め真皮構築を行ってから移植する必要がある¹⁾。本邦でも自家培養表皮移植が重症熱傷に保険収載され、臨床で広く行われている²⁾。しかしながら、現状の臨床での課題は、人工真皮を用いて真皮構築を行っても、自家培養表皮移植後に長期間移植皮膚の脆弱性が持続することであり³⁾、基底膜構成タンパク発現の遅延が原因として指摘されている⁴⁾。

本研究⁵⁾では、ブタを用いた自家培養表皮移植モデルにおいて、人工真皮による移植床準備に際して脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)DFAT 投与による基底膜構築促進効果を検討した。

その結果、DFAT 投与群では主要な基底膜構成タンパクである collagen type IV と laminin-5 が表皮真皮接着層における発現が有意に促進され、anchoring-fibril を含めて基底膜形成が促進されることが示され、DFAT 投与により自家培養表皮の人工真皮上への生着促進効果が示唆された。

【背景および目的】

1975年にGreenら⁶⁾によりヒト表皮培養法が確立され、1981年にO'Connorら⁷⁾により初めて重症熱傷症例に培養表皮移植が行われた。しかし、その後、真皮成分の存在しない移植床には著しく生着が不良であることが明らかとなり、Cuonoら¹⁾により重症熱傷症例に凍結保存同種皮膚を用いて予め真皮構築を行ってから移植する方法が報告された。本邦でも自家培養表皮移植が重症熱傷に保険収載され、Cuonoら¹⁾の方法を用いて広く臨床で広く行われている²⁾。また、凍結保存同種皮膚の供給に制限がある本邦では人工真皮を用いた真皮構築も重要なオプションである。しかしながら、人工真皮を用いて真皮構築を行っても、自家培養表皮移植後に長期間移植皮膚の脆弱性が持続することが現状の臨床での課題であり³⁾、基底膜構成タンパク発現の遅延が原因として指摘されている⁴⁾。

本研究⁵⁾では、ブタを用いた自家培養表皮移植モデルにおいて、人工真皮による移植床準備に際して脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)DFAT 投与による基底膜構築促進効果を検討した。

【方法】

- 1) DFAT の調整 LWD 系ブタ(15kg, 雄)の頸部皮膚より Green 型培養表皮を 3T3 feeder layer 法で培養した。また、同部位皮下脂肪より天井培養法により DFAT を調整した⁸⁾。
- 2) 真皮構築 上記と同一個体ブタの背部の 2X3cm 大の脂肪が露出する全層皮膚欠損創を作成して人工真皮(Pelnac®, 通常タイプ、ゲンゼ社製)を移植した。その際に
対照群 (人工真皮単独移植 n=12)
DFAT 群 (DFAT 細胞(0.5X10⁵ cells/cm²)を移植床に投与, n=12)
を作成した。
- 3) 自家培養表皮移植 真皮構築手術後 10 日目に構築された真皮様組織上に自家培養表皮移植を行った。
- 4) 組織学的検討 移植後 14 日目に開創して、組織採取を行い、collagen type IV, laminin-5 の免疫染色を行い、表皮真皮接着層中央部で 40X80μm の単位面積内の染色部位の定量を行った。解析は digital image analysis software (Popimaging, Version 6.10: Digital being kids Ltd., Tokyo, Japan)を用いて行い、統計処理は t-test で行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

【結果】

対照群と比較して、DFAT 群では表皮真皮接着層において collagen type IV, laminin-5 の発現が促進されており、単位面積当たりの染色度を定量評価した結果、

	collagen type IV (%)	laminin-5 (%)
対照群	1.9 ± 1.5	0.8 ± 1.0
DFAT 群	17.4 ± 6.5*	14.4 ± 3.5*

(*: $p < 0.05$ from control group)

いずれも、DFAT 群で有意に染色度の促進が見られた。

また、真皮表皮接着層の透過電子顕微鏡像では、対照群では基底膜構築も不完全であったのに対して、DFAT 群では正常皮膚と遜色のない基底膜、hemidesmosome, anchoring fibril が形成されていた。

【考察】

今回の実験結果より自家培養表皮移植のための移植床を人工真皮により準備する際に、移植床に DFAT を投与すると基底膜構築促進が得られることが示唆された。現状での課題である移植後の長期脆弱性は表皮-真皮の接着不良が原因であるので、laminin-5, anchoring fibril の形成促進はその解決に寄与するものと期待される。表皮真皮接着層における基底膜と脂肪細胞の固有基底膜は構成タンパクに共通なものが多く、collagen type IV, laminin は共通しており、間葉系幹細胞が脂肪分化する際に多く発現することが報告されている^{9,10)}。DFAT にはこれらのタンパク質の発現能が備わっていると考えられ、培養表皮移植時に併用することでその能力を発揮し必要部位に作用したと推測された。

自家培養表皮の培養と調整には約 3-4 週間を要するので、重症熱傷患者を自家培養表皮移植で治療するためには、急性期に熱傷壊死組織を切除し、真皮構築手術を行う必要がある。自家 DFAT の調整には約 2 週間を要するので、今後同種 DFAT での効果も検討する必要がある。

【結語】

自家培養表皮移植のための移植床を人工真皮により準備する際に、移植床に DFAT を投与すると基底膜構築促進が得られることが示唆され、それにより生着促進効果が期待される。

【参考文献】

- 1) Cuono CB, Langdon R, Birchall N, et al. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. *Plast Reconstr Surg*. Oct 1987;80(4):626-637.
- 2) Matsumura H, Matsushima A, Ueyama M, et al. Application of the cultured epidermal autograft "JACE((R))" for treatment of severe burns: Results of a 6-year multicenter surveillance in Japan. *Burns*. Jun 2016;42(4):769-776.
- 3) Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature. *Burns*. Jun 2006;32(4):395-401.
- 4) Matsumura H, Gondo M, Imai R, et al. Chronological histological findings of cultured epidermal autograft over bilayer artificial dermis. *Burns*. Jun 2013;39(4):705-713.
- 5) Soejima K, Kashimura T, Asami T, et al. Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on Formation of Basement Membrane after Cultured Epithelial Autograft on Artificial Dermis. *Plast Reconstr Surg*. 2019;in press.
- 6) Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331-343.
- 7) O'Connor NE, Mulliken JB, Schlegel SB. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*. 1981;1(8211):75-78.
- 8) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*. Apr 2008;215(1):210-222.
- 9) Aratani Y, Kitagawa Y. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J Biol Chem*. Nov 5 1988;263(31):16163-16169.
- 10) Noro A, Sillat T, Virtanen I, et al. Laminin production and basement membrane deposition by mesenchymal stem cells upon adipogenic differentiation. *J Histochem Cytochem*. Oct 2013;61(10):719-730.

ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果

Effect of dedifferentiated fat cell transplantation in a rat intervertebral disc degeneration model

中山渕志¹⁾, 風間智彦²⁾, 加野浩一郎³⁾, 徳橋泰明¹⁾, 松本太郎²⁾

Enshi NAKAYAMA¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Koichiro KANO³⁾, Yasuaki TOKUHASHI¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ³⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科

【要旨】

腰痛の主原因である椎間板変性症は髄核細胞の不可逆的な変性によって起こる。近年、椎間板変性症に対して間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)などの細胞移植による再生医学的アプローチを用いた研究が行われている。脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)は成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製される MSC 様細胞である。本研究では、ラット尾椎針穿刺による椎間板変性モデルに対し DFAT を椎間板内に投与し、その治療効果を評価した。その結果、DFAT 投与により、椎間板間隙の短縮が有意に抑制され、線維輪組織の一部に髄核様組織の再生が認められた。椎間板変性症に対する DFAT を用いた細胞治療の可能性が示唆された。

【背景および目的】

椎間板変性症は、日本人に最も多い愁訴である腰痛症の主原因であり、椎間板を構成する髄核細胞の不可逆的な変性によって起こる。椎間板変性症に対する治療法として、鎮痛剤投与などの保存療法や、椎体間固定術などの手術療法が行われているが、現時点では根本的な治療方法はない。近年、椎間板再生を目指す再生医学的アプローチとして、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)を変性椎間板に移植する研究が行われ、その有効性がメタ解析¹⁾等にて報告されている。一方、MSC はその採取に伴い比較的侵襲性の高い手技が必要であることや、ドナー年齢や基礎疾患に影響され必要細胞数が調製できない症例が存在するといった問題点が指摘されている。Matsumoto ら²⁾は、皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することにより調製される脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)が、高い増殖能と MSC に類似した多分化能を獲得することを明らかにした。DFAT は少量の脂肪組織より大量調製することが可能であることから実用性の高い細胞治療用ソースとして期待される。本研究では、ラット尾椎針穿刺による椎間板変性モデルに対し DFAT を椎間板内に投与し、その治療効果を評価した。

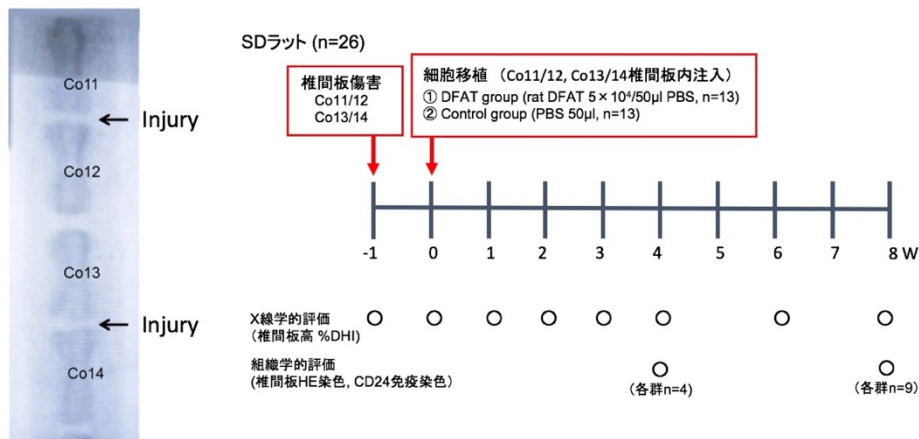


図1. 実験プロトコール

【方法】

尾椎針穿刺によるラット椎間板変性症モデルは、Issy らの既報³⁾を一部改変して作成した。雄性 SD ラットに対して、全身麻酔下に尾椎椎間板Co11/Co12 及びCo13/Co14 を21G 針にて、5 回 x 6 方向 穿刺を行い、椎間板傷害を作製した。傷害作製 7 日後に傷害椎間板 にラット DFAT (5×10^4 /頭, DFAT 群, n=13)または PBS (Control 群, n = 13)を移植した。移植後、経時的にX 線撮影を行い、椎間板高の変化(%DHI)を算出し、両群を比較した。また移植 4, 8 週間後に尾椎の切片標本を作製し、HE 染色および髓核細胞マーカーCD24 に対する免疫染色にて組織学的評価を行った。また移植したDFAT の局在や髓核細胞への分化の有無を検討するため、椎間板穿刺 1 週間後にGFP ラベルしたDFAT (5×10^4 / 頭)を傷害椎間板内に注射した。移植 4, 8 週後に、尾椎切片標本を作成し、抗GFP 抗体及び抗 CD24 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

【結果】

尾椎穿刺による椎間板変性モデルラットに対するDFAT 移植の効果を検討した結果、X 線学的評価では、DFAT 群は Control 群に比べ、Co11/Co12 では移植 2 週間後より、Co13/Co14 では移植3 週間後より%DHI が有意に高値となり、この差は移植 8 週間後まで認められた。組織学的評価では、移植4 週間後のCo11/Co12, Co13/Co14 において、両群とも髓核構造は消失し、結合組織に置換されている所見が認められた。DFAT 群の一部(9 検体中5 検体)では、椎間板辺縁に不定形の腔胞をもつ髓核様細胞塊が認められ、この組織の構成細胞は、髓核細胞マーカーCD24 陽性を示した。一方、Control 群ではこのような所見は認められなかった。次にGFP 標識DFAT を傷害椎間板に移植し、GFP とCD24 に対する蛍光免疫染色を行った。その結果、移植 4 週間および8 週後の検体において、椎間板辺縁に出現した髓核様組織には、CD24, GFP 二重陽性を示す細胞が多数認められた。以上の結果より、DFAT 移植により椎間板間隙の狭小化が改善し、また移植した DFAT が直接髓核様細胞に分化していることが明らかになった。

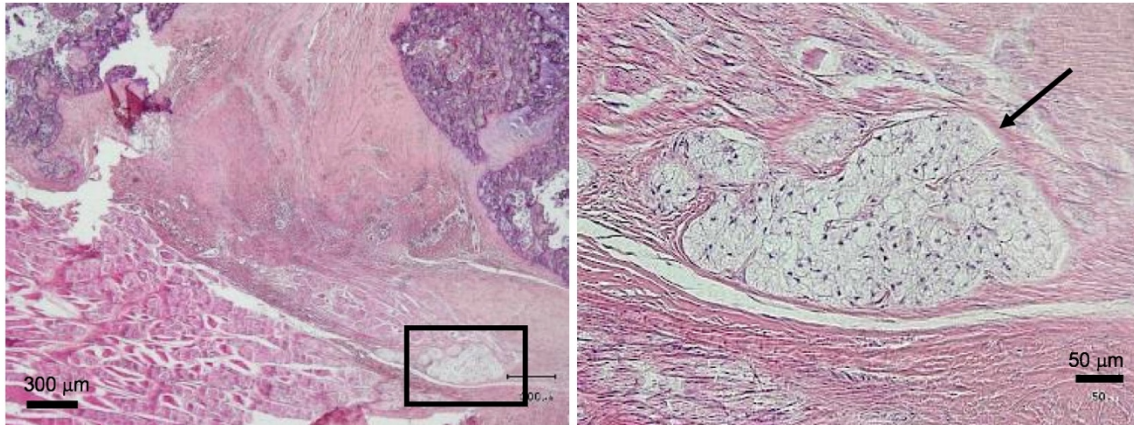


図 2. DFAT 移植群の傷害椎間板組織に認められた異所性髄核様組織

【考察】

本研究では、DFAT を傷害椎間板に局所注入すると椎間板変性が抑制できる可能性が示された。既報では髄核細胞や骨髄 MSC の椎間板再生効果は硫酸化グリコサミノグリカンや II 型コラーゲンの産生増加に起因することが示されている^{4,5)}。本研究の組織学的検討結果から DFAT の椎間板変性抑制作用に関しても同様の機序が考えられる。今後、再生椎間板組織のプロテオグリカンや細胞外マトリックスの定量評価を行い、作用機序の検証が必要である。DFAT は、①組織採取に伴う侵襲性が低く高齢者からも調製可能であること、②単離された成熟脂肪細胞から調製される細胞であるため初代培養から高純度の細胞が得られること、③少量の脂肪組織から低侵襲性に大量調製できること、等の利点があることから、椎間板変性症患者の大部分を占める高齢者でも自家移植を可能とする治療用細胞として期待できる。今後ヒト DFAT を用いた前臨床試験を行い、有効性や安全性を検証することが望まれる。

【結語】

椎間板穿刺によるラット椎間板変性症モデルの傷害椎間板にDFATを局所注射することにより、椎間板間隙の狭小化抑制が認められ、移植したDFATの一部は髄核細胞へ分化している所見が認められた。椎間板変性症に対するDFATを用いた細胞治療の可能性が示された。

【参考文献】

- 1) Wang Z, Perez-Terzic CM, Smith J, et al. Efficacy of intervertebral disc regeneration with stem cells - a systematic review and meta-analysis of animal controlled trials. *Gene* 2015; **564**: 1-8.
- 2) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 3) Issy AC, Castania V, Castania M, et al. Experimental model of intervertebral disc degeneration by needle puncture in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research* 2013; **46**: 235-244.
- 4) Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine* 2005; **30**: 2379-2387.
- 5) Feng G, Zhao X, Liu H, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration. *J Neurosurg Spine* 2011; **14**: 322-329.

脱分化脂肪細胞による歯周組織再生

Mature adipocytes derived dedifferentiated fat (DFAT) cells enhanced periodontal regeneration

秋田大輔¹⁾, 加野浩一郎²⁾, 田村瑛子³⁾, 真下貴之⁴⁾, 鶴町仁奈³⁾, 鳥海 拓⁵⁾, 新井嘉則⁶⁾, 月村直樹¹⁾, 松本太郎⁷⁾, 石上友彦¹⁾, 磯川桂太郎⁸⁾, 本田雅規⁵⁾

Daisuke AKITA¹⁾, Koichiro KANO²⁾, Yoko TAMURA³⁾, Takayuki MASHIMO⁴⁾, Niina TSURUMACHI³⁾, Taku TORIUMI⁵⁾, Yoshinori ARAI⁶⁾, Naoki TSUKIMURA¹⁾, Taro MATSUMOTO⁷⁾, Tomohiko ISHIGAMI¹⁾, Keitaro ISOKAWA⁸⁾, Masaki J. HONDA⁵⁾

¹⁾ 日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座, ²⁾ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科, ³⁾ 日本大学歯学部歯科矯正学講座, ⁴⁾ 順天堂大学歯科口腔外科講座, ⁵⁾ 愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座, ⁶⁾ 日本大学歯学部歯科放射線学講座, ⁷⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ⁸⁾ 日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座

【要旨】

歯周炎, 外傷など種々の原因で破壊された歯槽骨ならびに歯根膜の再生には, 人工骨移植や組織再生誘導法が行われているが, その適応や効果は現時点ではまだ限定的である。近年, 再生医療の分野において細胞と生体材料を組み合わせた細胞移植治療が有望視されている。歯周組織再生の移植細胞源として有用と考えられている骨髄や歯根膜由来の幹細胞は, 細胞の採取に制限が伴うため, 口腔領域から低侵襲に採取可能で, 大量に調製可能な細胞源が模索されている。脂肪組織中の成熟脂肪細胞分画から調整される脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)は, 高い増殖能と多分化能を示すことから, ラットに作製した歯周組織欠損を応用し, DFAT 細胞の歯周組織再生能を検討した。

その結果, 歯根吸収や骨性癒着することなく, 高い再生した硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められた。また蛍光標識された DFAT 細胞は歯根膜組織中に多数散在しているほか, 一部の細胞は新生セメント質と新生骨中に認められたことから DFAT 細胞は歯周組織再生に有用であることが示唆された。

【背景および目的】

歯周病はう蝕と並ぶ歯科の二大疾患の一つであり, 国民の約 8 割が歯周炎に罹患していると云われている。歯周炎とはセメント質・歯肉・歯根膜・歯槽骨から構成される歯周組織の炎症性破壊を特徴とし, 進行すると歯の喪失に繋がる。破壊された歯周組織の再生には, 従来から人工骨移植や組織再生誘導法(GTR 法)が行われているが, その適応や効果は未だ限定的である。そのため, 近年では間葉系幹細胞と適切な足場材もしくは成長因子を組み合わせた再生医療が歯周組織再生の効果向上に有望視されている。

増殖能力を喪失した終末分化細胞であると捉えられてきた成熟脂肪細胞は, 培養下においては自発的に脱分化し, 高い増殖活性と多分化能を再獲得することが近年明らかにされている¹⁾。この成熟脂肪細胞由来の脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)は均質かつ大量に調製することが可能であるため, 細胞移植治療のソースとして有用視されている。

そのためラット下顎骨に作製した歯周組織欠損部に DFAT 細胞を移植し, 歯周組織再生能を検

討した。

【方法】

9 週齢の近交系 F344 雄性ラットの鼠径部皮下脂肪組織を採取し、細切後、0.1%のコラゲナーゼ溶液にて 1 時間酵素処理を行い、濾過および遠心分離にて余分な細胞外基質成分を除去後、成熟脂肪細胞分画を単離した。成熟脂肪細胞分画を 12.5 cm² のフラスコに 1.0×10⁴ 個ずつ播種し天井培養を行い、7 日後にフラスコを反転した。フラスコ反転後に DFAT 細胞がコロニーを形成しているのを確認後、第三継代の細胞を脂肪細胞と骨芽細胞への分化誘導培地で培養し、Oil-Red O および Alizarin Red 染色性、カルシウム沈着量などを指標に分化能の有無を検討した。

In vivo では、F344 ラットの左側下顎臼歯部頬側に吸入麻酔下で左側下顎下縁の皮膚を切開して、咬筋を切断し、剥離後に下顎骨頬側を露出させた。第 1 臼歯中央根から第 2 臼歯近心相当部をインバーテッドバーで歯周組織欠損領域(縦 2 mm×横 3 mm×深さ 1 mm)を作製し、欠損部に実験群として DFAT/PLGA 複合体を、対照群として PLGA を移植した。CT を用いて移植後の再生過程を観察し、得られた CT データから硬組織再生量の定量をおこなった。また、5 週経過後の下顎骨を摘出し、第 1 臼歯中央根および遠心根の組織学的解析から欠損部の歯周組織再生能を評価した。

さらに、蛍光色素でラベリングした DFAT を PLGA scaffold に播種して歯周組織欠損部に移植し、5 週経過後の細胞局在部位を蛍光顕微鏡観察から評価した。

【結果】

ラット鼠径部皮下脂肪組織から採取した DFAT は、分化誘導培地を用いた培養により Oil-Red O および Alizarin Red 染色性、カルシウム沈着に陽性反応を示し、脂肪細胞、骨芽細胞への分化誘導が認められた。

移植を行った両群には、歯根吸収や骨性癒着は観察されず、欠損部の硬組織形成が CT による経日的観察から認められた。硬組織定量解析の結果、移植 5 週後には DFAT/PLGA 移植群は PLGA 群よりも 2.4 倍程度高い硬組織再生量が認められた。さらに、組織学的解析から、両群において移植部の新生骨組織とセメント質様硬組織の形成のほかに、再生した硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められているが、組織形態計測からセメント質様硬組織と歯根膜の幅径は DFAT/PLGA 移植群では PLGA 群よりも有意に大きい値を示していた。さらに、蛍光色素で標識させた DFAT を同様に移植した際には、DFAT は新生歯根膜中に最も多く確認されたほか、新生骨・セメント質内や血管様構造物内にも陽性反応が認められた²⁾。

【結語】

これらの結果から多分化能を示す DFAT と PLGA 複合体移植が、歯槽骨、セメント質様硬組織および線維性の歯根膜組織の再生において促進的に作用することを示唆しており、破壊された歯周組織の再生に有望であることが考えられる^{3, 4)}。

【参考文献】

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 2) Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, et al. Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol* 2016; **7**: 50

- 3) Kaku M, Akiba Y, Akiyama K, Akita D, Nishimura M. Cell-based bone regeneration for alveolar ridge augmentation--cell source, endogenous cell recruitment and immunomodulatory function. *J Prosthodont Res.* 2015; **59**:96-112.
- 4) 秋田大輔, 伊藤智加, 月村直樹, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞の臨床応用化に向けた取り組み. *日歯医師会誌.* 2019; **71**:829-839.

ラットモデルにおける PGA conduit、DFAT を使用した顔面神経再生能の検討

Study of facial nerve regeneration using PGA conduit and DFAT cells
in a rat model

藤巻 弘¹⁾, 松峯 元¹⁾, 尾崎弘展³⁾, 植田禎史³⁾, 亀井 航²⁾, 清水真理¹⁾,
橋本一輝²⁾, 新美陽介²⁾, 風間智彦⁴⁾, 松本太郎⁴⁾, 宮田麻里子³⁾, 櫻井裕之²⁾
Hiroshi FUJIMAKI¹⁾, Hajime Matsumine¹⁾, Hironori OZAKI³⁾, Yoshifumi Ueta³⁾, Wataru
KAMEI²⁾, Mari SHIMIZU¹⁾, Kazuki HASHIMOTO²⁾, Yosuke NIIMI²⁾, Tomohiko KAZAMA⁴⁾,
Taro MATSUMOTO⁴⁾, Mariko MIYATA³⁾, Hiroyuki SAKURAI²⁾

¹⁾東京女子医科大学八千代医療センター 形成外科, ²⁾東京女子医科大学病院 形成外科, ³⁾東京女子医科大学医学部生理学講座, ⁴⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

生体分解性人工神経誘導管内(PGA conduit)にDedifferentiated fat cell (DFAT) を封入したハイブリッド型人工神経を作成し、顔面神経再生能力についてラット動物実験モデルを用いて検証した。

【はじめに】

現在、臨床で使用されている生体分解性人工神経誘導管内(PGA conduit)は末梢神経の再建に有用とされている。また Dedifferentiated fat cell (DFAT)は適切な分化誘導培地にて培養することにより、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、筋線維芽細胞などに分化する事が既に報告されている。今回我々は PGA conduit に Dedifferentiated fat cell (DFAT) を封入したハイブリッド型人工神経を作成し、ラット動物実験モデルを用いて顔面神経再生能力について検証した。

【対象及び方法】

吸入麻酔下にルイス系ラットの顔面神経 Buccal branchを露出し7mmの神経欠損を作成した。次にラットの皮下脂肪組織から作成したDFATを1型コラーゲンを足場としてPGA conduitに充填したハイブリッド型人工神経(DFAT群)を作成し、先の神経欠損部に顕微鏡下に移植した¹⁾。PGA conduit単独(control群)を同様に神経欠損部に移植し、術後13週に逆行性トレーサーを用いた神経再支配を確認した後、再生神経の組織学的、生理学的比較検討を行なった。

【結果】

Myelinated fiberの平均数ではDFAT群(1605 ± 806.23)、control群(543.6±478.66)でありDFAT群が人工神経群に対して有意に高値であった。Myelin thicknessではDFAT群(0.57 ± 0.17 μm)、control群(0.46 ± 0.14 μm)でありDFAT群がcontrol群に対して有意に厚かった。CMAPのAmplitudeはDFAT群(2.84 ± 2.47 mV)、control群(0.88 ± 0.56 mV)でありDFAT群、

control群で有意差は認めなかったが、Whisker motionはDFAT群($9.22 \pm 0.65^\circ$)、control群($1.9 \pm 0.84^\circ$)でありDFAT群はcontrol群に対して有意に高値であった。

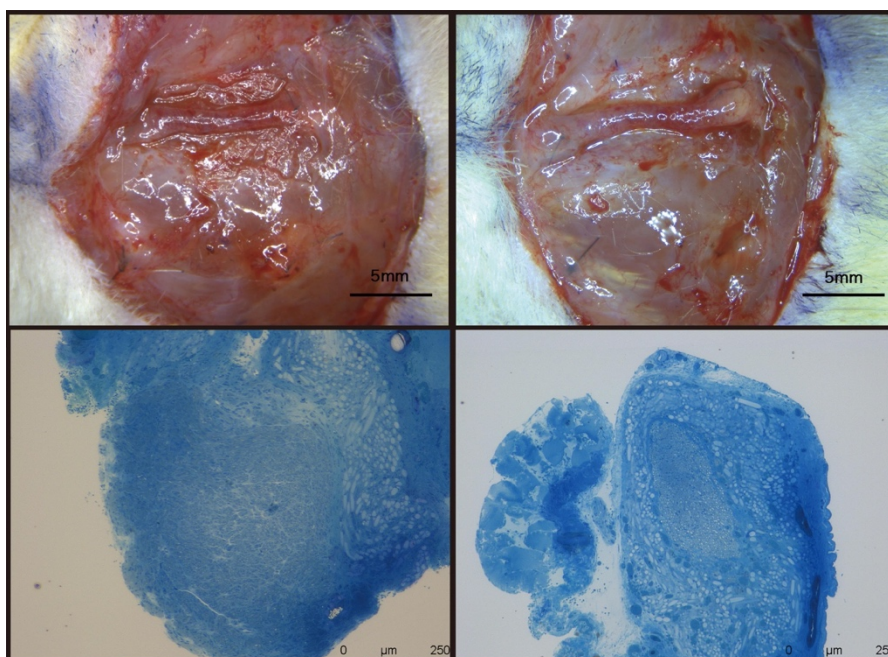


図 2. 再生神経の顕微鏡所見

上段左: DFAT 含有 PGA conduit 光学顕微鏡所見

上段右: PGA conduit 単体 光学顕微鏡所見

下段左: DFAT 含有 PGA conduit トルイジンブルー染色顕微鏡所見

下段右: PGA conduit 単体 トルイジンブルー染色顕微鏡所見

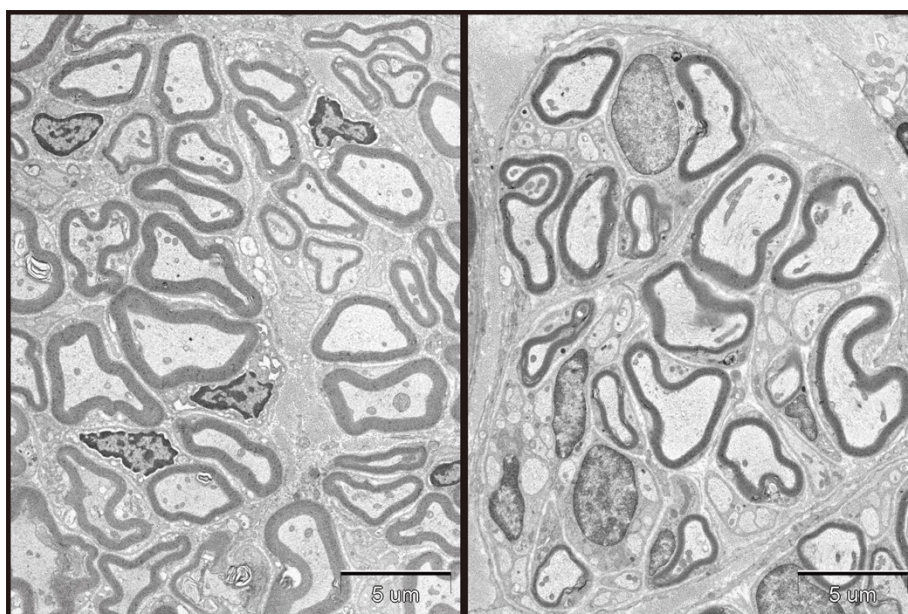


図 3. 再生神経の電子顕微鏡所見

左: DFAT 含有 PGA conduit TEM 所見

右: PGA conduit 単体 TEM 所見

【考察】

本研究では、現在で臨床使用されている PGA conduit 単体と DFAT 含有 PGA conduit とで顔

面神経再生能を組織学的、生理学的に比較検討し、DFAT 群の著しい神経再生促進効果を確認することができた。本実験において DFAT を充填することにより神経再生が促進された理由として第 1 に DFAT からの成長因子の放出である。タンパク質アレイ分析では血管内増殖因子(VEGF)を多量に放出されるとされる。第 2 に DFAT の多能性である。我々の研究グループは二重免疫染色によって、緑色蛍光色素陽性の DFAT が緑色蛍光色素蛋白/S100 二重陽性のシュワン細胞に分化したことを報告してきた²。

外傷や悪性腫瘍切除後などによる顔面神経損傷に対する治療は自己神経移植にとってかわる様々な幹細胞の移植が試みられており、今回実験で用いた DFAT もそのうちの一つである。DFAT は以下の特徴を有している^{3,4}。

- ・Adipose-derived stem cell(ADSC)や stromal vascular fraction(SVF)と比較し成熟脂肪細胞から調製され、複雑な細胞選択なしに高純度の細胞が得られる。
- ・成熟脂肪細胞は少量の採取(1g 以下)しか必要とせず、採取部位の犠牲が少ない。
- ・遺伝子操作やウイルスベクターを使用せずに簡単な方法で大量の細胞を短時間で調製できる。

我々の研究グループはシリコンチューブを使用し、DFAT を充填することにより顔面神経再生が促進されることを報告してきたが、今回は臨床により近づける為に PGA conduit を使用した。その結果、PGA conduit においても DFAT は組織学的、生理学的に顔面神経再生が促進される可能性を示すことができた。

【結語】

ラットの 7 mm の顔面神経欠損モデルでは、PGA conduit への DFAT の充填が、再生神経軸索の増殖、成熟、および生理学的機能を有意に促進し、PGA conduit の機能をさらに改善する可能性を示した。

【参考文献】

1. Matsumine, H., Sasaki, R., Takeuchi, M., Yamato, M., Sakurai, H. Surgical procedure for transplanting artificial nerve conduits for peripheral nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2011;128:95e-97e.
2. Matsumine, H., Takeuchi, Y., Sasaki, R., et al. Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:686-697.
3. Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008;215:210-222.
4. Obinata, D., Matsumoto, T., Ikado, Y., et al. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. *Int J Urol* 2011;18:827-834.

マウス急性移植片対宿主病モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果

Effect of dedifferentiated fat cell transplantation in a mouse model of acute graft-versus-host disease

村井健美¹⁾, 石毛美夏¹⁾, 風間智彦²⁾, 加野浩一郎³⁾, 高橋昌里¹⁾, 麦島秀雄⁴⁾, 松本太郎⁵⁾
Takemi MURAI¹⁾, Mika ISHIGE¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Koichiro KANO³⁾,
Shori TAKAHASHI¹⁾, Hideo MUGISHIMA⁴⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

¹⁾日本大学医学部小児科科学系小児科学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ³⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科, ⁴⁾川越予防医療センター・クリニック

【要旨】

造血幹細胞移植において移植片対宿主病(graft versus host disease: GVHD)はしばしば治療に難渋する重大な合併症である。近年、ステロイド抵抗性急性 GVHD に対し、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)を用いた細胞治療の有効性が報告され、臨床応用が開始されている。脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)は成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製される MSC 様細胞である。本研究では、マウス急性 GVHD モデルに対し DFAT を経静脈的に投与し、その治療効果を評価した。その結果、DFAT 投与により、GVHD に伴う体重減少が抑制され、GVHD の臨床スコアを有意に改善することが明らかになった。急性 GVHD に対する DFAT を用いた細胞治療の可能性が示唆された。

【背景および目的】

造血幹細胞移植に伴う重大な合併症として移植片対宿主病(graft versus host disease: GVHD)がある。レシピエントの抗原提示細胞によるドナーT 細胞の活性化により免疫拒絶が惹起されて起こる病態である。治療としてステロイドや免疫抑制剤投与が行われるが、しばしば治療に抵抗性を示し、重篤な場合は死に至る。薬物治療に抵抗性を示す急性 GVHD に対して、近年、細胞治療が注目されており、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)を用いた臨床応用が開始されている¹⁾。Matsumotoら²⁾は、成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することにより調製される脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)が、高い増殖能と MSC に類似した多分化能を獲得することを明らかにした。DFAT は少量の脂肪組織より大量調製することが可能であることから実用性の高い細胞治療用ソースとして期待される。本研究では、マウス急性 GVHD モデルに DFAT を経静脈投与し、その治療効果を検討した。

【方法】

MHC 不一致の急性 GVHD モデルは、Schroederらの既報³⁾に従い作成した。具体的にはドナーマウス(C57BL/6J, MHC:H-2[b])より単離した骨髓細胞(1×10^7)および脾臓 CD3⁺細胞(3×10^6)を骨髓破壊処置(X線 11Gy 全身照射)を行ったレシピエントマウス(B6D2F1, MHC:H-2[b/d])の尾静脈に投与して GVHD を誘導した。計 30 頭のマウスを Control 群、GVHD 群、GVHD+DFAT 群の3群に分けた(各群 n=10)。Control 群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナーマウス骨髓細胞を移植した。GVHD 群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナ

一マウス骨髄細胞と脾臓 CD3⁺細胞を同時移植した。GVHD 群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナーマウス骨髄細胞と脾臓 CD3⁺細胞を同時移植した。GVHD+DFAT 群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナーマウス骨髄細胞と脾臓 CD3⁺細胞を同時移植したのに加え、マウス DFAT(5 x10⁵)を移植当日、7日後、14日後に尾静脈より投与した(図1)。各群の評価は、Kaplan-Meier 曲線による生存分析、体重の推移、GVHD 臨床スコア⁴⁾、移植 21 日後の大腸の組織学的検討にて行った。

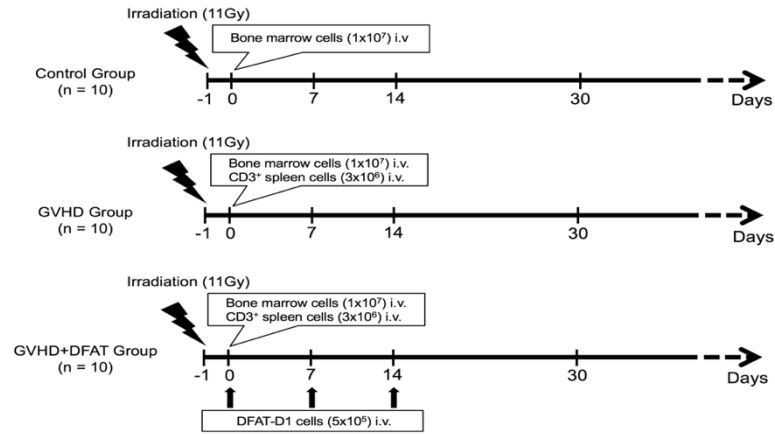


図 1. 実験プロトコール

【結果】

各群の生存分析では、Control 群は、移植後 84 日の観察期間中、死亡は 10 頭中 2 頭のみであった。GVHD 群は、移植後 20 日目より死亡例が出現し、54 日目には 10 頭全て死亡した。一方、GVHD+DFAT 群は移植後 24 日目から死亡例が認められたものの、84 日目まで生存例が認められた。各群の体重推移の比較を図2に示す。Control 群は移植後 3 日目までは体重が減少したが、その後増加に転じ、14 日目には移植前の体重に回復した。GVHD 群と GVHD+DFAT 群は Control 群に比べ、7 日目より有意な体重低下を認めた。GVHD+DFAT 群は全期間を通して GVHD 群よりも体重減少が軽度であり、14、24 日目の時点において両群間に有意差(p<0.05)を認めた。各群の臨床症状の比較では、移植後 21 日以後 GVHD+DFAT 群は GVHD 群に比べ、活動性の低下、亀背、脱毛の程度が弱い傾向があり、下痢を認める個体は存在しなかった。各群の大腸組織所見の比較では、Control 群がほぼ正常であったのに対し、GVHD 群は腸管径の拡大、絨毛構造の破壊、著明な炎症性細胞の浸潤が認められた。一方、GVHD+DFAT 群は炎症細胞の浸潤は認めるものの絨毛構造は比較的保たれており、腸管径の拡大も軽度であった。

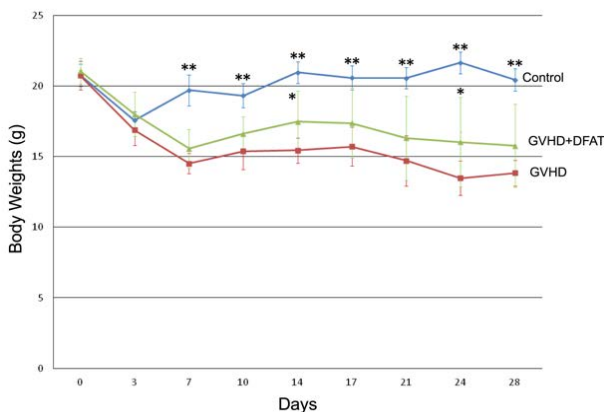


図2. 各群の体重推移の比較

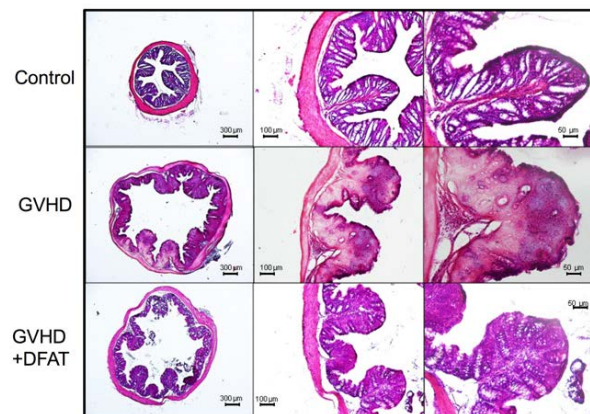


図3. 各群の大腸組織像の比較

【考察】

本研究では、DFAT を全身投与すると急性 GVHD が抑制できる可能性が示された。DFAT は MSC と類似した液性因子の分泌プロファイルを示すことが明らかにされている⁵⁾。したがって MSC で報告されている TGF- β , HGF, NO, HLA-G,IDO-1 といった免疫制御に関わる液性因子の分泌や、制御性 T 細胞の誘導促進作用⁶⁾を介して治療効果を示したと予想される。造血幹細胞移植後の急性 GVHD 患者では、骨髄 MSC を採取することは困難であるため、同種他家 MSC 移植が行われている。DFAT は少量の脂肪組織から低侵襲性に大量調製できることから、患者自身の細胞を用いた治療が可能となることが予想される。今後ヒト DFAT を用いた前臨床試験を行い、有効性や安全性を検証することが望まれる。

【結語】

マウス急性GVHDモデルに対しDFATを静脈内投与すると、GVHDに伴う臨床症状や病理所見を改善できることが明らかになった。急性GVHDに対するDFATを用いた新規細胞治療の可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579-1586.
- 2) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J. Cell. Physiol.* 2008;215:210-222.
- 3) Schroeder MA, DiPersio JF. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis. Model. Mech.* 2011;4:318-333.
- 4) Fukui J, Inaba M, Ueda Y, et al. Prevention of graft-versus-host disease by intra-bone marrow injection of donor T cells. *Stem Cells* 2007;25:1595-1601.
- 5) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A* 2013;19:1792-1802.
- 6) Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2011;10:410-415.

4. 資料

- ① 平成 26 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム
- ② 平成 27 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム
- ③ 平成 28 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム
- ④ 平成 29 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム
- ⑤ 平成 30 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果公開シンポジウム・プログラム

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 26 年度 研究成果公開シンポジウム

日時:平成 27 年 1 月 31 日(土) 9:00～14:00

場所:日本大学医学部リサーチセンター 4Fホール

プログラム

9:00～9:30 基調講演

司会: 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野 榎島 誠

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 松本 太郎

9:30～12:00 成果発表

司会: 日本大学大学院総合科学研究科生命科学 福田 昇

日本大学生産工学部応用分子化学科 野呂 知加子

①「ヒト脱分化脂肪細胞および間葉系幹細胞における骨分化・再生能の比較検討」

日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野 澤田 浩克

②「ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞と副甲状腺ホルモン投与による治療効果」

日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野 木下 豪紀

③「ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植による椎間板再生」

日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野 中山 渕志

④「吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析」

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 風間 智彦

⑤「外傷性脊髄損傷モデルマウスの運動機能回復に及ぼす脱分化脂肪細胞移植の影響」

日本大学生物資源科学部総合臨床獣医学研究室 山田 宏美

⑥「腎症に対する DFAT 細胞移植の効果と機序の検討」

日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野 丸山 高史

⑦「脱分化脂肪細胞を用いた iPS 細胞への誘導検討」

日本大学医学部外科学系小児外科学分野 橋本 真

⑧「ビタミン D シグナルによる成熟脂肪細胞の脱分化抑制」

日本大学医学部生体機能医学系生化学分野 石澤 通康

⑨「脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)応用した歯周組織再生の臨床応用に向けて」

日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座 秋田 大輔

⑩「脱分化脂肪細胞(DFAT)における血管新生効果の検討」

日本大学医学部小児科学系小児科学分野 渡辺 拓史

⑪「新規持続性腹圧性尿失禁モデルと脱分化脂肪細胞移植による排尿機能改善の効果」

日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野 村田 保貴

————— 昼食・休憩 (12:00～13:00) —————

13:00～14:00 教育講演

司会: 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 松本 太郎

「成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞 DFAT の発明と展望」

日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室 加野 浩一郎

脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究

松本 太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

両生類や魚類では、切断肢の再生に成熟体細胞の脱分化現象が寄与することが知られている。近年、細胞の運命を生体内で追跡できる遺伝子改変技術が開発されたことにより、マウスなどの哺乳類においても、組織障害に伴い脱分化した成熟体細胞が傷害組織の修復や再生に寄与することが明らかになっている。我々の研究グループでは、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で体外培養することにより得られる細胞群(脱分化脂肪細胞, Dedifferentiated fat cell:DFAT)が、高い増殖能と骨髄間葉系幹細胞(MSCs)と同等の多分化能を獲得することを明らかにした(Matsumoto T, Kano K et al. J Cell Physiol. 215:210, 2008)。DFATはiPS細胞に比べ分化度が高い細胞であるため、増殖能は有限で万能性はないが、高い効率で調製が可能であり、がん化する可能性も低い。またMSCに比べ均質性が高く、ドナー年齢や基礎疾患を問わず調製できることから、実用性の高い治療用ドナー細胞となりうると考えている。DFATはMSCと同様に種々の液性因子の分泌を介して、組織修復作用、血管新生作用、免疫制御作用などを示す。このような多能性を利用して、難治性末梢動脈疾患(PAD)に対する血管新生細胞治療や難治性潰瘍に対する組織修復を期待した細胞治療などへの臨床応用を目指している。平成26年度より採択された私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」では、我々が今まで蓄積してきた研究成果を発展させ、DFATを用いた細胞治療のFirst in Man臨床研究実施を目標としている。具体的には、①治療用細胞としてのDFATの特性解析、②臨床応用に適合した細胞調整法の確立と移植安全性の検証、③DFATを用いた細胞治療の開発および前臨床試験を3本の柱として、研究を行っている。本研究プロジェクトにより、DFATの治療用細胞としての適性や多能性の分子メカニズムが明らかになると共に、DFAT細胞治療の臨床研究開始に向けた多くの知見が得られる予定である。また、重度熱傷、難治性腹圧性尿失禁、難治性骨折など種々の難治性疾患に対する細胞治療や、臍帯血造血幹細胞移植時の生着率向上・急性GVHD予防を目的とした細胞治療など、DFATを用いた新たな細胞治療の実現性が明確になることが期待される。本講演では、本プロジェクトの概要と現在までの進捗状況、期待される研究成果につき概説する。

ヒト脱分化脂肪細胞および間葉系幹細胞における骨分化・再生能の比較検討

○澤田 浩克¹⁾、風間 智彦²⁾、新井 嘉則³⁾、本田 雅規³⁾、加野 浩一郎⁴⁾、徳橋 泰明¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学歯学部解剖学教室Ⅱ講座、⁴⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

【目的】脂肪細胞から調製される脱分化脂肪細胞 dedifferentiated fat cell (DFAT)は、MSC、ASC に類似した多分化能を有する細胞であり、骨再生能や骨密度増加作用を有することが報告されている。また骨髄中にも脂肪細胞が存在し、皮下脂肪組織と同様に DFAT を調製することが可能である。しかし DFAT が BM-MSC や ASC と同等の骨分化能・再生能を有するか明らかになっていない。また皮下脂肪由来 DFAT (SC-DFAT)と骨髄脂肪由来 DFAT (BM-DFAT)の骨分化能に差異があるか明確ではない。同一ヒト由来の BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC を調製し、これらの細胞の骨分化能を *in vitro* で明らかにすること。さらに免疫不全(SCID)マウス大腿骨骨折モデルの骨折部位にこれらの細胞を移植し、骨再生能の差異を *in vivo* で明らかにすること。

【方法】人工膝関節置換術を受ける患者より事前の同意を得た上で、ヒト BM-DFAT、SC-DFAT、BM-MSC、ASC を調製した。これらの細胞を骨分化誘導培地にて3週間培養した後、Alizarin Red S 染色を行い、カルシウムの沈着を顕微鏡で観察した。

また SCID マウスに大腿骨横骨折を作成し、同一ドナーから調製した BM-DFAT、SC-DFAT、ASC、BM-MSC (各 1×10^5 /個)をペプチド水ゲル 50 μ l と混合後、骨折部に移植した (各群 n=10)。ペプチド水ゲルのみを移植した群を Control 群とした (n=10)。移植4週間後に大腿骨を摘出し、MicroCT による骨構造解析を行い、各群の骨密度や仮骨量を評価した。

【結果】骨分化誘導実験では、BM-DFAT、BM-MSC は SC-DFAT、ASC に比べ高い骨分化能を示した。SCID マウス大腿骨骨折モデルに対する移植実験では、骨密度は Control 群に比べ、BM-MSC 群、BM-DFAT 群で有意 ($p < 0.05$) に高値であり、仮骨内と皮質骨 CT 値もこれらの群で高い傾向を認めた。骨折部の仮骨量は細胞移植群で少ない傾向を示し、BM-MSC 群は Control 群より有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。

【考察】BM-MSC 群、BM-DFAT 群は骨折後、早期に骨リモデリングが起こり、骨折治癒が促進されることが示唆された。BM-DFAT は BM-MSC と同等の高い骨再生能を有することが明らかとなり、骨折治癒促進を目的とした細胞治療のセルソースとして有望である可能性が示唆された。

成果発表②

ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞と

副甲状腺ホルモン投与による治療効果

○木下 豪紀¹⁾、風間 智彦²⁾、新井 嘉則³⁾、長岡 正宏¹⁾、徳橋 泰明¹⁾、加野 浩一郎⁴⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

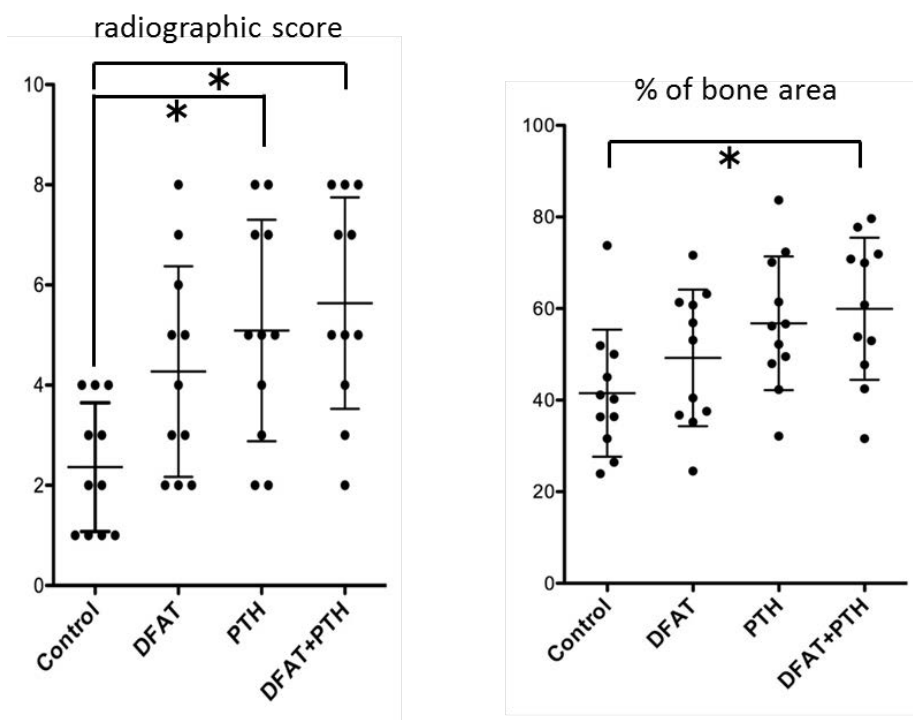
³⁾日本大学歯学部、⁴⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科

【目的】ラット骨欠損型偽関節モデルを作成し、人工骨基質(β -TCP/collagen 複合体)に播種した脱分化脂肪細胞(DFAT)を骨欠損部に移植し、さらに副甲状腺ホルモン(PTH)全身投与を併用することにより、骨折治癒が促進されるかについて検討した。

【方法】SD ラットに脛骨骨幹部に 4mm の骨欠損を作製し、①人工骨基質のみ移植する群(Control 群)、② GFP-DFAT (1×10^6)を播種した人工骨基質を移植する群(DFAT 群)、③人工骨基質を移植後、rhPTH 30 mg/kg を週 3 回、8 週間皮下注射する群(PTH 群)、④ GFP-DFAT を播種した人工骨基質を移植後、③と同様に PTH を注射する群(DFAT+PTH 群)に分け検討した(各群 n=11)。8 週間後、脛骨を摘出し、 μ CT を用いた骨構造解析や組織学的検討を行った。

【結果】Control 群に比べ、DFAT 群、PTH 群はいずれも骨癒合や皮質骨新生を促進する傾向があり、特に DFAT+PTH 群は高い治癒効果が認められた。欠損部の%Bone area および radiographic score は、Control 群に比べ DFAT+PTH 群は有意($P < 0.05$)に高値を示した。組織学的に骨欠損部における DFAT の生着が確認できた。

【結論】ラット偽関節モデルに対して、DFAT 移植と PTH 間歇投与を併用した結果、高い偽関節治癒効果が認められた。難治性骨折に対して DFAT 細胞治療と PTH 間歇投与の併用は、新たな治療戦略になりうる可能性がある。



ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植による椎間板再生

○中山 潤志¹⁾、風間 智彦²⁾、加野 浩一郎³⁾、徳橋 泰明¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

【目的】Matsumoto らは脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が高い増殖能と間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) に類似した多分化能を有していることを明らかにした。今回、人工的に椎間板変性を生じさせたラットの椎間板に DFAT を移植し、椎間板高の定量及び変性した椎間板組織の再生能が促進されるかについて検討を行った。

【方法】体重約 300g の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに対し、X 線透視装置を用いて椎間板高を測定した後、椎間板組織 Co11/Co12 及び Co13/Co14 を 21G 針にて透視装置下に経皮的椎間板穿刺を行い、椎間板変性モデルを作製した。穿刺 1 週間後に Co11/Co12 及び Co13/Co14 に DFAT (5×10^4 / 50 μ l Phosphate buffered saline (PBS), DFAT 群, n=13) または同量の PBS (Control 群, n=13) を注射した。移植後、経時的に X 線撮影を行い、椎間板傷害前に対する傷害後の椎間板高の比率 (%DHI) を算出し、両群を比較した。また、移植 4 週間後、8 週間後に尾椎の切片標本を作成し、Hematoxylin & Eosin (HE) 染色、髄核細胞の特異的表面マーカーである CD24 に対する免疫染色にて組織学的評価を行った。また移植した DFAT の局在、髄核細胞への分化の有無を検討するため、SD ラット Co11/12 および Co13/14 に対し椎間板穿刺処理を行い、1 週間後に Green fluorescent protein (GFP) ラベルした DFAT (5×10^4 / 50 μ l PBS) を傷害椎間板内に注射した。移植 4、8 週後に尾椎を摘出し、凍結切片を作成した。切片は抗 GFP 抗体および抗 CD24 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、組織学的所見により椎間板細胞の再生能や増殖能について評価した。

【結果】PBS 投与群と比較して DFAT 投与群は X 線学的には椎間板高の減少が抑えられた。また、病理組織学的には両群とも髄核構造は消失し、結合組織に置き換わっている所見が認められた。DFAT 投与群の一部では椎間板辺縁に、髄核様細胞集団が認められた。GFP 標識 DFAT を傷害椎間板に移植した結果、移植 4 週間後および 8 週間後の検体において、椎間板辺縁に出現した髄核様組織には、CD24、GFP 二重陽性を示す細胞が多数認められた。

【考察および結論】変性椎間板に対する DFAT を用いた細胞移植治療は、椎間板高の変性が抑制され、DFAT の一部は髄核細胞への形質転換を生じさせることが明らかになった。これらの結果により、DFAT を用いた細胞移植治療は、椎間板再生の有効な治療となる可能性が示唆された。

吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析

○風間 智彦¹⁾、副島 一孝²⁾、加野 浩一郎³⁾、松本 太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、²⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、

³⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

【目的】我々はヒトを含む哺乳類の脂肪組織から単一画分として採取した成熟脂肪細胞を、天井培養法を用いて脱分化を誘導することによって脱分化脂肪細胞(DFAT)を樹立したことを報告した。本研究では、吸引脂肪組織からDFATの調製を試み、切除脂肪組織を用いた従来の調製法ならびに調整されたそれぞれのDFATの機能を比較解析した。

【方法】当大学病院形成外科にて手術を受ける患者より吸引脂肪(約10 ml)と切除脂肪(約1 g)の提供を受け、走査電子顕微鏡にてそれぞれの組織構造を比較した。吸引脂肪から酵素処理を行わずに成熟脂肪細胞を単離し、天井培養にてDFATの調製を試みた。そして、切除脂肪から酵素処理により成熟脂肪細胞を単離する従来法とDFATの調製効率を比較した。それぞれの組織から調製したDFATは、FACSを用いて細胞表面抗原解析を行うとともに、脂肪、骨、軟骨への分化特性を比較した。

【結果】吸引脂肪組織は切除脂肪組織と比較して血管や結合組織が少なく、脂肪細胞間の接着が疎であった。吸引脂肪では酵素処理を行わずにフィルトレーションのみで成熟脂肪細胞の単離が可能であり、切除脂肪を酵素処理する従来法と同等の効率でDFATを調製することが可能であった。吸引脂肪組織由来DFATは、切除脂肪組織由来DFATと同様に間葉系幹細胞(MSC)のminimal criteriaに一致した細胞表面抗原発現プロファイルを示し、脂肪、骨、軟骨系列への多分化能を有することを明らかにした。

【結論】少量の吸引脂肪から酵素処理を行わずDFATを調製できることが明らかになった。今後、吸引脂肪組織を細胞源とするより簡便で安全性の高いDFAT調製方法の確立への進展が期待される。

外傷性脊髄損傷モデルマウスの運動機能回復に及ぼす脱分化脂肪細胞移植の影響

○山田 宏美¹⁾、伊藤 大介¹⁾、沖 嘉尚²⁾、北川 勝人¹⁾、松本 太郎³⁾、亘 敏広⁴⁾、加野 浩一郎²⁾

¹⁾日本大学生物資源科学部総合臨床獣医学研究室、²⁾日本大学生物資源科学部生体機構学研究室、

³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、⁴⁾日本大学生物資源科学部獣医内科学研究室

【目的】我々は、成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪(dedifferentiated fat; DFAT)細胞を脊髄損傷モデルラットに移植すると、運動機能が回復することを報告した。しかし、DFAT 細胞の移植が脊髄損傷モデルにおける運動機能の回復を促進するメカニズムについては不明である。本研究では、脊髄損傷モデルマウスに移植した DFAT 細胞が運動機能回復に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、移植後における再髄鞘化とグリア瘢痕の縮小に着目して検討した。

【方法】成体雌マウス(n=22)の第 10 胸髄を椎弓切除により露出した後に、Infinite Horizon インパクト(60-kilodyne)を用いて脊髄を圧迫挫滅し脊髄損傷モデルとした。脊髄損傷モデルマウスを損傷 8 日後に無作為に DFAT 細胞区と対照区に分類し、DFAT 細胞区には Green Fluorescent Protein (GFP)トランスジェニックマウス由来の DFAT-GFP 細胞(1×10^5 cells/ 2μ l)を損傷中心部に注入した。対照区には同様に培養液(2μ l)のみを注入した。後肢の運動機能の評価は、損傷 8、9、11、14、17、22、29 および 36 日後に行った。損傷 36 日後に脊髄を採取し組織標本作製し、ルクソールファスト青(LFB)染色、免疫組織化学、ならびに HE 染色による組織学的分析を行った。組織学的分析において、再髄鞘化のため、LFB 染色、および免疫組織化学による抗ミエリン塩基性タンパク質(MBP)抗体陽性の髄鞘面積比(髄鞘面積/脊髄面積)をそれぞれ定量化した。また、グリア瘢痕の縮小の評価のため、HE 染色によるグリア瘢痕面積比(グリア瘢痕面積/脊髄面積)を定量化した。定量化した各面積比は DFAT 細胞区と対照区で比較検討した後に、運動機能回復との相関性を分析した。

【結果】DFAT 細胞区の脊髄損傷モデルマウスは、対照区と比較して後肢の運動機能が有意に改善した。損傷 36 日後における LFB および MBP 陽性の髄鞘面積比は、いずれも対照区に比べて DFAT 細胞区で有意に高かった。運動機能と LFB および MBP 陽性の髄鞘面積比における相関性を調べると、いずれも有意な正の相関を示し、それぞれの相関係数は 0.8106 および 0.7937 とほぼ一致した。また、損傷 36 日後におけるグリア瘢痕面積比は、対照区に比べて DFAT 細胞区で有意に低かった。運動機能とグリア瘢痕面積比における相関を調べると、有意な負の相関を示し、相関係数は -0.6414 であった。損傷 36 日後の運動機能と髄鞘面積比およびグリア瘢痕面積比の各相関係数を比較すると、再髄鞘化の指標である LFB および MBP の髄鞘面積比の相関係数はグリア瘢痕の縮小の指標であるグリア瘢痕面積比に比べていずれも高い値を示した。さらに、損傷 36 日後の脊髄損傷部位において、移植した DFAT 細胞が観察された。損傷した脊髄内の DFAT 細胞は、神経幹前駆細胞と成熟オリゴデンドロサイトのマーカーを発現していた。さらに、DFAT 細胞はリング状の形態で MBP を発現するとともに、ニューロンマーカー陽性の細胞を被鞘する形態を示した。また、損傷脊髄内の DFAT 細胞はニューロン、アストロサイト、および神経栄養因子のマーカーを発現することも示された。

【結論】脊髄損傷モデルマウスに移植された成熟脂肪細胞由来の DFAT 細胞は、脊髄損傷部位におけるグリア瘢痕の縮小とともに、主に再髄鞘化に寄与することにより運動機能の回復を促進することが明らかとなった。また、脊髄損傷モデルマウスに移植した DFAT 細胞は、神経系細胞へ分化転換する直接作用と、神経栄養因子を放出する間接作用の両方の作用をもつことが示唆された。

腎症に対する DFAT 細胞移植の効果と機序の検討

○丸山 高史¹⁾、福田 昇¹⁾³⁾、渡辺 めぐみ¹⁾、阿部 雅紀¹⁾、上野 高浩¹⁾、松本 太郎²⁾、遠藤 守人⁵⁾、
岡田 一義¹⁾、松本 紘一¹⁾、相馬 正義¹⁾³⁾、河内 裕⁶⁾

¹⁾ 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、²⁾ 日本大学医学部機能形態学系 細胞再生・移植医学分野

³⁾ 日本大学大学院総合科学研究科生命科学、⁴⁾ 日本大学医学部内科学系総合内科学分野

⁵⁾ 八戸大学人間健康学部人間健康学科、⁶⁾ 新潟大学医歯学総合研究科附属 腎研究施設 分子病態学分野

【目的】皮下脂肪を脱分化させたDFATは本学で開発され、間葉系幹細胞(MSC)と同等の多分化能を有し細胞移植治療の移植細胞源として期待されている。最近 MSC 移植に GVHD 等への免疫抑制作用が知られている。今回、DFAT 移植の免疫性腎炎モデルである MoAb1-22-3 誘発腎炎と非免疫性腎症であるアドリアマイシン腎症ラットに DFAT 移植を行い、腎障害に対する効果を検討した。【方法】雌性 Wistar ラットに蛍光ラベル DFAT を移植して 1 週間後に体内分布を検討した。MoAb1-22-3 誘発腎炎及びアドリアマイシン腎症ラットに腎動脈と尾静脈から 10^6 個/頭の DFAT を投与しその効果を検討した。【結果】DFAT 移植 1 週間後に腎動脈投与では DFAT は糸球体に、尾静脈投与では肺に存在していた。DFAT 移植 1 ヶ月後に MoAb1-22-3 抗体による尿蛋白量、血清 BUN、Cr 値、GIS、TIS が有意に改善、特に DFAT 全身投与する尾静脈移植でより改善していた。DFAT 移植後脾臓内の T_{reg} の割合は有意な変化を観なかった。DFAT 全身移植にて腎内 TSG-6 および TNF- α mRNA 発現は有意に上昇していた。また MoAb1-22-3 誘発腎炎において腎内の増加した IL-6 と IL-12 β を有意に抑制した。DFAT 全身投与群において移植 1 日後の血清中 TSG-6 濃度はコントロール群より有意に上昇していた。in vitro では DFAT に TNF- α を添付 1 日後、培養上清中 TSG-6 濃度は有意に上昇した。線維芽細胞でも上昇したが、添付前後共に DFAT が有意に高値であった。DFAT と SHR-SP のメサングウム細胞をトランスウエルで両者を培養した場合、TSG-6 の細胞内発現は単独培養よりも有意に亢進していた。一方アドリアマイシン腎症において移植による効果は認められなかった。【結論】MoAb1-22-3 誘発腎炎への DFAT 細胞移植治療は特に全身投与群で有効であり、移植群で体内の TSG-6 の発現が亢進していたこと、一方アドリアマイシン腎症では移植効果がなかったことや前述の in vitro の結果より間葉系幹細胞の性質を有する DFAT の TSG-6 を中心とした全身の免疫調整作用が腎不全改善の機序として考えられた。

脱分化脂肪細胞を用いた iPS 細胞への誘導検討

○橋本 真¹⁾、小沼 憲祥¹⁾、後藤 俊平¹⁾、益子 貴行¹⁾、大橋 研介¹⁾、越永 従道¹⁾、加野 浩一郎²⁾、松本 太郎³⁾

¹⁾日本大学医学部外科学系小児外科学分野、²⁾日本大学生物資源学部応用生物科学科、

³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】iPS細胞の樹立は、ヒトES細胞の研究を急速に進めるだけでなく、体細胞からの脱分化が可能であることを示した。我々は手術で破棄される成熟脂肪細胞を用いて脱分化脂肪細胞(DFAT: dedifferentiated fat cell)を開発した。DFAT は間葉系幹細胞の表面マーカーとほぼ一致したプロファイルを持ち、多分化能を持つことから前駆脂肪細胞として研究を行っている。そこで、今回はヒト DFAT から iPS 細胞への誘導を試みた。

【目的】ヒト DFAT に KLF4, c-Myc, Oct3/4, Sox2 を遺伝子導入することで iPS 細胞への誘導を行い、体細胞(線維芽細胞)と誘導効率を比較し、DFAT の有用性を検討する。

【方法】ヒト DFAT は、手術で破棄された脂肪から作製し、線維芽細胞である HDF 株、BJ 株を対照とした。初期化因子の導入は、Dynavec 社のセンダイウイルスを用いた。誘導効率は、ALP 染色で比較検討し、樹立した iPS 細胞に対して未分化マーカーの確認を行った。

【結果】ヒト DFAT を用いて iPS 細胞を誘導することが可能であった。さらに ALP 染色より、ヒト DFAT では遺伝子導入後 11 日目からコロニーが出現し、17 日目の平均コロニー数は、ヒト DFAT で 211 個(誘導効率 $211/3 \times 10^4 \doteq 0.7\%$)、HDF で 93 個(誘導効率 $93/3 \times 10^4 \doteq 0.3\%$)であった。また、ヒト DFAT から誘導した iPS 細胞は未分化マーカーである Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60 が強陽性であった。

【結論】ヒト DFAT では、HDF 株や BJ 株と比較し、iPS 細胞樹立までの期間が短かく、誘導効率が高いことが示唆された。

ビタミン D シグナルによる成熟脂肪細胞の脱分化抑制

○石澤 通康¹⁾、水島 優介^{1,2)}、風間 智彦³⁾、松本 太郎³⁾、池田 和正²⁾、槇島 誠¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野、²⁾ 日本大学生物資源科学部生命科学専攻、

³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】 リガンド依存性転写因子であるビタミン D 受容体(Vitamin D receptor ; VDR)は、生体内カルシウム恒常性維持に重要な活性型ビタミン D の受容体であり、核内受容体スーパーファミリーの一種である。核内受容体の中には iPS 細胞へのリプログラミングにおいて、山中因子の代わりにはたらく分子も報告されている。近年、活性型ビタミン D が前駆脂肪細胞の分化を促進することや、VDR 欠損マウスでは脂肪蓄積が少ないという特徴が見られるなど、ビタミン D-VDR シグナルの脂肪細胞分化への影響が示唆されている。脂肪組織より成熟脂肪細胞(mature adipocyte; MA)を単離、天井培養することで多分化能を有する脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell ; DFAT)が作製できる。しかし、胚性幹細胞や iPS 細胞に比べ、DFAT の脱分化メカニズムには不明な点が多い。本研究では、DFAT の脱分化過程におけるビタミン D-VDR シグナルの影響を検討した。

【方法】 C57BL/6J 野生型マウスの皮下脂肪より MA を単離し、天井培養することで DFAT を作製した。天井培養の際に 100nM になるように活性型ビタミン D₃(1,25D3)を添加し、7 日後の脱分化過程の細胞数の測定と、RNA 抽出を行った。脱分化後の DFAT にも同様に活性型ビタミン D を処理し、生細胞数測定(MTT assay)、RNA 抽出を行った。次に、野生型マウス及び VDR 欠損マウスの MA を単離し、DFAT を作製した。天井培養一週間後の細胞より RNA を抽出した。抽出した RNA より RT-PCR 法にて脂肪分化マーカー、山中因子、未分化マーカーの発現評価を行った。

【結果】 1,25D3 添加培地では、DFAT に脱分化する細胞数が少なかった。天井培養一週間後の細胞において、脂肪細胞のマーカー分子である peroxisome proliferator activated receptor γ 2 (Ppar γ 2)、CCAAT-enhancer-binding protein α (C/ebp α)、C/ebp β の mRNA レベルは、MA に比べて減少が認められた。1,25D3 添加培地ではこれら脂肪細胞マーカー分子の発現減少が軽微であった。VDR 欠損マウスにおいても、天井培養一週間後で、野生型マウスと同様に脂肪分化マーカーの発現レベルが減少したが、播種する成熟脂肪細胞における脂肪分化マーカーの発現レベルは野生型よりも低かった。山中因子及び Nanog は、脱分化過程で発現減少し、活性型ビタミン D によってその減少が軽減した。VDR 欠損マウスでは、各遺伝子の発現変動がそれぞれ異なった。培養から 2 週間が過ぎると、DFAT はフラスコを反転して通常培養が可能な DFAT になる。DFAT に対して 100nM 1,25D3 を処理し、生細胞数への影響を検討したところ、細胞増殖の抑制が示唆された。また、脂肪分化マーカー分子は、1,25D3 処理によって軽微な発現増加が認められた。

【結論】 本研究より、VDR は MA の DFAT への脱分化過程を抑制すること、山中因子は脱分化に必要な因子ではないことが示唆された。本研究成果は DFAT を応用した再生医療や、細胞の脱分化メカニズム解明において有用な情報となりうる。

脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)応用した歯周組織再生の臨床応用に向けて

○秋田 大輔¹⁾、加野 浩一郎²⁾、田村 瑛子³⁾、真下 貴之⁴⁾、鶴町 仁奈³⁾、新井 嘉則⁴⁾、山中 克之⁵⁾、金子 正⁵⁾、塩野目 桃子⁶⁾、月村 直樹¹⁾、松本 太郎⁷⁾、磯川 桂太郎⁸⁾、石上 友彦¹⁾、本田 雅規⁸⁾

¹⁾日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座、²⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室、

³⁾日本大学歯学部歯科矯正学講座、⁴⁾日本大学歯学部、⁵⁾株式会社ジーシー研究所・生体材料開発グループ、

⁶⁾日本大学歯学部小児歯科講座、⁷⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

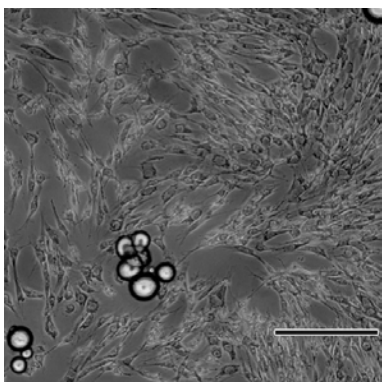
⁸⁾日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座

【目的】近年、歯周炎や外傷など種々の原因で破壊された歯周組織の再生に生体材料と組み合わせた間葉系幹細胞移植治療が有望視されている。歯周組織再生の移植細胞源として有用と考えられている骨髄や歯根膜由来の幹細胞は細胞の採取に制限が伴うため、口腔領域から低侵襲に採取可能で、in vitro で必要な細胞数が調整可能な細胞源が模索されている。脂肪組織中の成熟脂肪細胞分画から調整される脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)は、高い増殖能と多分化能を示すことから、ラットに作製した歯周組織欠損を応用し、DFAT 細胞の歯周組織再生能を検討した。

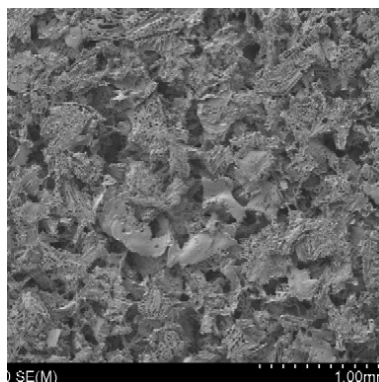
【方法】F344 ラット皮下脂肪組織を酵素処理した後に成熟脂肪細胞分画を採取し、天井培養することで DFAT 細胞を調整した。ラット左側下顎臼歯部頰側に歯周組織欠損(縦 2 mm × 横 3 mm × 深さ 1 mm)を外科的に作製し、DFAT 細胞を PLGA に播種した実験群と PLGA のみを移植した対照群に対して、micro-CT 撮影による欠損部の硬組織再生過程を検討した。また移植 5 週後の下顎骨を摘出し、第 1 臼歯中央根および遠心根部の歯周組織再生能を組織学的に評価した。さらに、蛍光標識させた DFAT 細胞を乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)ブロックに播種して歯周組織欠損部に移植し、移植 5 週間における再生組織中の細胞局在部位を解析した。

【結果】micro-CT による経日的観察から、移植を行った両群には、歯根吸収や骨性癒着することなく、欠損部の硬組織形成が認められた。定量解析の結果、移植 5 週後の実験群の硬組織再生量は対照群よりも有意に高い傾向を示した。組織学的解析から、両群において担体基質の残存と新生骨組織およびセメント質様組織の形成に加えて、再生した硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められた。実験群における第 1 臼歯中央根および遠心根の新生セメント質様組織上には、対照群よりも太く発達した線維束が観察された。また蛍光標識された DFAT 細胞は歯根膜組織中に多数散在しているほか、一部の細胞は新生セメント質と新生骨中に認められた。

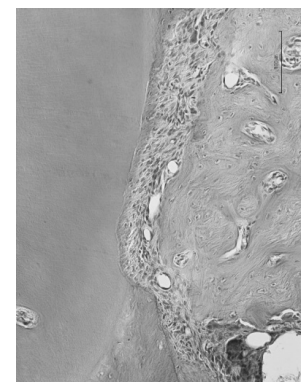
【結論】DFAT 細胞と PLGA ブロックの複合体は、歯槽骨、セメント質様組織および歯根膜様組織の再生を促進することから歯周組織再生に有用であることが示唆された。



ラット皮下脂肪由来 DFAT 細胞



PLGA ブロック SEM 像



DFAT 細胞移植後の歯周組織像

脱分化脂肪細胞(DFAT)における血管新生効果の検討

渡邊 拓史¹⁾、萩倉一博²⁾、高橋昌里¹⁾、松本太郎²⁾

¹⁾ 日本大学医学部小児科学系小児科学分野

²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

治療的血管新生において、現在は骨髄単核球細胞や間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)などの移植による細胞治療の可能性が期待され、臨床研究も開始されている。一方で、MSC とほぼ同じ細胞プロファイルを持つ脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)の血管新生メカニズムにおいて、血管内皮細胞にどのような作用を与えるかについては十分に解明されていない。本研究では、green fluorescent protein(GFP)標識 DFAT または GFP 標識脂肪組織由来幹細胞(adipose-derived stem cell: ASC)を血管内皮細胞と共培養する事により、細胞間相互作用による血管内皮細胞の遊走能や増殖能、管腔形成能の変化を比較検討した。さらに血管内皮細胞との共培養により、DFAT が血管構成細胞の1つであるペリサイトへ分化する可能性について ASC と比較して検討した。その結果、DFAT は血管内皮細胞に作用し、その細胞増殖能、遊走能、管腔形成能を促進する事が明らかになった。また、血管内皮細胞との直接および間接的共培養によりペリサイトへ分化する可能性が示唆された。一方、ASC は血管内皮細胞に対し DFAT と同等の細胞増殖能・管腔形成能を示すが、細胞遊走能は低い事が明らかになった。また、ASC のペリサイトへの分化能は、DFAT に比べ高くない事が示唆された。この結果より DFAT は治療的血管新生における有用な治療用細胞ソースとなりうる可能性があることが示された。今後、ASC と DFAT の in vivo における血管新生効果を直接比較する前臨床試験を行い、両者の治療用細胞としての有用性を評価する必要がある。

新規持続性腹圧性尿失禁モデルと脱分化脂肪細胞移植による排尿機能改善の効果

○村田 保貴¹⁾、大日方 大亮¹⁾、井門 祐一郎¹⁾、高橋 悟¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】ラット膀胱拡張(VD)モデルは腹圧性尿失禁の一般的なモデルであるが、可逆的であり短期間で回復するため、長期的な評価は困難である。近年両側卵巣摘除(OVX)によるラット閉経モデルを作製すると、長期的な腹圧性尿失禁が発症することが報告されている。今回 VD に OVX を併用することで、早期から評価可能な、長期的評価の出来る腹圧性尿失禁動物モデルを作成し、それを用いて括約筋障害に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)の移植効果を検討した。

【方法】実験動物は 200g 雌 SD ラットを用いた。VD は 10Fr 尿道カテーテルを腔内に挿入し、3ml 固定で 3 時間留置した。OVX は下腹正中切開し、両側卵巣を摘出した。VD、OVX 併用群(VD+OVX 群, n=12)、VD 単独施行群(VD 群, n=12)、OVX 単独施行群(OVX 群, n=12)、非処置群(Control 群, n=12)を作成した。傷害 2, 4, 6 週間後に各群 4 匹ずつ、膀胱内圧カテーテルにて Leak point pressure (LPP)を測定した後、膀胱尿道を摘出し組織学的に評価した。また、その動物モデルを用いて、DFAT 移植群(n=7)、細胞 Control として Fibroblast 群(n=7)に分け、VD+OVX 処置後尿道に各細胞を移植し、6 週間後に LPP を測定した後、膀胱尿道を摘出し組織学的に評価した。

【結果】VD 群は、Control 群に比べ 2 週目に LPP 低下を示したが、4, 6 週目には改善した。VD+OVX 群は 2 週目より低下を認め、4, 6 週目においても他群に比べ有意に低値を示した。また、6 週間後における尿道周囲組織の菲薄化は VD+OVX 群で最も顕著であった。DFAT 移植群は Fibroblast 群に比し、LPP で有意な改善を認め、同様に尿道周囲組織の菲薄化が改善された。

【結論】VD+OVX モデルは早期より傷害を認め、6 週間の LPP の低下と組織傷害が維持された。早期より評価可能な、より長期的評価ができる腹圧性尿失禁モデルであることが示唆された。この動物モデルに対し DFAT 移植より、LPP と尿道組織修復の改善効果を示した。

成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞DFATの発明と展望

加野 浩一郎

日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

イモリなどの有尾両生類では、四肢や尾を失うと損傷を受けた部位の分化細胞が脱分化し、分化転換することによって組織(器官)を再生することが知られている。一方、哺乳類では、有尾両生類のように終末分化した細胞が脱分化し、分化転換することはないと考えられている。したがって、哺乳類では損傷部位の幹細胞や前駆細胞が組織を修復すると考えられている。哺乳類における損傷部位の修復は「治癒」であり、損傷前と同一の組織を再生することはない。有尾両生類のように完全に再生する組織は、肝臓や骨格筋などに限定されており、有尾両生類のような再生機構はもたないと考えられている。この再生能力の違いは明らかではないが、多能性をもつ幹細胞および前駆細胞の量的な違いに起因すると推察されている。哺乳類の幹細胞は、組織を構成する細胞の新陳代謝を担っている。成体では、細胞の新陳代謝がゆっくりと起こるので、組織中に含まれる幹細胞の数は少なく、また幹細胞の増殖速度は前駆細胞に比べると著しく遅いことが知られている。したがって、哺乳類では組織が大きく損傷すると再生に必要な幹細胞および前駆細胞が不足することになる。一方、有尾両生類では損傷部位の分化細胞が脱分化して、増殖および多能性をもつ再生芽細胞となって集まり、再生芽を形成する。これは付加形成と呼ばれ、有尾両生類では分化細胞が脱分化することによって幹細胞や前駆細胞を大量に供給する仕組みをもつ。もし、哺乳類の終末分化した細胞においても、有尾両生類のように脱分化を誘導し、多能性細胞へと分化転換させることができれば革新的な医療技術になると考えられる。

我々は、終末分化した成熟脂肪細胞を体外培養し、自発的に脱分化させることによって、種々の分化細胞に分化転換する脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated Fat cell; DFAT)を樹立した。このことは、哺乳類の終末分化した細胞においても自発的に脱分化し、種々の細胞に分化転換する能力をもつことを強く示唆している。間葉系幹細胞を用いた再生医療は、成体の組織に僅かに存在する幹細胞を採取し、それらの幹細胞を培養して増やして移植するのが基本構想である。それに対して、我々は分化細胞を自発的に脱分化誘導し、間葉系幹細胞に類似した多能性細胞を簡便かつ大量に作製し、損傷部位に移植しようとする独自の構想に基づいた研究開発が本プロジェクトにおいて推進されている。本講演では、DFAT細胞の発明における着想から樹立に至るまでを紹介することによって、DFAT細胞の独自性の基盤となっている「脱分化と分化転換」について理解を深めてもらうとともに、今後の展望について概説し、議論したいと考えている。

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 27 年度 研究成果公開シンポジウム

日時：平成 28 年 3 月 5 日(土) 10:00～15:00

場所：日本大学医学部リサーチセンター 4Fホール

プログラム

1. 開会の挨拶 (10:00~10:05)

2. 成果発表 午前の部 (10:05~12:00) 発表 12分・討論 5分

①受動喫煙ラットにおける脱分化脂肪細胞(DFAT)の静脈内投与による椎間板変性抑制効果の検討

宮方啓行、小山公行、風間智彦、徳橋泰明、松本太郎

②幹細胞移植治療のための細胞キャリアの開発

三浦大輝、松本太郎、野呂知加子

③成熟脂肪細胞の大きさの違いによる DFAT 細胞の特性の検討

鶴町仁奈、秋田大輔、松本太郎、加野浩一郎、外木守雄、磯川桂太郎、清水典佳、本田雅規

④心膜脂肪由来脱分化脂肪細胞の心筋分化能の検討

遠山一人、風間智彦、加野浩一郎、平山篤志、松本太郎

⑤脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用細胞製造と細胞治療への応用

山元智衣、風間智彦、谷口浩章、長岡悠紀、菊田晋祐、徳橋泰明、松本太郎

⑥脱分化脂肪細胞を細胞源とした iPS 細胞誘導の検討

橋本真、小沼憲祥、後藤俊平、風間智彦、加野浩一郎、益子貴行、大橋研介、越永従道、松本太郎

3. 休憩 (12:00~13:00)

4. 成果発表 午後の部 (13:00~14:00) 発表 12分・討論 5分

⑦免疫性腎炎に対する DFAT 細胞移植によつ TSG-6 を介した免疫抑制作用

丸山高史、福田昇、松本太郎、渡辺めぐみ、阿部雅紀、上野高浩、遠藤守人、岡田一義、松本紘一、相馬正義、河内裕

⑧脱分化脂肪細胞(DFAT)の血管壁細胞分化

萩倉一博、渡邊拓史、後藤俊平、小沼憲祥、松本太郎

⑨終末分化した体細胞の自発的な脱分化および多能性獲得機構の解明

～ブタ卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得～

沖嘉尚、加野浩一郎

5. 特別講演 (14:00~15:00)

脂肪細胞の増殖と分化、およびメタボリック・シンドロームと脂肪細胞

国際医療福祉大学・病理学 杉原 甫 先生

6. 閉会の挨拶 (15:00~15:05)

受動喫煙ラットにおける脱分化脂肪細胞(DFAT)の静脈内投与による

椎間板変性抑制効果の検討

宮方 啓行¹⁾、小山 公行¹⁾、○風間 智彦²⁾、徳橋 泰明¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】我々は成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cell: DFAT)が高い増殖能と間葉系細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)と同等の多分化能を示すことを報告してきた。最近では腎障害ラットモデルに DFAT を静脈内投与することで TSG-6 を介した抗炎症作用を示すことが報告されている。さらに、当整形外科教室では受動喫煙ラットモデルを用いて喫煙によって椎間板変性が惹起されることを報告している。これらを踏まえ、今回我々は自動喫煙装置により椎間板変性を誘導したラットに対し DFAT を静脈内投与することで椎間板変性を抑制する可能性について検討した。

【方法】計 12 頭の SD ラット(8 週齢)を 2 群(DFAT 群または PBS 群、各群 n=6)に分け、自動喫煙装置でタバコを受動喫煙させた。DFAT 群はラット DFAT (1 × 10⁶ 個/500 μl PBS)を、PBS 群は 500 μl PBS を喫煙開始時より静脈内投与した。受動喫煙 8 週間後に両群の腰椎椎間板髓核を摘出し、プロテオグリカン量の測定と、腰椎椎間板髓核を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法にて各種グリコサミノグリカン、コラーゲン、炎症関連サイトカインの遺伝子発現を検討した。

【結果】椎間板髓核中のプロテオグリカン量は健常ラット(Control 群)に比べ喫煙ラット(PBS 群)で減少していた。DFAT 群は PBS 群に比較して髓核中のプロテオグリカン量の増加が認められた。遺伝子発現解析では、DFAT 群は PBS 群に比べ髓核の SOX9、アグリカンの有意な発現増加が認められた。

【結論】受動喫煙ラットに DFAT を静脈内投与することにより椎間板変性の進行が抑制されることが示唆された。DFAT を用いた細胞治療は、椎間板変性症に対する治療戦略となりうる可能性がある。

幹細胞移植治療のための細胞キャリアの開発

三浦 大輝¹⁾、松本 太郎²⁾、○野呂 知加子²⁾

¹⁾日本大学大学院生産工学研究科、²⁾日本大学生産工学部応用分子化学科、

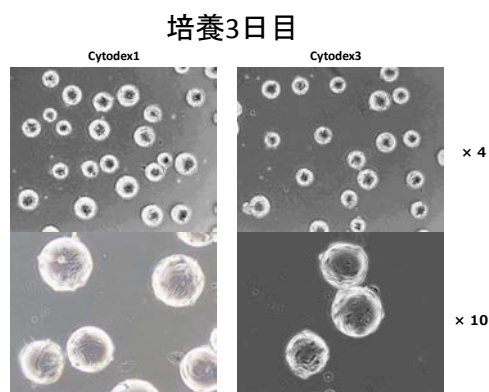
³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell :MSC) は、自身が骨・軟骨・平滑筋・脂肪等に分化するだけでなく、組織の再生力を高める効果のあるタンパク質等を分泌することから、細胞再生移植医療の材料として注目されている。MSC を損傷部位付近に導入移植し、細胞から分泌される増殖因子等により損傷組織の再生力を高める手法はすでに検討されているが、細胞を散逸させずに導入局所に長時間留めることが重要となるため、何らかの担体に細胞を結合させて移植の方が効率的である。哺乳類の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養法で脱分化させることによって得られる DFAT (dedifferentiated fat cell) は、MSC の持つ高い増殖能と多分化性および増殖因子等の分泌活性が備わっている。本研究では、DFAT による細胞移植治療のために、細胞培養担体(マイクロキャリア)材料の検討とその評価を行った。

Cytodex 1 および 3 (GE ヘルスケアサイエンス) 培養担体ビーズを用いた。Cytodex 1 は、表面に N-N-diethyl amino ethyl group の試薬が用いられ、軽度の正電荷を有する。Cytodex 3 は、Cytodex 1 の表面にコラーゲンがコーティングされている。Cytodex は PBS で膨潤後、PBS で洗浄し培養に使用した。DFAT 懸濁液 (2×10^5 cells/ml) 中に膨潤した Cytodex を加えて接着させた後、20~60rpm の攪拌、インキュベータ内 (37°C、CO₂ 濃度 5%) で 7 日間培養 (DMEM + 10% 牛血清 FBS + 1% PS) し、Cytodex 1 および Cytodex 3 の細胞保持能力 (核染色 Hoechst 33342)、細胞の増殖活性 (Ki67)、アポトーシスの有無 (Tunel 法) について検討した。

位相差顕微鏡観察および核染色により、Cytodex 1 および 3 上に細胞が接着していることが確認された。培養 4 日目では、増殖中の細胞に発現する Ki67 はどちらの Cytodex の場合も陽性であり Tunel は陰性であったことから、細胞が Cytodex 上で増殖していること、アポトーシスは起こっていないことが明らかになった。培養 7 日目になると、担体上の細胞数が減少しており、細胞の担体からの離脱が示唆された。この現象は Cytodex 3 よりも 1 で顕著であった。

以上の結果より、Cytodex 1 および 3 は DFAT の細胞移植治療時の担体になり得ることがわかった。担体に結合させる細胞数、担体からの細胞の離脱等について、今後さらに検討を行う。また他の担体についても同様に検討を行う。



Cytodex 上の DFAT 細胞

成熟脂肪細胞の大きさの違いによるヒト DFAT 細胞の特性の検討

鶴町 仁奈¹⁾、○秋田 大輔²⁾、松本 太郎³⁾、加野 浩一郎⁴⁾、外木 守雄⁶⁾、磯川 桂太郎⁵⁾⁶⁾、清水 典佳¹⁾⁶⁾、本田 雅規⁷⁾

¹⁾日本大学歯学部歯科矯正学講座、²⁾日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座、

³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、⁴⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科

⁵⁾日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座、⁶⁾日本大学歯学部総合歯学研究所、⁷⁾愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座

【目的】脂肪組織から単離できる成熟脂肪細胞を天井培養することで非対称分裂にて現われる脱分化脂肪細胞は高い増殖能と多分化能を有することが報告されている。従来、成熟脂肪細胞の大きさは約 60～100 μm と示されていたが、近年、40 μm 未満の大きさの脂肪細胞の存在も確認された。しかしながら、成熟脂肪細胞の大きさと脱分化脂肪細胞への脱分化について検討した報告はこれまでにない。そこで、本研究では、脂肪細胞の大きさに着目した脱分化脂肪細胞の特性を検討することを目的に以下の研究を計画した。

【材料および方法】ヒト頬脂肪体をコラゲナーゼ溶液で酵素処理後、遠沈管上部に浮遊した細胞画分を回収後、セルストレーナーにて 40 μm 未満と 40～100 μm の大きさの細胞画分に分取し、Adipored/Hoechst 染色にて、脂肪細胞以外の細胞が含まれていないことを確認した。次に、両大きさに分取した細胞画分を天井培養すると、線維芽細胞様細胞が観察できたので、その特性を解析するために遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能について検討した。

【結果および考察】40 μm 未満の成熟脂肪細胞画分から出現した脱分化脂肪細胞は、40～100 μm の成熟脂肪細胞画分から出現した脱分化脂肪細胞に比較して、CD146 陽性細胞の割合は約 2 倍高かった。また、同細胞は骨芽細胞誘導において誘導 3 および 5 日目に 40～100 μm の成熟脂肪細胞画分から出現した脱分化脂肪細胞に比較して、有意に高いアルカリフォスファターゼ活性を示し、7 日目において有意に多いカルシウム沈着量を認めた。

【結論】本研究より、40 μm 未満の成熟脂肪細胞画分からも脱分化脂肪細胞が獲得できる事が確認された。また、成熟脂肪細胞の大きさを分取し、40 μm 未満の成熟脂肪細胞画分から脱分化脂肪細胞を獲得する事で、従来よりも有意に早く骨芽細胞へ分化する脱分化脂肪細胞を獲得できる事が明らかとなった。

心膜脂肪由来脱分化脂肪細胞の心筋分化能の検討

遠山 一人¹⁾、○風間 智彦²⁾、加野 浩一郎³⁾、平山 篤志¹⁾、松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部内科学系循環器内科学分野、²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科

【目的】ブタの心膜脂肪組織、及び皮下脂肪組織から脂肪細胞を単離し、脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)を調製した。心膜脂肪由来 DFAT(Pericardial DFAT: PC-DFAT)、および皮下脂肪由来 DFAT(Subcutaneous DFAT : SC-DFAT)の分化指向性を in vitro で比較検討した。【方法】調整した PC-DFAT、及び SC-DFAT より、1. 脂肪、骨、軟骨、平滑筋への分化誘導実験、2. 新生児ラット心筋細胞との直接的、間接的共培養を行いリアルタイム RT-PCR 法での評価、3. 新生児ラット心筋細胞との直接的共培養を行い、心筋分化マーカーの免疫蛍光染色での評価、を行った。【結果】1. PC-DFAT、SC-DFAT はいずれも脂肪、骨、軟骨、平滑筋への分化誘導を認めた。2. PC-DFAT は SC-DFAT より、GATA4 の発現が有意に高かった($P < 0.01$)。SOX9、PPAR γ では SC-DFAT は PC-DFAT より高発現を認めた($p < 0.05$)。3. 心筋特異的蛋白質は PC-DFAT でより発現が強かった。また、PC-DFAT では自律的拍動が多く観察された。【考察】心膜脂肪に由来する DFAT が心筋細胞へ分化指向性があることが明らかとなった。DFAT は MSC に共通の多分化能を有するとともに採取部位に特異的な分化指向性を示すことが示唆された。

脱分化脂肪細胞 (DFAT) の臨床用細胞製造と細胞治療への応用

○山元 智衣¹⁾、風間 智彦¹⁾、谷口 浩章¹⁾、長岡 悠紀¹⁾、菊田 晋祐²⁾、徳橋 泰明²⁾、松本 太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、²⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野

我々は、JST 大学発新産業創出プログラム START 事業の一環として、ヒト脂肪細胞から脱分化脂肪細胞 DFAT の Good Manufacturing Practice (GMP) 製造方法を開発した。DFAT は MSC (間葉系幹細胞) 同様、組織を構成する細胞の活性に必要な分泌物質を効果的に分泌することで壊れた組織の自己治癒 (抗炎症) を促すと同時に体を構成する様々な組織に分化する細胞で、再生医療用の細胞技術として注目されている。現在までに、日本大学医学部リサーチセンターにあるセルプロセッシングセンターの GMP 製造施設適応への整備を行い、基礎研究で確立した方法を再生医療新法・薬事法改正成立にともなう規制・ガイドライン等に準拠したものに改良段階である。特にコストダウン、GMP 製造工程の簡略化と品質管理のしやすさを目的に、最適培養条件を整えるとともに、GMP 製造技術・品質管理技術、SOP の開発と確立、そして前臨床試験用の DFAT の GMP 製造を行っている。また、品質管理のためのマーカー開発、患者の皮下脂肪組織より低侵襲的、無菌的に脂肪組織を簡便に採取することができる DFAT 採取用キットや一貫した細胞調製システムの開発も同時に行っている。こうした安価で安全な標準化された細胞製剤の製造供給方法を開発することで、クリニック規模の病院でも特別な設備投資等をおこなうことなく、付加価値の高い細胞治療製品が提供できる可能性が考えられる。近年、国内外において再生医療等製品の臨床応用化が活発に進んでいるが、我々は日本固有の優れた再生細胞治療技術を用いた新しい細胞医薬品・サービスを提案し、ベンチャー企業の設立を目指して現在準備中である。本研究発表会においては、上記 GMP 製造技術だけではなく DFAT の細胞治療への応用のポテンシャルについて議論させていただきたい。

脱分化脂肪細胞を細胞源とした iPS 細胞誘導の検討

橋本 真¹⁾、小沼 憲祥¹⁾、後藤 俊平¹⁾、風間 智彦²⁾、加野 浩一郎³⁾、益子 貴行¹⁾、大橋 研介¹⁾、
越永 従道¹⁾、○松本 太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部外科学系小児外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学生物資源学部応用生物科学科、

【目的】我々は成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)が MSC に類似した形質と多分化能を有することを明らかにし、細胞治療用ソースとして研究開発を行ってきた。今回、ヒト DFAT から初期化因子導入により iPS 細胞の誘導を試みた。そしてその誘導効率や形質を線維芽細胞と比較検討した。**【方法】**ヒト皮下脂肪由来 DFAT、ヒト皮膚線維芽細胞(HDF、BJ)にセンダイウイルスを用いて KLF4, c-Myc, Oct3/4, Sox2 を導入し、ALP 陽性コロニー数を経時的に計測した。また形成されたコロニーを MEF フィーダー上で継代培養し、未分化 ES 細胞マーカーの発現を免疫染色および RT-PCR 法にて検討した。**【結果】**DFAT では HDF、BJ に比べ初期化因子導入後早期より ALP 陽性コロニーの出現が認められる傾向にあった。遺伝子導入 17 日後の ALP 陽性平均コロニー数は、DFAT 211.0 (誘導効率 0.7%) であり、HDF 93.0 (0.3%)、BJ 82.8 (0.3%) に比べ 2 倍以上高値を示した。DFAT 由来 iPS コロニーは免疫染色では Nanog, Oct3/4, SSEA-3, TRA-1-60 強陽性を示し、RT-PCR 法にて検討した未分化 ES 細胞マーカー 25 因子中 19 因子の発現が認められた。**【考察】**DFAT は線維芽細胞に比べ、より効率よく iPS 細胞を調製できる細胞ソースである可能性が示唆された。

免疫性腎炎に対する DFAT 細胞移植による TSG-6 を介した免疫抑制作用

○丸山 高史¹⁾、福田 昇¹⁾³⁾、松本 太郎²⁾、渡辺 めぐみ²⁾、阿部 雅紀¹⁾、上野 高浩¹⁾、遠藤 守人⁵⁾、
岡田 一義¹⁾、松本 紘一¹⁾、相馬 正義¹⁾⁴⁾、河内 裕⁶⁾

¹⁾日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

³⁾日本大学大学院総合科学研究科生命科学、⁴⁾日本大学医学部内科学系総合内科学分野

⁵⁾八戸大学人間健康学部人間健康学科、⁶⁾新潟大学医歯学総合研究科附属腎研究施設分子病態学分野

【目的】本学で開発され間葉系幹細胞と同等の多分化能を持つ DFAT を慢性腎障害モデルラットに移植して効果を検討した。【方法】mAb1-22-3 誘発腎炎およびアドリアマイシン腎症に DFAT を移植、1 カ月後に効果を評価した。移植は他家移植で、その経路は腎動脈又は尾静脈から行った。【結果】DFAT を腎動脈から腎に直接移植した場合、移植 1 週間後の DFAT は腎糸球体の中に存在を確認したが、尾静脈から全身投与した場合、DFAT は腎臓には到達せず、殆どが肺にトラップされていて他臓器には存在を確認出来なかった。mAb1-22-3 誘発腎炎は DFAT を腎へ直接移植するより尾静脈から移植した方がより改善した。その際血清中 TSG-6 濃度は有意に上昇し、腎内 TSG-6 および TNF- α の mRNA 発現は有意に上昇、IL-6 と IL-12 β は抑制されていた。脾臓内の T_{reg} の割合は有意な変化を観なかった。in vitro で DFAT に TNF- α を添付した場合培養上清中 TSG-6 濃度は有意に上昇した。DFAT と SHR-SP のメサンギウム細胞をトランスウエルで共培養した場合、TSG-6 の細胞内発現は単独培養より亢進して培養上清中濃度も上昇していた。DFAT の TSG-6 の発現を siRNA でノックダウンした場合、腎炎改善効果が観られなくなった。また MoAb1-22-3 誘発腎炎に DFAT の細胞移植を自家移植で尾静脈から行った場合、改善効果は他家移植と同等であった。アドリアマイシン腎症では、移植効果は観られなかった。【結論】DFAT 移植による腎炎改善の機序の一つに TSG-6 を中心とした全身の免疫調整作用が考えられ、ANCA 関連腎炎やループス腎炎など予後不良の疾患を始め、自己免疫異常が関係することが多い種々の腎炎に臨床応用出来る可能性が示された。

脱分化脂肪細胞(DFAT)の血管壁細胞分化

○萩倉 一博¹⁾、渡邊 拓史²⁾、後藤 俊平³⁾、小沼 憲祥³⁾、松本 太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、²⁾日本大学医学部小児科学系小児科学分野、

³⁾日本大学医学部外科学系小児外科学分野

【目的】Vascular sprouting から始まる血管新生過程において、壁細胞(pericyte)や血管平滑筋(vascular smooth muscle cell)などの周皮細胞(mural cell)は、血管腔の安定化や微小血管網の構築に重要な役割をしている。成熟脂肪細胞の脱分化によって得られる細胞 DFAT(Dedifferentiated Fat Cell)は、MSC、ASCと同等の多分化能を有する。マウス虚血肢への DFAT 移植では、DFAT から血管新生因子が分泌され血管新生が促進すると共に、移植した DFAT が新生血管の血管壁に接着し、 α -smooth muscle cell actin(ASMA)を発現していることを確認した。そこで今回、DFAT の血管内皮細胞への遊走能及び血管壁細胞への分化能について in vitro で検討した。【方法】1. transwell と 3D gel assay による DFAT 及び血管内皮細胞の遊走能の検討 2. 免疫染色と qPCR による NG2(壁細胞特異的マーカー)及び ASMA の発現解析 3. TGF- β 刺激および SMAD2/3 阻害における DFAT の NG2 発現解析 【結果】1. DFAT の血管内皮細胞への遊走が transwell 及び 3D gel assay で確認された。2. 血管内皮細胞と共培養した DFAT は、NG2 の発現亢進が確認された。3. DFAT の NG2 発現は TGF- β 刺激で促進し SMAD2/3 阻害で抑制された。【結論】脱分化脂肪細胞(DFAT)は血管内皮細胞へ遊走し、TGF- β によって血管周皮細胞へ分化し、新生血管の成熟化に関与する可能性が示唆された。

終末分化した体細胞の自発的な脱分化および多能性獲得機構の解明

～ブタ卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得～

○沖 嘉尚、加野 浩一郎

日本大学生物資源科学部応用生物科学科

我々は、皮下脂肪組織から単離した脂肪細胞に外来遺伝子を導入することなく、自発的に脱分化誘導することによって、均一な増殖および多分化能力をもつ脱分化脂肪細胞(DFAT)を取得する方法を開発した。また、卵巣から単離した卵胞顆粒層細胞から DFAT と類似した特性をもつ卵胞顆粒層細胞由来の多能性前駆細胞(DFOG)の作出にも成功している。しかし、それらの終末分化した体細胞が自発的に脱分化し、多能性獲得するのかについては明らかではない。本研究では、脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得機構の一端を明らかにする目的で行なった。

我々は脱分化前後におけるブタ脂肪細胞(AC)およびブタ卵胞顆粒層細胞(GC)をマイクロアレイ解析し、それらのデータを NCBI Gene Expression Omnibus に公開している(GSE18854)。実験Ⅰでは、異なる機能をもつ AC および GC が脱分化前後において、それぞれ特徴的な遺伝子発現プロファイルをもつのかを明らかにする目的で行なった。AC、GC、DFAT および DFOG の遺伝子発現データを階層的クラスタリングおよび主成分分析を用いて包括的に解析した結果、AC および GC は異なる遺伝子発現プロファイルを示したが、DFAT および DFOG は類似した。ついで、脱分化前後において有意に発現変動する遺伝子群を False Discovery Rate を用いて抽出し、DAVID によって機能解析を行なった。その結果、AC は脂肪酸代謝、GC は卵胞刺激ホルモンの分泌など細胞機能に特異的な遺伝子群の発現が減少し、細胞増殖、細胞接着および創傷治癒などに関連する遺伝子群が共通して増加することが明らかとなった。以上の結果から、AC および GC は体外培養することによって類似した遺伝子発現プロファイルをもつ脱分化細胞になることが明らかとなった。実験Ⅱでは、GC が体外培養過程のどのタイミングで脱分化し、多能性獲得するかを明らかにする目的でマイクロアレイ解析を行なった。階層的クラスタリングおよび主成分分析の結果、遺伝子発現プロファイルは卵胞顆粒層細胞層および単離直後の GC の間では殆ど違いがみられなかったが、単離直後から培養 1 日後に著しく変化し、その後、徐々に培養 7 日後の遺伝子発現プロファイルへと変化した。単離直後および培養 1 日後の GC 間において有意に発現変動する遺伝子群を抽出し、機能解析した結果、細胞接着または細胞形態に関連する遺伝子群が増加し、細胞周期と生殖腺発達に関連する遺伝子群が減少した。以上の結果から、GC は培養皿底面の接着が起こる培養 1 日後に脱分化することが明らかとなった。体細胞が培養皿の底面に接着すると、その刺激によってアクチンファイバーが形成され、それによって細胞形態が変化することが知られている。また、我々はアクチンファイバーの形成が細胞の遺伝子発現を直接的に制御することを明らかにしている。実験Ⅲでは、アクチンファイバーの形成が GC の脱分化を惹起するかを明らかにする目的で行なった。GC は培養 1 日後において培養皿へ接着し、一部の細胞では細胞の伸長が観察され、それに伴って、アクチンファイバーが観察された。また、アクチンファイバーは培養時間の経過に伴って増加した。GC 特異的機能であるアロマトーゼの発現を免疫蛍光染色法を用いて調べた結果、培養 1 日後に大きく減少し、2 日後には消失した。一方、アクチン重合阻害剤である Latrunculin A を添加すると、多くの GC が球状の細胞形態を示し、それらの細胞にアクチンストレスファイバーの形成は観察されなかった。また、アロマトーゼの発現は維持された。以上の結果から、GC の脱分化は培養 1 日後の細胞接着に伴うアクチンファイバーの形成によって惹起されることが示唆された。

脂肪細胞の増殖と分化、および、メタボリック・シンドロームと脂肪細胞

杉原 甫 先生

国際医療福祉大学・病理学

高邦会高木病院・病理部

ヒトで最大量をしめる白色脂肪細胞は脳以外の種々の組織に存在し、主役の細胞の増殖と分化に影響を及ぼしている。この細胞の増殖と分化を培養条件下で検討した。脂肪組織を消化すると、成熟脂肪細胞を単離できるが、液中では浮遊するので培養できない。そこで、我々は、フラスコに100%、培養液を入れて、そこに成熟脂肪細胞を入れて、フラスコの天井面に接着させて培養し得た。脂肪細胞は脱分化して紡錘形になり、活発に増殖し、再び分化した。また、コラーゲンゲルという生理的な基質内で三次元培養をした所、同様の増殖と分化を示した。これらの培養脂肪細胞は培養条件下で、表皮の増殖と分化を促進し、また、腎尿細管上皮など多くの上皮にも影響を与えた。さらに、癌細胞に対しては、多くの場合、増殖を促進させた。培養脂肪細胞の研究を日大の松本太郎先生グループは大きく発展させて、多種細胞への分化を見出された

次に、人体病理学の面から、脂肪細胞を眺めると、メタボリック・シンドロームへの関与となる。ヒトのメタボリック・シンドロームでは、低アディポネクチン血症による動脈硬化症が起こる。アディポネクチンは、動脈にアテローマができる過程を防ぐのであるが、このアディポネクチンが、太ると減るのである。何故、そのようなことが起こるのか、という機序を、メタボリック・シンドロームの際の、過度に肥大した脂肪細胞の形態から説明したい。メタボリック・シンドロームの脂肪細胞は、最密充填形という非常に密に接した形を採るために、脂肪細胞の間を走行する小血管が圧迫され、脂肪細胞を虚血に陥れるのである。虚血に陥った脂肪細胞ではアディポネクチン産生低下が起こる。これがメタボリック・シンドロームの基礎病因ではないかと考えている。また、肥満者で、小血管が圧迫されると高血圧症も引き起すことも示したい。

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 28 年度 研究成果公開シンポジウム

日時:平成 29 年 3 月 11 日 (土) 10:00～15:00

場所:日本大学医学部図書館 3F 大学院ゼミナール室 1

プログラム

1. 開会の挨拶 (10:00~10:05)

2. 成果発表 午前部 (10:05~12:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 槇嶋 誠 (日本大学医学部生体機能医学系生化学分野)

①ヒト吸引脂肪組織からの脱分化脂肪細胞の調製

風間智彦、山元智衣、風間美奈子、長岡悠紀、谷口浩章、萩倉一博、加野浩一郎、相川佳之、松本太郎

②脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用製造と細胞治療への応用

山元智衣、風間智彦、風間美奈子、長岡悠紀、大野聡子、萩倉一博、李 予昕、松本太郎

③同一ドナー由来 DFAT および ASC における血管新生因子の比較検討

長岡悠紀、風間智彦、中村隆広、松本太郎

座長: 野呂 知加子 (日本大学生産工学部応用分子化学科)

④DFAT 細胞による移植治療のための細胞キャリアの開発

三浦大輝、風間智彦、萩倉一博、松本太郎、野呂知加子

⑤ヒト頬脂肪体由来脱分化脂肪細胞調整時の酵素濃度の検討

鶴町仁奈、秋田大輔、加野浩一郎、松本太郎、鳥海 拓、風間智彦、外木守雄、沖 嘉尚、齊藤瑛子、清水典佳、本田雅規

⑥脱分化脂肪細胞(DFAT)移植による免疫性腎炎の改善効果

丸山高史、福田 昇、松本太郎、東 龍英、深澤みゆき、遠藤守人、岡田一義、河内 裕、阿部雅紀

3. 休憩 (12:00~13:00)

4. 成果発表 午後部 (13:00~14:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 加野 浩一郎 (日本大学生物資源科学部応用生物科学科)

⑦成熟脂肪細胞の脱分化による性質変化に対するビタミン D シグナルの影響

石澤通康、風間智彦、松本太郎、槇嶋 誠

⑧培養表皮移植時の脱分化脂肪細胞(DFAT)投与による基底膜構築促進

副島一孝、樫村 勉、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明

⑨下肢虚血モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)自家移植の有効性の検討

河野通成、河内秀臣、前田英明、田中正史、山元智衣、松本太郎

⑩脱分化脂肪細胞(DFAT)に由来するエクソソームの解析と椎間板髄核細胞に対する作用

冨塚孔明、風間智彦、徳橋泰明、松本太郎

5. 特別講演 (14:00~15:00)

座長: 松本 太郎 (日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野)

細胞ファイバ技術が拓く3次元組織形成と細胞治療への展開

東京大学生産技術研究所 教授 竹内 昌治 先生

6. 閉会の挨拶 (15:00~15:05)

ヒト吸引脂肪組織からの脱分化脂肪細胞の調製

○風間智彦¹⁾、山元智衣¹⁾、風間美奈子¹⁾、長岡悠紀¹⁾、谷口浩章¹⁾、萩倉一博¹⁾、加野浩一郎²⁾、相川佳之³⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学、²⁾日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

³⁾湘南美容外科クリニック

【目的】我々は成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)が脂肪組織由来幹細胞(ASC)に類似した多能性を示すことを報告してきた。今回、ヒト吸引脂肪サンプルを用いてDFATを調製し、調製に必要な至適組織量、細胞純度、造腫瘍性の有無などについて検討を行った。**【方法および結果】**美容目的に採取された吸引脂肪組織(約50 ml)から、適量を分注しDFAT調製を試みた。その結果、2mlの脂肪組織から平均 5×10^5 個の成熟脂肪細胞が単離され、培養4週間で 1×10^8 のDFATが調製できることが明らかになった。調製されたDFATのFACS解析では、P0~P3までASC陽性マーカー(CD73, CD90, CD105)の陽性率は90%以上である一方、陰性マーカー(CD31, CD45, HLA-DR)の陽性率は0.1%未満であった。これら陰性マーカーの陽性率は、同一サンプルから調製したASCに比べて有意に低かった。In vitro分化誘導実験にて、調製されたDFATは、脂肪、骨、軟骨への多分化能を示すことを確認した。また軟寒天コロニー形成試験やNOGマウス造腫瘍試験を行った結果、DFATは造腫瘍性を認めなかった。**【結論】**約2mlの吸引脂肪組織から高純度のDFATを大量調製できることが明らかになった。調製されたDFATは造腫瘍性を認めず、ASC同様安全に移植できることが示唆された。DFATは低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞ソースとして期待できる。

脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用製造と細胞治療への応用

○山元智衣、風間智彦、風間美奈子、長岡悠紀、李 予昕、萩倉一博、大野聡子、松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

DFAT は間葉系幹細胞(MSC)同様、組織を構成する細胞の活性に必要な液性因子を効果的に分泌することで、組織修復作用、血管新生作用、免疫制御作用を有する細胞である。また高い増殖能を有し MSC と比べ均一性が高く、わずかな脂肪組織から大量の細胞を調整できることから、実用性の高い再生医療用細胞になり得ると期待できる。特に血管新生に関しては様々な確証が得られており、各種動物モデルを用いた実験では DFAT 移植により、虚血肢に成熟した血管の増加が確認されている。これらのことより DFAT を用いた重症下肢虚血に対する血管新生細胞治療への臨床応用を目指し、基礎研究によって確立した方法を臨床用に改良および品質管理方法を検討している。

再生医療に関しては、平成 26 年 11 月より施行された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(再生医療等安全性確保法)により、提供計画の段階から国への届出が義務付けられている。再生医療に用いる細胞を培養する場合、特定細胞加工物の製造許可申請を行い、細胞培養加工施設ごとに厚生労働省の許可を受けなければならない。

我々は、再生医療安全性確保法に基づく培養施設として、Cell Processing Facility(CPF)の整備および CPF 内に設置されたセルプロセッシング・アイソレーターを用いた離床用ヒト DFAT 作成方法の開発を行い、施設に関しては今年度、「日本大学医学部リサーチセンター CPF」として厚生労働省より再生医療用細胞の特定細胞培養加工施設の許可認定を受け、施設番号を付与された。また、セルプロセッシング・アイソレーターを用いてヒト DFAT の大量培養が可能であることを確認した。

今後、上記 CPF においてセルプロセッシング・アイソレーターを利用した、再生医療安全性確保法下での臨床用 DFAT の製造技術の確立、標準化を行い、早期の臨床応用を目指したい。

同一ドナー由来 DFAT および ASC における血管新生因子の比較検討

○長岡悠紀¹⁾、風間智彦¹⁾、中村隆広²⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態医学系細胞再生・移植医学分野、²⁾日本大学医学部小児科学系小児科学分野

【目的】脂肪組織から調製される脱分化細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) は、高い増殖能と間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) や脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) と同等の多分化能を示すことが報告されている。また、血管新生サイトカインを分泌するため、血管新生治療の有望な細胞源として考えられている。今回は同一ヒト由来の DFAT、ASC を調製し、これらの細胞の血管新生サイトカインについて比較を行った。そしてこれらの細胞の継代数およびドナー年齢が影響するかについて検討した。

【方法】1、種々のドナー年齢 (6 ヶ月～74 歳) のヒト皮下脂肪組織 (n=5) から DFAT, ASC を調製し、その培養上清を継代 2、4、6、8 代目に採取した。各培養上清における vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), hepatocyte growth factor (HGF), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), leptin の濃度を ELISA 法を用いて測定した。2、免疫不全 (SCID) マウス下肢虚血モデルに同一ドナー由来 DFAT, ASC を移植し、血流改善効果をレーザードップラー血流計にて測定した。

【結果】1、HGF の分泌量が ASC に比べ DFAT で高い傾向が認められ、そのほかのサイトカインについても ASC と同等の分泌量が確認された。Leptin の分泌量は高齢者で高い傾向が認められた。また、サイトカイン分泌量は継代 8 代目まで低下しないことが確認された。2、DFAT は ASC と同等の血流改善効果が認められた。

【結論】DFAT は ASC と同様の血管新生療法の効果を持ち、高齢者においても自家移植による治療効果が期待できることが示唆された。

DFAT 細胞による移植治療のための細胞キャリアの開発

○三浦大輝^{1), 2)}、風間智彦²⁾、萩倉一博²⁾、松本太郎²⁾、野呂知加子^{1), 2), 3)}

¹⁾日本大学大学院生産工学研究科、³⁾日本大学生産工学部応用分子化学科、

²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell :MSC) は、自身が骨・軟骨・平滑筋・脂肪等に分化するだけでなく、組織の再生力を高める効果のあるタンパク質等を分泌することから、細胞再生移植医療の材料として注目されている。MSC を損傷部位付近に導入移植し、細胞から分泌される増殖因子等により損傷組織の再生力を高める手法はすでに検討されているが、細胞を散逸させずに導入局所に長時間留めることが重要となるため、何らかの担体に細胞を結合させて移植の方が効率的である。哺乳類の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養法で脱分化させることによって得られる DFAT (dedifferentiated fat cell) は、MSC の持つ高い増殖能と多分化性および増殖因子等の分泌活性が備わっている。本研究では、DFAT による細胞移植治療のために、細胞キャリア材料の検討とその評価を行った。

Cytodex 1 および 3 (GE ヘルスケアサイエンス) 培養担体デキストランビーズを用いた。Cytodex 1 は、表面に N-N-diethyl amino ethyl group の試薬が用いられ、軽度の正電荷を有する。Cytodex 3 は、Cytodex 1 の表面にコーゲンがコーティングされている。Cytodex は PBS で膨潤後、PBS で洗浄し培養に使用した。DFAT 懸濁液 (2×10^5 cells/ml) 中に膨潤した Cytodex を加えて接着させた後、20~60rpm の攪拌、インキュベータ内 (37°C、CO₂ 濃度 5%) で 7 日間培養 (DMEM + 10% 牛血清 FBS + 1% PS) し、Cytodex 1 および Cytodex 3 の細胞保持能力 (核染色 Hoechst 33342)、細胞の増殖活性 (Ki67)、アポトーシスの有無 (Tunel 法) について検討した。

位相差顕微鏡観察および核染色により、Cytodex 1 および 3 上に細胞が接着していることが確認された。培養 5 日目では、増殖中の細胞に発現する Ki67 はどちらの Cytodex の場合も陽性であり Tunel は陰性であったことから、細胞が Cytodex 上で増殖していること、アポトーシスは起こっていないことが明らかになった。培養 7 日目になると、担体上の細胞数が減少しており、細胞の担体からの離脱が示唆された。この現象は Cytodex 3 よりも 1 で顕著であった。以上の結果より、Cytodex 1 および 3 は DFAT の細胞移植治療時の担体になり得ることがわかった。

次に、Cytodex 上の細胞のサイトカイン遺伝子発現について、検討を行った。2 時間、1 日、2 日、4 日間培養したキャリア接着培養細胞をキャリアごと回収し、RNA を抽出した。この RNA を鋳型に cDNA を合成し、qPCR にて 5 種類の血管新生因子 (HGF, VEGF, PDGF-B, TGF- β , hbFGF) 遺伝子発現を測定した。その結果 4 種類 (VEGF, HGF, hbFGF, TGF- β) の遺伝子発現が認められたが、PDGF-B は本実験における培養環境と PCR のサイクル数では観測されなかった。これらの結果は、通常培養時における Hunam-DFAT の結果と同様の傾向であった。移植下組織中など低酸素下では、これらのサイトカインの産生が増強することが知られているので、低酸素培養下での検討がさらに必要である。

一方、生体適合性と生分解性があり、GMP グレードで製造されている PLGA (DL-乳酸-グリコール酸共重合体) ポリマープレート上で、DFAT 細胞が接着、増殖することを確認した。蛍光核染色色素 (NucRed® Live 647 ReadyProbes® Reagent, ThermoFisher) で処理し蛍光顕微鏡画像からセルカウントをしたところ、培養日数増加により細胞数が増加した。さらに、プレートをゼラチンやポリリジンでコーティング処理すると、より細胞が接着しやすくなることが分かった。

ヒト頬脂肪体由来脱分化脂肪細胞調整時の酵素濃度の検討

鶴町仁奈¹⁾、○秋田大輔²⁾、加野浩一郎³⁾、松本太郎⁴⁾、鳥海拓⁵⁾、風間智彦⁴⁾、外木守雄⁶⁾、
沖嘉尚³⁾、齊藤瑛子¹⁾、清水典佳¹⁾、本田雅規⁷⁾

¹⁾日本大学歯学部歯科矯正学講座、²⁾日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座、

³⁾日本大学生物資源科学部動物資源科学科、⁴⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

⁵⁾日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座、⁶⁾日本大学歯学部口腔外科講座、⁷⁾愛知学院大学歯学部口腔解剖学講

【目的】脂肪組織から単離できる成熟脂肪細胞を天井培養することで非対称分裂にて現われる脱分化脂肪(DFAT)細胞は、高い増殖能と多分化能を有することが報告されている。従来、成熟脂肪細胞の大きさは約100 μ m前後と定義づけられていたが、我々は頬脂肪体由来の40 μ m未満の成熟脂肪細胞画分からDFAT細胞を調整する事で、従来よりも有意に早く骨芽細胞へ分化する事を報告した。しかしながら、この小さな成熟脂肪細胞を調整する際の適切な酵素条件に関する報告はこれまでにない。そこで、本研究では、コラゲナーゼ濃度による差異が脱分化脂肪細胞の調整に及ぼす影響について検討することを目的に以下の研究を計画した。

【材料および方法】日本大学歯学部付属歯科病院口腔外科を受診した健常な男女10名からヒト頬脂肪体を摘出し、0.01%、0.02%、0.1%、0.5%コラゲナーゼ溶液に分けて酵素処理後、遠沈管上部に浮遊した脂肪細胞数と直径を測定した。その後、単離された成熟脂肪細胞を天井培養し、DFAT細胞を調整した。1週間後フラスコを反転し、その3日後に継代した際の細胞数を測定した。さらに0.1%と0.02%で酵素処理して調整したDFAT細胞の遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能について検討し、特性を比較した。

【結果および考察】0.02%コラゲナーゼ濃度で酵素処理したグループが他のグループと比較して2.5倍以上の脂肪細胞数が計測され、その多くは直径30 μ m以下であった。また、第一継代のDFAT細胞数は0.02%で酵素処理したグループが最も多かった。さらに、0.02%と0.1%の濃度で調整したDFAT細胞の遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期および脂肪細胞への分化能に有意な差はみられなかったが、骨芽細胞誘導におけるアルカリホスファターゼ活性は0.02%で調整したグループが高い傾向を示した。

【結論】本研究より、0.02%の酵素処理したグループが小さな成熟脂肪細胞を多く獲得できるだけでなく、0.1%で調整したDFAT細胞と差異がなかったことから、至適酵素濃度は0.02%であることが示唆された。一連の結果からDFAT細胞を口腔領域に臨床応用する際の具体的な酵素処理条件が確立された。

脱分化脂肪細胞(DFAT)移植による免疫性腎炎の改善効果

○丸山高史¹⁾、福田 昇¹⁾³⁾、松本太郎²⁾、東 龍英¹⁾、深澤みゆき¹⁾、遠藤守人⁴⁾、岡田一義¹⁾、河内 裕⁵⁾、阿部雅紀¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾ 日本大学大学院総合科学研究科生命科学、⁴⁾ 八戸大学人間健康学部人間健康学科、

⁵⁾ 新潟大学医歯学総合研究科附属腎研究施設分子病態学分野

【目的】本学で開発され間葉系幹細胞と同等の多分化能を持つ DFAT を 3 種類の腎障害モデル動物に移植してその効果を検討した。

【方法】各腎障害モデルに DFAT を移植、1 ヶ月後に腎障害の改善効果を評価した。移植は他家移植で行い、移植経路は DFAT を腎動脈から腎に直接移植する群と、尾静脈から全身投与する 2 群を設けた。

【結果】①抗体を用いて腎症を発症させる MoAb1-22-3 誘発腎炎では、腎動脈群より尾静脈投与群の方がより腎症が改善した。移植により血清中 TSG-6 濃度は有意に上昇し、腎内 TSG-6、TNF- α の mRNA 発現は有意に上昇、IL-6 と IL-12 β は抑制されていた。脾臓内の T_{reg} は有意な変化は無かった。さらに以下の追加実験を行った。in vitro で DFAT に TNF- α を添付すると培養上清中 TSG-6 濃度は有意に上昇した。DFAT と SHR-SP のメサンギウム細胞をトランスウエルで共培養した場合、TSG-6 の細胞内発現は亢進していた。そこで TSG-6 の発現を siRNA でノックダウンした DFAT を腎炎ラットに細胞移植したが、前述した腎炎の改善効果が消失した。また MoAb1-22-3 誘発腎炎に DFAT の細胞移植を自家移植で尾静脈から行った場合、効果は他家移植と同等であった。②免疫反応を腎症の本態としない抗癌剤によるアドリアマイシン腎症では DFAT 細胞移植による腎症改善効果は観られなかった。③ANCA 関連腎炎モデルである SCG マウスに DFAT 細胞移植した場合、血中の TSG-6 の上昇、生存率の改善、尿蛋白改善効果が認められた。

【結論】DFAT の細胞移植は TSG-6 を中心とした免疫調整作用で ANCA 関連腎炎など自己免疫性腎炎に臨床応用出来る可能性がある。

成熟脂肪細胞の脱分化による性質変化に対するビタミン D シグナルの影響

○石澤通康¹⁾、風間智彦²⁾、松本太郎²⁾、槇島 誠¹⁾

¹⁾日本大学医学部生体機能医学系生化学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

[背景]

リガンド依存性転写因子であるビタミン D 受容体(Vitamin D receptor ; VDR)は、血中カルシウム濃度の維持や骨代謝活性化など、生体内カルシウム恒常性維持に重要な活性型ビタミン D の受容体であり、核内受容体スーパーファミリーの一種である。近年、活性型ビタミン D が前駆脂肪細胞の分化を促進することや、VDR 欠損マウスでは脂肪蓄積が少ないという特徴が見られるなど、ビタミン D-VDR シグナルの脂肪細胞分化への影響が示唆されていたことから、本研究では成熟脂肪細胞が脱分化過程において性質変化する際のビタミン D シグナルの影響を検討した。

[方法と結果]

天井培養 1 週間後の成熟脂肪細胞において、脂肪細胞のマーカー分子である peroxisome proliferator activated receptor $\gamma 2$ (Ppar $\gamma 2$)、CCAAT-enhancer-binding protein α (C/ebp α)、C/ebp β の mRNA レベルが減少した。活性型ビタミン D 添加培地ではこれら脂肪細胞マーカー分子の発現減少が軽減された。VDR 欠損マウスにおいても、天井培養 1 週間後で、野生型マウスと同様に脂肪分化マーカーの発現レベルが減少したが、脂肪分化マーカーの発現レベルは野生型よりも低かった。

ブタの成熟脂肪細胞の脱分化過程で発現増加する Fibronectin 1 (Fn1), Platelet-derived growth factor α (Pdgf α), Pdgf β , Integrin $\alpha 5$ (Itg $\alpha 5$)は、マウス成熟脂肪細胞の脱分化過程でも発現増加するが、活性型ビタミン D 添加により、更に発現が増加した。

[結語と展望]

ビタミン D シグナルは脱分化過程において発現低下する分子の発現を軽減するだけでなく、発現増加する分子の発現を促進した。ビタミン D シグナルは脱分化脂肪細胞の性質に影響することが予想されるため、今後は脱分化脂肪細胞の再分化能への検討を加えていく。

培養表皮移植時の脱分化脂肪細胞(DFAT)投与による基底膜構築促進

○副島一孝¹⁾、櫻村 勉¹⁾、風間智彦²⁾、松本太郎²⁾、仲沢弘明¹⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】自家培養表皮(JACE®, J-TEC 社製)は本邦ではじめて認可された再生医療製品であり、広範囲重傷熱傷の治療に対して保険適応となっている。全層皮膚欠損創であるⅢ度熱傷創への自家培養表皮移植に際しては予め凍結保存同種真皮あるいは人工真皮による真皮再構築が前提となるが、現状では再建真皮上への自家培養表皮の長期生着率不良が課題である。そこで、全層皮膚欠損創の再建真皮上への自家培養表皮移植生着へのDFATの効果について検討を行った。

【方法】LWD系SPFブタより全層皮膚、皮下脂肪を採取してGreen型培養表皮およびDFAT細胞を調整した。同一個体ブタの背部にⅢ度熱傷創を模して脂肪露出全層皮膚欠損創を作成し、予め凍結保存した同種皮膚あるいは人工真皮(Pelnac、グンゼ)により真皮再建を行い、対照群(未治療)とDFAT治療群(0.5×10⁵cell/cm²)を作成した。その10日後に再建真皮上に自家培養表皮を移植した。培養表皮移植後14日目に開創して評価を行った。

【結果】肉眼的所見、顕微鏡所見では2群間に明らかな差は無かった。表皮真皮接着層のTEM像で、DFAT群で基底膜(BM)構築とanchoring fibril(AF)形成が促進されていた。免疫染色像ではcollagen IVは全群陽性、lamininは対照群で弱発現DFAT群で強発現であった。

【結論】DFAT群では、培養表皮移植後の表皮真皮接着層にlamininの発現促進が見られ、BM、AFの形成促進が認められた。DFATが培養表皮生着促進に有用であることが示唆された。

下肢虚血モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)自家移植の有効性の検討

○河野通成¹⁾、河内秀臣¹⁾、前田英明¹⁾、田中正史¹⁾、山元智衣²⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部外科学系心臓血管外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】脱分化脂肪細胞 DFAT は成熟脂肪細胞を脱分化させて得られる細胞で、高い自己増殖能と間葉系幹細胞様の高い分化能を有することが報告されている。本研究では下肢虚血モデルに対する DFAT 自家移植での虚血改善および血管再生能を検討し、さらに凍結・解凍後の DFAT 自家移植での有効性を検討した。

【方法】1. ブタ下肢虚血モデルに対する DFAT 自家移植での虚血改善および血管再生能を TcPO₂、血管密度測定で評価。2. ウサギ下肢虚血モデルに対する DFAT 自家移植、凍結・解凍後 DFAT 自家移植での虚血改善および血管再生能を TcPO₂ で評価。

【結果】1. DFAT 肢は Control 肢と比較し、移植 1、2 週後で有意に TcPO₂ が回復した。虚血筋組織の免疫組織学的検討では平滑筋 α アクチン陽性を示す成熟度の高い微小血管が DFAT 肢で有意に増加した。2. DFAT 肢は Control 肢と比較し有意に TcPO₂ が回復した。また凍結・解凍後 DFAT 自家移植も Control 肢と比較し有意に TcPO₂ が回復した。

【結論】DFAT の自家移植は移植後早期の虚血改善の効果を示す傾向が明らかになり、凍結・解凍後 DFAT 自家移植も同様の傾向が明らかとなった。DFAT は高齢者や骨髄炎合併症例からも低侵襲性に調製できるため、難治性末梢血管病に対する細胞治療の細胞源として期待できる。DFAT の臨床応用によって下肢切断を余儀なくされたような患者に対して DFAT 移植により救肢できる可能性が示された。

脱分化脂肪細胞(DFAT)に由来するエクソソームの解析と 椎間板髄核細胞に対する作用

○富塚孔明¹⁾²⁾ 風間智彦²⁾ 徳橋泰明¹⁾ 松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】われわれは成熟脂肪細胞を天井培養することによって得られる脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)が間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)と同等の多能性を有することを報告してきた。近年、細胞が分泌する細胞外小胞であるエクソソームが細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たすことが報告されている。今回われわれはDFATの培養上清からエクソソームを抽出し、エクソソームが内包するmiRNAの網羅的解析と、エクソソームが椎間板髄核細胞に及ぼす作用について検討した。

【方法】同一ドナーに由来するヒト皮下脂肪組織からDFATとASCを調製した。それぞれ2日間培養後、培養上清を回収し、濃縮試薬を用いてエクソソームを分離・濃縮した。分離したエクソソームからtotal RNAを抽出し、miRNAマイクロアレイ法を用いて網羅的なmiRNA遺伝子発現解析を行った。またDFAT及びASC由来エクソソームをPKH67で蛍光標識後、培養ウサギNP cellへ添加し、細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した。DFAT及びASC由来エクソソームを培養NP cellへ添加し、NP cellの細胞増殖能に及ぼす影響を経時的に評価した。さらにエクソソーム添加によるNP cellの軟骨関連遺伝子の発現変化をリアルタイムRT-PCR法にて評価した。

【結果】miRNAマイクロアレイによる網羅的解析の結果、DFAT由来エクソソームとASC由来エクソソームは近似したmiRNA発現プロファイルを示した。NP cellに対し作用を及ぼすことが報告されているmiRNAが7つ検出され、この中で細胞外基質産生促進作用が報告されているmiR-93-5pが抽出された。DFAT、ASC由来エクソソームはどちらもNP cellへの取り込みが認められた。細胞増殖アッセイの結果、DFAT由来エクソソーム群では培養液を添加したコントロール群と比較し、NP cellの増殖能が有意に増加した。リアルタイムRT-PCR法による遺伝子発現解析では、DFATおよびASC由来のエクソソームを添加することによりNP cellにおけるVersican、Collagen type I、Sox9の遺伝子発現が有意に増加した。

【結論】DFAT由来エクソソームにはASCと類似した多くのmiRNAが内包され、椎間板髄核細胞に取り込まれ、細胞増殖能を促進させ軟骨関連遺伝子の発現を増加させることが明らかになった。DFAT由来エクソソームは椎間板変性症に対する治療効果が期待できる。

細胞ファイバ技術が拓く3次元組織形成と細胞治療への展開

竹内 昌治 先生

東京大学生産技術研究所

微小な流路を用いて作製したハイドロゲルのファイバ内に、細胞を3次元的に培養する方法について紹介する。ファイバはコアシェル型の形態を所持しており、コアは細胞や細胞外マトリックス、シェルはアルギン酸カルシウムから構成される。コア直径は100ミクロン程度であり、内部の3次元組織に養分を拡散によって供給できるため、中心壊死することなく、長期間の培養することができる。これにより、血管、神経、筋肉などのファイバ状の組織を細長く形成できたり、それら異種組織が結合された構造体もできるようになってきた。また、ファイバを編んだり巻いたりすることにより高次の組織を形成できることが分かった。さらに、膵島細胞などをファイバに内包すれば、糖尿病治療に有効な低侵襲の移植片として使えることも分かってきた。講演では、これら細胞ファイバの最近の成果について概説するとともにその応用可能性を議論する。

References:

1. Nobuhito Mori et al.: Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip, **Biomaterials**, vol. 116, pp. 48–56, 2017
2. Hiroaki Onoe et al.: Differentiation Induction of Mouse Neural Stem Cells in Hydrogel Tubular Microenvironments with Controlled Tube Dimensions, **Advanced Healthcare Materials**, vol. 5(9), pp. 1104–1111, 2016
3. Amy Y. Hsiao et al.: 3D Tissue Formation of Unilocular Adipocytes in Hydrogel Microfibers, **Advanced Healthcare Materials**, vol. 5(5), pp. 548–556, 2016
4. Keiko Sugai et al.: Neural Stem/Progenitor Cell-Laden Microfibers Promote Transplant Survival in a Mouse Transected Spinal Cord Injury Model, **Journal of Neuroscience Research**, vol. 93(12), pp. 1826–1838, 2015
5. Shigenori Miura et al.: Fluid shear triggers microvilli formation via mechanosensitive activation of TRPV6, **Nature Communications**, vol. 6, 8871, 2015
6. Amy Hsiao et al.: Smooth Muscle-like Tissue Constructs with Circumferentially Oriented Cells Formed by the Cell Fiber Technology, **Plos ONE**, doi: 10.1371/journal.pone.0119010, 2015
7. M. Negishi-Kato et al.: Millimeter-sized neural building blockssho for 3D heterogeneous neural network assembly, **Advanced Healthcare Materials**, vol. 2(12), pp. 1564–1570, 2013
8. Yuya Morimoto et al.: Three-Dimensional Neuron-Muscle Constructs with Neuromuscular Junctions, **Biomaterials**, vo. 34(37), pp. 9413–9419, 2013
9. Hiroaki Onoe et al.: Metre-long Cellular Microfibres Exhibit Tissue Morphologies and Functions, **Nature Materials**, vol.12, pp. 584–590, 2013

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 29 年度 研究成果公開シンポジウム

日時:平成 30 年 3 月 3 日 (土) 10:00~15:00

場所:日本大学医学部リサーチセンター4 階ホール

プログラム

1. 開会の挨拶 (10:00~10:05)

2. 成果発表 午前の部 (10:05~12:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 野呂 知加子 (日本大学生産工学部応用分子化学科)

①椎間板変性症に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植の治療効果

中山遡志、宮方啓行、小山公行、風間智彦、徳橋泰明、松本太郎

②DFAT(dedifferentiated fat cell) derived exosome の免疫抑制能

小野賀功、小沼憲祥、金澤剛二、土方浩平、日高綾乃、後藤俊平、越永従道、松本太郎

③免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発

丸山高史、宇都宮慧、深澤みゆき、常見明子、遠藤守人、松本太郎、福田昇、阿部雅紀

座長: 榎島 誠 (日本大学医学部生体機能医学系生化学分野)

④脱分化脂肪細胞 DFAT における造腫瘍性に関する安全性評価

風間智彦、長岡悠紀、山元智衣、萩倉一博、加野浩一郎、相川佳之、松本太郎

⑤DFAT の血管新生効果と壁細胞分化についての検討

萩倉一博、渡邊拓史、後藤俊平、石川三友紀、長岡悠紀、山元智衣、風間智彦、松本太郎

⑥脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用製造と細胞治療への応用

山元智衣、李予昕、風間智彦、長岡悠紀、萩倉一博、大野聡子、松本太郎

3. 休憩 (12:00~13:00)

4. 成果発表 午後の部 (13:00~14:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 福田 昇 (日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野)

⑦胎児付属物由来幹細胞から分泌する Exosome の免疫抑制能の検討

金澤剛二、小野賀功、谷川俊太郎、大熊啓嗣、下澤克宜、平井麻衣子、小沼憲祥、谷ヶ崎博、松本太郎、高橋 昌里

⑧脱分化脂肪細胞(DFAT)の自家培養表皮生着促進効果に関する検討

副島一孝、櫻村 勉、風間智彦、松本太郎、仲沢弘明

⑨脱分化脂肪細胞を用いた変形性膝関節症に対する細胞治療

遠藤則行、風間智彦、徳橋泰明、松本太郎

⑩脱分化脂肪細胞による血流不全組織の救済効果に関する検討

櫻村勉、副島一孝、風間智彦、仲沢弘明、松本太郎

5. 特別講演 (14:00~15:00)

座長: 松本 太郎 (日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野)

臍帯由来間葉系細胞の特長と臨床応用

東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部
准教授 長村(井上) 登紀子 先生

6. 閉会の挨拶

椎間板変性症に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植の治療効果

○中山瀧志¹⁾、宮方啓行¹⁾、小山公行¹⁾、風間智彦²⁾、徳橋泰明¹⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部外科学系整形外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】我々は皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞から調整される脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cell: DFAT)が高い増殖能と間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC)と同等の多分化能を示すことを報告している。今回、人工的に椎間板変性を生じさせたラットの椎間板に DFAT を移植し、椎間板高の定量及び変性した椎間板の再生効果を示すかについての検討を行った。

【方法】体重約 300g、約 12 週齢の雄性 Sprague-Dawley(SD)ラットに対して、急性炎症モデルとして、尾椎椎間板を 21G 針にて経皮的椎間板穿刺を行い、慢性炎症モデルとして、受動喫煙ボックス内で 1 日 20 本のタバコを 8 週間吸わせることで、椎間板変性モデルを作製した。椎間板穿刺モデルに対しては穿刺 1 週間後に DFAT (5×10^4 / 50 μ l Phosphate buffered saline (PBS), DFAT 群)または同量の PBS (50 μ l, PBS 群)を移植した。移植後、X 線透視装置下に椎間板高の測定を行い、椎間板高の変化% Disc height index (%DHI)を算出した。また、移植 4 週および 8 週間後に尾椎の切片標本作製し、collagenase 染色、HE 染色、CD24 染色及び Green fluorescent protein (GFP)トランスジェニックラットを用いた GFP と CD24 に対する蛍光二重免疫染色を行い椎間板細胞の再生能や増殖能について評価した。

受動喫煙モデルに対しては、DFAT 群には DFAT 1×10^6 / 0.5ml PBS を二週間おきに計 4 回尾静脈より投与し、PBS 群には同量の PBS を投与し、Control 群は PBS と DFAT の投与は行わなかった。移植後、DMMB 法によるプロテオグリカン定量を行った。また、移植 8 週間後に尾椎の切片標本作製し、HE 染色、Alcian blue 染色、Elastica von Gieson (EVG)染色を行い、椎間板変性症に対する再生効果について評価した。

【結果】椎間板穿刺モデルにおいて PBS 移植群と比較して DFAT 移植群は%DHI が有意に高値となり、椎間板高の狭小化が抑制され、椎間板間隙の高さが保持される傾向が認められた。受動喫煙モデルにおいてプロテオグリカン量を比較したところ、DFAT 群は PBS 群に比べプロテオグリカン量の減少が抑制される傾向にあることが示された。病理組織学的検討では、椎間板穿刺モデルでは DFAT 移植群の一部に、椎間板辺縁に不定形の腔胞をもつ分葉状の髄核様細胞集団が認められ、GFP と CD24 に対して二重陽性を示す細胞が多数認められた。受動喫煙モデルにおいては、DFAT 群は PBS 群に比較し髄核構造が保たれる傾向であった。

【結論】DFAT は椎間板変性症に対する新たな細胞治療用細胞ソースとして有望であり、椎間板再生の有効な治療となる可能性が示唆された。また、今後そのメカニズムの解明が椎間板再生治療への新たな可能性を示唆するものと思われる。

DFAT(dedifferentiated fat cell) derived exosome の免疫抑制能

○小野賀功^{1,2)}、小沼憲祥²⁾、金澤剛二³⁾、土方浩平²⁾、日高綾乃²⁾、後藤俊平²⁾、越永従道²⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生移植医学分野、²⁾ 日本大学医学部小児外科、

³⁾ 日本大学医学部小児科

【背景】細胞間情報伝達に細胞外小胞(extracellular vesicles : exosome)が間葉系幹細胞(MSC)から放出され、内部の miRNA を標的細胞に運搬することで、組織障害の修復や免疫抑制能を発揮し治療効果をもたらす報告がされている。例えば、MSC exosome が末梢血の T リンパ球に対して Th1 から Th2 への変換を起こし、Th17 を抑制し、制御性 T 細胞(Treg)を誘導する報告がされている。Th17 優位のリンパ球分画が病因とされる炎症性腸疾患(特に Crohn 病)において間葉系幹細胞由来の exosome の治療応用が期待されている。我々は成熟脂肪細胞を脱分化培養することで得られる細胞(脱分化脂肪細胞 : DFAT)が MSC に酷似した機能を持つことを示してきた。DFAT は MSC に比較して侵襲性が低く採取でき、細胞の均一性が高いために用いやすい。今回 DFAT から放出される exosome の持つ免疫制御能について検討したので報告する。

【方法】まずは DFAT 及び ASC から分泌される exosome の存在を電子顕微鏡、Western blot で証明した。DFAT、ASC derived exosome に内包する miRNA の網羅的解析を行い T リンパ球分化に関わる miRNA の存在を確認した。次に exosome のヒト末梢血リンパ球への取り込み、共培養において DFAT、ASC derived exosome にリンパ球増殖抑制能があることをフローサイトメトリーで示した。さらに臍帯血 naïve T 細胞に T リンパ球サブセットの分化誘導をかけ DFAT、ASC derived exosome が、リンパ球の Treg への分化誘導を促進し、Th17 への分化誘導を抑制することを示した。

【結論】DFAT、ASC derived exosome が炎症性腸疾患に対し治療効果を示す可能性を示唆するものである。

成果発表③

免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発

○丸山高史¹⁾、宇都宮慧¹⁾、深澤みゆき¹⁾、常見明子¹⁾、遠藤守人²⁾、松本太郎³⁾、福田昇¹⁾、阿部雅紀¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、²⁾ 八戸学院大学健康医療学部人間健康学科、

³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】本学で開発された成熟脂肪細胞の脱分化によって得られる脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated Fat Cell ; DFAT)は間葉系幹細胞と同等の多分化能を有する。我々は免疫異常に起因した進行性腎障害モデルである単クローン抗体 1-22-3 誘発腎炎ラットに対する DFAT 細胞移植の治療効果について報告してきた。この疾患モデルはラット特有のモデルである。この技術を臨床応用化するにあたり今回我々はヒトにも存在して免疫異常を病因とする、また進行性腎障害を呈し予後不良疾患である ANCA 関連腎炎のモデル動物に対して DFAT の細胞移植を行い、効果およびその機序について検証した。【方法】SCG/ThpNkc マウスは急性進行性糸球体腎炎である ANCA 関連腎炎を発症する事が報告されている。8週齢の SCG/ThpNkc マウスに DFAT を静脈投与、細胞移植を施行して 1 ヶ月後に移植の効果判定および作用機序解明のため、尿や血液および腎臓・脾臓・肝臓・心臓・肺・腫大リンパ節の各種臓器を採取し、尿蛋白量や血清尿素窒素、血清クレアチニン値や ANCA 抗体値の測定、また腎の組織評価や腎臓・肺の real-time PCR を行い TSG-6 や IL-1、IL-6、TNF- α の測定、また FACS 解析を行い Treg と Th-17 を測定した。【結果】DFAT 移植群は無治療群と比較して、生存率が上昇した。DFAT 移植群では無治療群と比較して、尿蛋白量と血清 ANCA 値が減少し、血液中の TSG-6 濃度の有意な上昇を認めた。【結論】DFA 細胞移植はモデルマウスにおいて ANCA 関連腎炎を改善させた。その機序の一つに TSG-6 の発現増加による免疫調整作用が考えられた。DFAT 細胞移植を ANCA 関連腎炎の治療法として臨床応用出来る可能性が示唆された。

脱分化脂肪細胞 DFAT における造腫瘍性に関する安全性評価

○風間智彦¹⁾、長岡悠紀¹⁾、山元智衣¹⁾、萩倉一博¹⁾、加野浩一郎²⁾、相川佳之³⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

²⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科動物生体機構学研究室、

³⁾湘南美容クリニック

【背景】再生医療・幹細胞技術の産業化においては、臨床応用に向けて効果・安全性をともに担保した有用な幹細胞の供給が待たれている。ヒト細胞加工製品の安全性指標としては、特に腫瘍原性に関する安全性評価が重要であり、造腫瘍性否定試験の実施が求められている。我々は成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が高い増殖能と間葉系細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) と同等の多分化能を示すことを報告してきた。DFAT は臨床応用における低コストかつ高品質な多分化性をもった細胞として利用でき、MSC 同様、様々な疾患に適応拡大可能である。本研究の目的として、DFAT の臨床応用に向けた重要課題である造腫瘍性について評価した。**【方法】**3例のドナーより調製したヒト DFAT の染色体核型解析およびテロメラーゼ活性測定を行なった。また、成熟脂肪細胞から DFAT への脱分化過程におけるゲノムコピー数の変化を CGH マイクロアレイにて解析するとともに、既知の癌関連遺伝子 (計 92 遺伝子) のプロモーター領域 CpG アイランドにおける DNA メチル化修飾を MassARRAY 法にて解析した。また、DFAT の造腫瘍性試験を行うにあたり、足場非依存性増殖能をみるため、軟寒天コロニー形成試験と NOG マウス皮下移植試験を実施した。**【結果】**検討したすべての細胞で、正常ヒト染色体数の 46 であり、明らかな染色体構造の異常はなく、テロメラーゼ活性の亢進がないことを明らかにした。CGH マイクロアレイ解析の結果、DFAT のゲノムコピー数のプロファイルは成熟脂肪細胞とほぼ一致していた。DNA メチル化解析の結果、脱分化に伴う特徴的なメチル化変動は、検討した癌関連遺伝子群の中では全く確認されなかった。また、軟寒天コロニー形成試験結果において、足場非依存性増殖能を有さないことを示し、NOG マウス皮下移植試験においても腫瘍性変化は認めなかった。**【結論】**脱分化培養による明らかな染色体異常やゲノムコピー数の変化、テロメラーゼ活性亢進、癌関連遺伝子の DNA メチル化変化は認められなかった。また、軟寒天コロニー試験ならびに NOG マウス皮下移植試験より造腫瘍性を認めず、安全に移植できることが示唆された。DFAT は低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できると考える。

DFAT の血管新生効果と壁細胞分化についての検討

○萩倉一博、渡邊拓史、後藤俊平、石川三友紀、長岡悠紀、山元智衣、風間智彦、松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】我々は、コラゲナーゼ処理した脂肪組織を天井培養することにより得られる細胞を DFAT (Dedifferentiated fat cells)と呼び、これらの細胞は MSC (Mesenchymal stem cell)と同様に多分化能を有することを報告した。また DFAT をマウス下肢虚血モデルへ移植すると、虚血部位の血流が改善することを報告した。DFAT の血管新生効果について、DFAT を低酸素培養すると VEGF, HGF などの血管新生因子を分泌することは報告しているが、DFAT と血管内皮細胞の相互作用については不明な部分が多い。今回我々は、DFAT と血管内皮細胞を共培養することで、DFAT の血管新生能および血管構成細胞への分化能について検討した。

【方法】1.マウス成熟脂肪細胞の天井培養を行い、DFAT を作成する。2.血管内皮細胞と DFAT との共培養により血管内皮細胞の遊走能・増殖能・管腔形成能の変化を評価する。3.血管内皮細胞と DFAT との共培養により DFAT における壁細胞マーカーの発現を qPCR、免疫染色で評価する。4.TGF- β 刺激および SMAD2/3 阻害における DFAT の血管壁細胞マーカーの発現を qPCR、免疫染色で評価する。

【結果】血管内皮細胞はマウス DFAT の存在下で遊走能・増殖能が亢進した。またコラーゲンゲル内で血管内皮細胞と DFAT を3次元培養すると、DFAT は血管内皮細胞の管腔形成能を亢進させ、管腔周囲に遊走・接着した。また内皮細胞との共培養により DFAT の壁細胞マーカー NG2 の発現が亢進した。DFAT の NG2 発現は TGF- β 刺激で促進し SMAD2/3 阻害薬で抑制された。

【結論】DFAT は血管内皮細胞の遊走能・増殖能・管腔形成能を促進した。また DFAT は血管構成細胞である壁細胞へ分化する可能性が示唆された。

脱分化脂肪細胞(DFAT)の臨床用製造と細胞治療への応用

○山元智衣、李予昕、風間智彦、長岡悠紀、萩倉一博、大野聡子、松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

脱分化脂肪細胞(DFAT)は間葉系幹細胞(MSC)同様、組織を構成する細胞の活性に必要な液性因子を効果的に分泌することで、組織修復作用、血管新生作用、免疫制御作用を有する細胞である。また高い増殖能を有し MSC と比べ均一性が高く、わずかな脂肪組織から大量の細胞を調整できることから、実用性の高い再生医療用細胞になり得ると期待できる。特に血管新生に関しては様々な確証が得られており、各種動物モデルを用いた実験では DFAT 移植により、虚血肢に成熟した血管の増加が確認されている。これらのことより DFAT を用いた重症下肢虚血に対する血管新生細胞治療への臨床応用を目指し、基礎研究によって確立した方法を臨床用に改良および品質管理方法を検討している。

再生医療に関しては、平成 26 年 11 月より施行された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(再生医療等安全性確保法)により、臨床に用いる場合は厚生労働省へ再生医療等提供計画書の届出が義務付けられている。さらに再生医療に用いる細胞を培養する場合、特定細胞加工物の製造許可申請を行い、細胞培養加工施設ごとに厚生労働省の許可を受ける必要があり、2017 年に「日本大学医学部リサーチセンター CPF」として厚生労働省より再生医療用細胞の特定細胞培養加工施設の許可認定を受け、施設番号を付与された。

我々は、再生医療安全性確保法に基づく培養施設として、日本大学医学部リサーチセンター CPF 内に設置されたセルプロセッシング・アイソレーターを用いた臨床用ヒト DFAT 作成方法の開発を行い、ボランティアから採取した脂肪組織を用いたヒト DFAT の大量培養が可能であることを確認した。

今後、上記 CPF においてセルプロセッシング・アイソレーターを利用した、再生医療安全性確保法下での臨床用 DFAT の製造技術の確立、標準化を行い、再生医療等提供計画の届出を経て早期の臨床応用を目指したい。

胎児付属物由来幹細胞から分泌する Exosome の免疫抑制能の検討

○金澤剛二¹⁾、小野賀功²⁾、谷川俊太郎¹⁾、大熊啓嗣¹⁾、下澤克宜¹⁾、平井麻衣子¹⁾、小沼憲祥²⁾、
谷ヶ崎博¹⁾、松本太郎³⁾、高橋昌里¹⁾

¹⁾日本大学医学部小児科学系小児科学分野、²⁾日本大学医学部外科学系小児外科学分野、

³⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】間葉系幹細胞(MSC)が細胞外小胞(Exosome)を分泌し、含有するマイクロRNA(miRNA)を標的細胞へ運搬することで、組織修復や免疫抑制能をもたらすことが明らかにされているが、胎児付属物由来 MSC から分泌される Exosome が免疫抑制能をもつかは明らかでない。本研究では胎児付属物より羊膜間質由来 MSC(AM-MS C) および臍帯 Wharton's Jelly 由来 MSC(WJ-MS C)から分泌された Exosome を抽出して、それらの T 細胞増殖抑制能や制御性 T 細胞(Treg)の分化に関わる効果を検討した。**【方法】**AM-MS C、WJ-MS C から Exosome を抽出し、透過電子顕微鏡による形態観察とウェスタンブロット法による Exosome 特異的マーカー(CD63)の検出を行った。また、それぞれの Exosome(AM-MS C Exo、WJ-MS C Exo)から RNA を抽出し、含有する miRNA の発現を miRNA マイクロアレイにて解析した。AM-MS C Exo、WJ-MS C Exo を CFSE 標識したヒト末梢血単核球に添加し、抗 CD3/28 抗体と IL-2 含有培地にて 4 日間培養後、T 細胞増殖能をフローサイトメーターで評価した。次に AM-MS C Exo、WJ-MS C Exo をヒト臍帯血 CD4 陽性 T 細胞に添加し、抗 CD3/28 抗体と IL-2 含有培地にて 4 日間培養後、ナイーブ T 細胞から Treg 細胞へ分化した割合を定量評価した。**【結果】**AM-MS C、WJ-MS C 培養上清の抽出液中には、高純度の Exosome の存在を確認することができた。また AM-MS C、WJ-MS C 由来 Exosome 中には多くの miRNA が存在し、T リンパ球の増殖抑制や Treg 細胞の分化に関わると報告される複数の miRNA の発現が認められた。AM-MS C Exo、WJ-MS C Exo は、濃度依存性にヒト T リンパ球の増殖を抑制した。AM-MS C、WJ-MS C との共培養、または AM-MS C-Exo、WJ-MS C-Exo 添加は、ヒト臍帯血ナイーブ T 細胞から Treg 細胞への分化を促進した。**【結論】**AM-MS C や WJ-MS C から分泌された Exosome には免疫制御に関わる複数の miRNA を含有し、T 細胞に効率良く取り込まれ、T 細胞増殖抑制作用やナイーブ T 細胞から Treg 細胞の分化促進作用を示すことが明らかとなった。

脱分化脂肪細胞(DFAT)の自家培養表皮生着促進効果に関する検討

○副島一孝¹⁾、 櫻村 勉¹⁾、 風間智彦²⁾、 松本太郎²⁾、 仲沢弘明¹⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、 ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】自家培養表皮(JACE®, J-TEC 社製)は本邦ではじめて認可された再生医療製品であり、体表面積の 30%以上を占める広範囲重傷熱傷の治療に対して保険適応となっている。熱傷創への自家培養表皮移植に際しては予め凍結保存同種真皮あるいは人工真皮による真皮再構築が前提となるが、現状では再建真皮上への自家培養表皮の長期生着率不良が課題である。そこで、全層皮膚欠損創の再建真皮上への自家培養表皮移植生着への DFAT の効果について検討を行った。

【方法】LWD 系 SPF ブタより全層皮膚、皮下脂肪を採取して Green 型培養表皮および DFAT 細胞を調整した。同一個体ブタの背部に III 度熱傷創を模して脂肪露出全層皮膚欠損創を作成し、人工真皮(Pelnac、グンゼ)により真皮再建を行い、対照群(未治療)と DFAT 治療群($0.5 \times 10^5 \text{ cell/cm}^2$)を作成した。その 10 日後に再建真皮上に自家培養表皮を移植した。培養表皮移植後 14 日目に開創して評価を行った。

【結果】肉眼的所見、顕微鏡所見では 2 群間に明らかな差は無かった。表皮真皮接着層の TEM 像で、DFAT 治療群で基底膜(BM)構築と anchoring fibril(AF)形成が促進されていた。免疫染色像では collagen IV は全群陽性、laminin は対照群で弱発現 DFAT 群で強発現を認めた。

【結論】DFAT 治療群では、培養表皮移植後の表皮真皮接着層に laminin の発現促進が見られ、BM、AF の形成促進が認められた。DFAT が培養表皮生着促進に有用であることが示唆された。

脱分化脂肪細胞による血流不全組織の救済効果に関する検討

○樫村勉¹⁾、副島一孝¹⁾、風間智彦²⁾、仲沢弘明¹⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】近年、骨髄や脂肪を細胞ソースとした多分化能を有する間葉系幹細胞が同定され、血流不全に起因する病態への治療が模索されている。その中で、幹細胞の血管新生作用による皮弁の生着域拡大に関する研究が行われており、一定の効果が得られることが報告されている。われわれはブタの皮下脂肪組織を体外で脱分化させることにより、高い増殖能と間葉系幹細胞と類似した性質を示す細胞群(脱分化脂肪細胞 dedifferentiated fat cells, DFAT)を調製する培養法を確立した。今回、DFAT をラット背部の乱走型皮弁に投与し皮弁生着域を拡大しうるか検討したため報告する。

【対象・方法】ラットの皮下脂肪を天井培養することで各実験群の DFAT を単離培養した。ラットの背部に乱走型皮弁(2×9cm)を挙上し以下の実験を行った。1)自家 DFAT 投与実験:対照群(未治療)(n=10)と DFAT 投与群:(DFAT(1×10⁶cells/0.1ml)を作製した。自家 DFAT 投与群は SD 系ラットより調整した DFAT を SD 系ラットの皮弁に移植した。皮弁基部より 2cm に投与する基部自家 DFAT 投与群(n=10)と皮弁中央に投与する中央自家 DFAT 投与群(n=10)の 2 群を作製した。2)他家 DFAT 投与実験:Wistar 系ラットより調整した DFAT を SD 系ラットの皮弁に移植した。他家 DFAT 投与群も同様に、基部他家投与群(n=10)と中央他家投与群(n=10)の 2 群を作製した。3)糖尿病ラット(SDT Fatty ラット)の皮弁の実験:SDT Fatty ラットの背部に同様に皮弁を作成し、DM 対照群(n=10)と SD 系ラットより調整した DFAT を投与する DM 基部投与群(n=10)を作成した。術後 14 日目に生着域を測定し組織を採取し、組織学的検討を行った。

【結果】術後 14 日目に皮弁の生着域と壊死部分の境界は明瞭であった。皮弁の平均生着率は対照群:53.8±6.4%、中央自家投与群:50.6±6.4%、基部自家投与群:65.8±2.4%、中央他家投与群:53.5±4.9%、基部他家投与群:62.8±5.9%、DM 対照群 34.5±9.2%、DM 基部投与群 48.9±10.8%、であった。皮弁基部投与群で皮弁生着域は、対照群と比較して有意に拡大した。組織学的検討では、DFAT 投与群で皮弁内の血管の増加を認めた。

【考察】いずれの実験群でも、皮弁基部への DFAT の投与により一定の生着域の拡大効果が得られた。これらの生着域拡大効果は、DFAT の血管新生作用によるものと考えられた。自家 DFAT の投与では待機的な皮弁手術や難治性潰瘍治療、他家 DFAT の投与では外傷や緊急手術、糖尿病ラットへの DFAT 投与では糖尿病性潰瘍など幅広い領域での臨床応用の有用性が示唆された。

臍帯由来間葉系細胞の特長と臨床応用

長村(井上) 登紀子 先生

東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部

間葉系細胞(Mesenchymal stromal cells: MSC)のソースとして、臍帯血、臍帯、胎盤や羊膜等の周産期付属物はドナーへの身体的負担なく採取でき、同種ソースとして期待されている。臍帯由来MSCは、母児の安全性を確認できるまで臍帯組織ごと凍結でき、初期培養コストを抑えられること、胎児組織由来であることから増殖率が高く、短期間で多くのMSCが回収できること、骨髄や脂肪由来MSCと異なり炎症性サイトカイン(インターフェロン γ)存在下でもHLA-Class IIが殆ど誘導されないことから抗原性が低いと考えられることなど種々の特長がある。また、臍帯由来MSCの同種抗原刺激による活性化T細胞の抑制作用や組織修復能を利用して、造血幹細胞移植後の重症急性移植片対宿主病(GVHD)や新生児脳症等を対象として、アカデミア発の再生医療等製品化に取り組んできた。重症急性GVHDは、造血幹細胞移植後のドナーリンパ球による同種免疫反応とそれらによる組織障害である。既に、テムセルHS注[®]など、骨髄由来MSC製品が市販されているが、国内ドナーの製品として高品質・安全かつより安価に、提供できるかが鍵となる。一方、新生児脳症は、脳性麻痺に進展する可能性が高い疾患であり、頭蓋内出血、低酸素性虚血性脳症などが原因となり、発症初期にはサイトカインストームを含む炎症が生じ、さらに脳神経細胞障害の拡大、グリア細胞の増加へとつながる。これまでの基礎的検討において、脳障害時の反応性グリオシスの抑制、局所ニューロンの修復に対して、臍帯由来MSCが効果を発揮することを見出している。

First-in-Humanとして、Phase I 医師主導治験を実施する予定である。

細胞調製においては、臍帯組織の凍結、無血清培地(ロート製薬株式会社製造)での培養や回収細胞の凍結に至る全工程での無血清化を初めて達成した。その過程での細胞調製工程の改良や今後の産業化に向けた取り組みについても紹介したい。

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

(研究拠点を形成する研究)

「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」

平成 30 年度 研究成果公開シンポジウム

日時:平成 31 年 3 月 16 日 (土) 10:00～15:00

場所:日本大学医学部リサーチセンター4 階

プログラム

1. 開会の挨拶 (10:00~10:05)

2. 成果発表 午前の部 (10:05~12:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 福田昇 (日本大学総合科学研究所)

①脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究

松本太郎

②脱分化脂肪細胞 (DFAT) の口腔領域における有用性の検討

秋田大輔、風間智彦、月村直樹、新井嘉則、岩崎仁奈、加野浩一郎、松本太郎

③マウス皮膚欠損治癒過程における成熟脂肪細胞の形質変換に関する検討

石川三友紀、萩倉一博、風間智彦、李予昕、松本太郎

④乳癌微小環境における脂肪細胞の形質変換についての検討

土方浩平、植草省太、加藤礼保納、日高綾乃、小沼憲祥、越永従道、松本太郎

座長: 松本太郎 (日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野)

⑤Thy1-22-3 抗体腎炎に対する DFAT 細胞療法の効果

丸山高史、福田昇、宇都宮慧、阿部雅紀、松本太郎

⑥Induction kidney organoid from disease-specific iPS cells

Lan Chen、Noboru Fukuda、Akiko Tsunemi、Sho Tanaka、Asako Oguni、Kosuke Saito、Kyoko Fujiwara、Masanori Abe、Taro Matsumoto

⑦補体 C3 は腎尿管上皮間葉化 (EMT) により腎内 RAS を活性化し塩分感受性高血圧を起こす。

ゲノム編集技術による C3 ノックアウト SHR での検討

根岸英理子、福田昇、片川まゆみ、阿部雅紀

3. 休憩 (12:00~13:00)

4. 成果発表 午後の部 (13:00~14:00) 発表 10分・討論 5分

座長: 加野浩一郎 (日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室)

⑧DFAT の血管新生効果および壁細胞分化

渡邊拓史、石川三友紀、長岡悠紀、山元智衣、風間智彦、萩倉一博、松本太郎

⑨ビタミン D シグナルの脂肪細胞脱分化過程における部分的関与の可能性と細胞治療法への応用

石澤通康、風間智彦、萩倉一博、松本太郎、槇島誠

⑩脱分化脂肪細胞に由来する肝細胞は中心静脈周辺領域の肝細胞の特性をもつ

萩原玲子、沖嘉尚、加野浩一郎

⑪皮膚再生医療における脱分化脂肪細胞 (DFAT) の効果に関する検討

副島一孝、樫村勉、風間智彦、仲沢弘明、松本太郎

5. 特別講演 (14:00~15:00)

座長: 野呂知加子 (日本大学大学院生産工学研究科)

細胞認識性バイオマテリアルによる医療の革新

—カドヘリンマトリックス工学・糖鎖マトリックス工学の再生医療への応用—

国際科学振興財団・再生医工学バイオマテリアル研究所 (東京工業大学名誉教授)

赤池 敏宏 先生

6. 閉会の挨拶 (15:00~15:05)

脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究

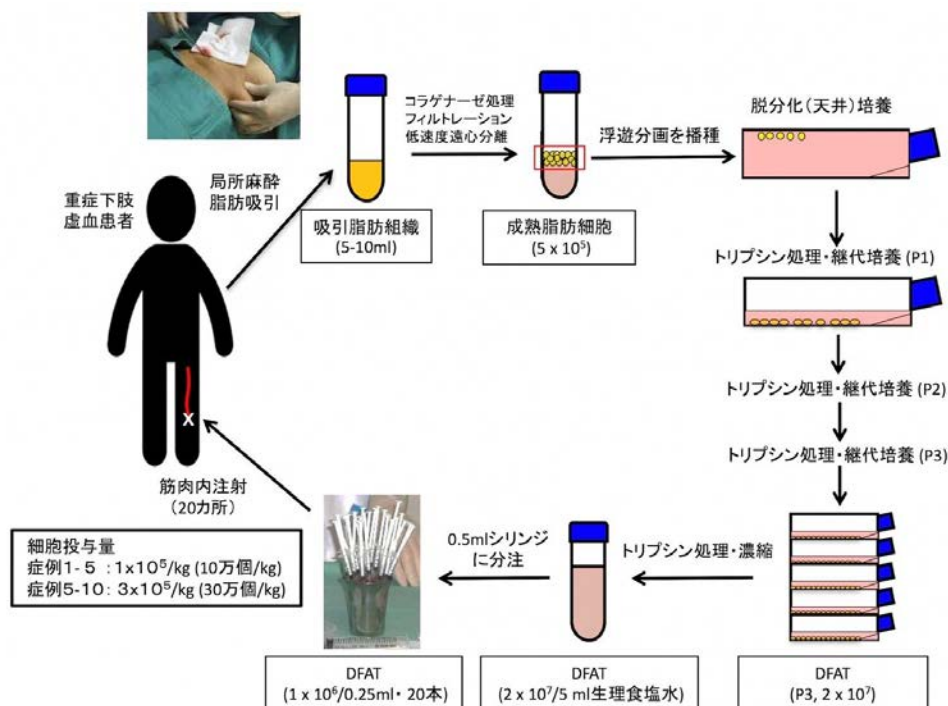
松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

我々の研究グループでは、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で体外培養することにより得られる細胞群(脱分化脂肪細胞, Dedifferentiated fat cell:DFAT)が、高い増殖能と骨髄間葉系幹細胞(MSCs)と同等の多分化能を獲得することを明らかにした。DFATはMSCに比べ均質性が高く、ドナー年齢や基礎疾患を問わず調製できることから、実用性の高い治療用ドナー細胞となりうると考えている。DFATは虚血組織において種々の血管新生因子をバランスよく分泌すると共に、ペリサイトなどの血管構成細胞への分化能を有することから、血管新生を目的とした治療用細胞としての実用化が期待できる。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」では、我々が今まで蓄積してきた研究成果を発展させ、DFATを用いた細胞治療のFirst-in-Human臨床研究実施を目標としている。具体的には、①治療用細胞としてのDFATの特性解析、②臨床応用に適合した細胞調製法の確立と移植安全性の検証、③DFATを用いた細胞治療の開発および前臨床試験を3本の柱として研究を行ってきた。これまでに臨床グレードのDFATを調製するために必要な細胞加工施設(日本大学医学部リサーチセンターCPF)の整備を行い、生物由来原料基準に適合した調製培地や、脂肪細胞を容易に効率良く脱分化させる脱分化培養フラスコを設計・開発を行ってきた(PCT出願済)。また軟寒天コロニー形成試験や免疫不全(NOG)マウス皮下移植による造腫瘍性試験を実施し、DFATの移植安全性を確認した。さらに健常ボランティアなどからヒト吸引脂肪組織の提供を受け、臨床グレードのDFATを調製し、品質をチェックする実験を繰り返し、細胞製造および品質管理に関するプロトコルおよび作業手順書を作成した。現在、重症下肢虚血(CLI)患者を対象に自家DFATを用いた血管再生細胞治療の臨床研究実施に向け、PMDAレギュラトリーサイエンス戦略相談を実施し、臨床研究に用いるDFATの品質や安全性を治験水準に高める作業を行っている。そして再生医療等提供計画書を作成し、特定再生医療等委員会への承認および厚生労働省への届け出を行う予定である。

本講演では、DFATを用いた細胞治療開発に関するこれまでの取り組みについて紹介する。



「重症下肢虚血に対する自家DFATによる血管再生細胞治療」FIH臨床研究の概要

脱分化脂肪細胞 (DFAT) の口腔領域における有用性の検討

○秋田大輔¹⁾、風間智彦²⁾、月村直樹¹⁾、新井嘉則³⁾、岩崎仁奈⁴⁾、加野浩一郎⁵⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、

³⁾日本大学歯学部歯科放射線学講座、⁴⁾日本大学歯学部歯科矯正学講座、⁵⁾日本大学生物資源科学部動物資源科学科

【目的】歯科領域では、口腔内器官に生じた欠損に対して人工材料を補填することで機能の回復を図る治療が古来よりおこなわれてきた。しかしながら近年、疾病などで損傷を受けた器官・組織に対して機能回復を目指す再生医療が飛躍的に発展し、歯科領域においても口腔機能の向上に対してその有用性が着目されているが、どの組織も採取に制限があるため、口腔内における現実的な細胞源は明らかになっていない。成熟脂肪細胞を天井培養することによって得られる脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)は、頬脂肪体からも調整可能なため、歯科領域においても組織再生に有用な細胞源であると考えられる。そのため我々は DFAT の口腔領域における有用性を検討した。

【方法】

- ①F344 ラット左側下顎臼歯部頰側に歯周組織欠損(縦 2 mm × 横 3 mm × 深さ 1 mm)を外科的に作製後、DFAT を PLGA(乳酸・グリコール酸共重合体)に播種した複合体を欠損部に移植し、第 1 臼歯中央根および遠心根部の歯周組織再生能を組織学的に評価した。
- ②F344 ラット下顎骨下縁に作製した骨欠損に対して、何もせず縫合したコントロール群、DFAT・RCP(リコンビナントペプチド)複合体を移植した細胞移植群を継時的にマイクロ CT 撮影し、硬組織再生能を比較検討した。
- ③日本大学歯学部付属歯科病院口腔外科を受診した健常な男女 10 名からヒト頬脂肪体を摘出して調整した DFAT 細胞の骨芽細胞への分化能について検討し、特性を解析した。

【結果】

- ①micro-CT による定量解析の結果、移植 5 週後の細胞移植群の硬組織再生量は対照群よりも有意に高い傾向を示した。組織学的解析から、両群において担体基質の残存と新生骨組織およびセメント質様組織の形成に加えて、再生した硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められた。また蛍光標識された DFAT 細胞は歯根膜組織中に多数散在しているほか、一部の細胞は新生セメント質と新生骨中に認められた。
- ②micro-CT による定量解析の結果、細胞移植群はコントロール群と比べて高い硬組織増加量を認めた。組織学的解析から、欠損内に骨様硬組織と血管様構造物の再生が認められた。
- ③ヒト頬脂肪体由来の脂肪細胞には 40 μm 未満の成熟脂肪細胞が多量に存在し、DFAT を調整した際に骨芽細胞分化誘導後 7 日後にはカルシウムの沈着を認めた。

【結論】一連の結果から DFAT 細胞が口腔領域における再生医療に有用な細胞源であることが示唆された。

マウス皮膚欠損治癒過程における成熟脂肪細胞の形質変換に関する検討

○石川三友紀、萩倉一博、風間智彦、李予昕、松本太郎

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【背景】近年、Genetic-lineage tracingにより、生体内の一部の成熟細胞が脱分化し組織再生に関わることが示されている。一方、成熟脂肪細胞が組織再生に関与しているかは明らかになっていない。今回、成熟脂肪細胞の運命追跡が可能な遺伝子改変マウスに皮膚全層欠損を作製し、治癒過程における成熟脂肪細胞の形質変換および組織再生への関与を検討した。

【方法】tamoxifen 投与により adiponectin 発現細胞特異的に tdTomato (tdT) を発現するマウス (Adipoq-CreERT2/tdT マウス) を実験に用いた。このマウスに tamoxifen を投与後、後背部に皮膚全層欠損創を作製した。経時的に欠損部の組織標本を作製し、免疫組織学的に tdT⁺細胞の解析を行った。また肉芽組織中の細胞を酵素処理により単離し、同様に tdT⁺細胞の形質解析を行った。

【結果】皮膚欠損1週間後には、欠損部の脂肪組織周囲に perilipin⁻ で線維芽細胞様形態を示す tdT⁺ fibroblast-like cell (FLC) の出現を認め、欠損2週間後をピークに肉芽組織内でも確認された。tdT⁺FLCの一部は脂肪前駆細胞マーカー-Dlk1 や MSC マーカー-PDGFRa、Sca-1 を発現しており、また、ペリサイトマーカー-NG2、細胞増殖マーカー-Ki-67 発現細胞も確認された。

【結論】皮膚欠損後の治癒過程で成熟脂肪細胞に由来する線維芽細胞様細胞が出現し、その一部は肉芽組織内で間葉系幹細胞、前駆脂肪細胞、ペリサイトなどの形質を獲得していることが示唆された。

乳癌微小環境における脂肪細胞の形質変換についての検討

○土方浩平^{1),2)}、植草省太²⁾、加藤礼保納^{1),2)}、日高綾乃^{1),2)}、小沼憲祥²⁾、越永従道²⁾、松本太郎¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、²⁾ 日本大学医学部外科学系小児外科学分野

【目的】癌組織の周囲には線維芽細胞やマクロファージなどの間質細胞が存在し、癌細胞との相互作用により癌微小環境を形成し、癌の浸潤や転移に影響を与えていることが明らかにされている。乳癌組織周囲には脂肪細胞が豊富に存在していることから、乳癌により形成される癌微小環境において脂肪細胞の関与が示唆される。一方、乳癌組織周囲の脂肪細胞の挙動や形質変化についてはこれまでに明らかにされていない。本研究では脂肪細胞の運命追跡ができる遺伝子改変マウスを用いて、脂肪組織近傍に乳癌細胞を移植し、その増殖過程における脂肪細胞の挙動や形質変化の有無について検討する。

【方法】タモキシフェン投与によりアディポネクチン発現細胞特異的に赤色蛍光(tdTomato)を発現するマウス(Adipoq-CreERT2/tdT マウス、雌性)を成熟脂肪細胞特異的レポーターマウスとして実験に用いた。タモキシフェン(1mg)を5日間連続で腹腔内投与し、成熟脂肪細胞に tdTomato を発現させた。その後、マウス乳癌細胞株 E0771 を背部皮下(細胞数 1×10^6 個)や乳腺周囲脂肪体(細胞数 1×10^5 個)に移植し、2週間後に腫瘍組織を摘出し、凍結切片標本作製した。蛍光光学顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて腫瘍組織内の tdTomato 陽性細胞の局在を検討するとともに、前駆脂肪細胞、ペリサイト、血管内皮細胞、間葉系幹細胞、癌関連線維芽細胞(CAF)などに対する蛍光免疫染色を行い、観察および定量し、腫瘍組織内における tdTomato 陽性細胞との関連を検討した。

【結果】移植2週間後の乳癌組織内に成熟脂肪細胞マーカーの Perilipin A 陰性で tdTomato 陽性を示す線維芽細胞様細胞(Adipocyte-derived fibroblast-like cells: AFC)の存在が認められた。AFCの一部は体性幹細胞マーカーの Sca-1(背部皮下腫瘍 21%、乳腺周囲脂肪体腫瘍 15%)、PDGFR α (背部皮下腫瘍 0%、乳腺周囲脂肪体腫瘍 5%)、ペリサイトマーカーの NG2(背部皮下腫瘍 0%、乳腺組織腫瘍 18%)を発現していた。一方、CAFマーカーの α -SMA、Fibronectin、FSP-1、血管内皮マーカーの CD31 を発現する AFC は検出されなかった。

【考察】乳癌細胞移植により形成された乳癌組織内には成熟脂肪細胞に由来する線維芽細胞様細胞(AFC)が出現することが明らかになった。AFCの一部は体性幹細胞やペリサイトの形質を発現することが示唆された。乳癌進展過程において周囲の成熟脂肪細胞が形質変換して、体性幹細胞やペリサイトの形質を獲得し、腫瘍内の血管新生などに関与することが示唆された。

Thy1-22-3 抗体腎炎に対する DFAT 細胞療法の効果

○丸山高史¹⁾、福田昇^{1), 2), 3)}、宇都宮慧¹⁾、阿部雅紀¹⁾、松本太郎³⁾

¹⁾ 日本大学医学部腎臓高血圧内分泌内科学、²⁾ 日本大学総合科学研究所、

³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】本学で開発された脱分化脂肪細胞(DFAT)は高い増殖能と間葉系幹細胞と同等の多分化能を有し、調整法も簡便で細胞移植治療の移植細胞源として期待出来る。今回、進行性腎障害モデルである単クローン抗体(mAb)1-22-3 誘発腎炎およびアドリマイシン腎症ラットへの DFAT 細胞移植効果を検討した。【方法】蛍光ラベルした DFAT を 7 週齢雌性の Wistar ラットに移植して 1 週間後に体内分布を検討した。次に同種ラットで mAb1-22-3 誘発腎炎を事前に作成、腎炎作成 1 カ月後に DFAT を他家移植、移植 1 カ月後に効果を評価した。アドリマイシン腎症についても同様に効果を検討した。移植細胞数は 10^6 個/頭で、経路は腎動脈又は尾静脈からの 2 種類を設定した。【成績】移植 1 週間後には腎動脈から移植された DFAT は糸球体に、尾静脈から移植された DFAT は肺に存在していた。アドリマイシン腎症では尿蛋白排泄量、血清 BUN、Cre 値、腎組織において DFAT 細胞移植の効果は認められなかった。mAb1-22-3 誘発腎炎では移植の効果が確認され、特に尾静脈から全身投与した群でより大きな効果が見られた。腎組織内での TSG-6 および TNF- α mRNA 発現は、腎炎群より移植群が有意に上昇して IL-6 と IL-12 β は抑制されていた。血清 TSG-6 濃度は移植群の方が有意に上昇していた。一方 TSG-6 siRNA により DFAT の TSG-6 の発現をノックダウンして移植を行った場合、移植による尿蛋白抑制効果や組織改善効果が消失した。DFAT の自家移植では腎症改善効果は同等だった。他の結果として FACS 解析において脾臓内の T reg の割合を測定したが各群とも有意差は得られなかった。in vitro では培養 DFAT に TNF- α を添付すると線維芽細胞より培養上清中 TSG-6 濃度は上昇した。又 DFAT と SHR-SP のメサングウム細胞をトランスウエルで培養した場合、単独培養よりも TSG-6 の細胞内発現や培養上清中濃度は上昇していた。【結論】以上の結果から DFAT の細胞移植の腎症改善の機序として、間葉系幹細胞の性質を有する DFAT の TSG-6 を中心とした全身の免疫調整作用が考えられた。今後 ANCA 関連腎炎やループス腎炎など予後不良の免疫性腎炎に臨床応用出来る可能性が示唆された。

Induction kidney organoid from disease-specific iPS cells

OLan Chen¹⁾、 Noboru Fukuda^{1), 2)}、 Akiko Tsunemi²⁾、 Sho Tanaka²⁾、 Asako Oguni³⁾、 Kosuke Saito³⁾、
Kyoko Fujiwara³⁾、 Masanori Abe²⁾、 Taro Matsumoto¹⁾

¹⁾Division of Cell Transplantation and Regeneration, Department of Functional Morphology, Nihon University School of Medicine,

²⁾Division of Nephrology Hypertension Endocrinology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine,

³⁾Department of General Medicine, Nihon University School of Medicine,

Objective: Kidney organoids generated from human iPS cells contain nephrons with a collecting duct network, renal interstitial and endothelial cells. They showed highest congruence with human fetal kidney. Nephrogenic diabetes insipidus (NDI) is characterized by defective urine concentration mechanisms in the kidney, which are mainly caused by loss-of-function mutations in the vasopressin type 2 receptor in collecting duct. In polycystic kidney disease (PKD), increased renal GSK3 β expression corresponds with the rise in cAMP levels is associated with abnormal response of collecting duct cells to AVP, mediating fluid secretion and cyst expansion. To analyze functions of collecting duct cells differentiated from the disease-specific iPS cells derived from NDI and PKD patients. To develop in vitro vasopressin stimulating test, we will establish the disease-specific iPS cells from peripheral blood mononuclear and differentiate the disease-specific iPS cells to collecting duct cells on which we will perform the vasopressin stimulating test.

Methods: iPSC was adapted into matrigel and differentiated in MEF-conditioned KSR medium, containing bFGF. To make kidney organoids, duration of CHIR99021 determines the ratio of collecting duct/nephron in the organoid. Cells were cultured with refreshing the FGF9 medium. To eliminate undifferentiated iPS contamination, cells were incubated with rBC2LCN-PE23.

Results: We succeed in making kidney organoid from iPS cells, confirmed collecting duct cells exist by marker confirmation of E-cadherin, Vasopressin type 2 receptor and aquaporin 2 for collecting duct cells. But there were undifferentiated iPS cells exist in the kidney organoid by marker confirmation of Nanog, OCT4, rBC2LCN-FITC for iPS cells.

Conclusion: We succeed in inducing kidney organoid and acquiring collecting duct cells from iPS cells, but there were undifferentiated iPS cells contamination, next step we will try to eliminate these undifferentiated iPS cells by rBC2LCN-PE23 which is designed for undifferentiated iPS cells elimination.

成果発表⑦

補体 C3 は腎尿細管上皮間葉化(EMT)により腎内 RAS を活性化し塩分感受性高血圧を起こす。

ゲノム編集技術による C3 ノックアウト SHR での検討

根岸英理子¹⁾、○福田昇^{1), 2), 3)}、片川まゆみ³⁾、阿部雅紀¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部腎臓高血圧内分泌内科学、²⁾ 日本大学総合科学研究所、

³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】最近、補体 C3 に間葉系幹細胞、間葉系細胞の脱分化性を保つ作用が認められている。我々は SHR の間葉組織では補体 C3 が高発現している事、また補体 C3 は EMT により組織 RA 系を活性化し高血圧に関与している事を報告した。今回、SHR よりジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)法により C3 ノックアウト(KO) SHR を確立し、血圧、表現形、血管腎臓の組織、遺伝子発現を *in vivo* および *in vitro* で検討した。【方法】C3 遺伝子に対する ZFN mRNA を SHR/Izm 受精卵にインジェクションし、C3 KO SHR/Izm を系統樹立した。WKY、SHR、C3 KO SHR を正塩および高塩食とし、血圧を Tail cuff 法およびテレメトリー法でモニタリングした。生直後、8、20 週齢の大動脈、心臓、腎臓を取り出し組織学的評価、SMemb、レニン、KLF-5、E-カドヘリン発現を評価した。*In vitro* で WKY、SHR 及び C3 KO SHR 由来腎メサンジウム細胞(MC)の増殖能、合成型形質マーカーオステオポンチン発現を評価した。【成績】C3 KO SHR の SBP は、SHR より約 20 mmHg 低く、Tail cuff 法およびテレメトリー法とも塩分負荷で観られた SHR お血圧の上昇が C3 KO SHR では抑制されていた。生直後の腎髄質 SMemb 発現は SHR で亢進し、C3 KO SHR で抑制されていた。SHR の腎髄質でレニン、KLF-5 発現が亢進し、C3 KO SHR では低下していた。また SHR の腎髄質では E-カドヘリン発現が低下し、EMT が起こっていたが、C3 KO SHR では抑制されていた。SHR 由来メサンジウム細胞の細胞増殖は WKY に比し亢進し、C3 KO SHR の MC では増殖が抑制されていた。*In vitro* では SHR 由来腎メサンジウム細胞では増殖が亢進し、オステオポンチン mRNA 発現は亢進していたが、C3 KO SHR 由来メサンジウム細胞では抑制されていた。【結論】補体 C3 は SHR で間葉系組織を合成型形質に変換し、また EMT により腎内 RA 系を亢進し、塩分感受性高血圧に関与している事が示され、SHR の高血圧の発症、病態の一義的因子であると考えられた。

DFAT の血管新生効果および壁細胞分化

○渡邊拓史¹⁾、石川三友紀²⁾、長岡悠紀²⁾、山元智衣²⁾、風間智彦²⁾、萩倉一博²⁾、松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部小児科学小児科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる細胞を DFAT (Dedifferentiated fat cells) と呼び、MSC (Mesenchymal stem cell) と同様の多分化能を有する可能性があることが知られている。以前の我々の検討において、マウス下肢虚血モデルへの DFAT 移植により局所の血流が改善することが示された。しかし DFAT の血管新生効果については、まだ機序が不明な部分が多い。今回我々は、DFAT の共培養による血管内皮細胞に与える作用と DFAT の前駆脂肪細胞を経た血管構成細胞への分化能について検討した。

【方法】1. マウス成熟脂肪細胞の天井培養を行い、DFAT を調製する。2. 血管内皮細胞と DFAT との共培養により血管内皮細胞の遊走能・増殖能・管腔形成能の変化を評価する。3. 血管内皮細胞と DFAT との共培養により DFAT における壁細胞マーカーの発現を qPCR、免疫染色で評価する。4. TGF β 1 刺激および阻害による DFAT の壁細胞マーカーの発現の変化 qPCR、免疫染色で評価する。

【結果】血管内皮細胞はマウス DFAT の存在下で遊走能・増殖能が亢進した。またコラーゲンゲル内で血管内皮細胞と DFAT を3次元培養すると、DFAT は血管内皮細胞の管腔形成能を亢進させ、管腔周囲に遊走・接着した。また内皮細胞との共培養により DFAT の壁細胞マーカーの発現が亢進した。さらに TGF β 1 刺激により DFAT の壁細胞マーカーの発現は亢進し、阻害により低下した。

【結論】DFAT は血管内皮細胞の遊走能・増殖能・管腔形成能を亢進させ、血管新生を促進することに加え、血管構成細胞である壁細胞へ分化する可能性が示された。さらに壁細胞分化には TGF β 1 を介するシグナルが重要であることが示唆された。

成果発表⑨

ビタミン D シグナルの脂肪細胞脱分化過程における部分的関与の可能性と細胞治療法への応用

○石澤通康¹⁾、風間智彦²⁾、萩倉一博²⁾、松本太郎²⁾、槇島誠¹⁾

¹⁾日本大学医学部生体機能医学系生化学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】リガンド依存性転写因子であるビタミン D 受容体(Vitamin D receptor ; VDR)は、血中カルシウム濃度の維持や骨代謝活性化、骨細胞の分化誘導など、生体内カルシウム恒常性維持に重要な活性型ビタミン D の受容体であり、核内受容体スーパーファミリーの一種である。また、活性型ビタミン D が前駆脂肪細胞の分化を促進することや、VDR 欠損マウスでは脂肪蓄積が少ないという特徴が見られるなど、ビタミン D-VDR シグナルの脂肪細胞分化への影響が報告されている。本研究では成熟脂肪細胞の脱分化過程における遺伝子変化に対してビタミン D シグナルの影響を検討した。更に、ヒト脱分化脂肪細胞 (hDFAT) を効率的に再分化誘導可能な組織選択的活性を有する薬剤開発を目的とした。

【方法と結果】①天井培養 1 週間後の成熟脂肪細胞において、脂肪細胞のマーカー分子である peroxisome proliferator activated receptor $\gamma 2$ (Ppar $\gamma 2$)、CCAAT-enhancer-binding protein α (C/ebp α)、C/ebp β の mRNA レベルが減少した。活性型ビタミン D 添加培地ではこれら脂肪細胞マーカー分子の発現減少が軽減された。VDR 欠損マウスにおいても、天井培養 1 週間後で、野生型マウスと同様に脂肪分化マーカーの発現レベルが減少したが、脂肪分化マーカーの発現レベルは野生型よりも低かった。ブタの成熟脂肪細胞の脱分化過程で発現増加する Fibronectin 1 やその受容体である Integrin $\alpha 5$ は、マウス成熟脂肪細胞の脱分化過程でも発現増加するが、活性型ビタミン D 添加により、更に発現が増加した。②hDFAT の骨芽細胞への再分化誘導時に活性型ビタミン D 或いは各種組織由来細胞株において選択的活性を有するビタミン D 誘導体を添加したところ、いずれの化合物においても再分化誘導 7 日後のアルカリフォスファターゼ活性の増強が認められた。

【結論】①活性型ビタミン D 及び VDR はマウス脂肪細胞の脱分化過程において発現変化する遺伝子群に部分的に関与した。他の薬剤、培養材料(フラスコのコーティングなど)と組み合わせることで、脱分化効率の制御が期待できる。②活性型ビタミン D 及び組織選択的 VDR アゴニストであるビタミン D 誘導体は、hDFAT の骨芽細胞への再分化効率を増強した。損傷部位への DFAT の注入治療法等において、これら VDR アゴニストを細胞と同時に注入することで、損傷部位の治療効果の増強が期待できる。

脱分化脂肪細胞に由来する肝細胞は中心静脈周辺領域の肝細胞の特性をもつ

○萩原玲子、沖嘉尚、加野浩一郎

日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

【目的】我々は、種々の動物の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を体外培養すると、自発的に脱分化し、線維芽細胞様の脱分化脂肪細胞（DFAT）になることを明らかにしている。平成 29 年度研究成果報告会において、肝幹細胞および肝細胞の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析によって抽出した遺伝子を DFAT に導入すると、Alb および Tat 遺伝子を発現する肝細胞様細胞へ分化することを報告した。一方、肝細胞は肝小葉内の領域（門脈周辺 zone1、中心静脈周辺 zone3、それらの中間 zone2）によって異なる機能をもつことが知られているが、DFAT に由来する肝細胞が zone1~3 のいずれの特性をもつのかについては明らかではない。本研究では、DFAT 由来の肝細胞（DFAT-Hep）における zone 特異的な機能を明らかにする目的で行った。

【材料および方法】抽出した遺伝子を導入した DFAT をコラーゲンコートディッシュに播種し、0.1 μ M デキサメタゾン、10 mM ニコチンアミドを含む DMEM/F12 培地で肝分化誘導した。分化誘導前および分化誘導 14 日後に細胞形態を観察したのち、定法にしたがって細胞の全 RNA を抽出した。リアルタイム RT-PCR 法を用いて、肝細胞特異的遺伝子および zone 特異的遺伝子の発現状況を調べた。また、肝細胞特異的機能の発現については、免疫蛍光染色法および PAS 染色法を用いて調べた。

【結果】肝細胞特異的遺伝子および機能の発現を調べた結果、Afp、Tdo2 遺伝子の発現や、アルブミンおよびグリコーゲンの合成が認められた。zone 特異的遺伝子の発現を調べた結果、zone3 特異的遺伝子である Cyp1a2、Cyp2e1、Cyp2a4、Cyp7a1 および Lgr5 の発現が認められた。

【結論】DFAT 由来の肝細胞は zone3 の特性をもつことが示唆された。また、zone3 の肝細胞は高い薬物代謝能をもつことから、DFAT-Hep は創薬研究への応用展開が期待される。

皮膚再生医療における脱分化脂肪細胞 (DFAT) の効果に関する検討

○副島一孝¹⁾、 櫻村勉¹⁾、 風間智彦²⁾、 仲沢弘明¹⁾、 松本太郎²⁾

¹⁾日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野、²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【目的】再生医療技術を応用した皮膚再建法として人工真皮と培養表皮がある。人工真皮はブタやウシの皮膚より抽出したコラーゲンをスポンジ状に加工したものを真皮構築の scaffold として利用するものであり、本邦でも市販され臨床に供されている。真皮欠損創に移植すると、宿主よりの細胞・毛細血管が侵入して真皮様組織を構築するものであるが、真皮構築に2-3週間を要する点が問題とされている。培養表皮については自家培養表皮(JACE®, J-TEC社製)が本邦ではじめて認可された再生医療製品である。体表面積の30%以上を占める広範囲重傷熱傷の治療に対して保険適応となっているが、自家培養表皮移植後の基底膜構築遅延による移植皮膚の長期脆弱性が問題とされている。われわれは、上記の問題点解決のために脱分化脂肪細胞(DFAT)を導入し、その有用性の検討を行ってきたので、今までに得られた知見を報告する。

【方法】①人工真皮に関する検討:DFATはSD系ラットの腹腔内脂肪より単離・培養した。同種同系ラット背部に全層皮膚欠損創を作製し、人工真皮(Pelnac標準タイプ、グンゼ社製)を移植するモデルを作製した。人工真皮移植に際して、以下の4群を作成した。I群:対照群(未治療)、II群:DFAT(0.5×10^5 cell)治療群、III群:bFGF治療群(bFGF製剤 科研製薬社製 $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)。人工真皮移植後2, 7日目に標本作製し組織学的に検討した。②培養表皮に関する検討:LWD系SPFブタより全層皮膚、皮下脂肪を採取してGreen型培養表皮およびDFAT細胞を調整した。同一個体ブタの背部にIII度熱傷創を模して脂肪露出全層皮膚欠損創を作成し、人工真皮(Pelnac、グンゼ)により真皮再建を行い、対照群(未治療)とDFAT治療群(0.5×10^5 cell/ cm^2)を作成した。その10日後に再建真皮上に自家培養表皮を移植した。培養表皮移植後14日目に開創して評価を行った。

【結果】①人工真皮に関する検討:移植後2日目にはIV群のみで人工真皮下層に新生血管の侵入が観察された。7日目にはII, III, IV群で真皮様組織構築の促進が観られたが、その効果はIV群で最も著明であった。②培養表皮に関する検討:表皮真皮接着層の免疫染色像では主要な基底膜構成タンパクであるcollagen IV、lamininがDFAT治療群で有意に発現が増強し、TEM像で、DFAT治療群で基底膜(BM)構築とanchoring fibril(AF)形成が促進されていた。

【結論】人工真皮移植に際してDFATおよびbFGFによる治療を行うと真皮様組織の構築促進効果が認められたが、それらを併用することにより促進効果は著明となり、人工真皮内への血管侵入も著明に促進され、真皮構築期間の著明な短縮に寄与することが明らかとなった。培養表皮移植に際しては、DFATが基底膜構成タンパクの発現促進に寄与し培養表皮生着促進に有用であることが示唆された。

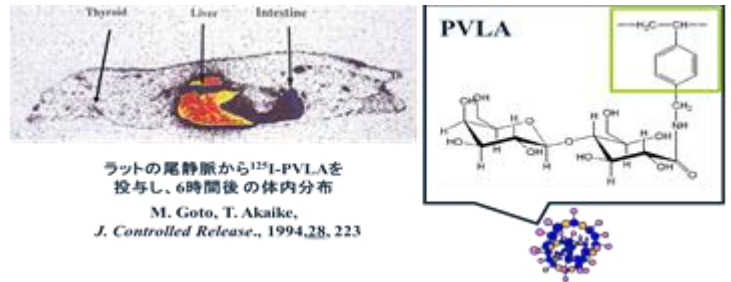
細胞認識性バイオマテリアルによる医療の革新

—カドヘリンマトリックス工学・糖鎖マトリックス工学の再生医療への応用—

赤池 敏宏 先生

国際科学振興財団・再生医工学バイオマテリアル研究所(東京工業大学名誉教授)

我々は 35 年前に肝実質細胞特異的認識機能を有し簡単にポリスチレンなどの疎水性表面に単分子コートできる合成糖鎖高分子 PVLA の設計開発に成功した。(Markromol. Chem., Rapid Commun. 7, 645-650, 1986) 肝実質細胞を選択的に接着しその分化機能を促進維持する新しいマトリックスとしてデビューし、一部は商品化された。PVLA は、肝細胞に特異的に認識される高分子ミセルでありガラクトース残基を有する PVLA のみが、肝臓細胞上のアシアロ糖タンパク質レセプター(AS-R)に特異的に認識された。この特異性は 10⁻⁹ 程度の結合定数を示すなど、アビジン-ビオチン間の相互作用にも匹敵する強固な認識であった。PVLA は肝実質細胞とのみ特異的相互作用を示し、他のどの細胞にもこれほど強い相互作用を示すことはなく、むしろ非常に低い接着力を示すか皆無である場合が多い。PVLA ミセルを尾静脈を介してラット血中に投与すると数時間以内に肝臓の細胞に集積し、興味深いことに一万を超える分子量を持つ高分子でありながら肝臓から体外へ胆汁酸排泄された。(J.Controlled Release.28(1994)223-233) 一方、10年ほど前から上図に示すように同じように疎水性表面に対して安定なコーティングが可能な両親媒性タンパク質として E-カドヘリンの細胞外ドメインをキメラ化した固定型 E-cad-Fc を新しいタイプの細胞認識性バイオマテリアルとして開発し、ES 細胞を筆頭に E カドヘリン発現細胞の新しい培養方法として応用を試みた。(PLoS ONE, 1, e15, 2006 他多数) E-cad-Fc は E-カドヘリン分子の細胞外ドメインと抗体 IgG (Immunoglobulin G) の Fc 領域を融合化したキメラタンパク質である。E-カドヘリン分子を介した細胞—細胞間接着機構を細胞—基質間接着機構に置き換える画期的モデル分子となった。未処理ポリスチレンの表面のような疎水性表面上にはその水溶液から安定かつ容易に固定化ができる。固定化された E-cad-Fc キメラタンパク質マトリックス上でマウス ES 細胞は単一細胞レベルで分散しながら未分化維持増殖できる全く新しい画期的な培養システムである。この単一細胞レベルでの ES/iPS 細胞の新規培養システムは、サイトカインなど液性因子の作用に不均一性を生じないため、すべての細胞においては直接的に均一なシグナルの刺激を与え、それまでのコロニー形成型培養法の決定的欠点を解決できた。E-cad-Fc キメラタンパク質の画期的な利点は一つの人



細胞認識バイオマテリアルとしてのキメラ抗体の開発



工定型 E-cad-Fc を新しいタイプの細胞認識性バイオマテリアルとして開発し、ES 細胞を筆頭に E カドヘリン発現細胞の新しい培養方法として応用を試みた。(PLoS ONE, 1, e15, 2006 他多数) E-cad-Fc は E-カドヘリン分子の細胞外ドメインと抗体 IgG (Immunoglobulin G) の Fc 領域を融合化したキメラタンパク質である。E-カドヘリン分子を介した細胞—細胞間接着機構を細胞—基質間接着機構に置き換える画期的モデル分子となった。未処理ポリスチレンの表面のような疎水性表面上にはその水溶液から安定かつ容易に固定化ができる。固定化された E-cad-Fc キメラタンパク質マトリックス上でマウス ES 細胞は単一細胞レベルで分散しながら未分化維持増殖できる全く新しい画期的な培養システムである。この単一細胞レベルでの ES/iPS 細胞の新規培養システムは、サイトカインなど液性因子の作用に不均一性を生じないため、すべての細胞においては直接的に均一なシグナルの刺激を与え、それまでのコロニー形成型培養法の決定的欠点を解決できた。E-cad-Fc キメラタンパク質の画期的な利点は一つの人工タンパク質分子でありながら生き物(細胞)と人工物(シャーレ)に同時に安定に接着できる機能を持ち、E-カドヘリン分子の生理活性発現を達成できることである。これにより今までに不可能であった単一細胞レベルの ES/iPS 細胞の培養システムを実現できることとなった。もちろん、未分化な ES/iPS 細胞から肝細胞や神経細胞への分化誘導に関する研究も精力的に行い報告している。さらに上記の PVLA と E-cad-Fc を組み合わせて共固定すると iPS 細胞を未分化で増殖させ、固定 PVLA 分子が分化初期の AS-R への刺激を加えることで、iPS 細胞から肝細胞への分化が加速促進された。我々は細胞を特異的に認識し固定できる様々なナノバイオマテリアルの設計を通じて安全性の高い標的(臓器・細胞)指向性の治療システムの開発に向けて、共同研究によりマラリアはもちろん、各種臓器の感染症・線維症・ガンへの治療・応用を目指したい。