

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11213

研究課題名(和文) iPS細胞由来液性パラクライン因子による骨再生医療の開発

研究課題名(英文) Bone regenerative medicine by iPS cell derived soluble paracrine factors

研究代表者

片桐 渉 (Katagiri, Wataru)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10437030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜由来iPS細胞あるいは骨髄由来間葉系幹細胞の培養上清およびその構成因子による骨再生に関し比較検討を行った。即ち各細胞由来の培養上清(CM)やそれを模したサイトカイン群(CC)、培養上清より抽出したエクソソーム(Exo)を用いた。CM、CC、Exoともに細胞遊走、血管新生、細胞分化を促進し、その効果は細胞間に有意な差を認めなかった。動物実験においても同等の骨形成を示した。これらの結果よりiPS細胞や骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨再生医療は細胞培養上清やその構成因子を用い代替できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone regeneration by the secretomes from oral mucosa derived iPS cells and bone marrow derived mesenchymal stem cells were evaluated. We used conditioned medium (CM), CM mimicked cocktail of cytokines (CC) and exosome (Exo). CM, CC and Exo improved the migration of stem cells, angiogenesis and differentiation into osteoblast although these three did not show any statistical difference. Even in animal studies, the results of bone formation were same. These results indicated the conditioned medium and its contents will be able to substitute the current stem cell therapy in bone regenerative medicine.

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨再生 iPS細胞 増殖因子 培養上清 液性因子

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでに骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いた骨再生医療のトランスレーショナルリサーチに取り組んできた。一方では近年、移植細胞の移植後の動態や移植細胞より分泌される様々な液性因子に関する研究から、組織再生には移植細胞のみならず、細胞から分泌されるサイトカインなど様々な液性因子が関与していることが明らかになってきた。

われわれはこの点に着目し、MSC の培養上清にこれら液性因子が含まれることに着目し、MSC の培養上清 (MSC-CM) による骨再生研究を行い、MSC の移植と同等以上の効果があることを明らかにしてきた。

このように細胞移植を行わない再生医療の可能性が示唆されたが、一方で実用化のためにはより CM による骨再生により有用な細胞源を確保すること、そして骨再生にとって不要あるいは負の作用をも含有するであろう CM ではなく、CM に含まれている有効成分のみで組織再生がなされる方がメリットが高いと考えられるが、そのような報告はわれわれの渉猟し得る限りは存在しない。

2. 研究の目的

本研究において細胞源として iPS 細胞に着目し、CM の成分としては骨再生に有用であるとされている既知のサイトカイン、あるいはエクソソームについて、それぞれによる骨再生能を *in vitro* および *in vivo* で検討し、細胞移植に代わる、あるいは既存の製剤に代わる組織再生の考え方もった、あらたなコンセプトを有する治療の可能性を探索することを目的とした。またここから得られる結果は将来的な創薬にも直結するため、そのための基礎的なデータを収集することも目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞、CM の作成 iPS 細胞は倫理審査委員会にて承認を得たプロトコールに従いヒト口腔粘膜より上皮細胞を採取し樹立した。MSC は Lonza 社のものを使用した。いずれも一定期間増殖させ、最後の 48 時間は無血清培地にて培養し、その培養上清を CM とした。

(2)細胞遊走能、血管新生能、骨分化誘導マーカーの評価 MSC を iPS-CM、MSC-CM 存在下に培養し細胞遊走能を double chamber assay にて、骨分化誘導マーカーは ALP (アルカリホスファターゼ)、OCN (オステオカルシン)、Runx2、Col1 (I 型コラーゲン) などの発現をリアルタイム PCR にて検討した。血管新生については HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) を培養し形成された管腔の長さや分岐の数などを評価した。

(3)ラット頭蓋骨骨欠損モデルに対する CM の移植実験 Wistar ラットの頭蓋骨に直径 5mm の骨欠損を形成し、足場としてアテロコラーゲンシート (テルダーミス®) を用い、各 CM を含浸させ移植した。移植後 2、4 週にマイクロ CT による X 線学的評価、および組織学

的、免疫組織学的評価を行った。

(4)MC 含有サイトカインの組み合わせによる骨形成能の評価 CM に含まれるサイトカインのうち、IGF-1 (インスリン様増殖因子)、VEGF (血管内皮細胞増殖因子)、TGF- β (形質転換増殖因子) の 3 種類を組み合わせ、CM を模倣したサイトカイン・カクテル (以下、CC) を作成し、上記 1~3 の検討を同様に行った。

(5)CM 由来エクソソームによる骨形成能の検討 各 CM より超遠心法にてエクソソームを分離し、上記 1~3 の検討を行った。

4. 研究成果

(1)各 CM に含まれるサイトカイン 各 CM に含有されるサイトカインはサイトカイン・アレイや ELISA 法に検討した。その結果、いずれの CM においても細胞遊走に関わる IGF-1、MCP-1、血管新生に深く関与する VEGF、骨分化に関与する TGF- β などが含まれ、CM による有意な差は認められなかった。

(2)細胞遊走能、血管新生能、骨分化誘導マーカーの発現の検討 コントロール群である PBS に比べいずれの CM も有意に遊走能、血管新生能、骨分化誘導マーカーの発現亢進が認められた。一部の指標においては iPS-CM が MSC-CM に比べ高い値を示したものの、CM 間の有意な差はみられなかった。

(3)ラット頭蓋骨骨欠損モデルに対する CM の移植実験 移植 2 週目では iPS-CM が MSC-CM に比べ有意な新生骨占有面積の増加を認めた。しかしながら移植後 4 週では同等であった。免疫組織学的検討ではいずれの群も 2 週において幹細胞マーカーである CD105 陽性細胞、血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性細胞の骨欠損部辺縁への集積を認め、iPS-CM の方がその集積は多かった。

(4)CC による骨形成能の検討 CM に含まれる濃度と同濃度を含む CC を作成し、各実験にて CC と CM の比較を行った。この結果、3 種のサイトカインのカクテルである CC においても *in vitro*、*in vivo* いずれも CM と同等の結果であった。

(5)エクソソームによる骨形成能の検討 各 CM 由来のエクソソームについて 1~3 の検討を行った。エクソソームを一定の濃度で使用すると骨形成能が更新することが示されたが、各 CM にくらべ骨形成は *in vivo* において少ない傾向であった。

(6)結論 以上の研究結果よりヒト口腔由来の iPS-CM は骨髄由来間葉系幹細胞由来である MSC-CM と同等、あるいはそれ以上の骨形成能を持つことが明らかとなった。また、CC の骨形成能に関しても iPS-CM や MSC-CM と有意差が認められなかった。

これらのことより CM は骨再生に有用であることが示唆された。また細胞移植に代わる、あるいは既存の製剤に代替する方法として今後も検討を進めていく必要がある。その中で iPS 細胞由来の CM や CM 構成成分であるサイトカインを組み合わせた CM を模倣した製

剤やエクソソームについても将来的な普及や創薬を考えた時には有用な方法であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- (1) Wataru Katagiri, Junna Watanabe, Naoto Toyama, Masashi Osugi, Kohei Sakaguchi, Hideharu Hibi.
Clinical study of bone regeneration by conditioned medium from mesenchymal stem cells after maxillary sinus floor elevation.
Implant Dentistry, Vol. 26, No. 4, 607-612, 2017, 査読あり
- (2) Wataru Katagiri, Takamasa Kawai, Masashi Osugi, Yukiko Sugimura-Wakayama, Kohei Sakaguchi, Taku Kojima, Tadaharu Kobayashi. Angiogenesis in newly regenerated bone by secretomes of human mesenchymal stem cells. Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery, Vol. 39, No. 1, 8, 2017, 査読あり
- (3) Wataru Katagiri, Kohei Sakaguchi, Takamasa Kawai, Yukiko Wakayama, Masashi Osugi, Hideharu Hibi.
A defined mix of cytokines mimics conditioned medium from cultures of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and elicits bone regeneration. Cell Proliferation, Vol. 50, No. 3, e12333, 2017, 査読あり
- (4) Kohei Sakaguchi, Wataru Katagiri, Masashi Osugi, Takamasa Kawai, Yukiko Sugimura-Wakayama, Hideharu Hibi.
Periodontal tissue regeneration using the cytokine cocktail mimicking secretomes in the conditioned media from human mesenchymal stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 484, No. 1, 100-106, 2017, 査読あり
- (5) Kenichi Ogata, Wataru Katagiri, Hideharu Hibi.
Secretomes from mesenchymal stem cells participate in the regulation of osteoclastogenesis in vitro. Clinical oral investigations, Vol. 21, No. 6, 1979-1988, 2017, 査読あり
- (6) Wataru Katagiri, Masashi Osugi, Takamasa Kawai, Hideharu Hibi
First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. Head & Face Medicine, Vol. 12, 5, 2016, 査読あり
- (7) Wataru Katagiri, Masashi Osugi, Kazuhiko Kinoshita, Hideharu Hibi.

Conditioned medium from mesenchymal stem cells enhances early bone regeneration after maxillary sinus floor elevation in rabbits.

Implant Dentistry, Vol. 24, No. 6, 657-663, 2015, 査読あり

- (8) Wataru Katagiri, Masashi Osugi, Takamasa Kawai, Hideharu Hibi Secreted frizzled-related protein promotes bone regeneration by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. International Journal of Molecular Sciences, Vol. 16, No. 10, 23250-23258, 2015, 査読あり
- (9) Kenichi Ogata, Wataru Katagiri, Masashi Osugi, Takamasa Kawai, Yukiko Sugimura, Hideharu Hibi, Seiji Nakamura, Minoru Ueda.
Evaluation of the therapeutic effects of conditioned media from mesenchymal stem cells in a rat bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like model. Bone, Vol. 74, 95-105, 2015, 査読あり
- (10) Takamasa Kawai, Wataru Katagiri, Masashi Osugi, Yukiko Sugimura, Hideharu Hibi, Minoru Ueda. Secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhance periodontal tissue regeneration. Cytotherapy, Vol. 14, No. 4, 369-381, 2015, 査読あり

[学会発表] (計 11 件)

- (1) Wataru Katagiri, Masashi Osugi, Junna Watanabe, Kohei Sakaguchi, Hideharu Hibi. Clinical study for bone regeneration after maxillary sinus floor elevation by secretomes from mesenchymal stem cells. 31st Annual Scientific Meeting of Association for Osseointegration, 2016
- (2) Wataru Katagiri, Yukiko Sugimura, Masashi Osugi, Takamasa Kawai, Kenichi Ogata, Kohei Sakaguchi, Hideharu Hibi. Novel bone regenerative medicine using the secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stem cells 2015 IADR General Session, 2015. _
- (3) Wataru Katagiri, Junna Watanabe, Naoto Toyama, Kohei Sakaguchi, Yukiko Sugimura-Wakayama, Masashi Osugi, Taku Kojima, Tadaharu Kobayashi. Translational research for bone regeneration by the conditioned medium from mesenchymal stem cells after maxillary sinus floor elevation. The 55th Congress of the Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons, 2016.
- (4) 片桐 涉
New strategies for oral and maxillofacial

regeneration using conditioned media and mesenchymal stem cells. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会第 2 回日中合同シンポジウム

(5) 片桐 渉

Translational research in tissue engineering and regenerative medicine of bone by mesenchymal stem cells and secretomes.

第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会
日台姉妹提携 10 周年記念シンポジウム

(6) 坂口晃平、片桐 渉、大杉将嗣、河合孝真、梶村有紀子、緒方謙一、日比英晴
成長因子混合剤による新たな骨再生法
第 14 回日本再生医療学会総会、2015

(7) 渡邊純奈、片桐 渉、大杉将嗣、安藤さやか、梶村有紀子、緒方謙一、坂口晃平、鶴田剛士、日比英晴
幹細胞培養上清由来成長因子を用いた新規骨再生医療における組織学的検討
第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2015

(8) 坂口晃平、片桐 渉、大杉将嗣、若山有紀子、鶴田剛士、日比英晴
イヌ歯周病モデルを用いた成長因子混合剤による歯周組織再生能の検討
第 15 回日本再生医療学会総会、2016

(9) 外山直人、片桐 渉、大杉将嗣、安藤さやか、若山有紀子、坂口晃平、鶴田剛士、渡邊純奈、日比英晴
骨髄由来間葉系幹細胞培養上清由来液性因子を用いた新たな骨再生治療に関する臨床的検討
第 15 回日本再生医療学会総会、2016

(10) 坂口晃平、片桐 渉、大杉将嗣、酒井陽、若山有紀子、鶴田剛士、日比英晴
幹細胞由来培養上清を模した成長因子混合剤による新たな歯周組織再生法
第 37 回日本炎症・再生医学会、2016

(11) 坂口晃平、片桐 渉、大杉将嗣、酒井陽、若山有紀子、鶴田剛士、渡邊純奈、日比英晴
骨髄由来間葉系幹細胞由来培養上清を模倣した成長因子混合剤による歯周組織再生
第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
片桐 渉 (KATAGIRI, Wataru)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：10437030

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし