

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09779

研究課題名（和文）不死化したヒト乳歯歯髄幹細胞の培養上清の基礎的解析と褥瘡マウスモデルの治療効果

研究課題名（英文）Characterization of conditioned medium of immortalized human exfoliated deciduous teeth and its therapeutic effect against a pressure ulcer mouse model

研究代表者

村上 史浩（Murakami, Fumihito）

東京医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40866662

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、製剤化を目指し、不死化したヒト乳歯歯髄幹細胞を作製し、その培養上清（SHED-CM）の生化学的解析と褥瘡モデルマウスを用いた潰瘍形成抑制効果について検討した。不死化SHEDは、増殖性とサイトカイン産生能が高かった。その不死化SHED-CMを、2つの磁石で背部皮膚を挟み誘導する虚血再灌流障害により発症する褥瘡の潰瘍形成モデルマウスに皮内投与すると、潰瘍形成が抑制された。その作用機序として、抗体を用いた免疫除去や細胞培養系を用いた検討より、SHED-CM中の肝細胞増殖因子や血管内皮細胞増殖因子による血管新生の促進や活性酸素種の産生阻害作用が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、間葉系幹細胞（MSC）の培養上清（CM）の投与が、細胞フリー療法として、拒絶反応の可能性を懸念することなく、治療効果や安全性も高いため注目されている。そこで、CMの製剤化を考えた場合、無限に安定的に増え同一性の高いCMの調製を可能とする不死化MSCを作製し、それをCMの供給源とすることが一番良いと考えた。高齢化が加速する今日の日本において、褥瘡、いわゆる床すれは、寝たきりの高齢者にはその対応が必須ではあるが、その根本的な治療法や予防法は今のところ存在しない。本研究結果は、この褥瘡などの潰瘍形成に対して、不死化した乳歯歯髄幹細胞のCMの医薬品としての有効性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：In the present study, immortalized stem cell line from human exfoliated deciduous teeth (SHED) was established aiming at implementation of its conditioned medium (CM) in human medicine. The SHED-CM was biochemically analyzed and its inhibitory effect on ulcer formation was investigated using a mouse model of pressure ulcer. Immortalized SHED cells have a high proliferative and cytokine-producing capacity. Intradermal injections of the SHED-CM significantly suppressed a mouse model of pressure ulcer formation caused by ischemia-reperfusion injury induced by sandwiching the dorsal skin between two magnets. The possible mechanisms of action are highly attributed to the promotion of angiogenesis and inhibition of reactive oxygen species generation by hepatocyte growth factor and vascular endothelial cell growth factor in the SHED-CM, which were suggested by using antibody-based immunodepletion experiments and in vitro cell culture systems.

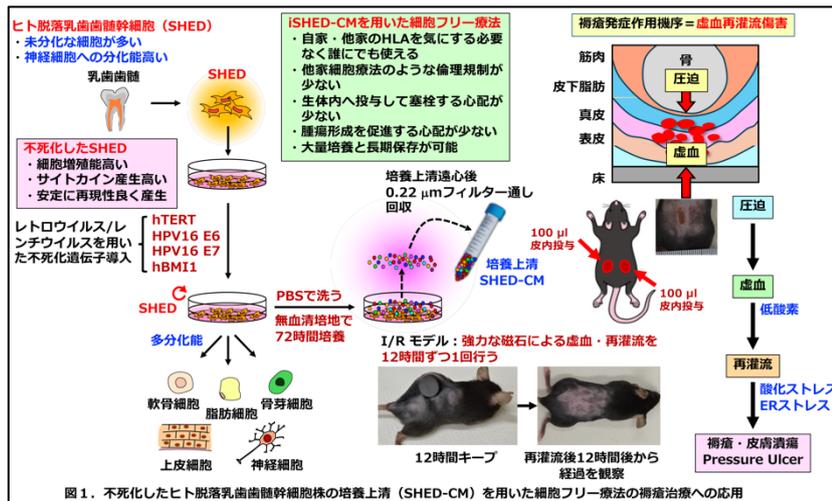
研究分野：再生医療

キーワード：乳歯歯髄幹細胞 細胞培養上清 不死化幹細胞 褥瘡モデルマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) は、自己複製能と多分化能を有する体性幹細胞で、組織修復・再生能や免疫抑制能を有し、各組織に微量に存在し、細胞培養で数回継代可能で増やすことができる。iPS細胞とは異なり、生体内に投与してもテラトーマを形成する造腫瘍性はなく、安全性が高い。これまでに、他家骨髄由来 MSC テムセルを用いた細胞移植療法など、3種類の MSC が再生医療等製品として認可されているが、他家幹細胞移植の倫理面や臨床応用の利便性、免疫拒絶などの問題が残っている。MSC の作用機序は、生体内に投与すると損傷した部位に遊走し損傷した細胞に分化誘導し修復再生と言われているが、その割合はかなり低いと考えられている。そのため、主に、その細胞が分泌するサイトカインなどの液性因子のパラクライン効果によると考えられている。それ故、MSC の細胞培養上清 (Conditioned Medium: CM) の投与が、細胞フリー療法として、拒絶反応の可能性を懸念する必要がなく、安全性も高いため注目されている¹⁾。ところが、その CM 中の各種液性因子の濃度が十分でない場合や安定性や再現性が低い問題が指摘されている。さらに、CM の製剤化を考えた場合、再現性よく調製できるように高い品質管理が必要であるが、それには、無限に安定的に増え同一性の高い CM の調製を可能とする不死化 MSC を作製し、それを CM の供給源とすることが一番良いと考えられる。高齢化が加速する今日の日本において、褥瘡、いわゆる床すれは、寝たきりの高齢者にはその対応が必須ではあるが、その根本的な治療法や予防法は今のところ存在しない。



2. 研究の目的

我々は、MSC として、未分化な幹細胞が多く、神経堤由来の細胞のため、神経系の治療に有効と考えられる乳歯に注目している。乳歯は、5、6歳前後の子供の歯であるため、小さく、その歯髄幹細胞はほんの少ししか採取できない。それ故、この生え替わるために脱落する乳歯を入手し、歯髄幹細胞 (SHED) を取り出し培養し、無限に増殖する細胞株にすることは極めて有効と考えられる。本研究では、SHED-CM の製剤化を目指し、不死化 SHED を作製し、プライマリーの SHED と比較検討し、その優越性や基礎的性質を明らかにする。さらに、この不死化した SHED の CM を用いて、褥瘡形成について、磁石を用いて誘導する虚血再灌流障害の褥瘡疾患モデルマウスを用いて、その治療効果と予防効果、その作用機序について明らかにする (図 1)。

3. 研究の方法

(1) 不死化 SHED の調製とその細胞増殖能とサイトカイン産生能の解析

プライマリーの SHED に不死化遺伝子 (ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、ヒトパピローマウイルス 16 型 E6&E7、human B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) を導入し株化した不死化 SHED を作製した。プライマリーおよび不死化した SHED を、コンフルエント手前まで培養後 PBS で洗い、無血清培地で 3 日間培養し、その上清を回収した。細胞増殖能は CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega) を用いて測定し、サイトカイン産生は、Quantibody Human Cytokine Array Q1000 (RayBiotech) を用いて網羅的に定量し、さらに、個別に個々のサイトカイン特異的な ELISA を用いても測定した。

(2) 褥瘡モデルマウスの解析

マウスの背部毛を剃毛後、2つの強力な円形磁石で皮膚を 12 時間挟み、その後外して 12 時間放置し、虚血再灌流障害による褥瘡モデルを作製した²⁾。次の日から、SHED-CM およびコントロール培地を磁石で挟んだ近傍に毎日皮内注射し、潰瘍形成の大きさを経時的に写真に撮影後、画像解析ソフト FIJI を用いて潰瘍形成の面積を定量した。

(3) 血管新生作用の解析

虚血再灌流障害を誘導した 4 日後に褥瘡モデルマウスの皮膚組織を回収し、血管新生マーカーの CD31 やパリスイトマーカーの NG2 に対する抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。さらに、ヒト臍帯由来血管内皮細胞を用いた管腔形成アッセイにより、in vitro の血管新生能を定量した。

(4) 抗酸化作用の解析

虚血再灌流障害を誘導した 4 日後に褥瘡モデルマウスの皮膚組織を回収し、血管新生マーカー

一の DNA 酸化ストレスマーカー 8-OHdG に対する抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。さらに、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞を低酸素下で 48 時間培養後、通常の酸素濃度下に移し 6 時間培養し、活性酸素種 (ROS) 産生を DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit (abcam) を用いて測定した。

4. 研究成果³

(1) 不死化 SHED は細胞増殖性が高くその CM は種々のサイトカインを豊富に含む

同細胞数のプライマリー SHED と不死化 SHED を培養し、増殖能を比較すると、それぞれ細胞の培地や無血清培地においても、不死化 SHED の方が増殖能が高く、サイトカインの産生量も、プライマリー SHED-CM に比べ不死化 SHED-CM の方が多く含まれていた。

(2) SHED-CM 投与は褥瘡モデルマウスで潰瘍形成を抑制

磁石を用いて虚血再灌流障害を誘導後、SHED-CM を潰瘍形成の近傍に毎日皮内投与すると、コントロール培地に比べ、有意に潰瘍形成が抑制された。潰瘍形成のピーク時の 4 日後を過ぎて SHED-CM を投与しても、その潰瘍形成抑制効果が見られた。以上の結果より、SHED-CM を皮内投与すると潰瘍形成の抑制効果があることを明らかにした。

(3) SHED-CM 投与による褥瘡モデルマウスでの潰瘍形成抑制の作用機序

これまでに、褥瘡治療に効果のあるサイトカインとして、basic Fibroblast growth factor (bFGF) が知られているが、SHED-CM に含まれる bFGF の量は多くない。そこで、bFGF を 1 µg 投与し SHED-CM と比較すると、SHED-CM と同様な潰瘍形成抑制効果が見られた。次に、SHED-CM 中には、エクソソームも含まれているため、SHED-CM を超遠心により、沈渣のエクソソーム分画とエクソソームを除いた上清分画に分けてマウスに投与すると、上清では、抑制効果がみられたが、エクソソーム分画では殆ど見られなかった。さらに、上清中に多く含まれるサイトカインの中で潰瘍形成に抑制効果を示す可能性のあるサイトカイン Vascular endothelial growth factor (VEGF) と Hepatocyte growth factor (HGF) に対する特異的抗体を用いた免疫除去により SHED-CM からそれぞれのサイトカインを除くと、潰瘍形成抑制効果がキャンセルされた。ところが、2つの組換え精製蛋白質を、上清に含まれる量と同量を混ぜて投与しても、SHED-CM ほどの抑制効果は示さなかった。以上の結果より、SHED-CM の潰瘍形成の抑制効果には、エクソソームの関与は低く、VEGF や HGF やその他のなどのサイトカインによる相乗効果が重要と考えられる。

(4) SHED-CM の血管新生促進作用

虚血再灌流障害を誘導した 4 日後に褥瘡モデルマウスの皮膚組織を回収し、血管新生マーカーの CD31 とペリサイトマーカーの NG2 に対する抗体を用いた免疫組織学的解析を行うと、SHED-CM 投与により、コントロール培地の投与に比べ有意に CD31⁺新生血管の数やペリサイトの数が増加し、血管新生が促進されていることがわかった。さらに、ヒト臍帯由来血管内皮細胞を用いた管腔形成アッセイでも、SHED-CM は管腔形成を促進した。さらに、その時、HGF および VEGF のどちらの抗体でも、SHED-CM による管腔形成促進効果が阻害された。以上の結果より、SHED-CM の潰瘍形成抑制効果には、VEGF や HGF などを経た血管新生を促進する作用機序の関与が示唆された。

(5) SHED-CM 抗酸化作用

虚血再灌流障害を誘導した 4 日後に褥瘡モデルマウスの皮膚組織を回収し、血管新生マーカーの DNA 酸化ストレスマーカー 8-OHdG に対する抗体を用いた免疫組織学的解析を行うと、SHED-CM 投与により、コントロール培地の投与に比べ有意に 8-OHdG⁺酸化 DNA の数が低下した。そこで、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞を低酸素下で 48 時間培養後、通常の酸素濃度下に移し 6 時間培養し、ROS 産生量を調べると、SHED-CM は、ROS 産生を抑制した。さらに、その抑制効果は、HGF および VEGF のどちらの抗体でもキャンセルされた。以上の結果より、SHED-CM の潰瘍形成抑制効果には、VEGF や HGF などを経た ROS 産生を阻害する作用機序の関与が示唆された。

(6) SHED-CM 投与の褥瘡予防効果

磁石を挟んで虚血再灌流障害を誘導する 1 週間前から前日まで毎日皮内に前投与しても、潰瘍形成の抑制が見られた。皮膚組織の組織学的解析より、皮膚の厚みを測定すると、SHED-CM の投与によりコントロール培地の投与に比べ肥厚が見られ、このことが、潰瘍形成の抑制に繋がったと考えられる。以上の結果より、SHED-CM の皮内前投与は、皮膚の肥厚を増強し褥瘡の予防効果を示すことが示唆された。

【参考文献】

1. Fernandez-Francos S, Eiro N, Costa LA, et al. Mesenchymal Stem Cells as a Cornerstone in a Galaxy of Intercellular Signals: Basis for a New Era of Medicine. *Int J Mol Sci.* 2021 22.
2. Motegi SI, Sekiguchi A, Uchiyama A, et al. Protective effect of mesenchymal stem cells on the pressure ulcer formation by the regulation of oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep.* 2017 7, 17186.
3. Katahira Y, Murakami F, Inoue S, et al. Protective effects of conditioned media of immortalized stem cells from human exfoliated deciduous teeth on pressure ulcer formation. *Front Immunol.* 2023 13, 1010700.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Katahira Y, Murakami M, Inoue S, Miyakawa S, Sakamoto E, Furusaka Y, Watanabe A, Sekine A, Kuroda M, Hasegawa H, Mizoguchi I, Yoshimoto T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Protective effects of conditioned media of immortalized stem cells from human exfoliated deciduous teeth on pressure ulcer formation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1010700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.1010700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito T, Yamaguchi S, Soga D, Ueda K, Yoshimoto T, Koyama Y.	4. 巻 9(12)
2. 論文標題 Water-absorbing bioadhesive poly(acrylic acid)/polyvinylpyrrolidone complex sponge for hemostatic agents.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering (Basel)	6. 最初と最後の頁 755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bioengineering9120755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito T, Yamaguchi S, Soga D, Yoshimoto T, Koyama Y.	4. 巻 8(8)
2. 論文標題 Preparation of a bioadhesive poly(acrylic acid)/polyvinylpyrrolidone complex gel and its clinical effect on dental hemostasis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gels	6. 最初と最後の頁 462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/gels8080462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe A, Mizoguchi I, Hasegawa H, Katahira Y, Inoue S, Sakamoto E, Furusaka Y, Sekine A, Miyakawa S, Murakami F, Xu M, Yoneto T, Yoshimoto T.	4. 巻 12
2. 論文標題 A chaperone-like role for EBI3 in collaboration with calnexin under inflammatory conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 757669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.757669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa H, Mizoguchi I, Orii N, Inoue S, Katahira Y, Yoneto T, Mingli X, Miyazaki T, Yoshimoto T.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 IL-23p19 and CD5 antigen-like form a possible heterodimeric cytokine and contribute to experimental autoimmune encephalomyelitis development.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84624-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furusaka Y, Inoue S, Mizoguchi I, Hasegawa H, Katahira Y, Watanabe A, Sakamoto E, Sekine A, Miyakawa S, Umezu T, Owaki T, Yoneto T, Yoshimoto T.	4. 巻 114(6)
2. 論文標題 Potent antitumor effects of the conditioned medium of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via IGFBP-4.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2499-2514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto E, Katahira Y, Watanabe A, Furusaka Y, Sekine A, Yamagishi M, Sonoda J, Miyakawa S, Inoue S, Hasegawa H, Yo K, Yamaji F, Toyoda T, Mizoguchi I, Yoshimoto T.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Chemical- and Drug-Induced Allergic, Inflammatory, and Autoimmune Diseases via Haptenation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology (Basel)	6. 最初と最後の頁 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology12010123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katahira Y, Sakamoto E, Watanabe A, Furusaka Y, Inoue S, Hasegawa H, Mizoguchi I, Yo K, Yamaji F, Toyoda A, Yoshimoto T.	4. 巻 108(3)
2. 論文標題 Upregulation of CD86 and IL-12 by rhododendrol in THP-1 cells cocultured with melanocytes through ROS and ATP.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 167-177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2022.12.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hasegawa H, Sakamoto E, Katahira Y, Miyakawa S, Murakami F, Inoue S, Watanabe A, Furusaka Y, Sekine A, Owaki T, Mizoguchi I, Yoshimoto T.
2. 発表標題 Protective effect of conditioned medium of immortalized stem cells from human exfoliated deciduous tooth on the peripheral neuropathy of experimental autoimmune neuritis.
3. 学会等名 JSICR/MMCB 2022 Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 善本隆之、長谷川英哲、片平泰弘、井上禎也、古阪悠馬、坂本恵梨、渡邊有麻、宮川聡美、大脇敏之、溝口 出
2. 発表標題 不死化したヒト脱落乳歯歯髄幹細胞の培養上清投与による実験的自己免疫性神経炎の治療効果
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Furusaka Y, Katahira Y, Hasegawa H, Umezu T, Mizoguchi I, Yoneto T, Yoshimoto T.
2. 発表標題 Inhibitory effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on tumor growth and its possible molecular mechanism.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米戸敏彦、古阪悠馬、片平泰弘、宮川聡美、長谷川英哲、溝口出、善本隆之
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞の腫瘍増殖の抑制効果とその作用機序
3. 学会等名 第30回乳癌基礎研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片平泰弘、坂本恵梨、古阪悠馬、村上史浩、宮川聡美、井上槇也、渡邊有麻、関根碧水、長谷川 英哲、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 不死化したヒト歯髓由来間葉系幹細胞(MSC)培養上清の褥瘡 モデルマウス皮膚潰瘍に対する治療効果と作用機序の検討
3. 学会等名 第85回本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古阪悠馬、片平泰弘、村上史浩、坂本恵梨、渡邊有麻、井上槇也、長谷川英哲、米戸敏彦、徐明利、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 間葉系幹細胞培養上清のIGFBP-4 を介した腫瘍増殖の抑制
3. 学会等名 第85回本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katahira Y, Inoue S, Hasegawa H, Watanabe A, Mizoguchi I, Yoshimoto T.
2. 発表標題 Protective effect of conditioned media of immortalized stem cells from human exfoliated deciduous teeth on the formation of acute pressure ulcers via HGF and VEGF.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片平泰弘、長谷川英哲、井上槇也、古阪悠馬、坂本絵梨、渡邊有麻、関根碧水、宮川聡美、村上史浩、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 不死化したヒト脱落乳歯歯髓幹細胞 (SHED-CM) 培養上清の褥瘡モデルマウス皮膚潰瘍に対する治療効果
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sekine A, Katahira Y, Watanabe A, Miyakawa S, Hasegawa H, Mizoguchi I, Yoshimoto T.
2. 発表標題 Inhibition of melanogenesis by conditioned medium of an immortalized stem cell line from human exfoliated deciduous teeth through possibly Wnt5a-mediated suppression of Wnt signaling.
3. 学会等名 第52回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 堀尾江里、山岸美宇、片平泰弘、長谷川英哲、井上槇也、渡邊有麻、関根碧水、園田寿希心、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髄幹細胞のセクレトームによるストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルマウスの末梢神経障害の抑制
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 片平泰弘、長谷川英哲、井上槇也、渡邊有麻、関根碧水、山岸 宇、山口夏輝、徐 明利、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髄幹細胞由来馴化培地でのX線照射による白髪化に対する保護効果
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 褥瘡の予防剤及び/又は治療剤	発明者 善本隆之、片平泰弘、山下靖弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/20880	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 褥瘡の予防剤及び/又は治療剤	発明者 善本隆之、片平泰弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-084260	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	善本 隆之 (Yoshimoto Takayuki) (80202406)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------