

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592883

研究課題名(和文) Wntシグナル制御下に培養した幹細胞由来成長因子による新規骨再生医療

研究課題名(英文) Novel bone regenerative medicine with secretome from stem cells cultivated under the regulation of Wnt signaling pathway

研究代表者

片桐 渉 (Katagiri, Wataru)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10437030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞の培養上清に含まれるサイトカインなどの液性因子(MSC-CM)を用い骨および歯周組織の再生を行うことを確認した。MSC-CMは幹細胞の遊走能を亢進し、さらに骨形成関連遺伝子、血管新生関連遺伝子の発現を上昇させた。さらにラット骨欠損モデルやイヌ歯周組織欠損モデルでは早期の骨あるいは歯周組織再生が確認された。またこれらの効果はWntシグナル阻害剤であるsFRP-3により促進された。本研究によりMSC-CMにより体内に存在する幹細胞を局所に遊走させ、血管新生を経て骨あるいは歯周組織再生がなされるという新たなコンセプトの再生医療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that secretome from the stem cell conditioned media (MSC-CM) regenerated bone and periodontal tissue defect. MSC-CM enhanced the migration and the expression of osteogenic and angiogenic related gene expressions of the stem cells cultivated with MSC-CM. Moreover, bone and periodontal tissue regeneration were confirmed using the animal models. This study revealed that MSC-CM induced the migration of stem cells and bone and periodontal defect were regenerated through the angiogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、歯科医用工学、再生歯学

キーワード：骨再生 歯周組織再生 培養上清 成長因子 幹細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会において、加齢に伴う骨粗鬆症およびそれに伴う骨折、歯周病による歯の喪失は患者の QOL、ADL に直結する疾病である。骨粗鬆症に対しては現在のところビスホスホネート製剤の投与が、歯の喪失に対しては歯科インプラントなどの補綴処置が現在行われている治療として一般的である。また骨折に対しては創内固定が進歩した現在に於いても荷重制限が一定期間必要であったり、ビスホスホネート製剤の使用においては顎骨壊死など治療に難渋する合併症が問題となっている。歯科補綴治療に関しては歯及びインプラント等の補綴装置の安定には十分な歯槽骨量が必要であるが、抜歯や歯周病によりそれらは大きく吸収しその後の補綴処置に十分な骨量が存在することはまれである。

申請者らはこれまで骨再生医療として自己骨髄由来幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells; MSCs) と多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP) を用いた培養骨 (Tissue Engineered Bone) について基礎研究から臨床研究を行い良好な結果を得ている。具体的には患者腸骨骨髄より穿刺針にて MSCs を含む骨髄液を採取し、一定期間培養、骨芽細胞様細胞に分化させたものを PRP と混合して歯槽骨の吸収した部分に移植しその後インプラント補綴を行うもので、長期予後を含め良好な臨床経過をたどっている¹⁾。またこの手法は動物実験において骨粗鬆症モデルや骨折あるいは仮骨延長モデルに応用され、骨質強化や早期の骨化など優れた成績を収めている。

しかしながら細胞移植を行う場合、細胞培養に一定期間を要し、培養に伴う設備投資、維持費、人件費といったコストは決して安価ではない。さらに幹細胞の取り扱いや臨床応用などに係る手続きや法整備の問題などもあり、幹細胞を用いた細胞移植は現段階では施設限定的な治療法といわざるを得ない。幹細胞の有用性を保持しつつもこれら細胞移植にまつわる問題が回避可能な治療法があれば、これは患者側、医療者側にとってきわめて意義の高い治療法となり得る。

近年、細胞培養に使用された培養上清に様々なサイトカイン等液性因子が含有され、これらが幹細胞の遊走や増殖、分化に寄与していることが *in vitro* および *in vivo* において明らかになった。従来の細胞移植治療においても移植した細胞が再生組織になることに加え、パラクライン効果により周囲の内在性幹細胞の病変部位への遊走、血管新生などを促し組織再生や組織修復に一定の効果を有していることが示されている。

骨再生の場においてこういった現象が利用可能であれば、細胞培養上清あるいはその生成物を用いた「細胞移植を伴わない」新規骨再生医療 (幹細胞由来成長因子療法) の実現が可能であると考えられる。

加えて申請者らはこれまでに Wnt シグナルの性質を利用した幹細胞を用いた新規骨再生医療の開発を行ってきた。従来より Wnt シグナルは骨形成において重要な役割を担っていることが明らかである。

しかしながら培養上清に含まれるパラク

ライン因子や Wnt シグナルの特性を利用した骨再生医療の研究はこれまでにない。従来の骨移植や幹細胞移植を回避できる本研究のような手法は今後「あらたな」再生療法となることが可能であると考え本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では幹細胞の培養上清を用いることにより、その液性因子に含まれるサイトカイン等の効果により「細胞移植を伴わない」全くこれまでの発想とは異なる骨再生医療を開発しようとするものである。

さらに従来の細胞移植療法が「施設特異的」な治療法である反面、この培養上清あるいはその生成物は大量生産が可能であり治療を一般化するとともに、「創薬」に適していることも重要な点である。

(1) 幹細胞培養上清の生物学的、生化学的特性と内在性幹細胞への作用機序

(2) 内在性幹細胞における細胞特性とくに増殖・遊走能と骨再生能への影響

(3) Wnt シグナルレギュレーション下での幹細胞培養上清の特性変化

以上を明らかにすることにより「新たな骨再生医療とそのための創薬」を可能にすることである。

3. 研究の方法

ヒトあるいはラット骨髄由来幹細胞 (MSC) を用いた。培養上清を採取し幹細胞由来液性因子 (MSC-CM) とした。

(1) 幹細胞培養上清により培養した MSC の細胞特性の検討

幹細胞培養上清に含有されるサイトカインの定量的測定

MSC-CM に含有されるサイトカインの発現を検討する。方法としては ELIZA 法を用い、発現を定量化した。

幹細胞培養上清により培養した MSC の細胞特性の検討

MSC-CM で培養した MSC の増殖能 BrdU 法などにより、遊走能は 2 層構造のカルチャーインサートを用いた Migration Assay にて、骨分化能は骨分化マーカーの発現を RT-PCR 法などにより検討した。

また Wnt シグナル阻害因子である sSRP-3 を添加して MSC を培養して得られた培養上清についても同様の検討を行った。

動物を用いた移植実験

これまでの細胞を用いた基礎実験のデータをもとに動物への移植実験を行った。

a) 骨欠損モデル: ラット頭蓋骨に径 5mm の骨欠損を作成し、MSC-CM を含浸させたアテロコラーゲンスポンジを充填し、移植 2、4 週後に組織学的評価を行った。また、sSRP-3 を作用させて得られた MSC-CM については移植後 1 週間で CT による骨形成の評価を行った。

b) 歯周組織欠損モデル: イヌ歯根周囲に幅 4mm、深さ 5mm の 1 壁骨欠損をもつ歯周組織欠損モデルを作成し移植材を充填し、移植 8 週後に組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) 幹細胞培養上清により培養した MSC の細胞特性の検討

MSC-CM に含有されるサイトカイン量は表1のようであった。すなわち、IGF-1、VEGF、TGF- β 1、HGF は検出されたが他の骨再生効果があると報告されているサイトカインは検出されなかった(表1)。MSC-CMはラット MSC の遊走能を亢進させた(図1)。また、MSC-CMはラット MSC におけるアルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオカルシン、*Runx2* といった骨形成関連遺伝子、および *VEGF*、*Ang1*、*Ang2* といった血管新生関連遺伝子の発現を亢進させた(図2)。

表1 MSC-CM に含有されるサイトカイン

Factors	Concentration (pg/mL)
IGF-1	1515.6 ± 211.83
VEGF	465.84 ± 108.81
TGF- β 1	339.82 ± 14.41
HGF	20.32 ± 7.89
PDGF-BB	N.D
BMP-2	N.D
FGF-2	N.D
SDF-1	N.D

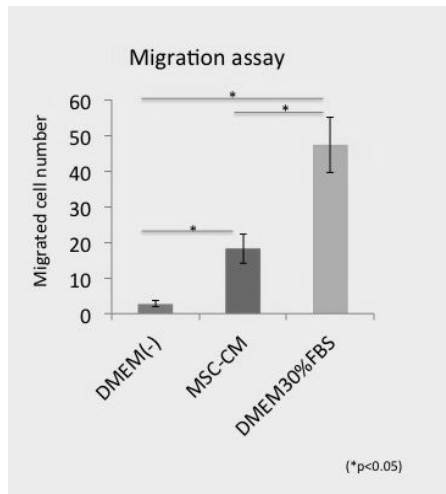


図1 MSC-CMはラット MSC の遊走能を亢進させた。

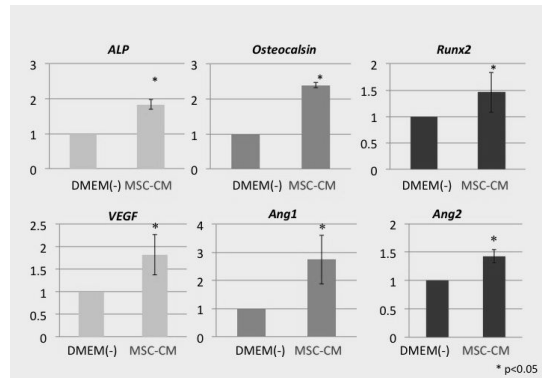


図2 MSC-CMはラット MSC の骨形成・血管新生関連遺伝子の発現を亢進させた(縦軸は相対的)。

移植実験結果

a) 骨欠損モデルにおいては2週という早い段階において対象群に比べ有意な新生骨面積の上昇が見られ、4週に至っては欠損部をほぼ新生骨が占有した。組織学的にも良好な骨再生が確認された(図3)。
b) 歯周組織欠損モデルにおいても歯槽骨高さ、面積、新生セメント質高さいずれにおいても MSC-CM 移植群において有意な上昇を認めた(図4)。

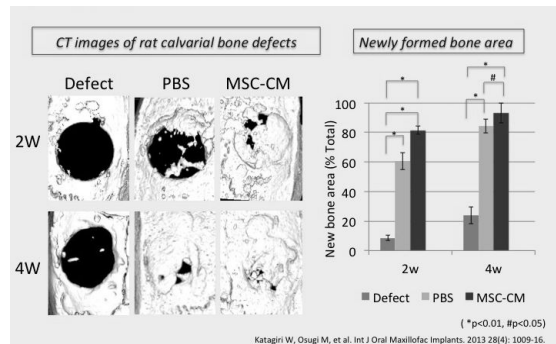


図3 ラット骨欠損モデルにおける骨再生

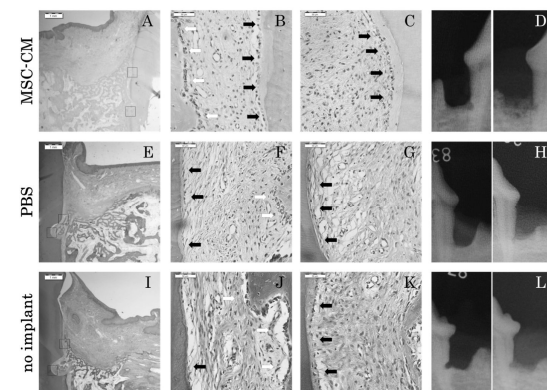


図4 イヌ歯周組織欠損モデルにおける歯周組織再生

Wnt シグナル阻害剤 sFRP-3 の MSC-CM による骨再生への影響の検討
sFRP-3 を添加して MSC を培養し得られた MSC-CM の骨形成関連遺伝子の発現およびラット骨欠損モデルでの骨再生について

sFRP-3 を添加しない通常の MSC-CM とで比較を行った。結果は図 5 に示す通り、1 週という早期において骨形成関連遺伝子の発現上昇を認め CT 画像においても sFRP-3 添加により早期からの骨再生を認めた。

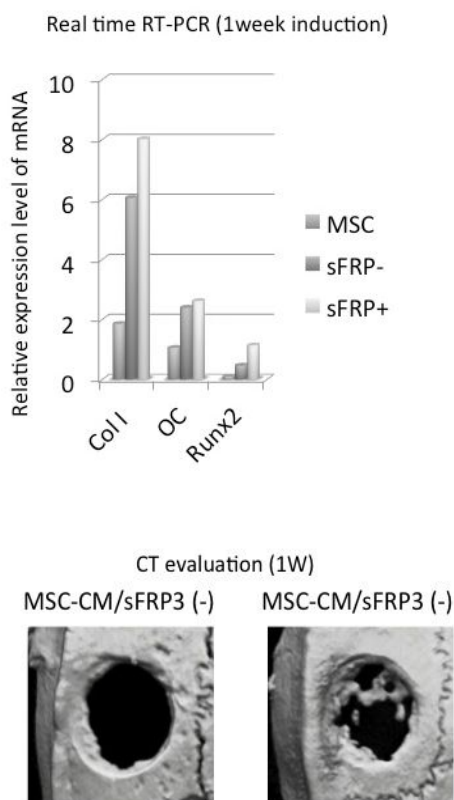


図 5 Wnt 阻害剤 sFRP-3 添加により作成された MSC-CM による骨再生(上段 : 遺伝子発現、下段 : CT 画像)

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 6 件)

W. Katagiri, M. Osugi, T. Kawai and M.Ueda, Novel cell-free regenerative medicine of bone using stem cell derived growth factors, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 査読有、28、2013、1009-1016

T. Inukai, W. Katagiri, R. Yoshimi, M.Osugi, T. Kawai, H. Hibi and M.Ueda, Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、430(2)、2013、763-768

Ueda M, Katagiri W, Paradigmshift in Tissue Engineered Bone *Regenerative Research*, 査読有、1(2): 2012、39-48

片桐 涉、上田 実、再生医療のドグマチェンジに挑む～幹細胞由来成長因子を用いた細胞移植を伴わない新しい骨再生医療～*ザ・クインテッセンス*、査読無、31(8): 2012、119-128

Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M, Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects *Tissue Engineering Part A*, 査読有、18(13-14)、2012、1479-1489

片桐 涉、幹細胞由来成長因子を用いた骨再生医療 内在性幹細胞に働きかける新しいコンセプトの骨再生医療、*医学のあゆみ*、査読無、239巻、2011、833-839

[学会発表] (計 4 件)

片桐 涉、大杉将嗣、匠原龍太郎、日比英晴、上田実、幹細胞培養上清由来液性因子による内在性幹細胞の遊送および血管新生を先行させる新たな骨再生法、*日本口腔インプラント学会 福岡市* 2013 年 9 月 14 日

片桐 涉、幹細胞由来成長因子により内在性幹細胞を誘導する新規骨・歯周組織再生療法、*日本再生医療学会 横浜市* 2012 年 6 月 12-14 日

片桐涉、大杉将嗣、犬飼丈晴、木下一彦、吉見涼子、井上実、河合孝真、日比英晴、上田実、*日本口腔外科学会 大阪市* 2011 年 10 月 21-23 日

片桐 涉、木下一彦、大杉将嗣、犬飼丈晴、上田 実、内在性幹細胞動員による細胞移植を伴わない新規骨再生医療～幹細胞培養上清由来成長因子による骨再生医療の開発～、*日本口腔インプラント学会 名古屋市* 2011 年 9 月 16-18 日
幹細胞培養上清由来成長因子による細胞移植をとまなわない新規骨再生医療の開発

[図書] (計 1 件)

中内啓光、片桐 涉、他、*南山堂、幹細胞研究と再生医療*、2013、238 ページ、(223-230)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称 : 組織形成用組成物及びその利用

発明者 : 片桐涉、大杉将嗣、上田実

権利者 : 名古屋大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2013-027069

出願年月日 : 2013 年 2 月 25 日

国内外の別 : 国内

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

片桐 涉 (KATAGIRI, Wataru)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 1 0 4 3 7 0 3 0

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉見 涼子 (YOSHIMI, Ryoko)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 4 0 5 4 7 5 4 3

大屋 盛道 (OHYA, Morimichi)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 7 0 5 9 7 8 6 4