

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2013

課題番号：23890079

研究課題名（和文）幹細胞由来成長因子を用いた骨造成に関する研究

研究課題名（英文）Bone regeneration with conditioned media from mesenchymal stem cells

研究代表者

池野 正幸（IKENO MASAYUKI）

京都大学・大学院医学研究科・医員

研究者番号：70614486

研究成果の概要（和文）：ヒト骨髄および歯髄幹細胞由来の培養上清液には多くの成長因子が含まれることが判明した。これらの培養上清液はウサギ頭頂部骨造成モデルにて有意な骨形成増強効果を示した。さらに、培養上清液からタンパク質成分を沈殿し、凍結乾燥して得られた粉末においても、有意な骨形成増強効果を示すことが明らかとなった。生細胞を含まない幹細胞由来成分のみを用いることで骨再生医療が実現できる可能性が見いだされた。

研究成果の概要（英文）：Conditioning media from mesenchymal stem cells of human bone marrow and deciduous teeth had many kinds of growth factors. It had enhanced bone regeneration on the augmentation model in rabbit. Moreover, freeze-dried powders of the conditioned media also had enhanced bone regeneration. It suggested the possibility of bone regeneration without cell treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：幹細胞、培養上清、骨造成、頭頂骨

1. 研究開始当初の背景

現在の骨欠損に対する主要な治療方法は自家骨移植であるが、採取部位の侵襲や採取量の限界といった問題があるため、自家骨移植に取って代わる治療方法が切に求められてきた。組織工学的概念に基づいた細胞・足場材料・成長因子について検討が進められてきた中で、骨髄および歯髄幹細胞移植が骨形成作用を示すことが見出されてきた。自己の幹細胞移植による組織再生医療は概念的に理想的な手法であるが、実際には細胞採取に激しい生体侵襲を伴うことや細胞移植に伴う安全性

の検証が未だ不十分であることから広く普及するには至っていない。さらに、幹細胞移植治療を行うには特別な細胞培養施設の医療機関内設置が必須であること、細胞の維持管理に手間を要すること、培養に多額の費用を要することなどが問題となり、一般的な治療方法として実用化するにはかなりの困難が予想される。また、細胞治療では移植細胞の腫瘍化といったリスクは常につきまとうものと考えられる。一方で、細胞を用いた骨再生医療では、移植細胞による骨形成作用だけでなく、移植細胞が分泌する骨栄養因子の自律的作用

が及ぼす効果も深く関わっていることが伺われた。ヒト骨髄および歯髄幹細胞培養上清中には多数のタンパク分子が発現しており、骨形成に関与する成長因子が多く含まれることが徐々に判明してきたことから、幹細胞培養上清に含まれる成長因子成分が生体内に含まれる幹細胞を集積し、骨形成能を活性化することで移植部の骨再生を増強することが期待された。組織再生医療においては、生細胞を移植せず、侵襲が少なく、効果的で安全性の高い新たな治療方法が求められていることから、幹細胞由来成長因子は理想的な方法と考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト骨髄幹細胞培養上清移植による骨再生効果および骨形成能活性化メカニズムを明らかにすることを目的とする。第一に、幹細胞培養上清の成分および生理活性分析を行い骨再生効果の可能性を評価すること。第二に、実際の動物実験にて幹細胞培養上清の骨再生効果を検証し、既存の治療法と比較した骨造成能力を評価すること。これらの検証により、細胞を含まない、安全で副作用の少ない骨再生療法の開発につながることを期待された。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hBMSC) は購入したものを使用し、ヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) は、研究目的のために無償供与された検体から採取した細胞を用いた。培養上清作製には、10 継代以下の細胞を用い、シャーレ上に播種した幹細胞が 80%以上コンフルエントになった時点で無血清培地に交換し、48時間後に回収したものを培養上清 (Conditioning media: CM) として用いた。培養上清に含まれる主要な成長因子の定量をElisa法にて行うとともに、サイトカインアレイにて発現タンパク質の網羅的解析を行った。

(2) ヒト骨髄および歯髄幹細胞培養上清を用いた骨再生効果を評価するため、in vivo実験モデルとしてウサギ頭頂部に設置したチタン円筒内(図1)に移植し、骨造成効果を測定した。 β -TCPを充填した上で各CMを添加し、次のような実験群を設定した(図2)。実験群1:hBMSC CM, 実験群2:SHED CM, 実験群3:無血清培地 (DMEM), 対照群:リン酸バッファー液 (PBS)。円筒上面を純チタン製の蓋で被覆し、閉鎖して終了とした。移植後8週において屠殺し、非脱灰標本を作製、トルイジンブルー染色して、円筒内部骨量を組織形態学的に比較評価した。

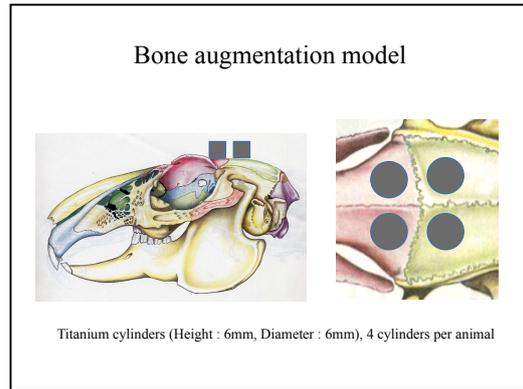


図1、ウサギ頭頂部骨造成モデル



図2、チタン円筒内への移植

(3) ヒト骨髄幹細胞培養上清のタンパク質成分をエタノール沈殿し、凍結乾燥して得た粉末 (CMパウダー) を作製し(図3)、次のような実験群にて同様に骨造成評価をした。実験群1:hBMSC CM, 実験群2:hBMSC CMパウダー, 実験群3:無血清培地, 対照群:生理食塩水。円筒上面を純チタン製の蓋で被覆し、閉鎖して終了とした。移植後8週において屠殺し、非脱灰標本を作製、トルイジンブルー染色し、円筒内骨量を組織形態学的に比較評価した。

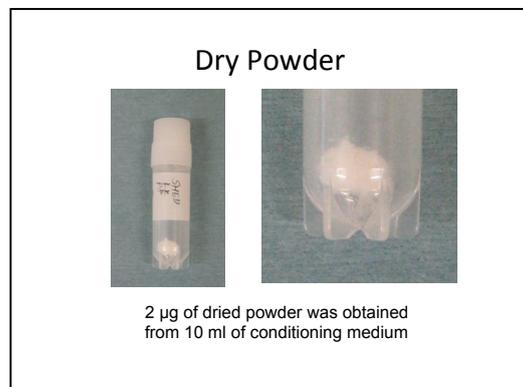


図3、培養上清の凍結乾燥粉末

(4) ヒト骨髄幹細胞培養上清をエタノール沈殿し、凍結乾燥して得た粉末 (CMパウダー) と足場材料の組み合わせについて、次のような実験群にて移植を行い、骨造成評価をした。実験群1:hBMMSC CMパウダー/ β -TCP, 実験群2:hBMMSC CMパウダー/コラーゲンスポンジ, 実験群3: hBMMSC CMパウダー/自己組織化ペプチド水ドロゲル, 対照群: 移植なし。円筒上面を純チタン製の蓋で被覆し、閉創して終了とした。移植後8週において屠殺し、非脱灰標本を作製、トルイジンブルー染色して、円筒内部骨量を組織形態学的に比較評価した。

4. 研究成果

(1) hBMMSC および SHED 由来培養上清の成分分析を行い、Elisa 法にて VEGF などの生理活性タンパク質が線維芽細胞などに比較して多く含まれていること、サイトカインアレイにて hBMMSC では 40 種類以上、SHED では 60 種類以上のタンパク質が発現していることを確認した。

(2) ウサギ頭頂部骨造成モデルで評価した結果、以下のグラフに示したようにコントロールに比べ、hBMMSC CM および SHED CM で有意に円筒内骨造成量の増加が認められた。

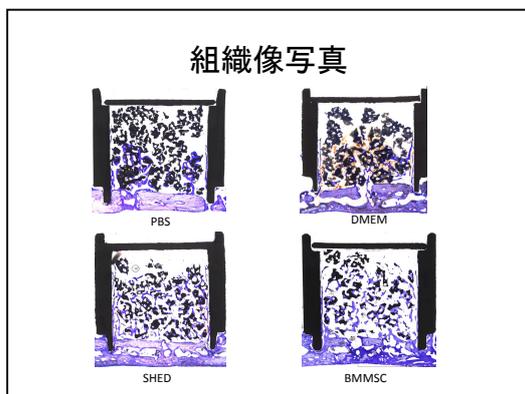


図 4、組織像写真 (40 倍)

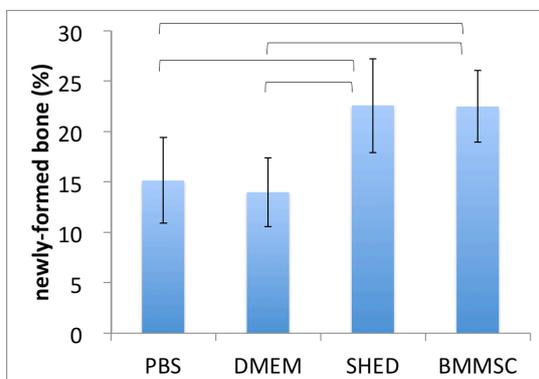


図 5、各培養上清移植による骨造成量

(3) ヒト骨髄幹細胞培養上清液の凍結乾燥粉末を用いた実験では、hBMMSC CM および hBMMSC CMパウダーで有意に骨造成量の増加が認められた。また、hBMMSC CMパウダーは hBMMSC CM と比較しても 80% 程度の骨造成効果を呈することが明らかになった。

(4) ヒト骨髄幹細胞培養上清液の凍結乾燥粉末と各種足場材料を組み合わせた実験では、hBMMSC CMパウダーと β -TCP の際に有意に骨造成量の増強効果が認められたが、コラーゲンスポンジ、自己組織化ペプチド水ドロゲルとの組み合わせでは有意な増強効果が認められなかった。

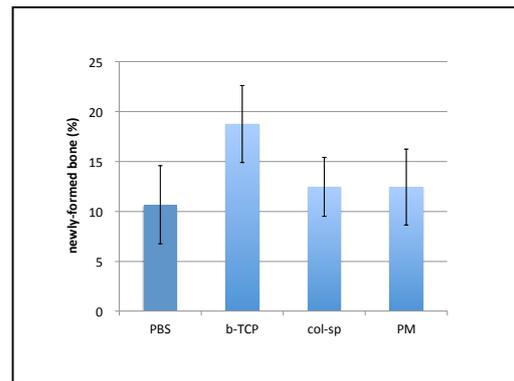


図 6、各足場による骨造成量

以上の結果から、幹細胞由来の培養上清液から抽出したタンパク質粉末が、適切な足場材料との組み合わせにおいて、骨造成に有用な新たな材料となりうる可能性が示唆された。生細胞を含まない幹細胞由来タンパク質画分のみを用いることで、安全、簡便、低価格での組織再生医療が実現できる可能性があり、細胞を用いた再生医療の実用化および産業化に向けた新たな方向性が見出された。

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 2 件)

- ① Tsuchiya T, Hara K, Ikeno M, Okamoto Y, Hibi H, Ueda M. “Rat bone marrow stromal cell-conditioned medium promotes early osseointegration of titanium implants.” *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* (掲載予定、査読有)
- ② Ikeno M, Hibi H, Kinoshita K, Hattori H, Ueda M. “Effects of the

permeability of shields with autologous bone grafts on bone augmentation. “ *Oral Craniofac Tissue Eng*, 1, 198-204, 2011. (査読有)

http://www.quintpub.com/journals/octe/full_txt_pdf_alert.php

article_id=11347&ref=/journals/octe/journal_contents.php?iss_id=9834ZZ5journal_name=octe4ZZ5vol_year=20114ZZ5vol_num=1

〔学会発表〕 (計 1 件)

原憲治、土屋周平、池野正幸、日比英晴、上田実. 骨髄間質細胞由来の培養上清由来成長因子を付着させた骨再生誘導膜有用性の検討、第 11 回日本再生医療学会、2012 年 6 月 13 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池野 正幸 (IKENO MASAYUKI)
京都大学・大学院医学研究科・医員
研究者番号：70614486

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：