

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293408

研究課題名(和文) 骨延長法を模倣した延長装置を用いない広範囲顎骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of the method for bone regeneration mimicing distraction osteogenesis for extensive bone defects without distraction devices

研究代表者

日比 英晴 (HIBI, Hideharu)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90345885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系幹細胞および歯髄幹細胞培養上清に含まれている成分を検出し、その一部を定量した。培養上清により細胞接着能、細胞遊走能、血管新生能、抗炎症効果、抗アポトーシス効果が高められること、低酸素濃度培養環境下で得られた培養上清により細胞遊走能、血管新生能がさらに高められることをインビトロで示した。また培養上清により実際に血管網構築が進み骨再生が促されること、低酸素培養上清によりこの過程がさらに促進されることをインビボで示した。

研究成果の概要(英文)：The components of the conditioned media collected from bone marrow mesenchymal stem cells and dental pulp stem cells were detected and partially quantified. We showed that the conditioned media enhanced cell adhesion ability, cell migration ability, angiogenic potential, anti-inflammatory action and anti-apoptotic effect, and that the conditioned media from hypoxic-cultured cells further enhanced the cell migration ability and the angiogenic potential in vitro. We also showed that the conditioned media promoted vascular network formation and consequent bone regeneration, and that the conditioned media from hypoxic-cultured cells further promoted this process in vivo.

研究分野：口腔外科学

キーワード：移植・再生医療 再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

われわれは培養自己骨髄間質細胞多血小板血漿複合体による骨再生法に取り組み、基礎から臨床まで研究成果を収めてきたが、なお再生可能な大きさは1センチほどにとどまっていた。その理由は適用したものの内部は、中心に近づくほど低栄養、低酸素濃度、高代謝産物となり、導入された細胞には過酷な環境になるからである。そのため導入細胞の生存率は1割に満たないことがあるが、それでも組織再生が得られるのは、導入細胞が組織を形成するよりもサイトカインなどを分泌し、それにより内在性の幹細胞を動員して組織を形成させる機序が主体だからである。そこでサイトカインの集合体として幹細胞培養上清に着目し検討したところ、これがもつ有力な骨形成作用を *in vitro*, *in vivo* で確認していた。

一方、確実に大量の骨形成を可能にするものに骨延長法があり、独自に開発した創内型延長装置を用いた骨延長法により10センチ以上にもおよぶ下顎骨区域欠損でも再建できることを示していた。骨延長は放射線照射などの悪条件でも適用できる優れた生体内組織再生モデルであることから、これを延長部に内在性幹細胞・前駆細胞を動員するシステムであるととらえ、サイトカインによる組織再生の機序の一部を明らかにした。また延長部への細胞培養上清の適用により有意な骨形成促進効果があること、それは血管網構築促進によるものであることを示した。

他方、米国では骨形成タンパク質製剤により下顎骨区域欠損部に骨形成を得たとの報告があるが、健全骨膜が温存されているなどの特別な要件を満たす必要があった。また単独の因子が有効なのは組織再生過程のごく一部でしかなかった。

本来、組織再生は多段階の過程を経るものであり、適切なサイトカインの組み合わせが適時適所に作用すべきである。また再生の場には何よりも血行を確保すべきである。幹細胞培養上清が血管内皮成長因子のほか多くの成長因子を含み、単独因子よりもその効果が高いと考えていた。

以上を踏まえ、本研究課題はこれまでの知見を骨再生に向けて体系化し、あらためてサイトカインの適用法を工夫することによって、延長装置を用いることなく、骨延長に匹敵する大量の骨再生を可能にし、これにより顎骨区域欠損の再建を目指すものであった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は骨延長法による組織再生過程を幹細胞培養上清で再現すべく、上清の内容、投与方法と時期を変数とし、求めるものを動員される細胞の種類と数、形成される組織の種類と量として解析し、その結果から骨再生のための至適な条件を決定することであり、その全体構想は幹細胞培養上清の適用法を工夫することにより、延長装置を用いるこ

となく、骨延長に匹敵する大量の骨再生を可能にし、これにより顎骨区域欠損の再建を目指すことであった。

### 3. 研究の方法

幹細胞培養上清はヒト細胞を培養して調製し、細胞種は骨髄間葉系幹細胞、歯髄幹細胞とした。培養終了後に無血清培地でさらに48時間培養し、それを遠心分離することによりその上清を得た。

培養上清の組成を明らかにするために、その中に含まれるタンパク質を質量分析法により網羅的に解析して同定し、その機能面からさらに種類を絞ってELISAで発現を確認し定量した。またその遺伝子発現について、培養終了後の細胞からRNAを抽出しリアルタイムRT-PCRにて解析した。培養細胞の種類、分化度と培養条件を変数とし、求めるものを骨と血管を中心に組織再生に関連するタンパク質発現、遺伝子発現、細胞増殖能、細胞遊走能、動員される細胞の種類と動態、再生組織の範囲と密度として解析を進め、組織再生に最適な因子群を含む培養上清を得るための条件を探索した。*in vitro* では細胞増殖および遊走アッセイ、RT-PCR、ウェスタンブロッティング、管腔形成アッセイを進めた。*in vivo* ではマウスあるいはラットの頭蓋骨欠損モデルに培養上清を含む担体を適用して、形成された組織を組織学的、X線学的に、また多重免疫組織化学法にて評価した。細胞動態は、体外で蛍光標識した細胞を体内に導入し、組織再生の場に遊走する様相を画像解析により評価した。

培養上清の担体としてコラーゲン、リン酸カルシウムなどの許認可材料のほか、水酸化ナトリウムや大気圧プラズマにより親水化処理を施したポリ乳酸グリコール酸共重合体膜やチタンを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養上清中の成分分析

骨髄および歯髄幹細胞培養上清に含まれている成分としてType I collagen, Decorin, Vimentin, Fibronectinなど約3000種のタンパク質を質量分析法により検出した。またサイトカインアレイではHepatocyte growth factor, Matrix metalloproteinase-10, Monocyte chemotactic protein (MCP) -1, Angiogenin (ANG), Stem cell factor, Insulin-like growth factor (IGF) -1, Vascular endothelial growth factor (VEGF) など約40種の成分を検出した。これらをELISA法により定量するとその主要なものはIGF-1, MCP-1, VEGF-A, ANG, Interleukin-6, Macrophage colony-stimulating factorなどであった。また細胞培養の環境を低酸素濃度下にするとVEGF-AとAngiopoietin-2の発現が遺伝子レベルでもタンパク質レベルでも亢進することが明らかになった。

## (2) 培養上清の機能解析

培養上清には細胞接着能、細胞遊走能、血管新生能を高め、抗炎症作用、抗アポトーシス作用を有する成分が含まれていた。また低酸素濃度培養環境下で得られた培養上清により細胞遊走能、血管新生能がさらに高められた (図 1)。

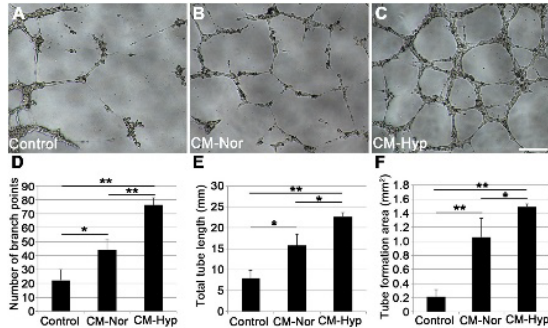


図 1 管腔形成能の比較

上段は基本的な培地 (A), 培養上清 (B), 低酸素培養上清 (C) を添加した基質中で血管内皮細胞により形成された管腔の様子を示し, 下段はそれぞれの管交差点数 (D), 総管長 (E), 総管形成面積 (F) をグラフ化したものである。培養上清により, さらに低酸素培養上清により管腔形成能が高められるのがわかる。

## (3) 骨欠損モデルにおける組織再生

マウス, ラットの頭蓋骨, 大腿骨の骨欠損モデルなどで培養上清により骨再生が促進されること, それは欠損部で血管新生が進んで構築された血管網によることを示した。また低酸素培養上清によりこの過程がさらに促進されることがわかった (図 2, 3)。

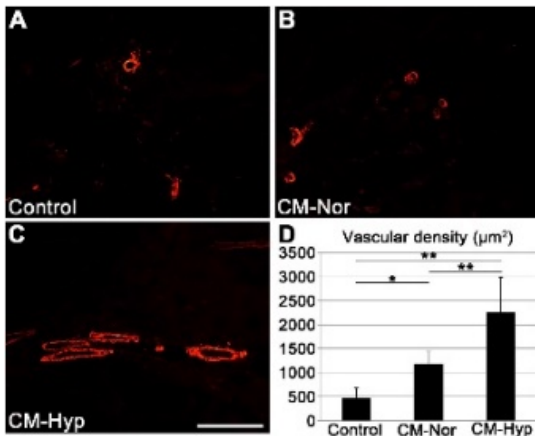


図 2 生体内での血管新生の比較

各図は基本的な培地 (A), 培養上清 (B), 低酸素培養上清 (C) を骨欠損部に注入した後, 一定期間中に形成された組織像と, その血管密度を示したグラフ (D) である。血管平滑筋細胞が蛍光免疫染色されている。培養上清により, さらに低酸素培養上清により生体内での血管化が促進されるのがわかる。

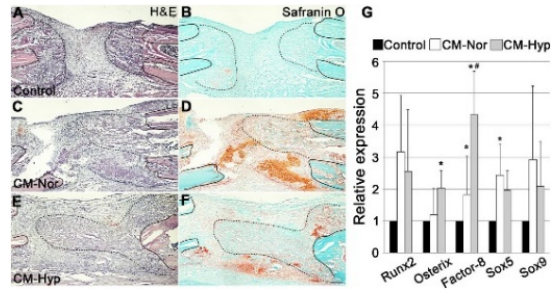


図 3 骨形成の比較

各図は基本的な培地 (A, B), 培養上清 (C, D), 低酸素培養上清 (E, F) を骨欠損部に注入した後, 一定期間中に形成された組織像と, それぞれで発現している遺伝子量を示したグラフ (G) である。図中の実線は骨断端を, 点線は形成された仮骨の境界を示す。培養上清により, さらに低酸素培養上清により生体内での骨形成が促進されるのがわかる。

## (4) 適用方法による組織再生

チタン製インプラントやポリ乳酸グリコール酸共重合体膜の表面に培養上清を付着させたものでは, それらの周囲の骨形成が促進された。また水酸化ナトリウムや大気圧プラズマなどで表面加工処理をすることにより培養上清の付着率が向上し, さらに骨形成が促進された (図 4)。

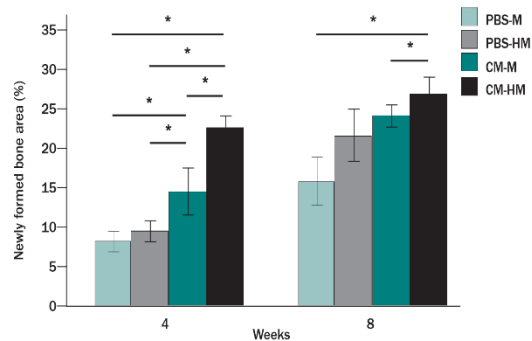


図 4 適用方法の比較

骨欠損部に担体を適用してから 4 週, 8 週後の新生骨の面積を示したグラフである。担体であるポリ乳酸グリコール酸共重合体膜は無処理 (M), 親水化処理 (HM) 後にリン酸緩衝液 (PBS) あるいは培養上清 (CM) を含ませた。培養上清を多く含む担体により骨形成量が増加するのがわかる。

組織再生は多段階の過程を経るものであり, 適切なサイトカインの組み合わせが適時適所に作用すべきである。また再生の場には何よりも血行を確保すべきである。幹細胞培養上清は血管新生に寄与する多くの成長因子を含み, また低酸素環境に置かれた細胞はさらにそれを増強するように因子を放出していた。培養細胞は低酸素, 低栄養といった環境で飢餓状態になるとその周囲環境を改善しようと

して血管新生などに有効なサイトカイン類を放出すると考えられる。培養環境を任意に設定することで合目的性のあるサイトカインや細胞外基質類を含む上清を得ることが目論める。

本研究の結果から、これまでの知見を補完して骨再生に向けて体系化できた。またあらためてサイトカインの適用法を工夫することによって、延長装置を用いることなく、骨延長に匹敵する大量の骨再生を得る構想の実現に近づいた。将来は創薬につながればどの医療機関でもできる組織再生法への途が開かれると確信する。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

- ① Hibi H: Clinical review of bone regenerative medicine and maxillomandibular reconstruction. *Oral Sci Int.* 13: 15-19, 2016. doi: 10.1016/S1348-8643(15)00037-3. 査読有
- ② Katagiri W (1 番目), Hibi H (他 2 名, 4 番目): First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head Face Med.* 12: 5, 2016. doi: 10.1186/s13005-016-0101-5. 査読有
- ③ Fujio M, Yamamoto A (5 番目), Hibi H (他 5 名, 6 番目): Conditioned media from hypoxic-cultured human dental pulp cells promotes bone healing during distraction osteogenesis. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015. doi: 10.1002/term.2109. [Epub ahead of print] 査読有
- ④ Ishikawa J, Hibi H (7 番目), Yamamoto A (他 8 名, 11 番目): Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. *Bone.* 83: 210-219, 2016. doi: 10.1016/j.bone.2015.11.012. 査読有
- ⑤ Katagiri W (1 番目), Hibi H (他 2 名, 4 番目): Conditioned medium from mesenchymal stem cells enhances early bone regeneration after maxillary sinus floor elevation in rabbits. *Implant Dent.* 24: 657-663, 2015. doi: 10.1097/ID.0000000000000335. 査読有
- ⑥ Katagiri W (1 番目), Hibi H (他 2 名, 4 番目): Secreted frizzled-related protein promotes bone regeneration by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci.* 16: 23250-23258, 2015. doi: 10.3390/ijms161023250. 査読有
- ⑦ Tsuchiya S (1 番目), Hibi H (他 5 名, 6 番目): An experimental study on guided bone regeneration using a polylactide-co-glycolide membrane-immobilized conditioned medium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 30: 1175-11786, 2015. doi: 10.11607/jomi.3915. 査読有
- ⑧ Sugimura-Wakayama Y, Katagiri W (2 番目), Hibi H (他 4 名, 7 番目): Peripheral nerve regeneration by secretomes of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev.* 24: 2687-2699, 2015. doi: 10.1089/scd.2015.0104. 査読有
- ⑨ Omori M, Tsuchiya S (2 番目), Kuroda K (4 番目), Hibi H (他 3 名, 5 番目): A new application of cell-free bone regeneration: immobilizing stem cells from human exfoliated deciduous teeth-conditioned medium onto titanium implants using atmospheric pressure plasma treatment. *Stem Cell Res Ther.* 6: 124, 2015. doi: 10.1186/s13287-015-0114-1. 査読有
- ⑩ Ogata K, Katagiri W (2 番目), Hibi H (他 5 名, 6 番目): Evaluation of the therapeutic effects of conditioned media from mesenchymal stem cells in a rat bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like model. *Bone.* 74: 95-105, 2015. doi: 10.1016/j.bone.2015.01.011. 査読有
- ⑪ Kawai T, Katagiri W (2 番目), Hibi H (他 3 名, 5 番目): Secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhance periodontal tissue regeneration. *Cytherapy.* 17: 369-381, 2015. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.11.009. 査読有
- ⑫ Ando Y, Hibi H (6 番目), Yamamoto A (他 5 名, 8 番目): Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. *Bone.* 61: 82-90, 2014. doi:

10.1016/j.bone.2013.12.029. 査読有

- ⑬ Ikeno M, Hibi H (他3名, 2番目) : Effects of the permeability of shields with autologous bone grafts on bone augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 28: e386-e392, 2013. doi: 10.11607/jomi.te19. 査読有
- ⑭ Ikeno M, Hibi H (他3名, 2番目) : Effects of self-assembling peptide hydrogel scaffold on bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 28: e283-e289, 2013. doi: 10.11607/jomi.te09. 査読有
- ⑮ Tateishi H, Hibi H (他3名, 4番目) : Effects of implant surface on bone healing around titanium screw implants in ovariectomized rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 28: e252-e259, 2013. doi: 10.11607/jomi.te05. 査読有
- ⑯ Tschiya S (1番目), Hibi H (他4名, 5番目) : Rat bone marrow stromal cell-conditioned medium promotes early osseointegration of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 28: 1360-1369, 2013. doi: 10.11607/jomi.2799. 査読有

[学会発表] (計75件)

- ① Osugi M, Katagiri W, Hibi H, 他: Conditioned media from bone marrow derived mesenchymal stem cells enhances bone regeneration in rat calvarial bone defects. Annual Meeting of Academy of Osseointegration. 2016.2.17-20. San Diego (USA)
- ② Katagiri W, Hibi H, 他: Clinical study for bone regeneration after maxillary sinus floor elevation by secretomes from mesenchymal stem cells. Annual Meeting of Academy of Osseointegration. 2016.2.19. San Diego (USA)
- ③ Ishikawa J, Hibi H, Yamamoto A, 他: A study of therapeutic effects of serum free conditioned media derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth for rheumatoid arthritis. 22nd

International Conference on Oral and Maxillofacial Surgeons. 2015.10.27. Melbourne (Australia)

- ④ Katagiri W, Hibi H, 他: Novel bone regenerative medicine using the secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. 2015 IADR/AADR/CADR General Session. 2015.3.12. Boston (USA)
- ⑤ Sugimura Y, Katagiri W, Hibi H, 他: Conditioned media from SHED enhanced peripheral nerve regeneration. 2015 IADR/AADR/CADR General Session. 2015.3.12. Boston (USA)
- ⑥ Kawai T, Katagiri W, Hibi H, 他: Secretomes from bone marrow derived mesenchymal stem cells enhanced periodontal tissue regeneration. 23rd Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration. 2014.9.25-27. Rome (Italy)
- ⑦ Ogata K, Katagiri W, Hibi H, 他: Evaluation of the therapeutic effects of conditioned media from mesenchymal stem cells in rat bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw model. 23rd Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration. 2014.9.25-27. Rome (Italy)
- ⑧ Sakaguchi K, Katagiri W, Hibi H, 他: Novel strategy of bone regeneration with the cocktail of recombinant cytokines mimicking secretomes derived from mesenchymal stem cells. 23rd Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration. 2014.9.25-27. Rome (Italy)
- ⑨ Sugimura Y, Katagiri W, Hibi H, 他: Conditioned media from stem cells from human exfoliated deciduous teeth enhanced peripheral nerve regeneration. 23rd Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration. 2014.9.25-27. Rome (Italy)
- ⑩ 日比英晴: 顎骨再建についての再生医学的な検討. 第68回日本口腔科学会. 2014.5.9. 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

- ⑪ Fujio M, Yamamoto A, Hibi H, 他:  
Using hDPCs culture environments  
affect regenerative potential of  
conditioned media. 46th Meeting of  
the Continental European Division of  
the International Association for  
Dental Research with the  
Scandinavian Division. 2013. 9. 5.  
Florence (Italy)

[図書] (計 2 件)

- ① Yamamoto A, 他: InTech, New Trends  
in Tissue Engineering and  
Regenerative Medicine. Hibi H, Ueda  
M 監修. 2014. 119 (67-79)
- ② Katagiri W: InTech, New Trends in  
Tissue Engineering and Regenerative  
Medicine. Hibi H, Ueda M 監修. 2014.  
119 (95-107)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日比 英晴 (HIBI, Hideharu)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 90345885

### (2) 研究分担者

山本 朗仁 (YAMAMOTO, Akihito)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 50244083

黒田 健介 (KURODA, Kensuke)  
名古屋大学・未来材料・システム研究所・  
准教授  
研究者番号: 00283408

片桐 渉 (KATAGIRI, Wataru)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 10437030

服部 宇 (HATTORI, Hisashi)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 60332699  
(平成 27 年 10 月まで分担)

土屋 周平 (TSUCHIYA, Shuhei)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20569785