

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K09635
研究課題名(和文)メカノトランスダクションと幹細胞体内移動メカニズムを応用した組織再生法の開発

研究課題名(英文)Development of tissue regeneration method applying mechanotransduction and stem cell migration mechanism

研究代表者
藤尾 正人(FUJIO, Masahito)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90612804
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞、ヒト歯根膜由来線維芽細胞に周期的な伸展刺激を加えて培養した。培養上清を回収し、成分解析を行った。伸展刺激を加えずに培養した場合に比べ、血管形成関連因子(VEGF, PDGF-AA)や骨形成関連因子(BMP-2, BMP-4)が多く放出されていた。in vitro、in vivoで血管形成能、骨形成能の上昇を認めた。細胞培養の環境を変えることにより、疾患特異的な細胞培養上清が得られる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

失われた骨組織の再生方法として、細胞移植の研究が盛んに行われている。我々はこれまでヒト間葉系幹細胞(hMSC)を骨欠損部に移植し良好な結果を得てきたが、細胞採取時の侵襲や感染のリスク、細胞の腫瘍化などの問題点も指摘されている。細胞移植に代わる方法として幹細胞培養後の培養上清(conditioned medium以下CM)を用いる方法を考案した。本研究では、細胞に機械的刺激を加えることにより、CMをより骨再生に適したものにできる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human periodontal ligament-derived fibroblasts were cultured by applying cyclic stretch stimulation. The conditioned media was collected and the secretome were analyzed. Angiogenesis-related factors (VEGF, PDGF-AA) and osteogenic factors (BMP-2, BMP-4) were released more than when cultured without applying cyclic stretch stimulation. An increase in angiogenesis and osteogenesis was observed in vitro and in vivo. It was suggested that by changing the cell culture environment, a disease-specific conditioned medium could be obtained.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 幹細胞 メカノトランスダクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 幹細胞の体内移動メカニズム

幹細胞の体内移動メカニズムを臨床応用した例として造血幹細胞移植が挙げられる。もともと造血幹細胞の採取は骨髄穿刺をともなうため、「骨髄移植」と呼ばれていた。しかし、G-CSF 製剤を投与することで骨髄中に留まっている造血幹細胞を積極的に末梢血中に動員させることができるようになった。このことにより「末梢血幹細胞」を回収し、移植することができるようになった。間葉系幹細胞 (MSC) においても徐々に移動メカニズムの一端が明らかとなりつつあるが、臨床応用に向けさらなる詳細な解析が求められている。

(2) 幹細胞の体内移動解析モデルとしての仮骨延長術

これまで私たちは、マウス脛骨仮骨延長モデルを解析することにより、ケモカイン Stromal cell-derived factor-1(SDF-1)が血管内皮前駆細胞を、Monocyte chemoattractant protein-1/-3(MCP-1/-3)が MSC を延長部に集積させる重要な因子であることを明らかにしてきた。また、*in vivo* イメージングを導入することで、骨髄内での細胞の移動をモニタリングすることに成功した。

(3) 仮骨延長術の治癒メカニズム

仮骨延長の治癒過程は以下の3つの要素が重要であると示唆されている。

血流低下による組織の低酸素状態が引き起こす血管新生

生体に内在する幹細胞、前駆細胞の集積

延長操作によるメカノトランスダクション

2. 研究の目的

本研究の最終目標は仮骨延長術治癒過程におけるメカノトランスダクションが生体内の幹/前駆細胞の体内移動に与える影響を明らかにすることである。まずは、細胞に周期的な伸展刺激を加え、得られた培養上清の性質を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

in vitro では、歯根膜細胞、骨髄由来間葉系幹細胞に間欠的な伸展刺激を与え、細胞からどのような成長因子が分泌されるかを遺伝子レベル (RT-PCR)、タンパクレベル (ELISA) で解析した。伸展刺激は培養細胞伸展装置を用いて行った。

それらの因子を、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト骨芽細胞様細胞に適用し、それぞれ、血管形成能 (tube formation assay)、石灰化能 (アリザリンレッド染色) に与える影響を調べた。

さらに、*in vivo* でマウスの頭蓋骨欠損モデルに上記の因子をコラーゲンスポンジとともに移植する実験をし、骨形成について放射線学的、組織学的に解析した。

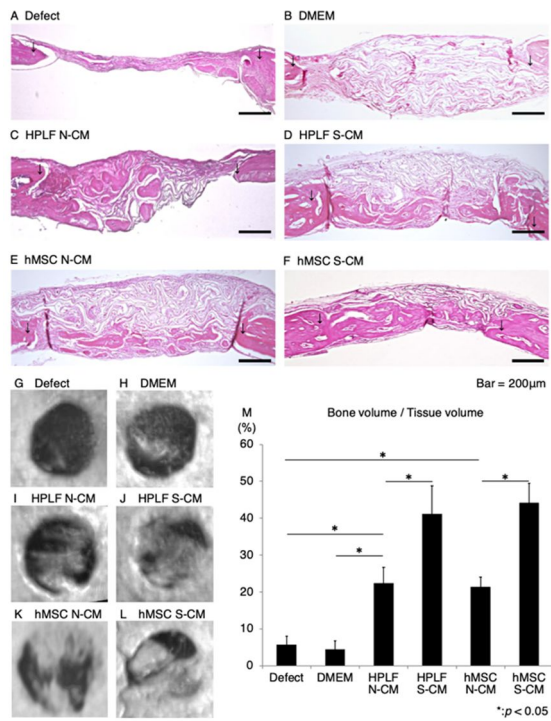
4. 研究成果

伸展刺激により間葉系幹細胞の集積に間接的に働く血管新生因子や骨形成を促進する液性因子

の発現が遺伝子レベルでも、タンパクレベルでも上昇することが明らかになった。以上の結果から、間欠的な伸展刺激により、細胞から出される液性因子の構成、発現量が変化することが明らかとなった。

伸展刺激を与えた細胞から得られた培養上清は、tube formation assayの結果からは、血管形成能の上昇が、アリザリンレッド染色の結果からは、石灰化を亢進させることが明らかとなった。以上の結果から、細胞から分泌された液性因子により、幹細胞遊走に重要な血管形成能が上昇する可能性が示唆された。

マウス頭蓋骨欠損モデルにおいて、対照群と比較すると、実験群では欠損部の骨再生が促進していることが組織学的、放射線学的に明らかになった(右図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogisu Kota, Fujio Masahito, Tsuchiya Shuhei, Tsuboi Makoto, Qi Chang, Toyama Naoto, Kamio Hisanobu, Hibi Hideharu	4. 巻 22
2. 論文標題 Conditioned media from mesenchymal stromal cells and periodontal ligament fibroblasts under cyclic stretch stimulation promote bone healing in mouse calvarial defects	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 543 ~ 551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcyt.2020.05.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荻須宏太、藤尾正人、土屋周平、岡部一登、外山直人、日比英晴
2. 発表標題 伸展刺激下で得た培養細胞上清における骨形成・血管新生能の検討
3. 学会等名 第64回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻須宏太・藤尾正人・土屋周平・岡部一登・神尾尚伸・外山直人・日比英晴
2. 発表標題 伸展刺激下で得た細胞培養上清における骨形成・血管新生能の検討
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	土屋 周平 (TUCHIYA Syuhei) (20569785)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	

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
---------	---------