

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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390384

研究課題名（和文）

血管構築を先行させる新たな骨再生法の開発

研究課題名（英文）

Bone regeneration following vascular network formation

研究代表者

日比 英晴 (HIBI HIDEHARU)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90345885

研究成果の概要（和文）：骨延長モデルでの骨形成過程を解析し血管新生に効果的な因子群を見出した。これを骨延長部に適用し、血管形成性細胞により血管構築を先行させると、これが骨形成性細胞の機能的足場の役割をして骨再生の効率化に役立つことが実験的に確かめられた。血管構築は骨欠損、創傷治癒、歯周組織欠損モデルにおいても組織再生を得る上で有用であった。骨再生医療において重要なのは骨形成予定部に密な血管網を構築しておくことであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：A group of cytokines effective in angiogenesis were found through analysis of distraction osteogenesis. Effective bone regeneration following vascular network formation has been shown *in vivo* and *in vitro* analysis. It is important to prepare vascular network in bone defect region for bone regeneration therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医学，細胞・組織，歯学

1. 研究開始当初の背景

組織を再生させる新しい方法としてわれわれが先進的に取り組んでいるものはいわゆる(1)培養骨による骨再生医療があった。これは自己骨髄間質細胞を骨形成性に分化誘導し多血小板血漿と組み合わせたもので、上顎洞底挙上部や顎裂部を対象にした臨床研究で成果を収めた。これにより低侵襲で良好な骨形成が得られたが、適用可能な大きさは血行の観点から1センチほどにとどまっていた。その一方でわれわれは独自に開発した(2)創内型延長装置による骨延長法に取り組み10センチ以上にもおよぶ区域欠損の再建

を可能にしていた。骨延長法は移植なしで骨形成ができ適応範囲が広く軟組織も延長できるが、短所として延長や骨化に要する治療期間が長いことが指摘されていた。骨延長法は骨周囲組織も延長させることから組織延長法という概念でとらえると、その治療スケジュールは骨形成が律速段階と考えた。そこで骨以外の組織の延長を優先してまず組織再生に関わる細胞の足場を作っておき、上記の骨形成性細胞と血小板中の増殖因子を補充する方法を検討し、(3)延長部への培養骨注入によりその骨化が有意に促進されることを示した。

他方、(4)骨延長部では骨形成域に先んじて血管形成域が観察され、骨化における血行の必然性が示されたことから、(5)血行改善による培養骨の適応拡大を目指し、これに血管内皮前駆細胞を同時に組み合わせたところ骨形成性細胞単独と比較して骨形成が有意に促進された。また(6)虚血部を想定した低酸素分圧、低グルコース濃度環境下では、細胞の増殖や分化が大きく異なることが示された。

以上のわれわれの取り組み(1)~(6)から得た知見を体系化し、あらためて現状の骨再生医療に血管構築を先行させる手立てを検討することにより、①骨欠損部では適応になる大きさの拡大、その適応を超える欠損では組織延長法が適応になり、②組織延長法ではその治療期間の短縮をそれぞれ目指す戦略を立てた。

2. 研究の目的

骨髄間質細胞あるいはそれから誘導した骨形成性細胞を用いた骨再生法および組織延長法について、その適応拡大と効率化を図るために、「血管内皮前駆細胞により血管構築を先行させると、これが骨形成性細胞の機能的足場の役割をする」を仮説とし、両細胞の動態を *in vitro*, *in vivo* で解析し、その相互作用と組織形成過程を明らかにし、骨形成のための至適条件を模索することを研究目的とした。

3. 研究の方法

まず生体内で骨を最も効率的に形成させるシステムとして骨延長モデル(図1)をとりあげ、骨延長部に動員される細胞の動態、関連遺伝子とタンパク質の発現の様相などについて解析した。骨延長部で働く因子を明らかにし、これらを血管新生と骨形成の観点から時系列で整理した。

つぎにこれらの因子を骨欠損モデルに適用し、骨形成性細胞、血管内皮前駆細胞の動態を解析し、その相互作用と組織形成におよぼす影響を明らかにした。以上の結果から得られた知見を骨欠損に関連する創傷治療モデル、歯周組織欠損モデルにおいても検証した。

4. 研究成果

骨延長部ではマウス骨延長モデルで *vegfr-1*, *-2*, *pdgfr- α* , *- β* , *sdf-1*, *cxcr4*, *7* などの血管新生に関連する遺伝子発現が亢進し、それらはタンパク質発現においても確認された。CXCR4, 7は骨延長部に動員された Sca-1⁺幹/前駆細胞に高率に発現していた。SDF-1を骨延長部に投与すると血管内皮前駆細胞を動員し、それから分化した CD31⁺血管内皮細胞と α SMA 血管周皮細胞による血管形

成が観察された(図2)。これによる実際の血流増加がレーザードップラー血流解析装置にて確認された。これらの血流増加により骨形成が促進されることも確認された。SDF-1/CXCR4, 7システムに着目し解析したことから SDF-1の局所投与は内在性の骨髄由来血管内皮細胞/前駆細胞を骨延長部に動員し骨形成を促進することが明らかになった。

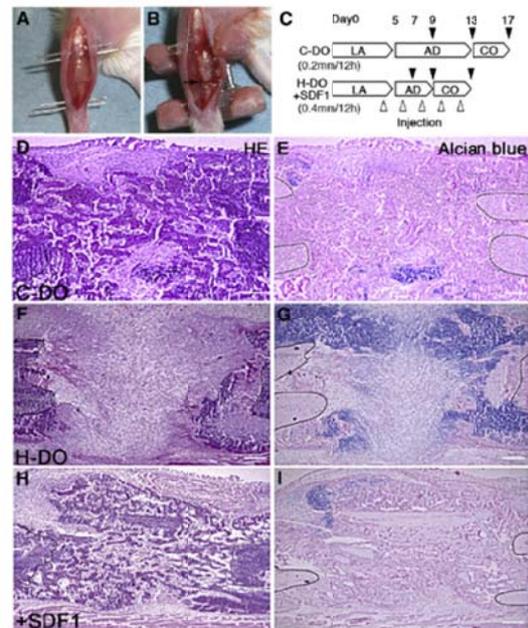


図1. 骨延長モデルと形成組織(論文①)

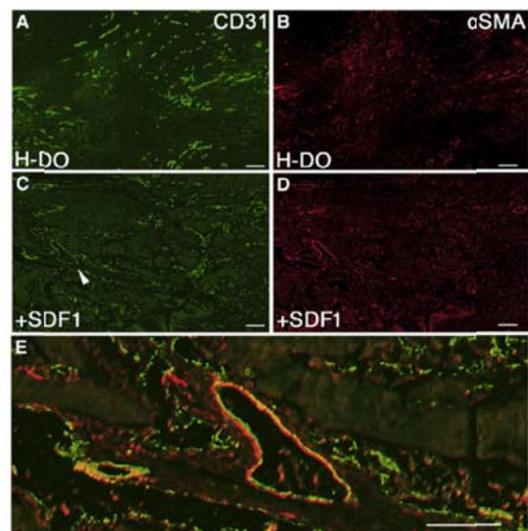


図2. SDF-1による血管形成促進(論文①)

以上は特定の因子群をとりあげたが、そのほかにもさまざまな因子群が協調して作用していた。そこでこれらの因子の集合体を含むものとして細胞培養上清に着目した。これをラット頭蓋骨欠損モデル、ラット創傷治療

モデル, ラットおよびイヌ歯周組織欠損モデルに適用したところ, いずれも血管構築が先行し組織形成が進む様子が観察された(図3)。以上の知見を体系化することで, さらに効率的な骨再生を可能にする方策について検討するための基盤が得られた。

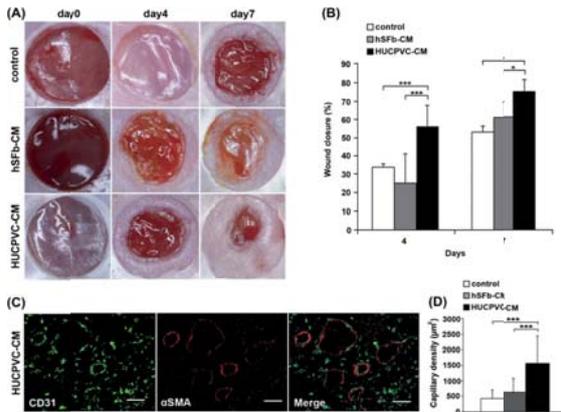


図3. 創傷治癒モデルでの血管形成(論文⑤)

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 13 件)

- ① Inukai T, Katagiri W, Yoshimi R, Osugi M, Kawai T, Hibi H, Ueda M: Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430(2): 763-768, 2013. 査読有
- ② Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, Sakamoto K, Tauchi R, Wakao N, Imagama S, Hibi H, Kadomatsu K, Ishiguro N, Ueda M: Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *Journal of Clinical Investigation* 122(1): 80-90, 2012. 査読有
- ③ 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* 18(13-14): 1479-1489, 2012. 査読有
- ④ Hibi H, Ueda M: Interfaces of titanium implants and a vascularized osteocutaneous scapular graft revised with distraction osteogenesis. *Journal of Craniofacial Surgery* 23(5): 1549-1550, 2012. 査読有
- ⑤ Shohara R, Yamamoto A, Takikawa S, Iwase A, Hibi H, Kikkawa F, Ueda M: Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. *Cytherapy* 14(10): 1171-1181, 2012. 査読有
- ⑥ Tateishi H, Okamoto Y, Kinoshita K, Hibi H, Ueda M: Effects of implant surface on bone healing around the titanium screw implants in ovariectomized rats. *Oral & Craniofacial Tissue Engineering* 1(1): 42-49, 2011. 査読有
- ⑦ Okamoto Y, Tateishi H, Kinoshita K, Tsuchiya S, Hibi H, Ueda M: An experimental study of bone healing around the titanium screw implants in ovariectomized rats: Enhancement of bone healing by bone marrow stromal cells transplantation. *Implant Dentistry* 20(3): 236-245, 2011. 査読有
- ⑧ Hibi H, Ueda M: Supraperiosteal transport distraction osteogenesis for reconstructing a segmental defect of the mandible. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 69(3): 742-746, 2011. 査読有
- ⑨ Ikeno M, Hibi H, Kinoshita K, Hattori H, Ueda M: Effects of self-assembling peptide hydrogel scaffold on bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Oral & Craniofacial Tissue Engineering* 1(2): 91-97, 2011. 査読有
- ⑩ Wadagaki R, Mizuno D, Yamawaki-Ogata A, Satake M, Kaneko H, Hagiwara S, Yamamoto N, Narita Y, Hibi H, Ueda M: Osteogenic induction of bone marrow-derived stromal cells on simvastatin-releasing, biodegradable, nano- to microscale fiber scaffolds. *Annals of Biomedical Engineering* 39(7): 1872-1881, 2011. 査読有
- ⑪ Fujio M, Yamamoto A, Ando K, Shohara R, Kinoshita K, Kaneko T, Hibi H, Ueda M: Stromal cell-derived factor-1 enhances distraction osteogenesis-mediated skeletal tissue regeneration through the recruitment of endothelial precursors. *Bone* 49(4): 693-700, 2011. 査読有
- ⑫ Ikeno M, Hibi H, Kinoshita K, Hattori H, Ueda M: Effects of permeability of

shields with autologous bone grafts on bone augmentation. *Oral & Craniofacial Tissue Engineering* 1(3): 198-204, 2011. 査読有

- ⑬ 日比英晴, 上田実: 歯槽骨の再生医療. 治療, 南山堂, 93(1): 142-146, 2011. 査読無

[学会発表] (計 57 件)

- ① Omori M, Tsuchiya S, Hara K, Fujio M, Kuroda K, Yajima A, Okido M, Hibi H, Ueda M: The application of atmospheric pressure plasma pretreatment for attaching conditioned medium to dental implant. 2013. 3. 7-9. 28th Annual Meeting, Academy of Osseointegration, Tampa, USA
- ② Katagiri W, Tateishi H, Osugi M, Shohara R, Inukai T, Kawai T, Hibi H, Hirai T, Ueda M: Preliminary and first-in-human clinical study of novel bone regenerative medicine using the conditioned media from bone marrow derived mesenchymal stem cells. 2012. 9. 6. 3rd TERMIS World Congress 2012, Vienna, Austria.
- ③ Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Kawai T, Hibi H, Ueda M: Conditioned media from bone marrow derived mesenchymal stem cells and adipose derived stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. 2012. 9. 6. 3rd TERMIS World Congress 2012, Vienna, Austria.
- ④ Kawai T, Katagiri W, Inukai T, Yoshimi R, Osugi M, Hibi H, Ueda M: Periodontal tissue regeneration with the stem cells cultured conditioned media. 2012. 9. 6. 3rd TERMIS World Congress 2012, Vienna, Austria.
- ⑤ Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inoue M, Hara K, Inukai T, Hibi H, Ueda M: The stem cells cultured conditioned media enhanced bone regeneration. 2011. 10. 12-15. 20th Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration, Athens, Greece.
- ⑥ Yoshimi R, Katagiri W, Osugi M, Inukai T, Yamamoto A, Hibi H, Ueda M: Novel xenograft technique using the stem cells cultured conditioned media for bone regeneration. 2011. 10. 12-15. 20th Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration, Athens, Greece.
- ⑦ Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Hibi H, Ueda M: Engrafted dental pulp stem

cells promoted functional recovery of completely transected rat spinal cord. 2011. 6. 15-18. 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Toronto, Canada.

- ⑧ Shohara R, Takikawa S, Yamamoto A, Hibi H, Kikkawa F, Ueda M: Umbilical cord Wharton's jelly: a new potential cell source of mesenchymal stem cells for wound healing. 2011. 6. 15-18. 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Toronto, Canada.
- ⑨ 日比英晴: 顎顔面領域の骨再生. シンポジウム 骨の再生医療 2011. 4. 22. 第65回日本口腔科学会 タワーホール船堀 東京.
- ⑩ Tateishi H, Okamoto Y, Kinoshita K, Hibi H, Ueda M: A study of bone healing around the titanium screw implants in ovariectomized rats: Can rough surface contribute to the implant stability? 2011. 3. 3-5. 26th Annual Meeting, Academy of Osseointegration, Washington DC, USA.
- ⑪ Okamoto Y, Tateishi H, Kinoshita K, Tsuchiya S, Hibi H, Ueda M: An experimental study of bone healing around the titanium screw implants in ovariectomized rats: enhancement of bone healing by bone marrow stromal cells transplantation. 2011. 3. 3-5. 26th Annual Meeting, Academy of Osseointegration, Washington DC, USA.
- ⑫ Hibi H: Bone tissue engineering for maxillofacial reconstruction. Special lecture. 2010. 11. 5. 49th Congress of the Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons, Byeonsan, Korea.
- ⑬ Hibi H, Yamada Y, Ueda M: Alveolar cleft osteoplasty using qualified tissue-engineered osteogenic material. 2010. 9. 15. 20th Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, Bruges, Belgium.
- ⑭ Katagiri W, Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Umemura E, Hara K, Hibi H, Ueda M: Proliferation of SHED and its relation to Wnt signaling pathway. 2010. 7. 17. 88th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Barcelona, Spain.
- ⑮ Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Katagiri W, Umemura E, Hara K, Hibi H, Ueda M:

Cell-based therapy with dental pulp stem cells for bone regeneration. 2010. 7. 17. 88th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Barcelona, Spain.

- ⑩ Sakai K, Yamamoto A, Hibi H, Yamada Y, Fujio M, Yamagata M, Ueda M: Transplantation of dental pulp stem cells in spinal cord injury. 2010. 7. 15. 88th International Association for Dental Research General Session & Exhibition, Barcelona, Spain.

[図書] (計 2 件)

- ① 日比英晴：顎骨の再生医療。上田実，朝比奈泉 編；再生医療叢書第 8 巻歯学系，朝倉書店，110-122，2012。
- ② Ito K, Yamada Y, Naiki T, Usami K, Mizuno H, Okada K, Narita Y, Aoki M, Kondo T, Mizuno D, Mase J, Nishiguchi H, Kagami H, Kinoshita K, Hibi H, Nagasaka T, Ueda M: Bone. In: Ueda M, ed.: Applied Tissue Engineering. InTech, 21-45, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：骨再生用自己組織化ペプチドハイドロゲル

発明者：上田実，日比英晴，服部宇，池野正幸

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：特許出願 2010-231554

出願年月日：22 年 10 月 14 日

国内外の別：国内

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・准教授
研究者番号：90345885

(2) 研究分担者

上田 実 (UEDA MINORU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00151803

(3) 連携研究者

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

片桐 渉 (KATAGIRI WATARU)

名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20569785