

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670863

研究課題名(和文) 組織再生スケールアップを目指した生体内血管網構築法の開発

研究課題名(英文) Development of vascular network construction method in vivo for enhancing tissue regeneration

研究代表者

日比 英晴 (HIBI, Hideharu)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90345885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は培養環境中に合目的な因子を放出する。その因子を含む骨髄間葉系幹細胞および歯髄幹細胞の培養上清を組織欠損モデル、臓器障害モデルに適用すると、それぞれ組織再生、障害軽減に有効であり、それには血管網構築が先行することを示した。培養環境を酸素濃度1%などの過酷な条件設定をする。と、培養細胞における血管新生に関連する遺伝子発現、その培養上清中のタンパク質が増し、管腔形成能、細胞遊走能はいずれも高くなり、血管網構築に有効であった。培養上清中の主な因子を組み合わせたもの、培養上清中からそれらを除いたものを適用することにより、その因子の有効性を示した。本研究は組織再生に有効な血管網構築法の端緒を開いた。

研究成果の概要(英文)：Cells release targeted factors into the culture environment. When the conditioned media derived from culturing bone marrow mesenchymal stem cells or dental pulp stem cells were applied in tissue defect models and organ disorder models, they were effective for regenerating tissues and alleviating disorders, and they followed vascular network construction. When the culture environment was set severely such as 1% oxygen concentration, genes related to angiogenesis expressed in cultured cells, those proteins in the conditioned media, tube formation and cell migration abilities were increased, it was effective for the vascular network construction. Applying the main factors in the conditioned media and also them excepting the main factors demonstrated the effectiveness of the factors for the vascular network construction. The research has opened the beginning of the vascular network construction method effective for tissue regeneration.

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

われわれは培養細胞あるいはその培養上清を用いた骨再生に関する一連の研究を通して、骨形成部では血管構築が骨形成に先行する様相を観察し、組織再生が促進されるにはその前に血管形成自体が促進されていることを、組織形態計測、血管形成関連タンパク質および遺伝子発現解析により明らかにしてきた。また血管や骨の形成に適した培養上清を調製する試みにも取り組み、その手がかりを得ていた。

軟骨や角膜を除くほとんどすべての組織の形成、維持には酸素、栄養供給や代謝物排除のため密な血管網が必要である。骨に限らず組織再生には母床の血管化が必須であり、さらにその先行が特に大規模な組織を得るカギと考えていた。

そこで幹細胞培養上清の調製法と適用法を工夫することにより、組織区域欠損部に骨再建など大規模組織再生を可能にするための血管網構築を誘導することを着想した。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は幹細胞培養上清の調製法と適用法を工夫することにより、区域欠損のような組織欠損部に血管網構築を誘導し、骨再建など大規模組織再生を可能にすることを旨とするものであり、その目的は血管系を誘導するのに最適な幹細胞培養上清を得るための培養条件と、生体内で実際に血管系を誘導するのに最適な上清の投与方法を定めることであった。

3. 研究の方法

本研究の出口は「幹細胞培養上清を用いて血管網を構築し、区域欠損部などで大規模組織再生を可能にする」という臨床的な課題解決であり、そのカギは血管化に最適な幹細胞培養上清の抽出とその適用法の工夫であった。

幹細胞培養上清の調製とその機能解析の手法、低酸素培養の設定はそれを扱ったわれわれの既報に準じた。

幹細胞培養上清は、所定の手続きを経て得たヒト細胞を培養して調製した。細胞種は骨髄間葉系幹細胞、歯髄幹細胞とし、その培養に用いた無血清培地を遠心分離することによりその上清を得た。

機能解析は上記の既報で示したデータを活かし、それを補完できるように項目を設定した。培養細胞の種類、分化度、酸素分圧を変数とし、求めるものを血管新生に関連するサイトカイン、遺伝子発現、細胞増殖能、細胞遊走能、管腔形成能、動員される細胞の種類と動態、血管新生の範囲と密度、として解析を進めた。

動物の頭蓋骨および脛骨部分欠損モデル、臓器障害モデルを用いた。組織欠損部、障害臓器にシリンジにより培養上清を注入して浸潤させた。上清の内容、投与頻度を変数と

し、血管新生から血管網構築の得られる範囲と要する期間、欠損部に動員される細胞動態を求めるものとして検討した。血管化は免疫組織化学的に評価した。

培養上清中の主な因子を組み合わせ投与し、それを上清そのもの、それらの因子を上清から除いたもので比較し、血管化について評価した。

4. 研究成果

(1) 幹細胞培養上清の調製条件

培養環境を酸素濃度 21% の標準に対して 1% などの低い酸素濃度の環境下で歯髄幹細胞を培養すると、培養細胞に発現する血管新生に関連する遺伝子、培養上清中のそれらのタンパク質、管腔形成能、細胞遊走能はいずれも標準よりも特に低酸素条件で有意に高かった (図 1)。

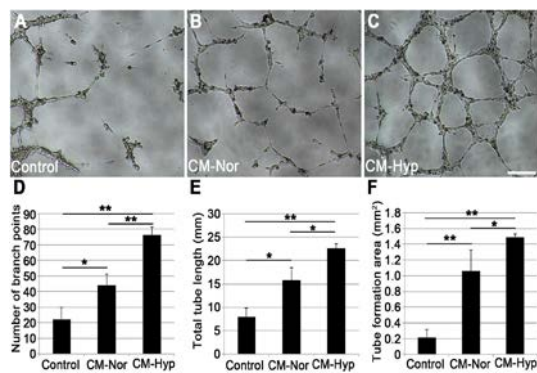


図 1 低酸素培養上清による血管新生促進マトリゲル管腔形成試験 A: 対照, B: 培養上清, C: 低酸素培養上清, D: 分岐数, E: 総管腔長, F: 管腔面積 (雑誌論文①より引用)

また培養上清を生体内の組織欠損モデル、障害臓器モデルに適用することにより、組織再生が促されること、臓器障害の程度が軽くなることを示した。またその効果は標準よりも低酸素条件で有意に高かった。さらにその過程は培養上清に含まれる血管形成に関係する因子が組織欠損部で作用し、血管網が構築されることから始まることを示した (図 2)。

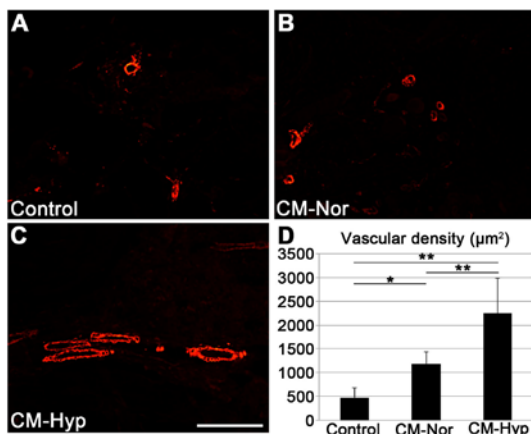


図 2 低酸素培養上清による血管新生促進

α -SMA に対する免疫組織化学染色 A: 対照, B: 培養上清, C: 低酸素培養上清, D: 血管密度 (雑誌論文①より引用)

(2) 培養上清中の因子による血管形成

骨髄間葉系幹細胞培養上清中に含まれた多くの因子のうちで主なものはインシュリン様成長因子-1, 血管内皮細胞増殖因子, トランスフォーミング増殖因子- β 1 であった. これら3種の因子を上清中と同濃度として組み合わせたものを添加すると, 培養細胞に発現する血管新生に関連する遺伝子, 培養上清中のそれらのタンパク質, 管腔形成能, 細胞遊走能はいずれも培養上清と同程度に高くなった (図3, 4).

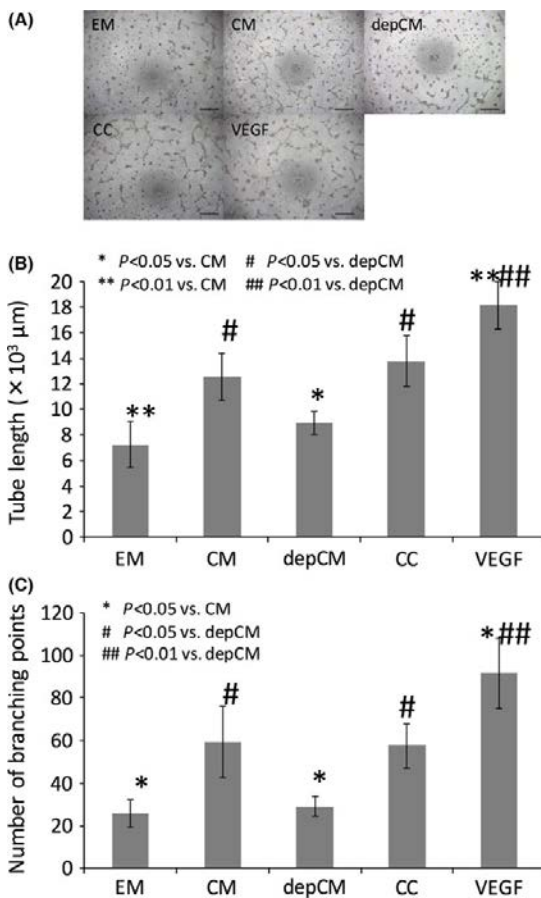


図3 培養上清中因子による血管新生促進 A: 各培地中での管腔形成能, B: 管腔長, C: 分岐数, EM: 血管内皮細胞用培地, CM: 培養上清, depCM: サイトカインを除去した培養上清, CC: サイトカインカクテル, VEGF: 血管内皮細胞増殖因子 (雑誌論文②より引用)

またこれを生体内の組織欠損部に適用することにより, 血管形成のみならず骨などの組織再生が促されることを示した. 逆にこれらの効果は, 培養上清からこれら3種の因子を除いたものでは認められなくなることを示した. このことから確かにこれらの因子が組織欠損部で作用し, 血管網構築を促すことがわかった (図5).

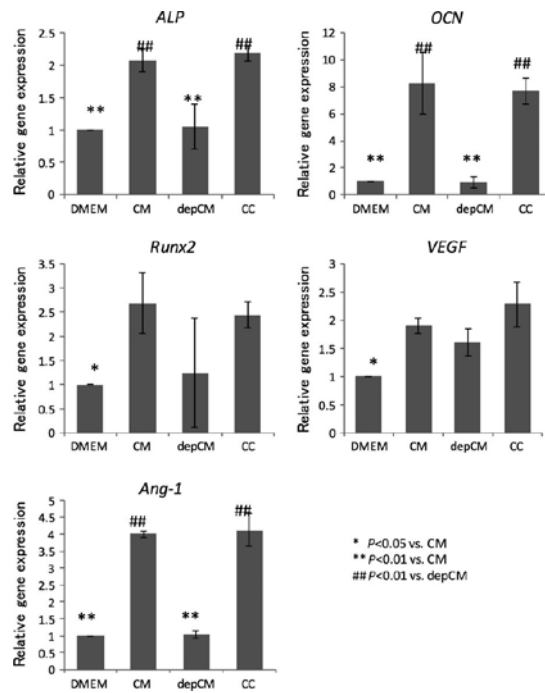


図4 培養上清中因子による遺伝子発現上昇 ALP, OCN, Runx2: 骨形成関連, VEGF, Ang-1: 血管新生関連 (雑誌論文②より引用)

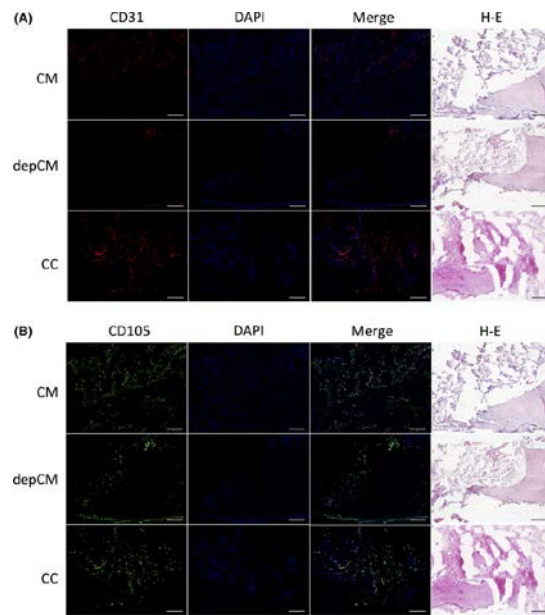


図5 培養上清中因子による血管新生促進 CD31: 血管内皮細胞, CD105: 幹細胞, DAPI: 細胞核 (雑誌論文②より引用)

(3) まとめ

低酸素濃度の培養環境下に置かれた細胞は酸素供給を欲し環境改善のために血管形成を促す因子を放出する. その因子を利用して組織を形成する細胞のライフラインである血管網を整備することは効率的な組織再生, 臓器障害軽減のための有効な方策であると考えられた.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 24 件)

- ① Fujio M, Xing Z, Sharabi N, Xue Y, Yamamoto A, Hibi H, Ueda M, Fristad I, Mustafa K, Conditioned media from hypoxic-cultured human dental pulp cells promotes bone healing during distraction osteogenesis, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 査読有, 印刷中
DOI: 10.1002/term.2109
- ② Katagiri W, Sakaguchi K, Kawai T, Wakayama Y, Osugi M, Hibi H, A defined mix of cytokines mimics conditioned medium from cultures of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and elicits bone regeneration, *Cell Proliferation*, 査読有, Vol. 50, No. 3, e12333, 2017
DOI: 10.1111/cpr.12333
- ③ Sakaguchi K, Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Sugimura-Wakayama Y, Hibi H, Periodontal tissue regeneration using the cytokine cocktail mimicking secretomes in the conditioned media from human mesenchymal stem cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol. 484, No. 1, pp. 100-106, 2017
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.065
- ④ 日比 英晴, 骨再生医療の取り組みと顎骨再建についての再生医学的な検討, *日本口腔科学会雑誌*, 査読有, 65 巻, 1 号, pp. 28-33, 2016
https://www.jstage.jst.go.jp/browse/stomatology/65/1/_contents
- ⑤ Hibi H, Clinical review of bone regenerative medicine and maxillomandibular reconstruction. *Oral Science International*, 査読有, Vol. 13, No. 1, pp. 15-19, 2016
DOI: 10.1016/S1348-8643(15)00037-3
- ⑥ Yamaguchi S, Shibata R, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Tanigawa T, Ueda M, Murohara T, Yamamoto A, Dental pulp-derived stem cell conditioned medium reduces cardiac injury following ischemia-reperfusion, *Scientific Reports*, 査読有, Vol. 5, p. 16295, 2015
DOI: 10.1038/srep16295
- ⑦ Katagiri W, Osugi M, Kinoshita K, Hibi H, Conditioned medium from mesenchymal stem cells enhances early

bone regeneration after maxillary sinus floor elevation in rabbits. *Implant Dentistry*, 査読有, Vol. 24, No. 6, pp. 657-663, 2015
DOI: 10.1097/ID.0000000000000335

- ⑧ Tsuchiya S, Ohmori M, Hara K, Fujio M, Ikeno M, Hibi H, Ueda M, An experimental study on guided bone regeneration using a polylactide-co-glycolide membrane-immobilized conditioned medium, *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 査読有, Vol. 30, No. 5, pp. 1175-1186, 2015
DOI: 10.11607/jomi.3915
- ⑨ Sugimura-Wakayama Y, Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Ogata K, Sakaguchi K, Hibi H, Peripheral nerve regeneration by secretomes of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Stem Cells and Development*, 査読有, Vol. 24, No. 22, pp. 2687-2699, 2015
DOI: 10.1089/scd.2015.0104
- ⑩ Kawai T, Katagiri W, Osugi M, Sugimura Y, Hibi H, Ueda M, Secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhance periodontal tissue regeneration, *Cytherapy*, 査読有, Vol. 17, No. 4, pp. 369-381, 2015
doi: 10.1016/j.jcyt.2014.11.009

[学会発表] (計 40 件)

- ① 坂口 晃平, 片桐 渉, 大杉 将嗣, 酒井 陽, 梶村 有紀子, 鶴田 剛士, 渡邊 純奈, 日比 英晴, 骨髄間葉系幹細胞由来培養上清を模倣した成長因子混合剤による歯周組織再生, 第 61 回日本口腔外科学会, 2016 年 11 月 25-27 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市)
- ② 坂口 晃平, 片桐 渉, 大杉 将嗣, 酒井 陽, 若山 有紀子, 鶴田 剛士, 日比 英晴, 幹細胞由来培養上清を模した成長因子混合剤による新たな歯周組織再生法, 第 37 回日本炎症・再生医学会, 2016 年 6 月 16 日, 京都市勧業館 (京都府・京都市)
- ③ 外山 直人, 片桐 渉, 大杉 将嗣, 安藤 さやか, 若山 有紀子, 坂口 晃平, 鶴田 剛士, 渡邊 純奈, 日比 英晴, 骨髄由来間葉系幹細胞培養上清由来液性因子を用いた新たな骨再生治療に関する臨床的検討, 第 15 回日本再生医療学会, 2016 年 3 月 17 日, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

- ④ 坂口 晃平, 片桐 涉, 大杉 将嗣, 若山 有紀子, 鶴田 剛士, 日比 英晴, イヌ歯周病モデルを用いた成長因子混合剤による歯周組織再生能の検討, 第 15 回日本再生医療学会, 2016 年 3 月 17 日, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- ⑤ Osugi M, Katagiri W, Sakaguchi K, Kawai T, Hibi H, Conditioned media from bone marrow derived mesenchymal stem cells enhances bone regeneration in rat calvarial bone defects, 31st Annual Meeting of Academy of Osseointegration, 2016 年 2 月 17-20 日, San Diego (USA)
- ⑥ Yamaguchi S, Shibata R, Yamamoto N, Nishikawa M, Wakayama H, Ishikawa J, Murohara T, Hibi H, Yamamoto A, Conditioned media derived from dental pulp stem cells prevent myocardial ischemic injury, 22nd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgeons, 2015 年 10 月 27 日, Melbourne (Australia)
- ⑦ 渡邊 純奈, 片桐 涉, 大杉 将嗣, 安藤 さやか, 梶村 有紀子, 緒方 謙一, 坂口 晃平, 鶴田 剛士, 日比 英晴, 幹細胞培養上清由来液性因子を用いた新規骨再生医療における組織学的検討, 第 60 回日本口腔外科学会, 2015 年 10 月 17 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ⑧ 山口 聡, 山本 朗仁, 山本 憲幸, 西川 雅也, 若山 博隆, 石川 純, 日比 英晴, ヒト歯髄幹細胞無血清培養上清を用いた急性心筋梗塞の治療効果の検討, 第 60 回日本口腔外科学会, 2015 年 10 月 16 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ⑨ 坂口 晃平, 片桐 涉, 大杉 将嗣, 河合 孝真, 梶村 有紀子, 緒方 謙一, 日比 英晴, 成長因子混合剤による新たな骨再生法, 第 14 回日本再生医療学会 2015 年 3 月 21 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑩ Katagiri W, Sugimura Y, Osugi M, Kawai T, Ogata K, Sakaguchi K, Hibi H, Novel bone regenerative medicine using the secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stem cells, 2015 IADR/ AADR/ CADR General Session, 2015 年 3 月 12 日, Boston (USA)
- ⑪ Sugimura Y, Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Ogata K, Sakaguchi K, Hibi H,

Conditioned media from SHED enhanced peripheral nerve regeneration, 2015 IADR/ AADR/ CADR General Session, 2015 年 3 月 12 日, Boston (USA)

- ⑫ 山口 聡, 山本 朗仁, 山本 憲幸, 西川 雅也, 古江 浩樹, 萩原 純孝, 若山 博隆, 石川 純, 日比 英晴, 上田 実, ヒト歯髄幹細胞無血清培養上清を用いた急性心筋梗塞の治療効果の検討, 第 59 回日本口腔外科学会, 2014 年 10 月 17 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市)
- ⑬ 大森 正裕, 土屋 周平, 原 憲史, 藤尾 正人, 西野 雄大, 杉本 圭佑, 日比 英晴, 上田 実, 大気圧プラズマ処理したチタンインプラントへのヒト脱落乳歯幹細胞由来培養上清の応用, 第 59 回日本口腔外科学会, 2014 年 10 月 17 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市)
- ⑭ 梶村 有紀子, 片桐 涉, 大杉 将嗣, 河合 孝真, 緒方 謙一, 坂口 晃平, 日比 英晴, 上田 実, 乳歯歯髄幹細胞を用いた末梢神経再生治療の可能性, 第 59 回日本口腔外科学会, 第 59 回日本口腔外科学会, 2014 年 10 月 17 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市)

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)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学系)・教授
研究者番号：50244083

(3) 連携研究者

片桐 涉 (KATAGIRI, Wataru)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：10437030