

令和 元年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05540

研究課題名(和文) 過酷な培養環境に応答した細胞由来因子群による骨再生法

研究課題名(英文) Bone regeneration with cell-derived factors in response to severe culture environment

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞は低酸素濃度や機械的ストレスにより刺激されると血管および骨形成に関連する遺伝子の発現率が上昇し、細胞培養上清中にはそれらに起因するタンパク量が増加した。この培養上清をさまざまな組織欠損および炎症性組織傷害モデルに適用すると、炎症を制御し組織を修復し再生させること、その機序は局在するマクロファージが極性転換し、局所に動員される生体内組織形成細胞が血管網を構築し、組織を修復あるいは適合組織を形成することがわかった。この培養上清に含まれる成長因子や基質を同定し、目的とする機能別にそれらの最適な組み合わせを明らかにし、それらが実際に組織を修復あるいは再生させることを実験動物モデルで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞は培養環境が過酷なほどそれに適応し生存しようとしてさまざまな基質や因子群を生成し、それらが培養上清中には含まれる。これらが炎症を制御し組織を修復あるいは適合組織を再生させる効果は因子群では単独因子と比べて極めて低濃度で得られており、この理由は生体内の複雑な組織修復および形成過程を並行的かつ連続的に進めているからであり、この効率は効率的なだけでなく生理的でもあると考えられる。さらに目的とする機能別に有効な因子群を明らかにでき、製剤化および創薬への途を開いた。以上の方法は培養細胞を生体内に導入する従来の再生医療と比べて、調節性、安全性、普遍性の点で優れ、時間的、経済的に有利であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Stimulation of stem cells by hypoxia or mechanical stress promoted gene expression related to osteogenesis and angiogenesis and increased the amount of protein resulting from them in the cell-conditioned media. The application of the conditioned media to various tissue defect and inflammatory tissue injury models controlled inflammation, repaired and regenerated the tissue. The mechanism was that localized macrophages were oppositely polarized and locally mobilized tissue forming cells constructed a vascular network and repaired or formed compatible tissue. We identified the growth factors and substrates contained in the conditioned media, clarified the optimal combination of them according to the target function, and showed that they actually repaired or regenerated the tissue in experimental animal models.

研究分野：口腔外科

キーワード：移植・再生医療 再生医学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

われわれは培養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、再生可能な大きさには限りがあった。その理由は、生体内に適用したものの内部は低栄養、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かなり低いことが示されてきた。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成長因子や基質などを分泌し、それにより内在性の幹細胞が動員されて組織を形成させる機序が主体だからであることがわかってきた。また環境が過酷なほど培養細胞もそれに適応し生存しようとして合目的に成長因子や基質などを分泌するだろう。そしてその分泌したものは培養上清に含まれるはずである。そこでそれらの集合体として幹細胞培養上清に着目し、内在性組織幹細胞による組織再生について検討することにした。

2. 研究の目的

研究の全体構想は、過酷な環境下で幹細胞を培養し、その上清中因子群を適用することにより、大量の組織再生を可能にし、さらにその製剤化も目指すことであった。研究の目的は、組織欠損部の環境を調整し、組織を再生させるのに最適な細胞由来因子群を明らかにすること、それらを得るための培養条件と、生体内で実際に骨を中心とした組織再生を誘導するのに最適な投与方法を求めることであった。

3. 研究の方法

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、歯髄幹細胞とした。培養条件は酸素濃度、機械的ストレスについて、生体にとって過酷な環境、組織破壊が起きる環境を想定して設定した。培養終了後、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マスマスペクトロメトリー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。さらに培養上清の機能を明らかにするために、細胞遊走能、創傷治癒能、管腔形成能、組織系性能などを評価した。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、培養上清中の因子や基質の親和性を高める表面加工処理を施したチタンを用いた。

実験モデルは骨欠損を中心にしたが、その基盤は血管形成であることが判明したため、それを組織欠損および炎症性組織傷害に展開した。

4. 研究成果

(1) 培養条件による上清中因子の変化と組織再生

骨髄および歯髄由来の幹細胞は、低酸素濃度あるいは伸展による刺激が加わる培養環境下にあると、その細胞において骨と血管形成に関連する遺伝子の発現が促進し、また培養上清中にはそれらに起因するタンパク量が増加した(図1)。そしてその培養上清により管腔形成能および血管内皮細胞の創傷治癒能と石灰化能が増強し、つまり血管と骨形成が促進した。さらにこの培養上清を実験動物の骨区域欠損などに適用し、培養上清中の因子群が骨および血管形成を促進することを示した(図2)。これは先行する血管形成により骨形成が促進したと考察した。

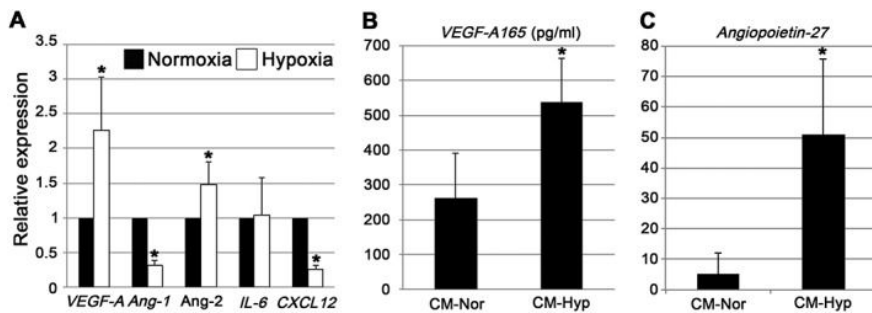


図1 低・標準酸素濃度培養歯髄幹細胞の血管形成関連遺伝子発現

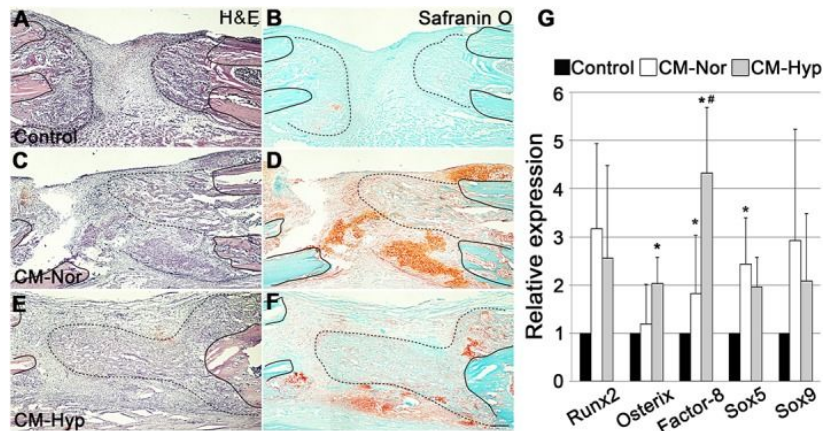


図2 低・標準酸素濃度培養上清による骨形成と関連遺伝子発現

(2) 幹細胞培養上清中因子群の定量とその適用による組織再生

幹細胞培養上清に含まれるタンパクを定量した。その量に応じて、目標とする再生組織別に成長因子などを候補として絞り込み、上清中と同濃度でそれらの組み合わせを検討し、その最適なものでは上清と同程度に組織再生が得られることを示した(図3)。再生した組織は骨だけでなく、歯周組織も含まれた。また前破骨細胞の増殖、破骨細胞への分化を調整し、顎骨壊死を防ぐ効果も見出した。これらは製剤化への途を開いたと考えている。

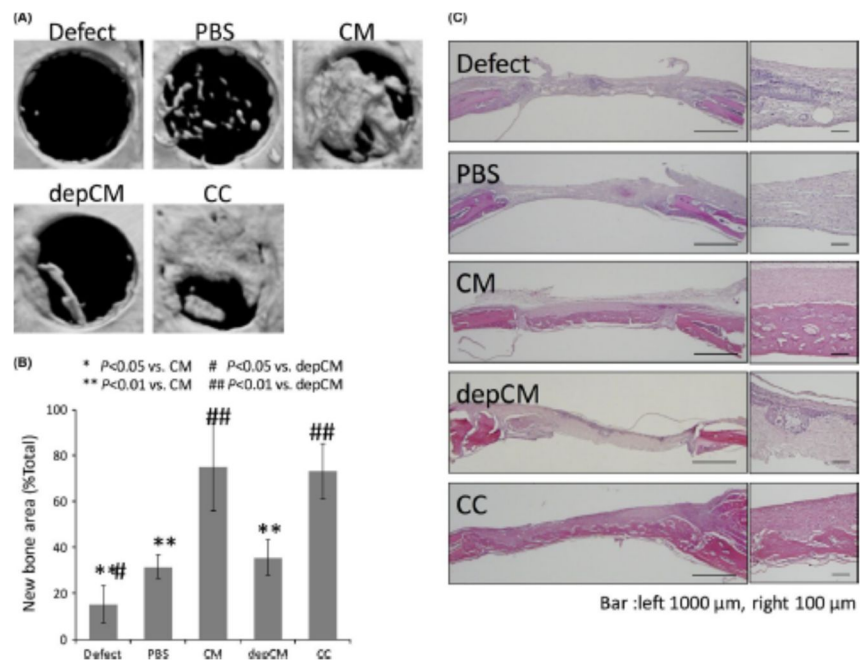


図3 培養上清とその組成を模倣したサイトカイン集合体による骨再生

(3) 幹細胞培養上清による炎症制御とその治療

幹細胞培養上清により、骨欠損、自己免疫性脳脊髄炎、肝線維症、急性肝不全、知覚および運動末梢神経圧挫および切断の各実験動物モデルにおいて、病態を改善し組織を再生できることを示した(図4)。またこの機序は幹部に局在するマクロファージの炎症型・組織破壊型から抗炎症型・組織再生型への極性転換であることも示せた。さらにこの効果は培養上清中の特定の因子によることまでもが明らかにできた。

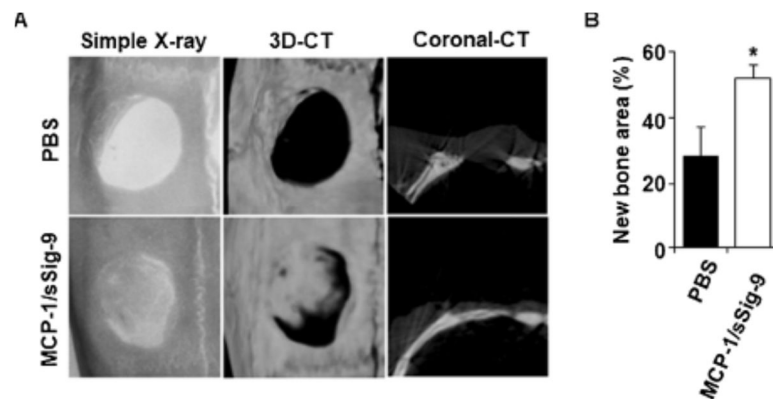


図4 培養上清中因子による骨再生

(4) 骨と結合するチタン表面の解析と結合能の増強

幹細胞培養上清によりチタン表面を修飾する前の検討として、吸着するタンパクを網羅的に解析し、その種類と量を明らかにした。またチタン表面の化学的処理により、骨形成を促進する因子の吸着する量が増え、骨結合能も増強することを示した。

以上を総括すると、細胞は培養環境に適応しようとしてさまざまな因子群を生成し、それらが培養上清中には含まれ、これらが炎症を制御し組織を再生させること、その根本には血管形成促進による血管網構築があることを示した。またこれらの効果は因子群では単独因子と比べて極めて低濃度で得られており、この理由は生体内の複雑な組織形成過程を並行的かつ連続的に進めているからと考えられる。これらの知見が将来、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ことが期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計16件)

Ishikawa J, Kano F, Ando Y, Hibi H, Yamamoto A: Monocyte chemoattractant protein-1 and secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 enhance bone regeneration by inducing M2 macrophages. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 査読有 31(3): 169-174, 2019.

DOI: 10.1016/j.ajoms.2018.12.007

Shimizu S, Tsuchiya S, Hirakawa A, Kato K, Ando M, Mizuno M, Osugi M, Okabe K, Katagiri W, Hibi H: Design of a Randomized Controlled Clinical Study of tissue-engineered osteogenic materials using bone marrow-derived mesenchymal cells for

Maxillomandibular bone defects in Japan: the TEOM study protocol. *BMC Oral Health* 査読有 19(1): 69, 2019
DOI: 10.1186/s12903-019-0753-1

Tsuruta T, Sakai K, Watanabe J, Katagiri W, Hibi H: Dental pulp-derived stem cell conditioned medium to regenerate peripheral nerves in a novel animal model of dysphagia. *PLoS One* 査読有 13(12): e0208938, 2018.
DOI: 10.1371/journal.pone.0208938

Fujio M, Osawa Y, Matsushita M, Ogisu K, Tsuchiya S, Kitoh H, Hibi H: A mouse distraction osteogenesis model. *Journal of Visualized Experiments* 査読有 141, 2018.
DOI: 10.3791/57925

Ogata K, Matsumura M, Moriyama M, Katagiri W, Hibi H, Nakamura S: Cytokine mixtures mimicking secretomes from mesenchymal stem cells improve medication-related osteonecrosis of the jaw in a rat model. *Journal of Bone and Mineral Research Plus* 査読有 2(2): 69-80, 2018.
DOI: 10.1002/jbm4.10013

Tsuchiya S, Sugimoto K, Kamio H, Okabe K, Kuroda K, Okido M, Hibi H: Kaempferol-immobilized titanium dioxide promotes formation of new bone: effects of loading methods on bone marrow stromal cell differentiation in vivo and in vitro. *International Journal of Nanomedicine* 査読有 13: 1665-1676, 2018.
DOI: 10.2147/IJN.S150786

Katagiri W, Watanabe J, Toyama N, Osugi M, Sakaguchi K, Hibi H: Clinical study of bone regeneration by conditioned medium from mesenchymal stem cells after maxillary sinus floor elevation. *Implant Dentistry* 査読有 26(4): 607-612, 2017.
DOI: 10.1097/ID.0000000000000618

Ito T, Ishigami M, Matsushita Y, Hirata M, Matsubara K, Ishikawa T, Hibi H, Ueda M, Hirooka Y, Goto H, Yamamoto A: Secreted ectodomain of SIGLEC-9 and MCP-1 synergistically improve acute liver failure in rats by altering macrophage polarity. *Scientific Reports* 査読有 7: 44043, 2017.
DOI: 10.1038/srep44043

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 484(1): 100-106, 2017.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.065

Kano F, Matsubara K, Ueda M, Hibi H, Yamamoto A: Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and MCP-1 synergistically regenerate transected rat peripheral nerves by altering macrophage polarity. *Stem Cells* 査読有 35(3): 641-653, 2017.
DOI: 10.1002/stem.2534

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 50(3): e12333, 2017.
DOI: 10.1111/cpr.12333

Ogata K, Katagiri W, Hibi H: Secretomes from mesenchymal stem cells participate in the regulation of osteoclastogenesis in vitro. *Clinical Oral Investigations* 査読有 21(6): 1979-1988, 2017.
DOI: 10.1007/s00784-016-1986-x

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 11(7): 2116-2126, 2017.
DOI: 10.1002/term.2109

Sugimoto K, Tsuchiya S, Omori M, Matsuda R, Fujio M, Kuroda K, Okido M, Hibi H: Proteomic analysis of bone proteins adsorbed onto the surface of titanium dioxide. *Biochemistry and Biophysics Reports* 査読有 7: 316-322, 2016.
DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.07.007

Hirata M, Ishigami M, Matsushita Y, Ito T, Hattori H, Hibi H, Goto H, Ueda M, Yamamoto A: Multifaceted therapeutic benefits of factors derived from dental pulp stem cells for mouse liver fibrosis. *Stem Cells Translational Medicine* 査読有 5(10): 1416-1424, 2016
DOI: 10.5966/sctm.2015-0353

Shimojima C, Takeuchi H, Jin S, Parajuli B, Hattori H, Suzumura A, Hibi H, Ueda M,

Yamamoto A: Conditioned medium from the stem cells of human exfoliated deciduous teeth ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. The Journal of Immunology 査読有 196(10): 4164-4171, 2016.
DOI: 10.4049/jimmunol.1501457

[学会発表](計 32 件)

石川純, 日比英晴, 山本朗仁 他: M2 マクロファージ誘導因子 MCP-1/sSiglec9 を用いた骨再生効果の検討. 第 18 回日本再生医療学会. 2019 年.

Hibi H: Role of regenerative medicine in medical treatment. Symposium I “New Era of Oral Medicine” The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 2018 年.

外山直人, 土屋周平, 日比英晴 他: チタン表面の大気圧プラズマ処理がマクロファージの挙動におよぼす影響の検討. 第 63 回日本口腔外科学会. 2018 年.

坂口晃平, 片桐渉, 日比英晴 他: 骨髄間葉系幹細胞が分泌するエクソソームによる新規骨再生法. 第 63 回日本口腔外科学会. 2018 年.

渡邊純奈, 日比英晴 他: 間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた BRONJ に対する治療の有効性の検討. 第 63 回日本口腔外科学会. 2018 年.

荻須宏太, 土屋周平, 日比英晴 他: 伸展刺激下で得た細胞培養上清における骨形成能の検討. 第 63 回日本口腔外科学会. 2018 年.

渡邊純奈, 日比英晴 他: BRONJ 発症におけるエクソソームの効果の検討. 第 60 回歯科基礎医学会. 2018 年.

Watanabe J, Hibi H 他: Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes for rat BRONJ model. 96th General Session & Exhibition of the IADR. 2018 年.

Sakaguchi K, Katagiri W, Hibi H 他: Exosomes derived from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration. 96th General Session & Exhibition of the IADR. 2018 年.

Sugimura Y, Katagiri W, Hibi H 他: A novel approach to peripheral nerve regeneration using conditioned media. 96th General Session & Exhibition of the IADR. 2018 年.

渡邊純奈, 日比英晴 他: ビスホスホネート関連顎骨壊死に対する間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた治療の可能性. 第 72 回日本口腔科学会. 2018 年.

緒方謙一, 片桐渉, 日比英晴 他: 間葉系幹細胞培養上清を模した液性因子カクテル剤を用いた薬剤関連顎骨壊死の新規治療法の検討. 第 72 回日本口腔科学会. 2018 年.

坂口晃平, 片桐渉, 日比英晴 他: 骨髄由来間葉系幹細胞が分泌するエクソソームによる新たな骨再生. 第 17 回日本再生医療学会. 2018 年.

渡邊純奈, 片桐渉, 日比英晴 他: 他家骨髄由来間葉系細胞の移植による骨再生の検討. 第 38 回日本口腔インプラント学会中部支部学術大会. 2017 年.

鶴田剛士, 片桐渉, 日比英晴 他: 乳歯歯髄幹細胞由来成長因子は神経の血管新生を介してラット末梢性嚥下障害を改善する. 第 62 回日本口腔外科学会. 2017 年.

加納史也, 山本朗仁, 日比英晴 他: MCP-1 と sSiglec-9 はマクロファージの極性変化を介して骨再生を促進する. 第 62 回日本口腔外科学会. 2017 年.

梶村有紀子, 片桐渉, 日比英晴 他: 乳歯歯髄幹細胞由来培養上清を用いた末梢神経再生治療の検討. 第 62 回日本口腔外科学会. 2017 年.

Kano F, Yamamoto A, Hibi H 他: Secreted ectodomain of sialic acid-binding ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 synergistically regenerate transected rat peripheral nerves by altering macrophage polarity. 13rd World Congress on Inflammation. 2017 年.

鶴田剛士, 片桐渉, 日比英晴 他: ラット末梢性嚥下障害モデルを用いた乳歯歯髄幹細胞由来成長因子の治療効果の検討. 第 71 回日本口腔科学会. 2017 年.

Kano F, Yamamoto A, Hibi H 他: Secreted ectodomain of sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 derived from dental pulp stem cells synergistically regenerate transected rat peripheral nerves by altering macrophage polarity. 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgeons. 2017 年.

⑳ 鶴田剛士, 片桐渉, 日比英晴 他: ラット末梢性嚥下障害モデルの確立と乳歯歯髄幹細胞由来成長因子による治療効果の検討. 第 16 回日本再生医療学会. 2017 年.

㉑ 片桐渉, 日比英晴 他: 再生医療安全性確保法に基づく先進医療 B の顎骨再生医療臨床試験実施体制の構築. 第 61 回日本口腔外科学会. 2016 年.

㉒ 鶴田剛士, 片桐渉, 日比英晴 他: ラット末梢性嚥下障害モデルにおける乳歯歯髄幹細胞由来成長因子による治療効果の検討. 第 61 回日本口腔外科学会. 2016 年.

㉓ 坂口晃平, 片桐渉, 日比英晴 他: 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.

㉔ 伊藤隆徳, 山本朗仁, 日比英晴 他: 新規 M2 マクロファージ誘導因子を用いた難治性肝疾

- 患治療法の開発．第 20 回日本肝臓学会大会．2016 年．
- ②6 酒井陽，山本朗仁，日比英晴 他：歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への分化における Epiprotein と T-box1 の役割．第 58 回歯科基礎医学会．2016 年．
 - ②7 松下嘉泰，土屋周平，日比英晴 他：Kaempferol を用いた新規骨補填材料の開発．日本補綴歯科学会第 125 回学術大会．2016 年．
 - ②8 杉本圭佑，土屋周平，日比英晴 他：インプラント周囲の骨形成促進を目指したチタン表面へのケンフェロールの応用．日本補綴歯科学会第 125 回学術大会．2016 年．
 - ②9 坂口晃平，片桐渉，日比英晴 他：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．
 - ③0 下島千明，山本朗仁，日比英晴 他：ヒト脱落乳歯歯髓由来幹細胞培養上清を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎治療の検討．第 37 回日本炎症・再生医学会．2016 年．
 - ③1 伊藤隆徳，山本朗仁，日比英晴 他：新規 M2 マクロファージ誘導因子を用いた難治性肝疾患治療法の開発．第 37 回日本炎症・再生医学会．2016 年．
 - ③2 加納史也，山本朗仁，日比英晴 他：M2 マクロファージの Schwann 細胞に対する影響と神経再生療法の開発．第 37 回日本炎症・再生医学会．2016 年．

〔図書〕(計 2 件)

Hibi H, Katagiri W, Tsuchiya S, Omori M, Ueda M: Tissue-engineered bone and cell-conditioned media. In: Jensen OT, ed: The Sinus Bone Graft, Third Edition. Quintessence Publishing, 268(235-243), 2019.

日比英晴：歯の欠損と補綴，インプラント．福井次矢，高木誠，小室一成 編：今日の治療指針，医学書院，2192(1594-1595)，2019.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：興戸 正純
 ローマ字氏名：(OKIDO, masazumi)
 所属研究機関名：名古屋大学
 部局名：未来材料・システム研究所
 職名：教授
 研究者番号：50126843

研究分担者氏名：黒田 健介
 ローマ字氏名：(KURODA, kensuke)
 所属研究機関名：名古屋大学
 部局名：未来材料・システム研究所
 職名：准教授
 研究者番号：00283408

研究分担者氏名：土屋 周平
 ローマ字氏名：(TSUCHIYA, shuhei)
 所属研究機関名：名古屋大学
 部局名：医学部附属病院
 職名：助教
 研究者番号：20569785

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山本 朗仁
 ローマ字氏名：(YAMAMOTO, akihito)
 所属研究機関名：徳島大学
 部局名：医歯薬学研究部
 職名：教授
 研究者番号：50244083

研究協力者氏名：片桐 渉
 ローマ字氏名：(KATAGIRI, wataru)
 所属研究機関名：新潟大学
 部局名：医歯学総合研究科
 職名：准教授
 研究者番号：10437030

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。