

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10113

研究課題名(和文) 幹細胞・マクロファージ動態制御を行う幹細胞培養上清由来液性因子による骨質改善法

研究課題名(英文) Improvement method of bone quality using stem cell culture conditioned medium-derived factors that control stem cell/macrophage dynamics

研究代表者

片桐 渉 (Katagiri, Wataru)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10437030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：MSC-CMからMCP-1を除去したdepMSC-CMを作成した。マクロファージ(BMM)はラット大腿骨より採取培養した。BMMをMSC-CM、depMSC-CM存在下で培養し極性を確認した。ヒトMSCを各CM存在下で培養、骨形成関連遺伝子発現を検討した。ラット頭蓋骨欠損モデルでは各CMを移植し骨形成を検討した。MSC-CMにはMCP-1が含有され、MSC-CM存在下で培養したBMMにおける抗炎症性マクロファージマーカーの発現、ヒトMSCにおける骨形成関連遺伝子の発現の亢進を認めた。移植実験ではMSC-CM群で骨形成が促進、免疫組織化学の評価で抗炎症性マクロファージ数が上昇した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSC-CMに含有されるMCP-1がマクロファージ極性転換およびそれに続く骨形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

MSC-CMによる骨形成に関わる因子の同定は組織再生のメカニズムを明らかにするばかりでなく、創薬の基盤研究ともなり得る。幹細胞ニッチにおける造血幹細胞・間葉系幹細胞間の相互作用などを含め新たな骨再生の戦略として今後も研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：depMSC-CM was prepared by removing MCP-1 from MSC-CM. Macrophages (BMM) were collected and cultured from rat femurs. Polarity was confirmed by culturing BMM in the presence of MSC-CM and depMSC-CM. Human MSCs were cultured in the presence of each CM, and osteogenesis-related gene expression was examined. In a rat calvaria bone defect model, each CM was implanted and bone formation was examined.

MSC-CM contains MCP-1, and the expression of anti-inflammatory macrophage markers in BMM cultured in the presence of MSC-CM and the expression of osteogenesis-related genes in human MSCs were enhanced. In the transplantation experiment, bone formation was promoted in the MSC-CM group, and immunohistochemical evaluation showed an increase in the number of anti-inflammatory macrophages.

研究分野：口腔外科

キーワード：マクロファージ 骨再生 培養液 幹細胞

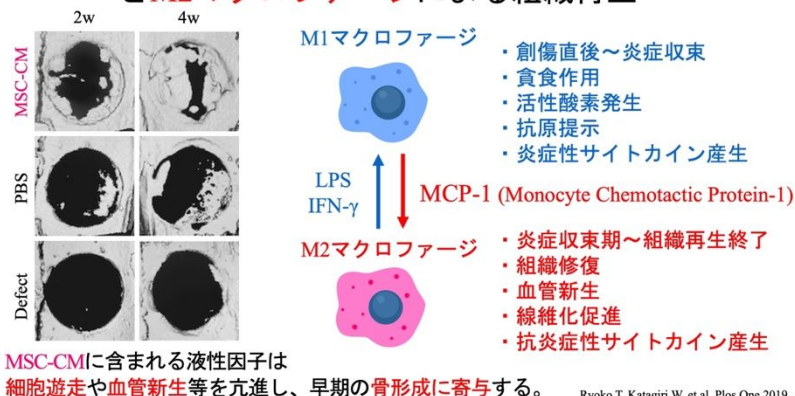
## 1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞が分泌する液性因子群が組織再生に深く関与することが明らかにされている。われわれは骨髄由来間葉系幹細胞由来培養上清(MSC-CM)が血管新生、細胞遊走、骨芽細胞分化の亢進等を介し骨形成を促進させること、特に血管新生および細胞動員効果が早期骨形成を可能にしていることを示してきた。一方、組織再生においては「炎症環境の抗炎症、血管・組織再生環境への転換」が血管・組織再生に先行することも明らかになってきた。

## 2. 研究の目的

今回、マクロファージの極性転換に着目し「MSC-CMが炎症環境を整備し、抗炎症型であるM2型マクロファージを誘導し早期骨形成を可能にする」との仮想を立て研究を実施した。これまでの先行研究でMSC-CMに多く含まれることが明らかであった単球走化性因子MCP-1を用い上記仮説の検証を行った。

### 骨髄間葉系幹細胞由来培養上清(MSC-CM)による骨形成とM2マクロファージによる組織再生



## 3. 研究の方法

MSC-CM含有MCP-1濃度はELISA法にて測定した。MSC-CMからMCP-1を除去したdepMSC-CMを作成した。マクロファージ(BMM)はラット大腿骨より採取培養した。

BMMをMSC-CM、depMSC-CM存在下で培養し免疫染色およびqRT-PCR法で極性を確認した。ヒトMSCを各CM存在下で培養、骨形成関連遺伝子発現をqRT-PCR法で検討した。ラット頭蓋骨欠損モデルでは各CMを移植し骨形成部をマイクロCT、免疫組織化学的に検討した。

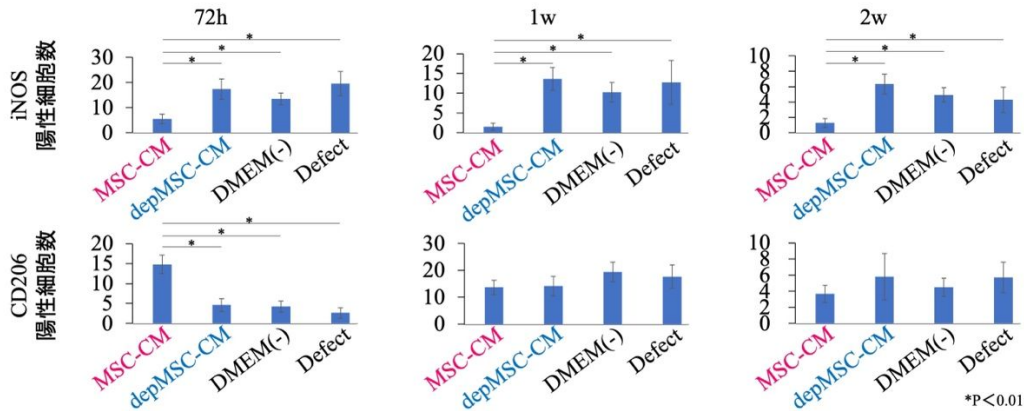
## 4. 研究成果

*in vitro*においてラット大腿骨骨髄より単離したマクロファージをMSC-CMあるいはMCP-1を除去したdepMSC-CM存在下で培養したところ、MSC-CM群ではM1型マクロファージマーカーである*iNOS*、*CD80*発現の減弱およびM2型マクロファージマーカーである*CD206*、*Arg-1*発現が増強しMSC-CMはM2型マクロファージを誘導することが示された。

次に、ヒトMSCをMSC-CMあるいはdepMSC-CM存在下に培養し骨形成関連遺伝子発現を比較した。結果、オステオポンチン、アルカリホスファターゼ等の発現がMSC-CM群に比べdepMSC-CM群で有意に低下した。*in vivo*においてもラット頭蓋骨欠損モデルへの移植実験を行ったところ、移植後1、2週でみられたMSC-CM群における骨形成がdepMSC-CM群では有意に抑制された。さらに移植後72時間ではいずれの群も骨形成は明らかでなかったが、MSC-CM群でM2型マクロファージが優位、depMSC-CM群ではM1型マクロファージが優位となった。

## 結果

### b. 組織学的・免疫組織化学的評価



MSC-CM群では72時間でiNOS陽性細胞が有意に少なく、CD206陽性細胞が有意に多い。  
depMSC-CM群ではその逆の結果となった。  
MSC-CMIは1週、2週でiNOS陽性細胞数が有意に少なかった。

以上より MSC-CM に含有される MCP-1 がマクロファージ極性転換およびそれに続く骨形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

MSC-CM による骨形成に関わる因子の同定は組織再生のメカニズムを明らかにするばかりでなく、創薬の基盤研究ともなり得る。幹細胞ニッチにおける造血幹細胞-間葉系幹細胞間の相互作用などを含め新たな骨再生の戦略として今後も研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katagiri W, Takeuchi R, Saito N, Suda D, Kobayashi T	4. 巻 17
2. 論文標題 Migration and phenotype switching of macrophages at early-phase of bone-formation by secretomes from bone marrow derived mesenchymal stem cells using rat calvarial bone defect model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 421-429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jds.2021.08.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Katagiri Wataru, Endo Satoshi, Takeuchi Ryoko, Suda Daisuke, Saito Naoaki, Kobayashi Tadaharu	4. 巻 7
2. 論文標題 Conditioned medium from mesenchymal stem cells improves condylar resorption induced by mandibular distraction osteogenesis in a rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e06530 ~ e06530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2021.e06530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Kiyoshi, Tsuruta Takeshi, Watanabe Junna, Sugimura Yukiko, Sakaguchi Kohei, Katagiri Wataru, Hibi Hideharu	4. 巻 2155
2. 論文標題 Peripheral Nerve in a Novel Rat Model of	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0655-1_9	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋爪孝介, 片桐涉, 竹内涼子, 須田大亮, 小林正治
2. 発表標題 間葉系幹細胞培養上清による早期骨形成における単球遊走因子およびマクロファージ極性転換関連因子の影響に関する検討
3. 学会等名 日本口腔科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内涼子、片桐 渉、遠藤 諭、小林正治
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームは骨再生を促進する
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片桐 渉、竹内涼子、遠藤 諭、小林正治
2. 発表標題 幹細胞培養上清の保有するマクロファージスイッチング作用は早期骨形成の起点となる
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片桐 渉、遠藤 諭、竹内涼子、須田大亮、齋藤直朗、小林正治
2. 発表標題 進行性下顎頭吸収に対する骨髄由来間葉系幹細胞培養上清を用いた再生医学的予防・治療法の開発
3. 学会等名 日本顎変形症学会
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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