

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11230

研究課題名(和文)骨再生過程に及ぼす炎症の影響に関する検討

研究課題名(英文)Influence of inflammation on Bone Regeneration

研究代表者

李 憲起 (Li, Xianqi)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60350831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：皮質骨由来細胞(compact bone derived cells, CBDCs)により免疫正常マウスを用いた骨再生モデルを作製したところ、培養骨による骨形成が認められ、炎症サイトカインIL-4、IL-17およびOsterixが2週から4週にかけて増加した。IL-6とTNF- α の発現は免疫不全動物に比べ高値であったことが明らかにした。ステロイドの投与によって移植部位の初期の炎症性細胞の浸潤とIL-4、TNF- α が減少した一方、短期間のステロイドの投与であってもIL-6など一部の炎症サイトカインの上昇を認め、アポトーシスおよびTRAP陽性細胞の増加も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A bone regeneration model was established by compact bone derived cells (CBDCs) in immunocompetent mice, new bone formation was observed, the expression of inflammatory cytokine IL-4, IL-17 and Osterix were increased from 2 weeks to 4 weeks. The levels of IL-6 and TNF- α were keeps in high value as compared with nude mice. After steroid administration, early inflammatory cell infiltration and IL-4, TNF- α were decreased in the transplantation site. Even with steroid short-time administration, the expression of inflammatory cytokines such IL-6 were elevated, the apoptosis and TRAP positive cells were also increased.

研究分野：再生医学・口腔顎顔面外科学

キーワード：骨再生 炎症サイトカイン 骨芽細胞 破骨細胞 ステロイド

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞を用いた再生医療が注目されている。口腔外科領域や整形外科領域では、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSCs) を用いた骨再生治療が臨床応用され、その有用性が報告されている。これらの新たな治療は、従来の人工物による代替医療 (人工骨補填剤など) とは異なり、移植材料である MSCs 自体が骨形成能を有するため、高い治療効果が期待できる。

骨再生に用いられる方法は、細胞と細胞を支える担体、そして分化誘導因子を用いたティッシュエンジニアリングの手法を用いている。ティッシュエンジニアリングの問題の一つとして、移植に使用する担体に対するマクロファージなど免疫応答の影響が報告されている。さらに、局所の炎症は MSCs の細胞死の原因となり、骨再生能が低下することが報告されている。実際の臨床研究においても、骨再生には個体差が見られるが、その原因として患者に見られる免疫反応や局所の炎症の影響が懸念される。しかしながら、いずれの研究においても、移植により宿主の局部免疫応答が骨再生にどのような影響を与えるかについては十分理解されていない。臨床における骨再生治療の効果を最大化することのためには、骨再生過程における炎症反応の影響について理解することが重要である。さらに、骨再生過程における炎症反応を抑制することができれば、効率的で安定した骨再生治療が可能となることが期待される。

2. 研究の目的

これまでの臨床研究から、細胞を用いた骨再生治療の安全性や有効性が示され、実用化が期待されている。その一方で、移植された細胞から骨が再生するメカニズムの詳細については十分理解されていない。近年、骨粗鬆症に関する研究から、免疫細胞と骨芽細胞、あるいは破骨細胞との相互作用について研

究進みつつあり、さらに局所の炎症が骨再生を抑制する可能性が報告されている。細胞移植による骨再生の効果を最大化するためには、局所の炎症や免疫系細胞が骨再生に与える影響の詳細を理解する必要がある。そのため、本研究では免疫正常マウスを用いた骨再生モデルを用いて、骨再生過程における炎症反応の影響の解明をめざす一方で、炎症反応を抑制することにより、効率的で安定した骨再生治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 炎症と免疫系細胞による骨再生過程への影響を解明するために、免疫正常マウス (BALB/c AJc1) を用いて、同系マウスへ細胞移植を行なう骨再生モデルを作製した。比較検討のため、同じ細胞を同系統に由来するヌードマウス BALB/c AJc1 -nu/nu 背部皮下への移植を行った。

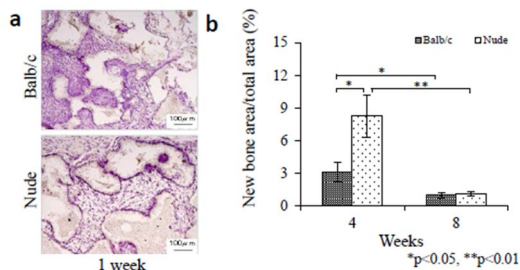
(2) モデル間の比較により、炎症と免疫系細胞による骨再生過程への影響について、免疫組織化学および定量的評価によって、炎症サイトカインと骨芽細胞および破骨細胞分化との関係を検討した。

(3) 抗炎症剤ステロイドを投与し、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-4、IL-6、IL-17 など) 及び骨分化誘導因子 Osterix 及び破骨細胞活化因子 RANKL の発現を解析によって、抗炎症剤が骨再生に与える影響について検討を行った。

4. 研究成果

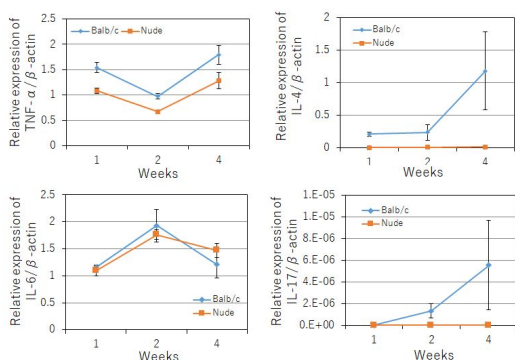
(1) BALB/c AJc1 マウス大腿骨および脛骨由来皮質骨由来細胞 (compact bone derived cells, CBDCs) を β -TCP 顆粒上に播種し、2週間の培養と分化誘導を行った後、免疫正常モデル動物として同系 BALB/cAJc1 マウスおよび同系由来のヌードマウス (BALB/c AJc1 -nu/nu 背部皮下へ細胞の移植を行い、骨再生モデルを作製した。免疫不全

動物のみでなく、免疫正常動物においても培養骨による骨形成が認められた。しかしながら、移植4週までの早期の骨形成過程には両群で差が認められ、免疫不全動物ではより多くの骨が形成された。



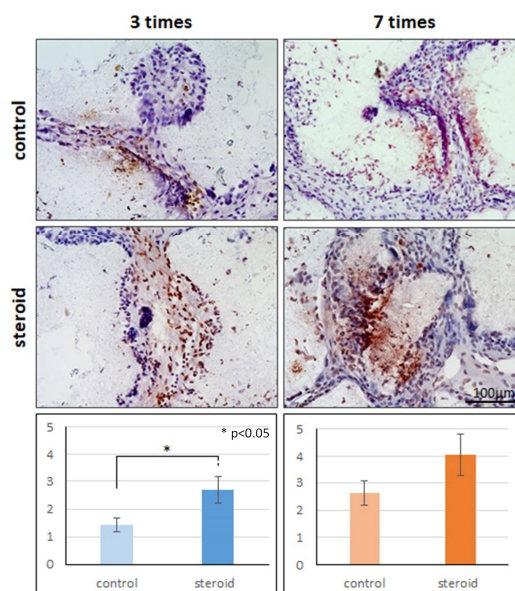
移植1週目にはBALB/cAJclおよびヌードマウス(nu/nu)の両群において、移植部位への炎症細胞浸潤が認められた。4週目にはnu/nu群において有意に骨量が多かったが、その後8週までに減少し、8週では両群に有意差を認めなかった。

(2) 次に炎症と免疫系細胞による骨再生過程への影響を調べた。免疫不全動物と免疫正常動物では、IL-4とIL-17の発現に違いが認められ、IL-4が免疫正常動物では破骨細胞の分化を抑制して、IL-17が骨芽細胞を活性化しているものと考えられた。一方、炎症性サイトカインであるTNF- α は免疫正常動物で高値であり、骨芽細胞のアポトーシスを誘導することで骨形成を抑制した可能性が示唆された。本研究の結果から、骨形成に影響を与える局所因子として、TNF- α 、IL-4、IL-17およびIL-6の関与が示唆された。細胞移植を行った局所におけるT細胞由来のサイトカインの発現が骨芽細胞や破骨細胞の分化に影響を与え、培養骨による骨再生の程度に違いをもたらす要因となっている可能性が示唆された。



TNF- α はBALB/cAJclに多く発現していた。IL-4およびIL-17のmRNAはBALB/cAJcl群のみで発現しており、2週から4週にかけて増加した。

(3) 抗炎症剤ステロイドを投与によって、初期の炎症性細胞の浸潤や一部の炎症性サイトカインが減少する可能性が示された。しかしながら、短期間のステロイドの投与であってもアポトーシスを増加させ、IL-6など一部の炎症性サイトカインの上昇を認めたことから、骨再生症例に対する有用性については慎重になるべきと考えられた。



ステロイドの投与がapoptosisに与える影響。ステロイド投与群ではapoptosis高値であり、3日後群としては有意差は認められなかった。

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 2 件)

Li X, Wu F, Zhang Y, Yang J, Shinohara A, Kagami H. Discontinuation of simvastatin lead to a rebound phenomenon and result in immediate peri-implant bone loss. Clin Exp Dent Res. 2016, 2(1): 65-72. (査読有)
DOI: 10.1002/cre2.23

Kagami H, Kobayashi A, Taguchi A, Li X, Yoshizawa M. Issues with the surgical treatment of anti-resorptive

agent-related osteonecrosis of the jaws. Oral Dis, 2018, 24(1-2):52-56.

(査読有)

DOI: 10.1111/odi.12783.

[学会発表](計 12 件)

Ni Li, Xiangqi Li, Kai Chen, Hongwei Dong, Michiko Yoshizawa, Hideaki Kagami. Characterization of sphere-forming cells from mouse oral mucosa. 第 17 回日本再生医療学会、2018 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜 (横浜)

Kai Chen, Xiangqi Li, Ni Li, Hongwei Dong, Michiko Yoshizawa, Hideaki Kagami. Generation and analysis of sphere-forming cells from mouse compact bone. 第 17 回日本再生医療学会、2018 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜 (横浜)

李 憲起, 芳澤享子, 楊 静, 各務秀明、短期間ステロイド投与が培養骨の骨形成過程に与える影響、第 21 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会、2017 年 12 月 9 日、富山国際会議場 (富山市)

李 憲起, 千原隆弘, 張 以鳴, 楊 静, 芳澤享子, 各務秀明、ステロイド投与が培養骨の骨形成過程に及ぼす影響、第 85 回松本歯科大学学会、2017 年 11 月 16 日、松本歯科大学 (長野県)

李 憲起, 芳澤享子, 各務秀明、自動培養装置と簡易型クリーンブースを用いた特定細胞加工物調製システムの構築、第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2017 年 10 月 21 日、国立京都国際会館 (京都市)

Kagami H, Inoue M, Li X, Nagamura-Inoue T, Tojo A, Yamashita N. Effect of cell processing protocol on the clinical result of bone tissue engineering. Translational Opportunities in Stem

Cell Research, 7 Feb-1 Mar, 2017, Basel, Switzerland

各務秀明, 李 憲起, 秋山 裕和, 市村昌紀, 宇田川信之、大学病院における閉鎖型自動細胞培養装置を用いた細胞培養とその経過、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月 18 日、松本歯科大学 (長野県)

斉藤安奈, 八上公利, 高田匡基, 井上 実, 森こず恵, 李 憲起, 田口 明, 各務秀明, 芳澤享子, 篠原 淳、T2 緩和差を利用した ^{31}P -NMR による非侵襲的な新生骨量・骨量測定法の開発、第 61 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、2016 年 11 月 25 日、幕張メッセ (千葉市)

李 憲起, 千原隆弘, 古田浩史, 楊 静, 各務秀明、再生骨移植局所の炎症サイトカインの経時的な変化に関する検討、日本口腔インプラント学会第 35 回関東・甲信越支部学術大会、2016 年 2 月 13 日、京王プラザホテル (東京都)

李 憲起, 千原隆弘, 楊 静, 古田浩史, 高田匡基, 篠原 淳, 各務秀明、再生骨移植局所の炎症サイトカインの経時的な変化に関する検討、第 19 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会、2015 年 11 月 28 ~ 29 日、ホテルメルキュール横須賀 (横須賀市)

斉藤安奈, 八上公利, 高田匡基, 井上 実, 千原隆弘, 森こず恵, 李 憲起, 田口 明, 各務秀明, 篠原 淳、T2 緩和差を利用した ^{31}P -MRS による非侵襲的な新生骨量・骨量測定法の研究、第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2015 年 10 月 16 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

小林明人, 八上公利, 下地茂弘, 丸川和也, 古田浩史, 中山洋子, 李 憲起, 田口 明, 各務秀明, 篠原 淳、アディポネクチン欠損マウスでは骨芽細胞数と骨形成速度が低下し下顎骨密度は増加する、

第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会、
2015 年 10 月 16 日、名古屋国際会議場(名
古屋市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

李 憲起 (LI Xianqi)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60350831

(2)研究分担者

高田 匡基 (TAKADA Masaki)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00507684

楊 静 (YANG Jing)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・
講師

研究者番号：50410436

各務 秀明 (KAGAMI Hideaki)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・
教授

研究者番号：80242866