

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15736

研究課題名(和文) 抗炎症性・組織再生型マクロファージを誘導する新規タンパク複合体による骨延長研究

研究課題名(英文) Evaluation of the therapeutic benefits of anti-inflammatory M2 macrophage inducer for distraction osteogenesis

研究代表者

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

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)：骨延長術では骨折部位に一定の張力をかけ続けることによって、骨・神経・血管・筋組織などを含む大型組織新生・再生を促す。しかしながら、治療期間が長いことが欠点である。延長速度を速めると骨形成が抑制される。本研究では急速延長が延長間隙に炎症反応を惹起することを示す。さらにケモカインMCP-1と分泌型Type1レクチンSiglec-9で構成される抗炎症性M2マクロファージ誘導因子の投与によって延長間隙が組織再生環境に変化し骨延長の仮骨形成能力が回復することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Distraction osteogenesis (DO) successfully induces large-scale skeletal tissue regeneration, but it involves an undesirably long treatment period. A high-speed DO mouse model (H-DO) failed to generate new bone callus in the distraction gap. In this study, we showed that H-DO induced pro-inflammatory reaction in the gap. Importantly, we found that administration of anti-inflammatory M2 macrophage inducer, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and the secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 (ED-Siglec-9), restored callus formation in the H-DO- gap.

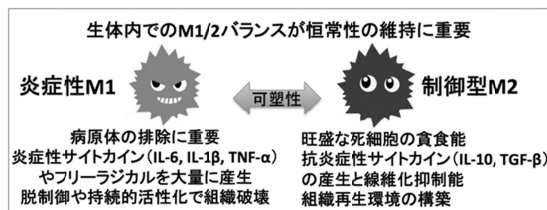
研究分野：再生医学

キーワード：骨延長 マクロファージ 炎症

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞の移植による骨再生医療の実用化が期待されている。しかしながら移植細胞の生着率は低く、再生効果の多くが「細胞が分泌するパラクライン因子」による可能性が指摘されている。申請者らは間葉系幹細胞の無血清培養上清(MSC-CM)を含有したコラーゲンスキャホールドをマウス骨延長モデルに移植すると、早期に有意な骨再生効果が見られることを見出した。しかしながら MSC-CM の組成は細胞培養条件で大きく変化する。工業化レベルで一定の品質や安全性を確保することは難しい。本研究では MSC-CM から新たに見出した 新規組織再生因子である M2 マクロファージ (Mac) 誘導複合体の骨延長促進効果、治療期間短縮効果を検証する。

炎症性/組織破壊型 M1Mac および抗炎症性/組織再生型 M2Mac のバランスは、組織再生環境の構築に重要な役割を果たすと考えられ



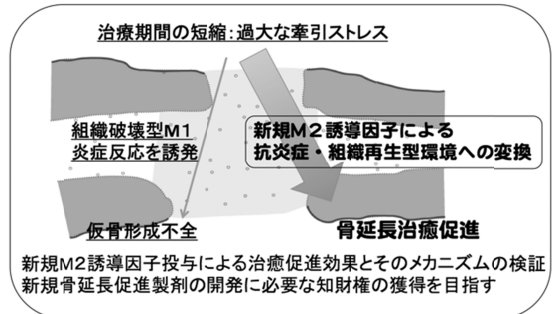
ている。M1Mac の活性化が組織損傷の拡大や線維化を促進し組織再生を妨げる。一方、抗炎症性 M2Mac は血管再生を促進、死細胞の貪食、生体内幹細胞の増殖や集積を促すことで組織再生を促す。しかしながら、生体の M2 誘導能は限られており、ほとんどの組織破壊環境が M1 優位である。我々の見出した M2Mac 誘導複合体は M1 優位な炎症環境を抗炎症・組織再生環境に変換する。急速骨延長の持続的な炎症ストレスはフリーラジカルや炎症性サイトカインの産生を促進し、M1Mac を活性化する。この M1 環境を M2 環境に変換すれば、骨延長治療が促進される可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

申請者は間葉系幹細胞の無血清培養上清(MSC-CM)のプロテオーム解析によって、「抗炎症性・組織再生型 M2 マクロファージ (Mac)を誘導する新規タンパク複合体」を同定した。この複合体は MCP-1 と分泌型 Type1 レクチン sSiglec-9 で構成される。この新規 M2 誘導複合体をラット脊髄損傷モデルに投与すると、損傷部位の組織破壊的な炎症環境を抗炎症環境に変換し、下肢運動機能を著しく改善する。本申請研究では、整形外科や口腔外科領域で臨床的に用いられている、大型組織再建システム・骨延長術に新規 M2Mac 誘導複合体を局所投与し、治療促進効果とそのメカニズムを明らかにする。これにより新規骨延長促進剤の開発に必要な知財権の獲得を目指した。

3. 研究の方法

8週齢の雌性ICRマウスを実験動物とし、片側性の骨延長モデルを作製した。骨延長の速度は0.2mm/12時間とする。サンプル採取のスケジュー



ールは図に示す。

詳細は、ペントバルビタール 40mg/kgをマウス腹腔内に投与し、右下肢を剃毛、消毒後、正中に約 15 mmの切開を加えた。そして、腓骨を明示し周囲組織の損傷を最小限にして、腓骨のみを骨折させた。次に、脛骨近位端に25G針を、遠位端に27G針をそれぞれ2本ずつ貫通させ、即時重合レジン(ユニファスト、GC社)にて延長装置と固定した。延長装置はエキスパンションスクリュー(オーソデントラム社)と、即時重合レジンで作成した外径20mm、内径10mm、厚さ5mmの固定装置を連結させたものを使用した。レジン硬化後、脛骨骨幹中央部を横骨折させ、4-0 ナイロンにて皮膚を縫合し閉創した。

Control-distraction osteogenesis model (C-DO) :手術後3日間の待機期間(Latency; LA)の後、術後3日目から11日目まで0.2mm/12h (0.4mm/day) で延長し(Active Distraction; AD)、8日間で脛骨を32mm延長させた。4日間の骨硬化期間(Consolidation; CO)の後、手術後15日目に屠殺し、4%パラホルムアルデヒドにて灌流し固定した。そして、脛骨と周囲組織を含め採取し、凍結非脱灰標本作製した。凍結マイクロームにて5μmの薄切切片を作成し、H-E染色を行った。

マウス大腿骨を骨切り後、独自に開発した創外固定装置を用いて固定して、5日間の待機期間を経た後、延長操作を開始した。通常、仮骨が形成されないハイスピードで延長を行った。過去の実験経験によるとハイスピード延長では、仮骨形成は完全に抑制され、大量の軟骨が形成されることがわかっている。ハイスピード延長期間に集積因子をコラーゲンタイプIと混和して延長部に2日間隔で投与する。組織学的解析を行い、



骨再生の効果について比較検討を行った。

(1) Hi speed-distraction osteogenesis model (H-DO)：骨の延長速度を2倍にした。手術後5日間の待機期間の後、術後5日目から9日まで0.4 mm/12h (0.8mm/day)で延長し、4日間で脛骨を32 mm延長させる。4日間の治癒期間の後、手術後13日目に屠殺し、組織を採取、凍結非脱灰標本を作製、薄切切片を作成し、染色を行った。

(2) 3つの時期(延長前の待機期間終了時 day5、延長中期 day9、延長完了後 day13)からRNAを抽出。定量的リアルタイムPCRにて炎症関連因子や血管再生因子の発現変化を解析した。

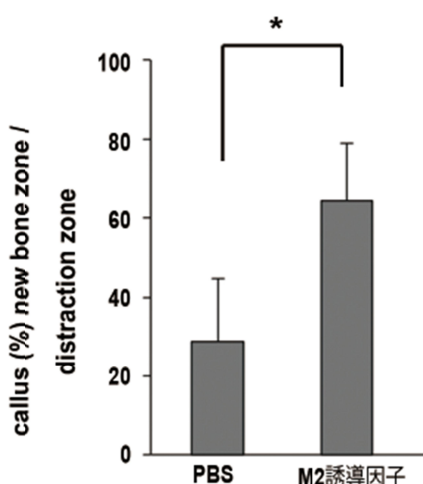
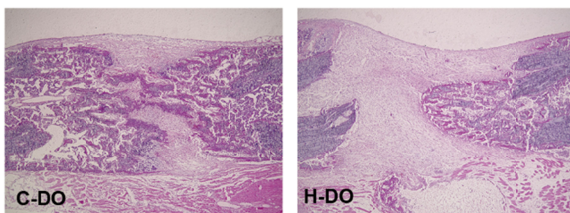
(3) 誘導したM2マクロファージの培養上清を回収し、骨芽細胞に添加し細胞機能に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 急速な延長操作は仮骨の形成を抑制し軟骨の形成を促進した。急速な延長操作により延長間隙ではEPCの割合が減少し、血管新生も抑制された。

そして、M2誘導因子の局所投与は、EPCの集積を促進することにより血管新生を促進し、骨延長部に大量の仮骨を形成した。

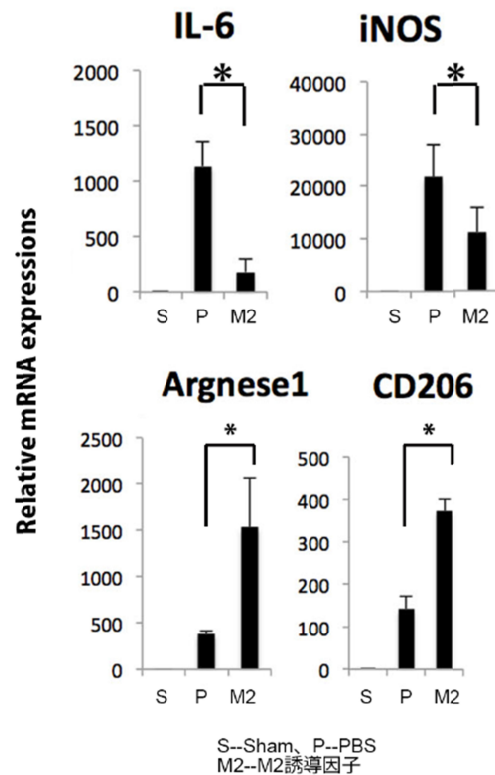
(2) 急速な延長操作によって延長間隙は炎症状態となった。炎症性サイトカインIL-6や一酸化窒素合成酵素iNOSの遺伝子発現が亢進した。M2誘導因子の投与によって、炎症性サイトカインの発現は低下し、抗炎症性マクロファージマーカーであるArginase1やCD206の発現が亢進した。急速な延長した局所の炎症環境は炎症状態か



ら抗炎症状態に変化した。

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6件)

1 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. *Sci Rep* 2017;7:44043. 査読あり

2 Kano F, Matsubara K, Ueda M, Hibi H, Yamamoto A. 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. *Stem Cells* 2017;35:641-653. 査読あり

3 Ishikawa J, Takahashi N, Matsumoto T, Yoshioka Y, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Ishiguro N, Ueda M, Furukawa K, Yamamoto A. Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. *Bone* 2016;83:210-219. 査読あり

4 Matsumoto T, Takahashi N, Kojima T, Yoshioka Y, Ishikawa J, Furukawa K, Ono K, Sawada M, Ishiguro N, Yamamoto A. Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages. *Arthritis Res Ther* 2016;18:133. 査読あり

5 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. *J Tissue Eng Regen Med* 2015. 査読あり

6 Matsubara K, Matsushita Y, Sakai K, Kano F, Kondo M, Noda M, Hashimoto N, Imagama S, Ishiguro N, Suzumura A, Ueda M, Furukawa K, Yamamoto A. Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 promote recovery after rat spinal cord injury by altering macrophage polarity. *J Neurosci* 2015;35:2452-2464. 査読あり

[学会発表](計 1 件)

山本朗仁、脱落乳歯歯髓幹細胞由来の無血清培養上清を用いた再生医療；第23回歯科医学総会、シンポジウム；S002-4；福岡国際会議場（福岡県福岡市）；2016年10月21~23日

[図書](計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://akihitoyamamoto1.wixsite.com/mysite>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 朗仁(YAMAMOTO, Akihito)

研究者番号:50244083

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

名古屋大学大学院医学系研究科口腔外科

大学院生 加納 史也 (KANO, Fumiya)

大学院生 石川 純 (ISHIKAWA, Jun)