

令和元年6月5日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05546

研究課題名(和文)次世代骨再生法開発のための基盤研究

研究課題名(英文)Fundamental research on the development of next generation bone tissue engineering

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養骨の移植部位における炎症が移植細胞に与える影響については十分理解されていない。本研究から、移植組織中に見られる炎症性サイトカインがin vitroにおいて骨芽細胞の細胞死を引き起こし、骨分化を抑制することが明らかとなった。その結果移植後の細胞数の減少や再生骨量の減少に影響を与えている可能性が示された。また、副腎皮質ステロイドの投与が移植部位における炎症を抑制する可能性について検討した。その結果、投与回数を制限することで、炎症性サイトカインの発現抑制と細胞死の減少が得られることが示された。本研究から、移植部位における炎症と細胞数減少との関係、およびそのメカニズムの一部が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療では移植細胞の生存率が低い問題が報告されているが、その原因については十分明らかになっていない。われわれは、免疫正常動物を用いた骨再生モデルの実験から、移植部位におけるサイトカインの発現を明らかにしてきた。本研究では、短期間のステロイド投与が移植部位におけるサイトカインのプロファイルを変え、移植細胞の生存数を増加させる可能性を示した。また、移植部位に見られるサイトカインは骨芽細胞の細胞死を誘導するのみでなく、骨分化を抑制することを明らかとした。この結果は移植細胞の生存率や機能向上のための新たな治療法の開発につながるため、再生医療の費用の軽減や治療期間の短縮に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The effect of local inflammation on the transplanted cells at transplanted site is not well understood. The results from this study showed that the inflammatory cytokines observed at the transplanted site induced apoptosis of the osteoblasts in vitro and they also inhibit the osteogenic differentiation. This may cause the reduction of transplanted cell number and the volume of regenerating bone in vivo. The effect of corticosteroid administration on the local inflammation was also studied. The results showed that the limited number of corticosteroid administration could reduce the expression of inflammatory cytokines and the apoptosis of osteoblasts at the transplanted site. This study unveiled a part of the relationship between the local inflammation and the reduction of transplanted cell number as well as the underlying possible mechanisms.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 細胞治療 骨再生 細胞死 アポトーシス サイトカイン 骨芽細胞 破骨細胞

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

### 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。口腔外科領域でも骨髄や骨膜由来細胞を用いた培養骨が作製され、臨床研究を通じてその安全性や有効性が報告されている。これらの新たな治療は、従来の骨移植とは異なり健康な組織を採取する必要がないことから、患者への負担が少ない。一方、人工骨による骨再生治療も徐々に応用範囲が広がっているが、人工骨には骨再生能（骨を作る能力）が無いため、適応されるのは小さな骨欠損や周囲を骨で囲まれた骨欠損など限界がある。

細胞を用いた培養骨では、移植材料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。しかしながら、10年以上の臨床応用を経ても従来の治療を置き換える存在にはなっていない。その大きな原因は、細胞治療の構造的な問題である個体差と、治療に大量の細胞を用いるために、長期間の培養と高額な費用が必要であるなど、その効率性の低さにある。これまでのわれわれの研究から、移植後局所のサイトカイン濃度が上昇し、それが移植細胞の生存や分化に大きな影響を与えることが明らかになってきた。実際に大量の細胞を移植しても、生存し、目的の機能を果たす細胞数はわずかであるとされている。移植細胞の生存率が低いために、治療に必要な細胞数は大量にならざるを得ない。その結果として細胞調製に必要な期間や費用は増大し、細胞治療の効率性が著しく損なわれてしまう。骨再生に限らず、現在の細胞を用いた再生医療にとっての大きな課題の一つは、移植後の局所の環境をコントロールすることで移植細胞の生存や分化を促進し、少ない細胞数で効率的な再生を達成することである。細胞治療の効率化は、現在の再生医療で問題となっている治療可能な欠損の大きさの制限や高コストという問題の解消に対しても直接貢献する。

### 2. 研究の目的

細胞移植による組織再生については、これまで有用性が報告されているが、実際に移植した細胞のうちどの程度の細胞が患者の体内に生着し、組織再生に関与するかについてはよくわかっていない。これまでの研究から、軟骨再生においては細胞とともに移植された人工材料（担体）に対する炎症による細胞への障害が大きいこと、マクロファージの浸潤とサイトカインにより細胞死が誘導されることが報告されており、移植細胞の生着率の減少と効率の悪化に影響していると考えられる。しかしながら、移植部位に存在するサイトカインは多数あり、またそれらの相互作用も予測されるため、その全容を解明することはできていない。したがって、移植後の局所の炎症状態を解析し、それらのサイトカインが骨芽細胞の生存と分化に与える影響の解析をすることで、細胞の生存率を向上させるための戦略を考えることが重要と考え、本研究を計画した。

### 3. 研究の方法

マウスを用いた骨再生実験モデルを用いて異所性に培養骨を移植し、細胞移植後の組織を解析した。特に抗炎症作用を有する副腎皮質ステロイドを投与することで、これら局所における炎症性サイトカインの発現、および移植された骨芽細胞のアポトーシスへの影響について検討を行った。次に比較的良好な骨再生が見られたサンプルと骨再生が不十分なサンプルとの比較から、移植局所での炎症に関与するサイトカインについての検討を行った。さらに、発現の見られたサイトカインを *in vitro* において骨芽細胞に作用させ、細胞障害や分化抑制に作用する因子についても検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ステロイドの投与が骨芽細胞の生存に与える影響

SP7/osterix を骨芽細胞マーカーとして使用した。7日目に陽性細胞は TCP 周囲にみられたが、28日目には減少した (Fig. 1a-d)。3日目においてステロイドグループの細胞数はコントロール群より有意に大きかったが ( $p < 0.0001$ ) その後いずれのグループでも減少した (Fig. 1e)。

#### (2) ステロイド投与がアポトーシスに与える影響

3回投与では両群に差は認められなかったが、7回投与群ではステロイド投与群において多くのアポトーシス細胞が認められた (Fig. 2a-d)。細胞数の検討から、7回投与群ではステロイド群において有意にアポトーシス細胞が増加していた ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2e)。

#### (3) 破骨細胞形成に対するステロイドの影響

TRAP 陽性細胞（破骨細胞）は3回投与群および7回投与群双方に見られたが、3回投与群ではステロイド群とコントロール群に明らかな差は認められなかった。一方、7回投与群ではステロイド投与群で陽性細胞が増加していた (Fig. 3a-d)。細胞数の検討からも7回投与においては、ステロイド群ではコントロール群と比較して有意な破骨細胞数の増加を認めた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3e)。

#### (4) ステロイド投与がサイトカインの発現に与える影響

qRT-PCR による結果からは、IL-2 の発現にはステロイド群とコントロール群で有意差を認め

なかった (Fig. 4a). 一方, IL-4 の発現は 3 回投与の場合ステロイド群で有意に高く, 7 回投与ではステロイド群で有意に低い値であった (Fig. 4b). IL-6 の発現は, 3 回投与群ではステロイド群で減少したが, 7 回投与群では有意に増加した (Fig. 4c). TNF- $\alpha$  の発現には有意差は認められなかった (Fig. 4d). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

#### (5) ステロイド投与が TNF- $\alpha$ の局在に与える影響

われわれのこれまでの研究では, 培養骨周囲には TNF- $\alpha$  が発現し, これが骨芽細胞の生存に影響を与える可能性を示していた. したがって, ステロイド投与による TNF- $\alpha$  発現への影響を免疫組織化学的にも検討した. 7 日目のサンプルでは両群で陽性細胞が認められた (Fig. 5a, c). 染色性は両群とも 28 日にかけて弱くなった (Fig. 5b, d). 陽性細胞数には両群で有意差を認めず, qRT-PCR の結果を裏付けるものであった (Fig. 5e).

#### (6) 骨芽細胞の骨分化に与えるサイトカインの影響

次に, これまで移植された培養骨周囲で発現が見られたサイトカインが実際に骨芽細胞に与える影響について *in vitro* で検討した. IL-6 および TNF- $\alpha$  を骨芽細胞の培地中に加え, その 24 時間後と 72 時間後に RNA を抽出し, Runx2 の発現を検討した. IL-6 投与では Runx2 の発現に明らかな変化は認められなかった. 一方, TNF- $\alpha$  投与では 24 時間, 72 時間双方で Runx2 発現の減少を認めた. 同様に IL-6 と TNF- $\alpha$  が ALP 活性に与える影響について検討した. IL-6 は ALP 活性に影響を与えなかったが, TNF- $\alpha$  投与では ALP の発現が有意に低下した (Fig. 6) また, この変化は TNF- $\alpha$  濃度の影響を受けず, 低濃度であっても強く骨分化を抑制した.

#### (7) サイトカインが骨芽細胞の細胞死に与える影響

IL-6 と TNF- $\alpha$  の投与が骨芽細胞のアポトーシスを誘導するかどうかを検討した. アポトーシスマーカーとして Fas 遺伝子の発現を解析した. IL-6 を投与しても Fas 遺伝子の発現はコントロール群と差を認めなかった. 一方, TNF- $\alpha$  を投与したところ, コントロール群と比較して有意に Fas の発現が増加した. この結果から, TNF- $\alpha$  は細胞のアポトーシスを起こすと考えられ, 培養骨を移植後に移植細胞の細胞死を引き起こしている一つの原因となっている可能性が示唆された (Fig. 7).

#### 8) IL-6 と TNF- $\alpha$ の同時投与が骨芽細胞分化に与える影響について

次に IL-6 の投与量を一定として TNF- $\alpha$  の投与量を変化させた. その結果, TNF- $\alpha$  による Runx2 の発現抑制は一部の濃度でやや増強された. 次に TNF- $\alpha$  量を一定として IL-6 の量を変化させた. IL-6 量を増加させると, 24 時間後では TNF- $\alpha$  の影響を軽減させたが, 72 時間ではすべての群で Runx2 の発現はさらに抑制された. この結果から, IL-6 単独では移植細胞の骨分化に与える影響は大きくないものの, TNF- $\alpha$  等の他の炎症性サイトカインと共存することで, 移植細胞の骨分化をさらに抑制することが示唆された.

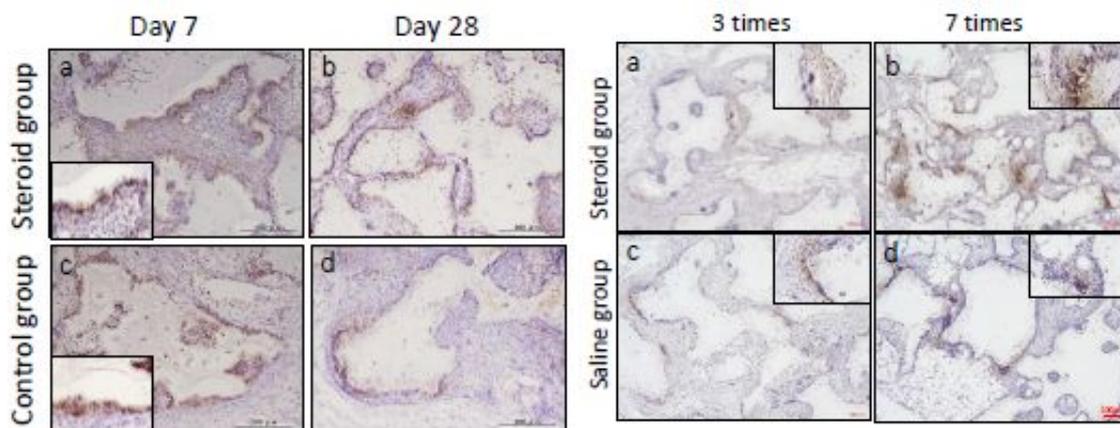


Fig. 1

Fig. 2

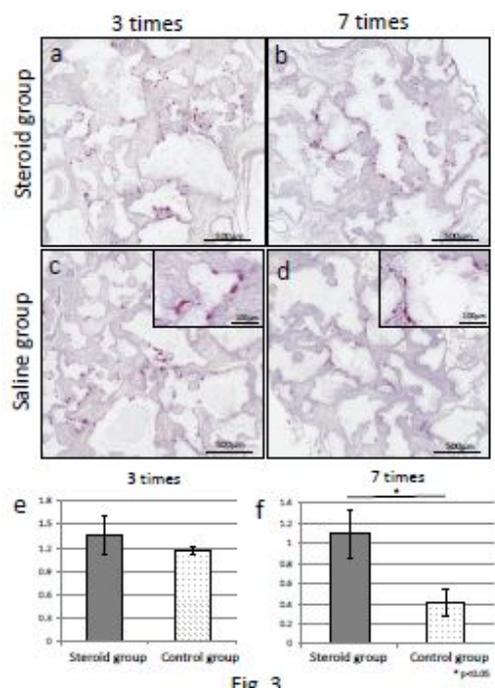


Fig. 3

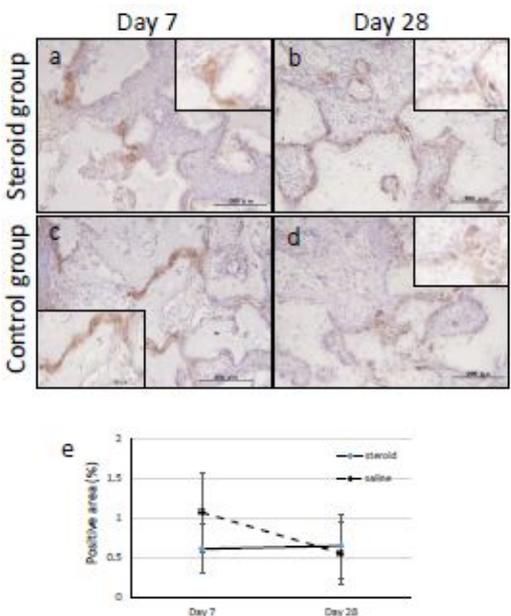
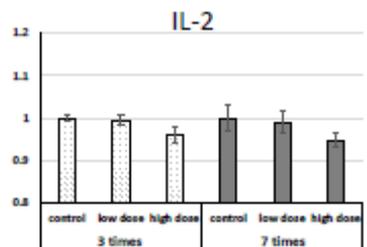
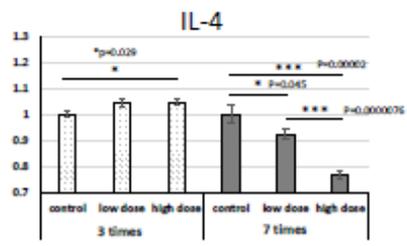


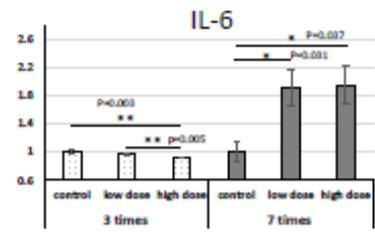
Fig. 5



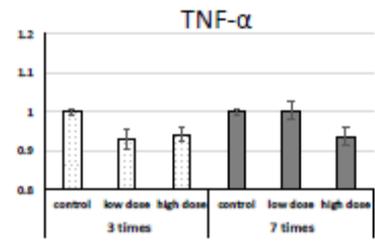
a



b



c



d

Fig. 4

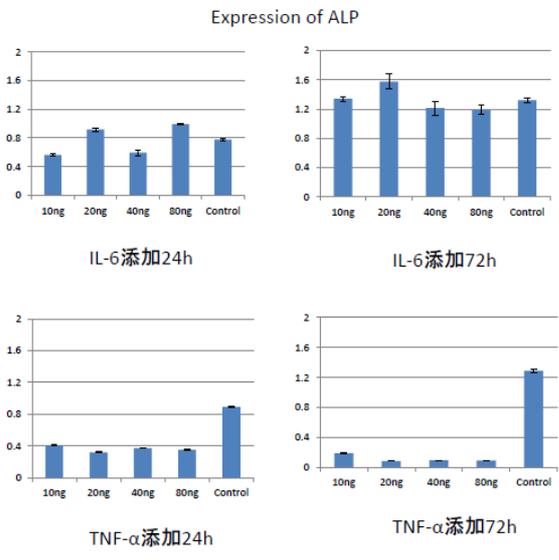


Fig. 6

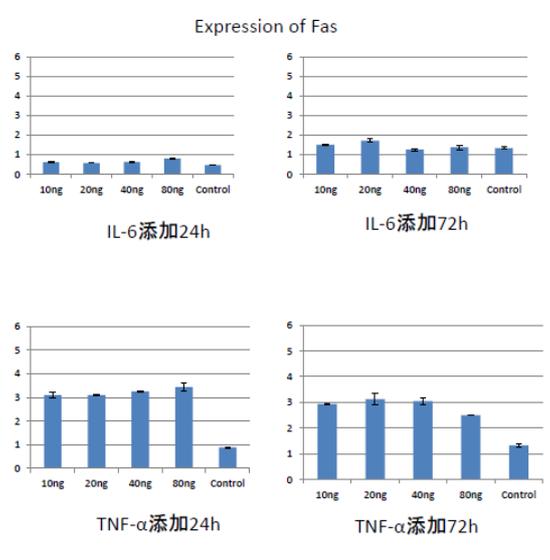


Fig. 7

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15件)

Chen K, Li X, Li N, Dong H, Zhang Y, Yoshizawa M, Kagami H, Spontaneously formed spheroids from mouse compact bone-derived cells retain highly potent stem cells with enhanced differentiation capability. *Stem Cell International*, 査読有, in press.

DOI: 10.1155/2019/8469012

Li X, Li Ni, Chen Kai, Nagasawa S, Yoshizawa M, Kagami H, Around 90 ° Contact Angle of Dish Surface Is a Key Factor in Achieving Spontaneous Spheroid Formation. *Tissue Eng Part C Methods*. 査読有, Vol.24, No.10, 2018, pp.578-584.

DOI: 10.1089/ten.tec.2018.0188

Ikono R, Mardliyati E, Agustin I, Ulfi M, Andrianto D, Hasanah U, Bachtiar B, Mardianingsih N, Bachtiar E, Maulana N, Rochman N, Li X, Kagami H, Nagamura-Inoue T, Tojo A, Chitosan - PRP nanosphere as a growth factors slow releasing device with superior antibacterial capability. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 査読有, Vol.4, 2018, 045026.

DOI: 10.1088/2057-1976/aac9f8

Kagami H, Inoue M, Kobayashi A, Taguchi A, Li X, Yoshizawa M, Issues with the surgical treatment of antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis*, 査読有, Vol. 24, No.1-2, 2018, pp.52-56. DOI: 10.1111/odi.12783.

Kagami H, Potential application of tissue engineering for the reconstruction of facial bones. *Oral Dis*, 査読有, Vol. 23, No. 6, 2017, pp.689-691.

DOI: 10.1111/odi.12581.

Li X, Wu F, Zhang Y, Yang J, Shinohara A, Kagami H, Discontinuation of simvastatin lead to a rebound phenomenon and results in immediate peri-implant bone loss. *Clinical and Experimental Dental Research*, 査読有, Vol. 2, No. 1, 2016, pp.65-72.

DOI: 10.1002/cre2.23.

Hori A, Agata H, Takaoka M, Tojo A, Kagami H. Effect of cell seeding conditions on the efficiency of in vivo bone formation. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 査読有, Vol. 31, No. 1, 2016, pp.232-239.

DOI: 10.11607/jomi.4729.

Miura K, Sumita Y, Kajii F, Tanaka H, Kamakura S, Asahina I, First clinical application of octacalcium phosphate collagen composite on bone regeneration in maxillary sinus floor augmentation: A prospective, single-arm, open-label clinical trial, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 査読有, in press.

DOI: 10.1002/jbm.b.34384.

Ohba S, Sumita Y, Nakatani Y, Noda S, Asahina I, Alveolar bone preservation by a hydroxyapatite/collagen composite material after tooth extraction, *Clin Oral Investig*, 査読有, May;Vol. 23, No. 5, 2019, pp.2413-2419.

DOI: 10.1007/s00784-018-2705-6.

Egashira K, Sumita Y, Zhong W, I T, Ohba S, Nagai K, Asahina I, Bone marrow concentrate promotes bone regeneration with a suboptimal-dose of rhBMP-2, *PLoS One*, 査読有, Vol. 18, No. 1, 2018, e0191099.

DOI: 10.1371/journal.pone.0191099.

Minamizato T, Koga T, I T, Nakatani Y, Umebayashi M, Sumita Y, Ikeda T, Asahina I, Clinical application of autogenous partially demineralized dentin matrix prepared immediately after extraction for alveolar bone regeneration in implant dentistry: a pilot study, *Int J Oral Maxillofac Surg*, 査読有, Vol. 47, No. 1, 2018, pp.125-132.

DOI: 10.1016/j.ijom.2017.02.1279.

Nakatani Y, Agata H, Sumita Y, Koga T, Asahina I, Efficacy of freeze-dried platelet-rich plasma in bone engineering, *Arch Oral Biol*, 査読有, Vol. 73, 2017, pp.172-178.

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.006.

Koga T, Minamizato T, Kawai Y, Miura K, I T, Nakatani Y, Sumita Y, Asahina I, Bone regeneration using dentin matrix depends on the degree of demineralization and particle size, *PLoS One*, 査読有, Vol. 11, No. 1, 2016, e0147235.

DOI: 10.1371/journal.pone.0147235.

Ohba S, Sumita Y, Umebayashi M, Yoshimura H, Yoshida H, Matsuda S, Kimura H, Asahina I, Sano K, Onlay bone augmentation on mouse calvarial bone using a hydroxyapatite/collagen composite material with total blood or platelet-rich plasma, *Arch Oral Biol*, 査読有, Vol. 61, 2016, pp.23-7.

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2015.10.012.

[学会発表](計 11件)

Chen K, Li X, Li N, Dong H, Yoshizawa M, Kagami H, Generation and analysis of spheroid from mouse compact bone-derived cells 2018 TERMIS World Congress, September 4-7, 2018, Kyoto

Li N, Li X, Chen K, Dong H, Yoshizawa M, Kagami H, Characteristic analyses of spheroids from oral mucosal cells in mice 2018 TERMIS World Congress, September 4-7, 2018, Kyoto

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, ISSCR International Symposium, 2.27-3.1, 2017, Basel, Switzerland.

篠原 淳, 斉藤安奈, 古橋明文, 西尾佳朋, 風岡宜暁, 田口 明, 各務秀明, 燐の核磁気共鳴分光法によって測定される新生骨の形成時期の研究 第22回 日本顎顔面インプラント学会 総会・学術大会 2018.12.1-2, 東京

李 憲起, 芳澤享子, 各務秀明, 新たなスフェロイド形成法は高い骨形成性を有する幹細胞の選択培養を可能にする, 第63回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2018.11.2-4, 幕張, 千葉

李 憲起, 芳澤 享子, 各務 秀明 スフェロイド形成による骨由来間葉系幹細胞の新規培養法の確立, 第72回 NPO 法人 日本口腔科学会学術集会, 2018.5.11-13, 名古屋

Chen K, Li X, Li N, Dong H, Yoshizawa M, Kagami H, Generation and analysis of sphere-forming cells from mouse compact bone, 第17回日本再生医療学会総会, 2018.3.21-23, 横浜

李 憲起, 楊 静, 芳澤享子, 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回日本口腔顎顔面インプラント学会総会・学術大会, 2017.12, 富山

各務秀明 歯槽骨再生治療の実現のための細胞調製システムの構築とその運用「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回歯科医学会学術大会, 2017.9.18 塩尻市, 長野

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 緩和時間を利用した 31P-MRS による非侵襲的な新生骨量・骨塩量測定法の開発, 第61回日本口腔外科学会総会・学術大会 2016.11.25-27, 幕張, 千葉

各務秀明, 井上実, 朝比奈泉, 宇田川信之, 骨再生治療:基礎研究から臨床応用まで 骨髄間質細胞を用いた骨再生治療, 第23回歯科医学会総会シンポジウム 2016.10.22, 福岡

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 住田 吉慶

ローマ字氏名: SUMITA Yoshinori

所属研究機関名: 長崎大学

部局名: 歯学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 50456654

研究分担者氏名: 李 憲起

ローマ字氏名: LI, Xianqi

所属研究機関名: 松本歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 60350831

研究分担者氏名: 井上 実

ローマ字氏名: INOUE, Minoru

所属研究機関名: 松本歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 90599036