

令和 3 年 4 月 29 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11728

研究課題名(和文) ホスファチジルセリンリポソームと生体活性化ガラスを応用した骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine for bone defect using a combination of phosphatidylserine-containing liposomes and bioactive glass

研究代表者

阿南 壽 (Anan, Hisashi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：80158732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラット頭蓋冠骨欠損モデルを用いて、PSリポソーム(PSL)と生体活性化ガラス(BAG)が骨形成に及ぼす影響について検討するとともに、PSLの骨芽細胞系細胞に及ぼす効果について解析した。その結果、BAG + PSL添加群ではBAG群と比較して早期に骨形成が促進され、術後8週目においては欠損部に連続した厚い新生骨のバリアーが形成された。さらに、PSLはアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を増加させ、ALPのタンパク発現を亢進することが明らかとなった。以上のことより、BAGとPSLの併用により、ALP活性の発現が亢進し骨芽細胞が活性化することにより、骨組織の形成が促進された可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在行われている組織誘導再生法(GTR)は限定された歯周病変においては良好な治療成績が報告されているが、その治癒のメカニズムについては不明な点もあり、いまだ発展途上にあると考えられる。そのため、破壊から組織修復へとスイッチする可能性を有する再生のコアとして、BAGとPSリポソームを応用することにより、消失した骨組織を再生させるという点が本研究の特徴である。BAGとPSLの併用療法により、消失した骨組織の再生を効率よく誘導する骨組織誘導再生法(GBR)が確立されることは、骨病変の治療法の発展に大きく寄与し、国民のQOLの向上に対する歯科的貢献を果たすことができるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The effects of PS liposomes (PSL) and bioactivated glass (BAG) on bone formation were investigated using a rat calvaria defect model. In addition, the effects of PSL on osteoblast lineage cells were analyzed. In BAG + PSL group, bone formation was promoted earlier in the than in the BAG group, and a continuous thick new bone barrier was formed on the dural side of the defect at 8 weeks after the operation. Furthermore, it was shown that PSL increased ALP activity and enhanced ALP protein expression. From the above, it was suggested that the combined use of BAG and PSL may have promoted bone tissue formation by enhancing the expression of ALP activity and activating osteoblasts.

研究分野：実験病理学

キーワード：骨再生誘導法 PSリポソーム 生体活性化ガラス 骨芽細胞 アルカリフォスファターゼ 骨形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)近年、再生医療の分野において様々な分化成長因子やサイトカインの応用が注目されている。歯周組織再生療法においては、エナメルマトリックスタンパクを含有する Emdogain®gel (EMD) が頻用されており(Froum SJ et al. J Periodontol 72, 25-34, 2001)、骨吸収が根尖にまで及ぶデヒセンスやクレーター型の骨欠損形態においても良好な結果が報告されている(末田 武他, 日歯周誌 46, 2004)。一方、EMD は生物材料であるため、リコンビナントな硬組織再生医療用材料の開発が期待されている。そこで最近では、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)製剤であるリグロス®が歯周組織再生療法に応用されるようになり高い臨床成績が報告されている(Kitamura M et al. J Dent Res. 2011; 90: 35-40)。しかしながら、骨壁が消失した大きな骨欠損では、その修復効果にいまだ不明な点が残されている。

(2)最近、骨髄細胞培養系において、ホスファチジルコリンとホスファチジルセリンのモル比が 7:3 の割合で作成されたリポソーム(PSL)が TRAP 陽性の多核細胞破骨細胞の形成を用量依存的に減少させることが明らかとなった。また、PSL は腹腔マクロファージの TGF- $\beta$  1 の産生分泌を誘導し、LPS 刺激による強力な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の産生分泌を抑制することが報告された(Zhou Wu et al. J Immunol 184, 3191-3201, 2010)。

(3)一方、PSL の骨形成に及ぼす影響を解析した報告は少なく、PSL と骨補填材の併用療法が消失した骨組織の修復に及ぼす効果についても不明な点が多く残されている。一方、生体活性ガラス(bioactive glass 以下 BAG)は、骨伝導能があり、骨補填材としての有用性が示唆されている。そこで今回、ラット骨欠損モデルを用いて、PSL 生体親和性に富む BAG が骨形成に及ぼす影響について検索するとともに、PSL が骨芽細胞系細胞に及ぼす骨形成促進効果について解析した。

### 2. 研究の目的

ラット頭蓋冠骨欠損モデルを用いて、PS リポソーム(PSL)と生体親和性に富む BAG が骨形成に及ぼす影響について検討するとともに、PSL の骨芽細胞系細胞に及ぼす効果について解明する。

### 3. 研究の方法

#### 実験

1. BAG の作製: SiO<sub>2</sub> ; 53wt%、CaO ; 20wt%、Na<sub>2</sub>O ; 23wt%、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ; 4wt%の組成のガラスを溶融法によって合成した後、粉碎してふるいに通し、粒径 100  $\mu$ m 以上の粉末を得た後(Fig.1) 乾熱滅菌 (200  $^{\circ}$ C, 20 分)を行った。

2. PSL の調整: PSL の作製は Wu らの方法に基づいて行った。すなわち、ホスファチジルコリンとホスファチジルセリンの乾燥リン脂質フィルムをモル比 7:3 の割合で PBS に溶解し、氷上で 10 分間超音波振動を与えて溶解した。その後、0.22  $\mu$ m のフィルター滅菌を行い、調整から 3 日以内に実験に供した。

3. 動物実験: 10 週齢雄性 Wistar ラット 37 匹を用いた(n=3)。イソフルラン(フォーレン吸入麻酔液、アボットジャパン)による吸入麻酔後、ラット頭頂部を剃毛し切開線を入れ、皮膚および骨膜を剥離反転した。注水下でトレフィンバー(直径 5mm、GC 社)により、円形の骨欠損窩洞を作製した(Fig.2)。その後、ラットを 3 群に分け、骨欠損部に試作した骨補填材を埋入した。すなわち、BAG 単独群(BAG6 mg + PBS 10  $\mu$ l 添加、以下 BAG 群)、BAG と PSL 併用群(BAG6 mg + PSL10  $\mu$ l 添加群、以下 BAG + PSL 群)、骨欠損部に何も埋入しないコントロール群の 3 種類の骨窩洞処置群を作製した。骨窩洞形成直後および処置後、2、4、8 週目に標本を採取し、

4%paraformaldehyde 溶液で灌流固定を行い、頭部を取り出した後、マイクロ CT (SKYSCAN, Bruker Corporation 社製) 撮影を行い定量的に解析した。また、パラフィン標本を作製し、H.E. 染色およびマッソントリクローム染色を行い検鏡した。

福岡歯科大学・福岡医療短期大学動物実験委員会 (承認番号 13030)

#### 実験

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて、PSL の細胞増殖およびアルカリホスファターゼ (ALP) 活性に及ぼす効果について検索した。まず、PS リポソームの細胞増殖に対する影響を検討した。24 穴ディッシュに  $1 \times 10^4$  個の細胞を播種し、翌日 PS リポソームで刺激した。細胞数の計測はコールターカウンターを用いて行った。

次に、PS リポソームの ALP 活性に対する影響を検討した。ALP 活性の測定は、基質として p-ニトロフェニルリン酸を用い、吸光度を計測した。

#### 4. 研究成果

##### 実験

実験期間を通して、コントロール群、BAG 群および BAG + PSL 添加群の各群間において、ラットの体重変化に著変は認められず、ほぼ同様の増加傾向を示した。マイクロ CT 画像解析では、コントロール群では、処置後 8 週目まで骨欠損部に硬組織形成像は観察されなかった。BAG 群では、処置後 2 週目の骨欠損部に硬組織の形成像はほとんど認められなかった。処置後 4 週目では、BAG を核にして新規の硬組織様石灰化物と思われる不透過像が少数、散在性に認められた。処置後 8 週目では、骨欠損部に BAG を核にして不透過性の亢進した像が多数認められた。一方、BAG + PSL 添加群では処置後 4 週目から骨欠損部に BAG を中心にして不透過性の亢進した像が多数認められた (図 1)。さらに、処置後 8 週目においても活発な硬組織形成像が継続して観察された。また、マイクロ CT の定量的解析においても、処置後 4 週目に、BAG + PSL 添加群では BAG 単独群に比較して、窩洞内における不透過像の面積が有意に高い値を示した (図 2)。

一方、組織学的解析においては BAG と PSL 併用群の処置後 2 週目より BAG 粒子の周囲に単核の紡錘形、類円形、多核形などの多様な形状を示すマクロファージ様細胞が多数観察されるとともに、BAG 粒子に接して多核の巨細胞が観察された。また、BAG 粒子の近傍には幼若な骨細胞を含有した新生骨の形成像が観察された (図 3)。8 週目においては BAG と PSL 併用群と BAG 単独群の両群において、一部 BAG 粒子を含有した成熟した新生骨形成像が観察された (図 4)。

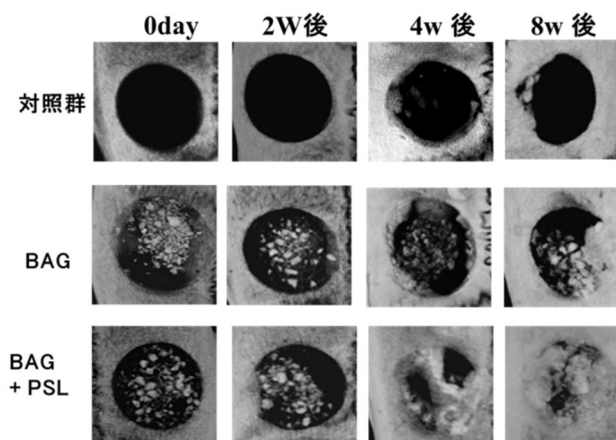
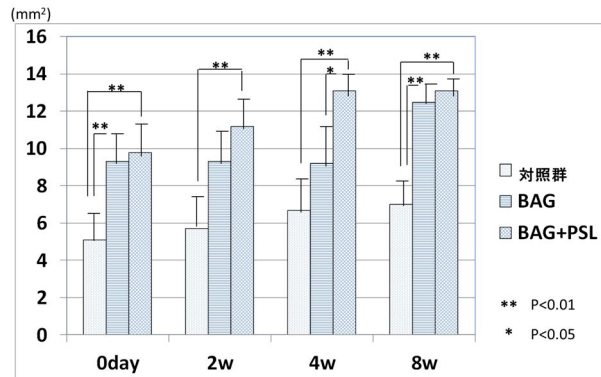


図 1 骨窩洞のマイクロ CT 画像



骨欠損窩洞内において計測された不透過像の面積

図2 骨欠損窩洞内において計測された不透過像の面積

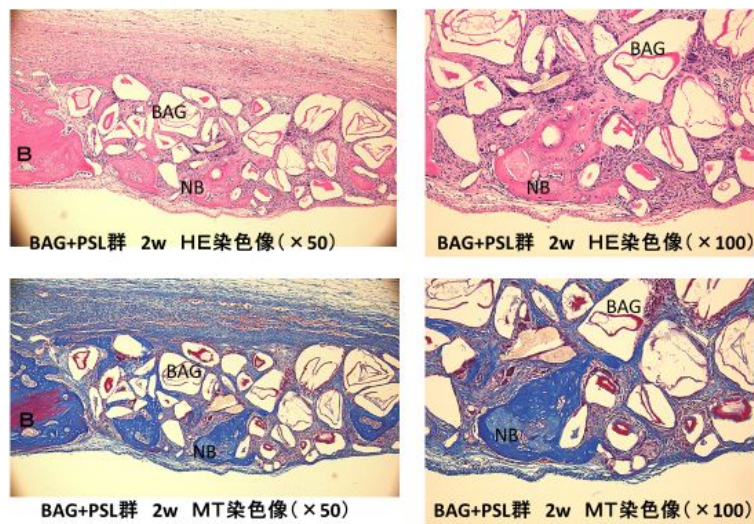


図3 処置後2週目の組織像

BAG + PSL群では硬膜からBAG粒子周囲に沿って新生骨様の幼若な硬組織の形成が多数、観察された。NB:新生骨 B:骨

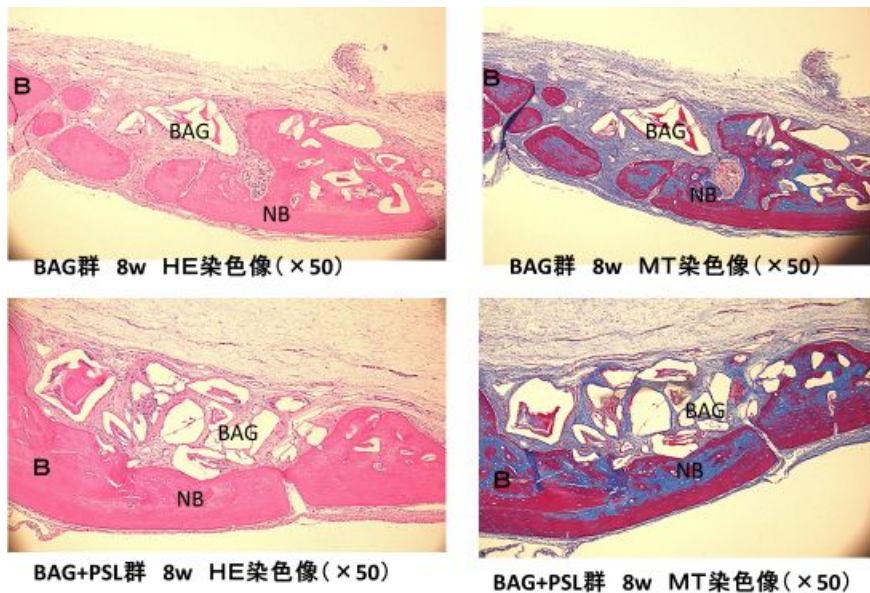


図4 処置後8週目の組織像

BAG群およびPSL + BAG群は共に8w目において、硬膜側に厚い骨組織の形成が認められた。NB:新生骨 B:骨

実験

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて、PSL の骨芽細胞の増殖および分化に対する影響を検討した結果、PSL および PCL の両群において細胞増殖は促進された（図 5）。

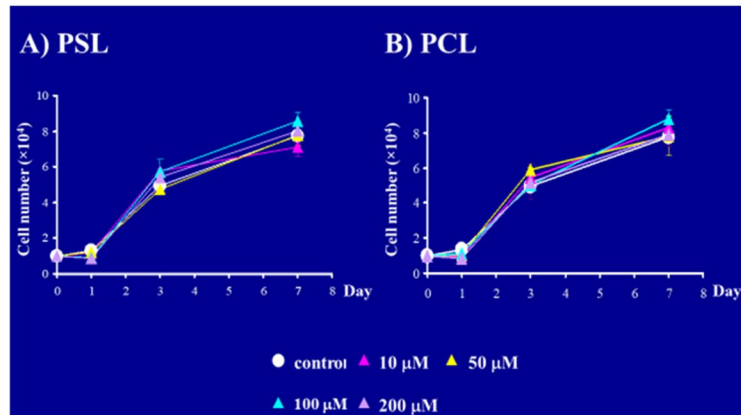


図 5 PSL の細胞増殖に及ぼす影響

次に、PSL の ALP 活性に対する影響を検討した。刺激後 1 日、3 日、7 日目に ALP 活性を測定した。その結果、PS リポソームは、術後 7 日目に ALP 活性を増加させ、100 μM の PS リポソームで最も高い値を示した（図 6）。

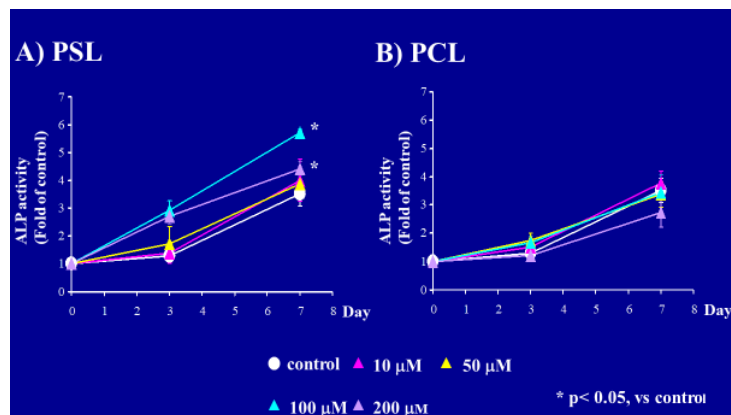


図 6 PSL の ALP 活性に及ぼす影響

さらに、PS リポソームの ALP 発現に対する影響について、100 μM の PS リポソームで 7 日間刺激した細胞を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、PS リポソームは、ALP のタンパク質発現を増加させることが明らかとなった（図 7）。

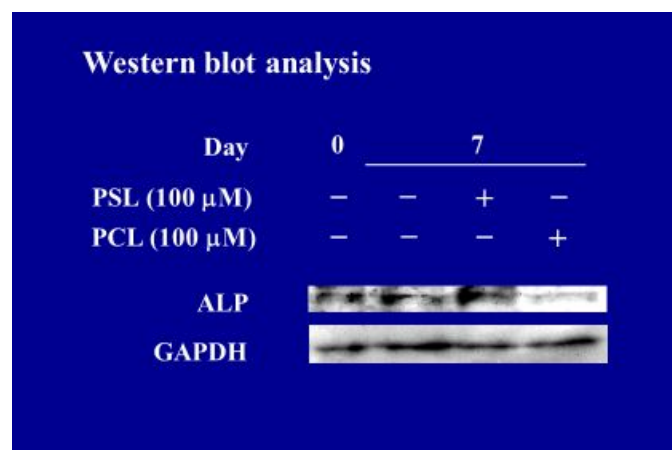


図 7 PSL の ALP タンパク質発現に及ぼす影響

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Junko Hatakeyama, Hisashi Anan, Yuji Hatakeyama, Noriyoshi Matsumoto, Fumiko Takayama, Zhou Wu, Etsuko Matsuzaki, Masahiko Minakami, Toshio Izumi, Hiroshi Nakanishi.	4. 巻 61
2. 論文標題 Induction of bone repair in rat calvarial defects using a combination of hydroxyapatite with phosphatidylserine liposomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Oral Science	6. 最初と最後の頁 111-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.17-0488	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 松崎英津子, 阿南 壽	4. 巻 41
2. 論文標題 歯内療法における新規歯槽骨再生療法の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 2-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20817/jeajournal	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 Etsuko Matsuzaki, Masahiko Minakami, Noriyoshi Matsumoto, Hisashi Anan	4. 巻 56
2. 論文標題 8. Dental regenerative therapy targeting sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling pathway in endodontics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 127-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2020.09.002	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 松本典祥、阿南 壽、畠山純子、二階堂美咲、中山英明、牛尾悟志、水上正彦、松崎英津子、泉 利雄
2. 発表標題 生体活性ガラスとPSリポソームの併用による骨再生療法の開発
3. 学会等名 日本歯内療法学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hatakeyama J, Anan H, Hatakeyama Y, Ayako Washio, Takahiko MOROTOMI, Chiaki KITAMURA
2. 発表標題 The TRPV4 mechanosensor contributes to mineralization in the KN-3 odontoblast-like cell line
3. 学会等名 第11回 世界歯内療法学会(IFEA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki E, Matsumoto K, Anan H
2. 発表標題 S1P signaling is a positive regulator of bone formation and is required for osteoblast differentiation
3. 学会等名 第11回世界歯内療法会議(IFEA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minakami M, Matsuzaki E, Anan H
2. 発表標題 Resolution of bifurcation involvement after non-surgical root canal treatment
3. 学会等名 第11回世界歯内療法会議(IFEA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki E, Anan H, Minakami M, Matsumoto K
2. 発表標題 A case report: Apexification for immature permanent tooth with a radicular cyst caused by trauma
3. 学会等名 第20回日韓歯科保存学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minakami M, Matsuzaki E, Anan H
2. 発表標題 Application of CBCT for the case of endodontic-periodontal disease with a bifurcation involvement
3. 学会等名 第20回日韓歯科保存学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nikaico M, Otani T, Kitagawa N, Iida H, Anan H, Inai T
2. 発表標題 Stress activated mitogen-activated protein kinases affect tight junctions in K38 mouse keratinocyte cells
3. 学会等名 第20回日韓歯科保存学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎英津子, 阿南 壽
2. 発表標題 骨形成の活性化に及ぼすスフィンゴシン-1-リン酸シグナル伝達経路の関与の解明
3. 学会等名 第40回日本歯内療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿南 壽
2. 発表標題 骨分化シグナルを標的とした新規歯槽骨再生療法の開発
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会（招待講演）
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 15. 松本典祥, 松崎英津子, 畠山純子, 牛尾悟志, 松本和磨, 松雪 稜, 小嶺文誉, 二階堂美咲, 水上正彦, 河村 隼, 泉 利雄, 阿南 壽
2. 発表標題 アメロゲニンと生体活性ガラスを併用した骨組織再生療法の開発
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuzaki E, Matsumoto N, Minakami M, Matsuyuki R, Matsumoto K, Hatakeyama J, Takahashi-Yanaga F, Anan H
2. 発表標題 S1P/S1PR2 signaling pathway promotes bone formation on rat apicoectomy model
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本典祥, 松崎英津子, 水上正彦, 畠山純子, 二階堂美咲, 廣瀬陽菜, 阿南 壽
2. 発表標題 PSリボソームと生体活性ガラスの併用がラット頭蓋骨欠損部に及ぼす骨形成促進効果の解明
3. 学会等名 第153回日本歯科保存学会
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
研究分担者	松崎 英津子  (Matsuzaki Etsuko)  (20432924)	福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授    (37114)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	畠山 純子  (Hatakeyama Junko)  (50374947)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師    (37114)	

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