様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

KAKENHI 科研費

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　６ 月 １７ 日現在

機関番号：１７６０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１７２７８

研究課題名（和文）骨芽細胞由来液性因子によるオーダーメイド骨再生医療のための基盤形成

研究課題名（英文）Foundation for customized bone regenerative medicine by osteoblast-derived fluid factor

研究代表者
金氏　毅（Kaneuji, Takeshi）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：３０６１１６６０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、患者由来の液性因子を用いた副作用の少ないオーダーメイドの顎骨再生医療を実現することを目的として、骨芽細胞系細胞に圧縮刺激を加えて得られた液性因子の骨形成・骨再生における作用について分子生物学的検討を行った。この液性因子は破骨細胞分化の抑制のみならず、骨形成を促進する可能性があり、新生骨を獲得するための新しい薬剤になり得ると考えられた。現段階では、骨芽細胞分化能に有意な結果が得られておらず、実験系の見直しを含めてさらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
歯周病や顎骨腫瘍切除後の骨欠損は、患者の摂食・発音・審美性などQuality of Life (QOL)の低下に直結する。これらの治療では、骨造成による顎骨誘導とそれに引き続くインプラントなどの補綴による咬合再建が必要になる。また、口腔外科医が治療対象とする顎顔面骨折や顎変形症では、骨折ならびに骨切り部位に一定の治癒が認められるまでの期間、患者にとって苦痛の大きい顎間固定が必要なケースが多い。そこで、迅速かつ質の高い効果的な骨誘導法が求められており、本研究では副作用の少ないオーダーメイドの顎骨再生医療の基盤を形成することを目指した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to realize customized jaw bone regenerative medicine with few side effects using liquid factor derived from patients. We conducted molecular biological studies on the bone formation effects of humoral factors obtained by applying a compressive stimulus to osteoblastic cells. It is thought that this humoral factor may promote not only the suppression of osteoclast differentiation but also bone formation and may be a new drug for acquiring new bone. At this stage, no significant result has been obtained on osteoblast differentiation ability, and it is considered that further study is necessary including the review of the experimental system.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨再生医療　機械的圧縮刺激　骨芽細胞　破骨細胞　骨リモデリング

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

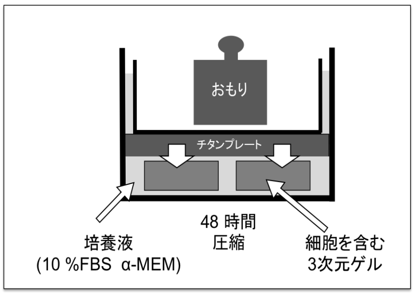
歯周病や顎骨腫瘍切除後の骨欠損は、患者の摂食・発音・審美性など Quality of Life (QOL)の低下に直結する。これらの治療では、骨造成による顎骨誘導と、それに引き続くインプラントなどの補綴による咬合再建が必要になる。近年、Guided Bone Regeneration: GBR 法の確立と、骨補填剤の進歩により、予定している咬合再構築に有利な骨質・骨形態を重視した骨誘導が重視されている。しかしながら、咬合再建に至るまでに 6 か月以上の治療期間がかかる場合もあり、迅速かつ質の高い効果的な骨誘導法が求められている。

われわれ口腔外科医が治療対象とする顎顔面骨折や顎変形症では、骨折並びに骨切り部位に一定の治癒が認められるまでの期間、患者にとって苦痛の大きい顎間固定が必要なケースが多い。そのため骨治癒を促進することで顎間固定期間を短縮し、患者の QOL を向上ならびに速やかに社会復帰させる必要がある。

２．研究の目的

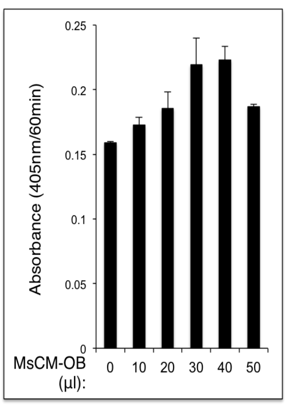
（1）骨芽細胞系細胞に圧縮刺激を加えて得られた培養上清（MsCM-OB）の骨形成・骨再生における作用を検討し、骨再生医療への応用を目指す。申請者はこれまでに予備的研究から MsCM-OB に含まれる液性因子が骨形成を促進する可能性を見出している。そこで本研究では、骨折モデルマウスならびに頭蓋骨欠損モデルマウスに MsCM-OB を局所投与し、骨折治癒や骨欠損修復に対する MsCM-OB の作用を検証する。そして将来的に、例えば“患者から樹立された iPS 細胞から骨芽細胞を分化させ、機械的圧力を加えて培養上清（MsCM-OB）を回収し、骨欠損部に局所投与する”といった患者由来の液性因子を用いた副作用の少ないオーダーメイドの顎骨再生医療が実現するための基盤を形成する。

(2) 骨は絶えず骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収がバランスよく繰り返しながら骨量が維持されている。骨量は運動などの機械的刺激（メカニカルストレス）によって増加し、それとは逆に長期の臥床、神経損傷による不動や宇宙での微小重力状態環境下では骨量が減少することが古くから知られているが、力学的負荷あるいは非過重をいかに感知し、骨量が制御されるかは長らく不明であった。しかしながら、近年その分子メカニズムの一端が明らかとなりつつある。すなわち、骨組織にメカニカルストレスが加わった場合、骨細胞や骨芽細胞などの骨芽細胞系細胞から分泌される様々な液性因子によって骨形成が亢進し、骨吸収が抑制される（骨量の増加）。それとは逆に、非加重状態では骨芽細胞系細胞から分泌される液性因子によって骨形成が抑制され、骨吸収が促進する（骨量の減少）（Robling AG et al, 2008）。我々はこれまでに、培養細胞に機械的圧縮刺激を加える実験系（図表１）を確立し、骨芽細胞（MC3T3-E1 細胞）、骨芽細胞前駆細胞（ST2 細胞）などの骨芽細胞系細胞に圧縮刺激を加えて得られた培養上清:MsCM-OB(Mechanical stress induced conditioned medium derived from osteoblast lineage cells）は多種多量の液性因子を含み、中でも Osteoprotegerin（OPG）が、破骨細胞の分化を抑制することを報告した（Kaneuji T et al., 2011）。また、この MsCM-OB は OPG 以外にも強い破骨細胞分化抑制活性を示す液性因子を有することを見出している。

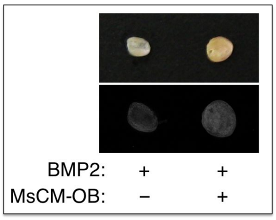


図表１. MsCM-OB 回収のプロトコール
3 次元培養ゲルに MC3T3-E1 や ST2 細胞を包埋し、チタン製プレートとおもりを使用して圧縮力を負荷する。48 時間の圧縮刺激後の培養上清

さらに予備的研究から、MC3T3-E1 細胞から得られた MsCM-OB で処理を行うと、容量依存的に MC3T3-E1 細胞のアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を上昇させた（図表 2）。また、BMP-2 と MsCM-OB の両方を含浸させ、凍結乾燥したコラーゲンスポンジをマウス背筋筋膜下に移植すると BMP-2 単独で移植したものより MsCM-OB は大きな異所性骨を形成する傾向にあった（図表 3）。破骨細胞分化の抑制のみならず、骨形成を促進する可能性があり、MsCM-OB は新生骨を獲得するための新しい薬剤になり得ると考えた。



図表 2.
MsCM-OB は ALP 活性を促進する
MsCM-OB は MC3T3-E1 細胞において容量依存的に骨芽細胞分化指標である ALP 活性を促進した。MsCM-OB 処理 3 日目に吸光度を測定した。



図表 3. MsCM-OB は BMP-2 が誘導する異所性骨を増大させる
BMP-2 (2μg)と MsCM-OB(40μl)を含有するペレットを 8 週齢のマウスに埋入。埋入 3 週後の異所性骨の写真(上)と軟 X 線写真像(下)。

３．研究の方法

（1）　<u>ALP 活性を指標にした MsCM-OB 調整の最適化</u>

骨組織に機械的刺激が加わった場合、骨髄間質細胞、骨芽細胞、骨細胞などの骨芽細胞系細胞で BMP や Wnt といった骨形成に重要なサイトカインを含む多種の液性因子が分泌されることが知られている（Ikegame M et al., 2001; Ito R et al., 2014）。さらに予備的実験から我々の実験系（図表１）を用いて回収した培養上清：MsCM-OB で MC3T3-E1 細胞を処理することにより、濃度依存的に骨芽細胞分化の指標である ALP 活性が上昇することを確認した（図表 2）。

そこで、本研究では予備的実験で用いた骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞だけでなく、より未分化な骨芽細胞系細胞の骨髄間質細胞株 ST2 細胞、より成熟した骨細胞株 MLO-Y4 をそれぞれ 3 次元培養し、異なる圧力で機械的刺激を加え培養上清(MsCM-OB)を回収し、MC3T3-E1 細胞ならびに ST2 細胞に対して MsCM-OB で処理を行い、ALP 活性を指標に最大の活性が得られる細胞種と至適機械的圧縮力を決定する。

（2）<u>MsCM-OB の骨芽細胞分化、骨形成に対する invitro 解析</u>

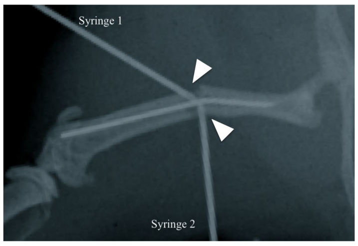
MC3T3-E1 細胞、ST2 細胞、初代培養骨芽細胞（C57BL/6N マウス頭蓋骨より採取）、初代培養骨髄間質細胞（8～10 週齢マウス骨髄より採取）に対して研究課題１で得られた MsCM-OB で処理を行い、骨芽細胞分化能に与える影響を検討する。

予備実験で評価した ALP 活性だけでなく、RNA を採取し、リアルタイム PCR 法を用いて Runx2、Osterix、Collagen I、osteocalcin などの骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現レベルを測定する。また、Ascorbic acid 、β-glycerophosphate で誘導した石灰化に対する MsCM-OB の作用も検討する。

さらに、MsCM-OB の骨芽細胞分化促進メカニズムとして Wnt シグナルや BMP シグナルの関与が考えられるため、それぞれのレポーターである SuperTopFlash と IdWT4F を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、Wnt シグナル、BMP シグナルの関与を評価しておく。

（3）　<u>MsCM-OB の大腿骨骨折治癒に対する作用を解析</u>

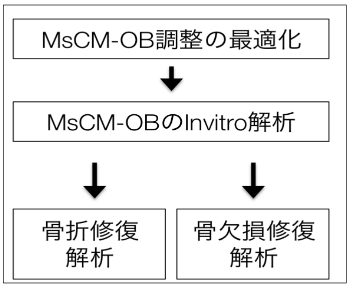
10 週齢の C57BL/6N マウス(n=4)に対して、ネンブタール(1mg/匹)の腹腔内投与を行い全身麻酔を行う。膝蓋部皮膚の切開を行い膝側から大腿骨に 23G の腰椎麻酔針の内針を髄内釘として挿入し、皮膚創部は 4-0 絹糸で縫合する。我々の研究室で既に稼働しているおもり落下試験装置を応用した骨折誘発装置(Tsuji K et al., 2006)を用いて大腿骨中央部に単線骨折を起こす。術後 24 時間、48 時間に骨折部にコントロールとして PBS、または遠心濃縮器で濃縮した MsCM-OB を 26G 針を用いてデリバリーする（図表 5)。通常骨折は 20 日で完全に治癒するため、術後 5 日、10 日、20 日に μCT を撮影する。さらに同タイムコースで骨折部位を採取し、組織切片を作製、 In situ hybridization 法と免疫組織学的手法、リアルタイム PCR により Runx2、Osterix、Collagen I、ALP、Osteocalcin などの骨芽細胞分化マーカーを指標に比較検討する。



図表5. X 線ガイド下における MsCM-OB の投与
予備実験におけるマウス大腿骨の X 線像。矢頭は骨折ならびに針の先端を示す。

（4）<u>4．MsCM-OB の頭蓋骨骨欠損修復に対する作用の解析</u>

研究課題 3 と同様に 10 週齢の C57BL/6N マウス(n=4)に対して全身麻酔を行い、頭蓋骨皮膚骨膜を剥離し、25G 針を用いて頭蓋骨に自然修復可能なサイズの骨欠損を形成する(Park D et al., 2012)。研究課題 3 の骨折実験と同様に術後 24 時間、48 時間に骨折部に PBS、または濃縮した MsCM-OB を 26G 針を用いてデリバリーする。術後 3、10、20 日にμCT を撮影ならび新生骨形成部位の採取を行う。やはり研究課題 2 と同様のパラメーターを用いて MsCM-OB が骨欠損修復に与える影響を評価する。図表 6 に本研究計画全体の概念図を示す。



図表 6. 本研究の概念図

４．研究成果

本研究では、患者由来の液性因子を用いた副作用の少ないオーダーメイドの顎骨再生医療を実現することを目的として、骨芽細胞系細胞に圧縮刺激を加えて得られた培養上清（MsCM-OB）の骨形成・骨再生における作用について分子生物学的検討を行った。これま

でに、培養細胞に機械的圧縮刺激を加える実験系を確立し、MC3T3-E1 細胞、ST2 細胞などの骨芽細胞系細胞に圧縮刺激を加えて得られた MsCM-OB は多種多量の液性因子を含み、中でも OPG が、破骨細胞の分化を抑制することを報告した。さらに、MC3T3-E1 細胞から得られた MsCM-OB で処理を行うと、容量依存的に MC3T3-E1 細胞の ALP 活性を上昇させた。また、BMP-2 と MsCM-OB の両方を含浸させ、凍結乾燥したコラーゲンスポンジをマウス背筋筋膜下に移植すると BMP-2 単独で移植したものより MsCM-OB は大きな異所性骨を形成する傾向にあった。MsCM-OB に含まれる液性因子は破骨細胞分化の抑制のみならず、骨形成を促進する可能性があり、MsCM-OB は新生骨を獲得するための新しい薬剤になり得ると考えられた。また、より未分化な骨芽細胞系細胞の骨髄間質細胞株 ST2 細胞、より成熟した骨細胞株 MLO-Y4 をそれぞれ 3 次元培養し、機械的刺激を加え、MC3T3-E1 細胞ならびに ST2 細胞に対して MsCM-OB で処理を行い、ALP 活性を指標に最大の活性が得られる細胞種と至適機械的圧縮力を決定した。その後、MC3T3-E1 細胞、ST2 細胞、初代培養骨芽細胞(C57BL/6N マウス頭蓋骨より採取)、初代培養骨髄間質細胞(8~10 週齢マウス骨髄より採取)に対して上記で得られた MsCM-OB で処理を行い、骨芽細胞分化能に与える影響を検討したが、明らかな有意差を示すデータは得られなかった。今後、実験系の見直しを含めて更なる検討が必要と考えられた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計５件）

① Takeshi Kaneuji、Daigo Yoshiga、Wataru Ariyoshi、Ikuo Nakamichi、Hironori Tanimoto、Junpei Tanaka、Ikuya Miyamoto、Manabu Habu、Sho Mitsugi、Tatsuji Nishihara、Tetsu Takahashi、Kazuhiro Tominaga、Izumi Yoshioka、Amelioration of limited mouth opening after treatment of primary biliarycholangitis: A case report、Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology、査読有、In Press、2019

② Takuma Matsubara、Nana Takakura、Mariko Urata、Yuya Muramatsu、Makoto Tsuboi、Kazuma Yasuda、William N Addison、Min Zhang、Kou Matsuo、Chihiro Nakatomi、Yukiyo Shigeyama-Tada、Takeshi Kaneuji、Atsuko Nakamichi、Shouichiro Kokabu、Geranylgeraniol Induces PPARγ Expression and Enhances the Biological Effects of a PPARγ Agonist in Adipocyte Lineage Cells. In Vivo、査読有、Vol. 32、2018、1339-1344
DOI：10.21873/invivo.11384

③ Yuudai Kondo、Yuri Tagawa、Tomohiro Tamura、Kenta Noumi、Kouji Yamamoto、Takeshi Kaneuji、Yuusaku Suehiro、Yoshihiro Yamashita、Cervical Lymph Node Metastatic Factors in the Preoperative Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. Journal of Oral Cancer and Research、査読有、Vol.2、2018、18-22

④ Yuudai Kondo、Aya Izumi、Koji Yamamoto、Takeshi Kaneuji、Yuusaku Suehiro、Yoshihiro Yamashita、A case report of free forearm dermal flap reconstruction in a patient with tongue cancer and psoriasis vulgaris. Oral Science International、査読有、Vol.15、2018、31-35
https://doi.org/10.1016/S1348-8643(17)30040-X

⑤ Yuudai Kondo、Keiichi Arimura、Yuri Tagawa、Tomohiro Tamura、Takeshi Kaneuji、Yuusaku Suehiro、Yoshihiro Yamashita、The effect of perioperative oral function management of patients undergoing chemotherapy, based on blood culture tests. Journal of Dental and Oral Health、査読有、Vol. 3、No. 6、2017、79

〔学会発表〕（計６件）

① Takeshi Kaneuji、Yoshihiro Yamashita、Effect of positional change of proximal segment on postoperative stability after sagittal split ramus osteotomy. 24th EACMFS CONGRESS、2018

② 金氏 毅、井川加織、近藤雄大、山下善弘．人工呼吸器管理患者に対する濁度計を用いた口腔清潔度評価の有用性．第 28 回日本口腔内科学会・第 31 回日本口腔診断学会 合同学術大会、2018

③ 金氏 毅、有村慶一、井川加織、永田順子、山下善弘．下顎枝矢状分割術術後の CT 画像を用いた近位骨片の位置変化と術後安定性についての検討．第 28 回日本顎変形症学会総会・学術大会、2018

④ 金氏 毅、永田順子、井川加織、山下善弘．当科における顎関節部の外科的治療に関する臨床的検討．第 30 回日本顎関節学会総会・学術大会、2017

⑤ 金氏 毅、近藤雄大、山下善弘．当科における薬剤関連顎骨壊死患者の臨床的検討．第 27 回日本口腔内科学会学術大会、2017

⑥ 金氏 毅、近藤雄大、野海健太、有村慶一、田村知丈、末廣雄作、井川加織、山下善弘．当科における薬剤関連顎骨壊死に対する外科療法の臨床的検討．第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2017

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/oral/

６．研究組織

(1)研究分
研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：
研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。