

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19092

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の新規未分化性維持因子トリプトファンを用いた骨質改善治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for improving bone quality using Tryptophan, a novel undifferentiated maintenance factor for mesenchymal stem cells

研究代表者

國友 由理 (Kunitomo, Yuri)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30837381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、L-Tryptophan全身投与が実験的骨欠損の創傷治癒に与える影響、L-Tryptophan全身投与がマウス大腿骨海綿骨量に与える影響、骨粗鬆症に対するL-Tryptophanの効果の検討、トリプトファンの投与方法の違いが骨質に与える影響、についての検討を行った。全身投与されたトリプトファンの効果は、トリプトファンの代謝経路が大きく関わっている可能性を示唆しており、今後は、トリプトファンの代謝経路も含め、詳細に検討していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究のテーマであるトリプトファンは間葉系幹細胞をターゲットとして骨質改善や骨の創傷治癒を促すので、現在主に骨粗鬆症患者の骨質改善を目的として使用されている骨芽細胞の活性化をターゲットとする薬剤(PTH製剤)や、破骨細胞の活性を抑制する骨吸収抑制薬(BP製剤)とは作用機序が異なる。そのためPTH製剤が抱える「長期投与による骨肉腫発症の危険性」や「生涯の投与期間が2年と限定されている」といった問題、骨吸収抑制薬のもつ「投与歴がある患者において、抜歯などの侵襲的歯科治療の後に顎骨壊死の発症の可能性」といった問題は起こらないと言える。

研究成果の概要(英文)：In this application study, (1) Effect of systemic administration of L-Tryptophan on wound healing of experimental bone defects, (2) Effect of systemic administration of L-Tryptophan on cancellous bone mass of mouse femur, (3) Examination of effect of L-Tryptophan on osteoporosis, and (4) Effects of different tryptophan administration methods on bone quality, were investigated. The effect of systemically administered tryptophan suggests that the metabolic pathway of tryptophan may be greatly involved, and we plan to investigate in detail including the metabolic pathway of tryptophan in the future.

研究分野：口腔インプラント

キーワード：間葉系幹細胞 トリプトファン アミノ酸 骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント治療は、人工歯根が歯槽骨や顎骨と結合することにより強固な骨支持を得るため、口腔インプラント治療の成功には、骨量と骨質が重要な因子となる。しかし、日本人は欧米人と比べ歯槽骨が解剖学的に菲薄で、インプラント体埋入のために骨造成が必要な場合も少なくない。また、高齢化が進む日本で増加傾向にある骨粗鬆症患者に口腔インプラント治療が必要となる場合も多く、多くの研究者が骨造成や骨質改善に関する研究を進めてきた。

申請者らは、サプリメントや日常の生活から摂取可能なアミノ酸であるトリプトファンが骨髄内の間葉系幹細胞の幹細胞性維持に関わっていることを明らかにしてきた。この結果は、トリプトファンの投与が骨質の改善や骨の創傷治癒に関わっていること、また、口腔インプラントの骨結合促進においても有用である可能性を強く示唆するものであり、本申請研究の着想に至った。

2. 研究の目的

必須アミノ酸の一つであるトリプトファンが骨髄内の間葉系幹細胞の幹細胞性維持に関わるというこれまでの研究成果を基盤に、本研究では、トリプトファンが骨質の改善や骨の創傷治癒に関わっているか、また、トリプトファンの幹細胞性維持メカニズム、骨形成促進メカニズムを分子生物学的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. L-Tryptophan の全身投与が骨の創傷治癒に与える影響の検討

L-Tryptophan (50 mg/kg) を7日間毎日腹腔内投与した5週齢雌性 C57BL/6 マウスをイソフル® (DSファーマアニマルヘルス株式会社、東京、日本) にて全身麻酔を行った後、下肢周囲を70%エタノールで消毒、剃毛した後、皮膚を切開し膝関節を露出させた。そして、大腿骨に付着している筋肉を剥離し大腿骨を明示し、膝関節から中枢側に5 mmの位置に歯科用ラウンドバーを用いて骨髄腔内に達する直径1 mmの窩洞を形成し、術野を縫合閉鎖した。その後、14日間毎日L-Tryptophanの腹腔内投与を行った。

骨欠損作製14日後に回収したマウス的大腿骨は、SkyScan-1174 micro-computed tomography (micro-CT) (SkyScan, Aartselaar, Belgium) を用いて解像度を6.4 µmに設定して撮影し、SkyScan社製ソフトウェアを用いて解析した。解析対象は、骨欠損とし、皮質骨骨欠損部の再生骨の体積 (Bone Volume) を測定した。

また、大腿骨のサンプルは4%パラホルムアルデヒドにて固定した後、ギ酸・クエン酸ナトリウム水溶液を用いて室温で約5日間脱灰した。脱灰されたサンプルは通法に従いパラフィン包埋し、5 µmの厚みで切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) を行い、顕微鏡下で観察した。

2. L-Tryptophanの全身投与が骨質に与える影響の検討

5週齢雌性C57BL/6マウスにL-Tryptophan (50 mg/kg) を21日間毎日腹腔内投与した。投与21日後にマウス的大腿骨を回収し、SkyScan-1174 micro-computed tomography (micro-CT) (SkyScan, Aartselaar, Belgium) を用いて解像度を6.4 µmに設定して撮影し、SkyScan社製ソフトウェアを用いて解析した。解析対象は、大腿骨顆部成長板から1 mm近位の位置を遠位端とした、皮質骨より内部の範

囲で約2 mm四方の立方体の計測部位として、海綿骨の骨塩量 (Bone Mineral Density; BMD)、海綿骨体積率 (Bone Volume/Tissue Volume; BV/TV) を測定した。

3. 骨粗鬆症に対する L-Tryptophan の効果の検討

通法に従い、8週齢雌性 C57BL/6 マウスの卵巣摘出手術を行った。卵巣摘出8週後に L-Tryptophan を腹腔内投与した。投与3週後に大腿骨を回収し、SkyScan-1174 micro-computed tomography (micro-CT) (SkyScan, Aartselaar, Belgium) を用いて解像度を 6.4 μm に設定して撮影し、SkyScan 社製ソフトウェアを用いて解析した。解析対象は、大腿骨顆部成長板からを 1 mm 近位の位置を遠位端とした、皮質骨より内部の範囲で約 2 mm 四方の立方体の計測部位として、海綿骨の骨塩量 (Bone Mineral Density; BMD)、海綿骨体積率 (Bone Volume/Tissue Volume; BV/TV) を測定した。

4. トリプトファンの投与方法の違いが骨質に与える影響の検討

トリプトファンの投与方法の違いが骨質に与える影響を検討するため、トリプトファンの腹腔内投与と同量のトリプトファンをマウスに経口投与した。投与3週後に大腿骨を回収し、SkyScan-1174 micro-computed tomography (micro-CT) (SkyScan, Aartselaar, Belgium) を用いて解像度を 6.4 μm に設定して撮影し、SkyScan 社製ソフトウェアを用いて解析した。解析対象は、大腿骨顆部成長板からを 1 mm 近位の位置を遠位端とした、皮質骨より内部の範囲で約 2 mm 四方の立方体の計測部位として、海綿骨の骨塩量 (Bone Mineral Density; BMD)、海綿骨体積率 (Bone Volume/Tissue Volume; BV/TV) を測定した。

4. 研究成果

1. L-Tryptophan 全身投与が実験的骨欠損の創傷治癒に与える影響

マウス大腿骨骨欠損モデルを用いて、L-Tryptophan が骨再生に与える影響を検討した。micro-CT 解析の結果、L-Tryptophan 投与群は骨欠損作製部位に、対照群と比較して著大な X 線不透過像が観察され、定量的解析の結果、L-Tryptophan 投与群において有意に骨が再生していた (1.8 倍, $p < 0.05$)。また、組織学的解析の結果、L-Tryptophan 投与群では対照群と比較して、より厚い皮質骨が再生されている像が観察された。

2. L-Tryptophan 全身投与がマウス大腿骨海綿骨量に与える影響

L-Tryptophan の全身投与が大腿骨海綿骨量に与える影響を検討するため、上記の実験同様、21 日間マウス腹腔内に L-Tryptophan (50 mg/kg) を投与したマウスより大腿骨を回収し、micro-CT を用い骨形態計測学的に評価した。その結果、L-Tryptophan 投与群は対照群と比較して、大腿骨の海綿骨梁の増加を認め、定量的解析の結果、Bone Mineral Density 量 (1.4 倍, $p < 0.001$)、Bone Volume/Total Volume (2.1 倍, $p < 0.01$) が有意に増大していた。

3. 骨粗鬆症に対する L-Tryptophan の効果の検討

骨粗鬆症モデルマウスを構築するため、8週齢のメスマウスに卵巣摘出術を実施し、骨粗鬆症を誘導した。卵巣摘出8週後にマウス (16週齢) を回収し、大腿骨への影響を micro-CT を用い骨形態学的に解析した。その結果、大腿骨の Bone Mineral Density、Bone Volume/Total Volume、Trabecular Number、Trabecular Thickness などのパラメーターが、対照群である疑似手術群と比較し有意に低下していることが確認できた。

4. トリプトファンの投与方法の違いが骨質に与える影響の検討

トリプトファンの投与が骨粗鬆症の予防・治療に有効かさらに詳細に検討した結果、腹腔内投与では、対照群と比較し、トリプトファン投与群では、大腿骨の Bone Mineral Density, Bone Volume/Total Volume, Trabecular Number, Trabecular Thickness 等のパラメーターが有意に上昇したが、経口投与群ではこれらのパラメーターに変化は認められなかった。また、通法に従い、脱灰・パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。その結果、経口投与群では、海綿骨の増加は認められなかった。

本結果は、全身投与されたトリプトファンの効果は、トリプトファンの代謝経路が大きく関わっている可能性を示唆しており、今後は、トリプトファンの代謝経路も含め、詳細に検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------