

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09967

研究課題名(和文) 骨組織マクロファージ(OsteoMacs)を標的とした新規骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of a new bone regeneration method targeting bone tissue macrophage (OsteoMacs)

研究代表者

阿南 壽 (Anan, Hisashi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・病院顧問

研究者番号：80158732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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、生体活性化ガラス(BAG)とPSリポソーム(PSL)の骨形成促進効果について検討した。その結果、BAGとPSL添加群では、BAG周囲に多数の破骨細胞様細胞が出現するとともに、BAG単独群に比較して骨形成の活性化が早期に認められた。また、PSLはマクロファージ培養系において、炎症性サイトカインであるTNF- α およびIL-6産生を抑制し、抗炎症性サイトカインであるIL-10産生を若干増加した。以上のことより、PSLはマクロファージ系細胞を介して骨欠損部におけるBAGの骨修復能を促進することにより、骨組織のリモデリングを促進する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

骨欠損部における再生のコアとしてBAGとPSLを応用することにより、骨吸収から骨形成に向かうリモデリングに類似した細胞連鎖が惹起され、早期に消失した骨組織の回復が観察された。また、PSLはTNF- α およびIL-6産生を抑制し、IL-10産生を増加することにより炎症反応を抑制し、修復・治癒へとスイッチする可能性が示唆された。超高齢社会における脆弱な骨欠損部に対する治療戦略として、BAGとPSLの応用は新規の歯周組織再生誘導技術の開発に貢献するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Effects of a combination of bioactive glass (BAG) and PS liposomes (PSL) on bone repair were investigated using rat calvaria bone defect model. In BAG+PSL group, a number of osteoclast-like cells appeared around BAG, and activation of bone formation was observed earlier compared with that of the BAG alone group. In addition, PSL suppressed the production of inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 and slightly increased the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 in a macrophage culture system. From the above, it is suggested that PSL may suppress the inflammatory response in bone defects through cells of macrophage series and promote bone tissue remodeling.

研究分野：歯科保存学

キーワード：PSリポソーム 生体活性ガラス M2マクロファージ 多核巨細胞 リモデリング 骨形成 骨再生療法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (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などの再生促進剤の応用が注目されている。現在まで、我が国においては歯周組織再生療法において、エナメルマトリックスタンパクを含有する Emdogain®gel (EMD) が頻用されている。(Froum SJ et al. J Periodontol 72, 25-34, 2001)。しかしながら、EMD は生物材料であるため、我が国ではリコンビナントな硬組織再生医療用材料の開発が進められ、現在では組換え型ヒト bFGF (塩基性線維芽細胞成長因子) を有効成分とするリグロス®歯科用液キットが歯周組織再生療法で頻用され成果を上げている (Murakami S et al. J Periodontal Res 38, 97-103, 2003)。一方、これらの歯周組織再生剤は、骨壁を多く有する骨欠損部では優れた骨組織の再生、アタッチメントの回復を誘導することができるが、多くの骨壁が消失した広範な骨欠損部における骨組織の誘導 (GBR) には適用できない。そこで最近の GBR では、これまで用いられてきた無生物材料、骨補填材に加え、ティッシュエンジニアリングを応用した再生療法に関心が高まっている。また近年、骨組織に存在するマクロファージの特別なサブタイプである骨組織マクロファージ (OsteoMacs) に関する基礎的研究から、骨形成とリモデリングにおける OsteoMacs の重要な役割が指摘されている (Batton L et al. Curr Osteoporos Rep 15, 385-395, 2017)。さらに最近では、歯科領域だけでなく医科領域においても、骨適合性および骨再生促進生体材料の開発を加速化するために、OsteoMacs と多角巨細胞の機能解析の必要性が示唆されている (Miron RJ et al. Biomaterials 82, 1-19, 2016)。しかしながら、骨組織のマクロファージ系細胞の多様性を制御する因子 (シグナル) については、いまだ不明な点が多い。

(2)広範な歯槽骨欠損で、骨組織の活性が衰えている場合には、骨再生医療用足場材を用いても GBR は予後不良となることが示唆されている。一般的に、欠損部周囲に骨壁が存在する 3 壁性の骨欠損では、修復に関与する幹細胞が骨膜に多数存在するため修復しやすい。それと同様に、多くの骨壁が消失した広範な骨欠損部において、「骨補填材に対する免疫反応が異物反応ではなく、骨吸収から骨形成に向かうリモデリングと同じ細胞連鎖を惹起することが可能となれば、骨修復能の低下した高齢者においても、消失した骨組織を回復することができるのではないか。」ということが、研究課題の核心をなす学術的「問い」である。

(3)ホスファチジルセリンを含有する PS リポソーム (以下 PSL と略す) はミクログリア/マクロファージに貪食された後、プロスタグランジン E2 (以下 PGE2 と略す) の産生を促すことが報告されている。PGE2 は強力な抗炎症作用を有していることから、PSL はマクロファージの浸潤した炎症部位において治癒促進作用が期待される。一方、生体活性ガラス (bioactive glass 以下 BAG と略す) は骨伝導能を有しており、臨床において、骨補填材としての有用性が示唆されている。しかしながら、GBR (骨誘導再生法) における骨組織マクロファージ (OsteoMacs) と骨芽細胞系細胞の細胞連鎖に関する報告はほとんど認められない。そこで本研究では、ラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いて、BAG と PSL を骨欠損部に应用することにより、OsteoMacs と骨形成との関連性について解析するとともに、PSL のマクロファージに及ぼす効果について、マクロファージ培養系を用いて検討した。

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)

2. 研究の目的

ラット骨欠損モデルを用いて、生体親和性に富む BAG と PSL が骨組織のリモデリングに及ぼす影響について組織学的に検討するとともに、PSL のマクロファージに及ぼす効果について解明する。

3. 研究の方法

実験 : ラット頭蓋冠頭蓋骨欠損モデルを用いての骨形成促進硬効果の解明

10 週齢ウイスター系雄性ラット 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パー (直径 5mm、GC 社) により、円形の骨欠損窩洞を作製した。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 μ l 添加、以下 BAG 群)、BAG と PSL 併用群 (BAG6mg + PSL10 μ 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、マッソントリクローム (MT) 染色および ED1 抗体を用いた免疫染色を行い検鏡した。

実験 : PSL のマクロファージに及ぼす抗炎症性作用の解明

実験には、倒立顕微鏡 (オリンパス (株) ・ CKX53) を用いた。ヒト単球系 U937 細胞を通常に従い PMA (100 nM) でマクロファージに分化させ、 E.coli 由来 LPS (100 ng/ml) または IL-4 (20 ng/ml) + IL-13 (20 ng/ml) にて M1/M2 マクロファージへ分極させた。PS リポソーム (100 μ M) 添加によるマクロファージのサイトカインの発現変動について検討した。解析方法として、TNF-、IL-6、IL-10 の発現について、ELISA 法を用いて解析した。

4 . 研究成果

実験

頭蓋冠骨欠損窩洞の変化についてマイクロ CT を用いて検索した。画像解析の結果、処置後 4 週目において、BAG + PSL 添加群は BAG 単独群に比較して、骨窩洞内における不透過像の面積の増加が認められた (図 1)。組織学的解析において、BAG と PSL 併用群の処置後 2 週目では、BAG 粒子に接して ED1 陽性を示す多核の破骨細胞様細胞が観察された。また、BAG 粒子の周囲では規則的に配列した厚いコラーゲン線維と胞体の大きな骨細胞を含有した幼弱な骨組織が観察された。さらに、BAG 粒子の近傍には単核で胞体が類円形、多核形などの多様な形状を示す ED1 陽性のマクロファージが散在性に観察された。一方、BAG 単独群の 2 週目では、単核の泡沫細胞や多核の巨細胞などマクロファージ系細胞と思われる細胞の集簇像が観察され、炎症反応の継続が認められた。BAG 周囲のコラーゲン線維の形状は不規則であり、新生骨の形成像は観察されなかった (図 2)。処置後 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、BAG 粒子を含有した成熟した新生骨の形成像が観察された。BAG と PSL 併用群では、炎症性細胞浸潤はほとんど観察されず、骨欠損部は一樣に厚い線維性骨で被覆されている像が観察された。BAG 単独群においても BAG と PSL 併用群と同様に厚い骨組織が観察されたが、形成された骨組織は連続したものではなく、一部、骨組織は島状の形態を示していたことより、BAG と PSL 併用群に比較して、骨組織の修復過程が遅れているものと推察された。また、BAG 単独群では ED1 陽性を示すマクロファージ系細胞の集簇像が 8 週目においても継続して観察された (図 3)。

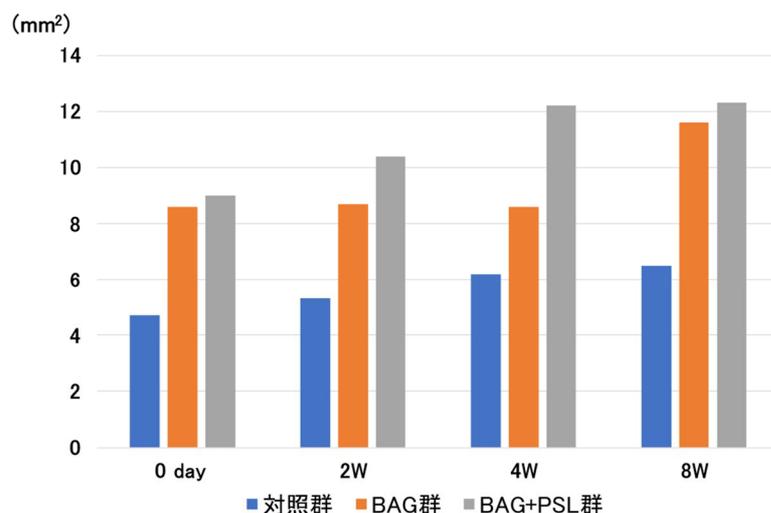


図1 頭蓋冠骨欠損窩洞内の不透過像のマイクロCT解析

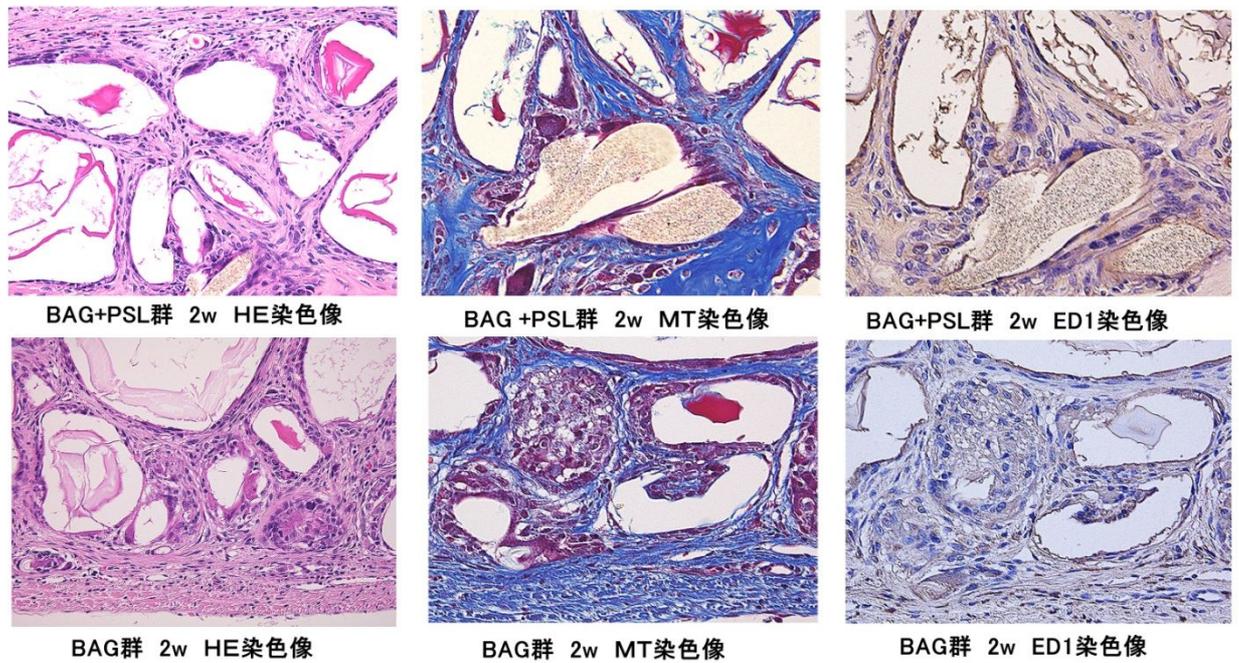


図2 頭蓋冠骨欠損処置後2週目のHE染色、MT染色、ED1染色像

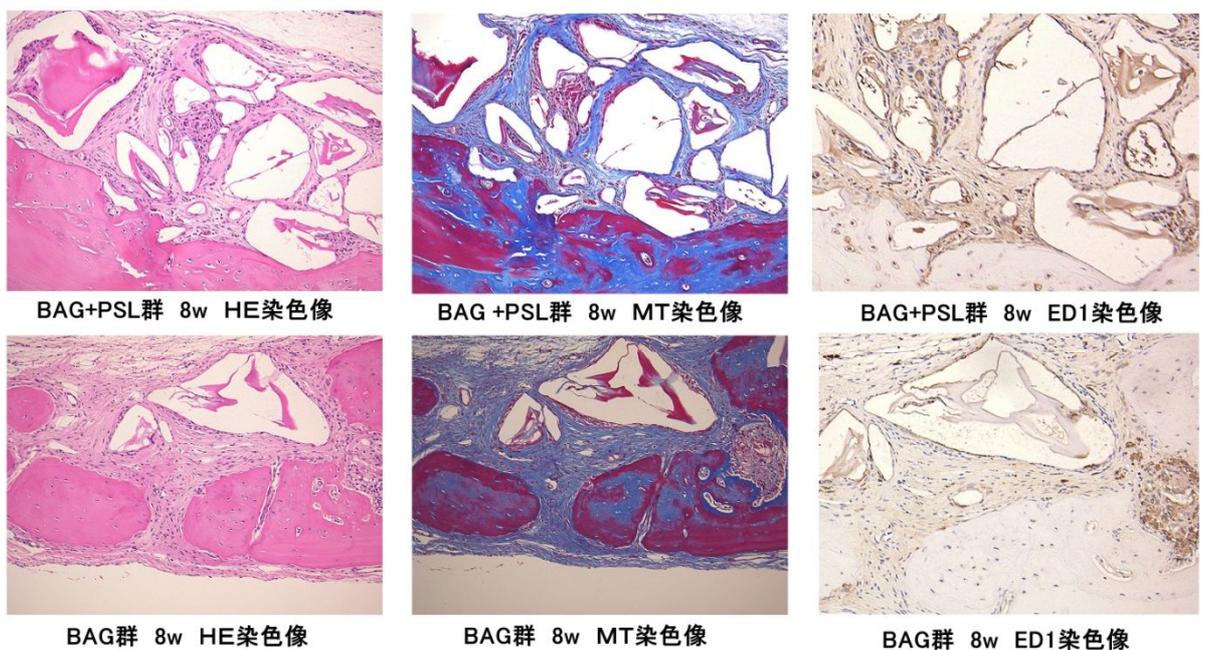


図3 頭蓋冠骨欠損処置後8週目のHE染色、MT染色、ED1染色像

実験 : PSLの抗炎症効果の解明: マクロファージ M2 タイプへの変換機構の探索
 PS リポソーム (100 μ M) は、LPS 刺激下で M1 マクロファージに適用すると培養上清中の炎症性メディエーターである TNF- α および IL-6 の産生は著明に抑制された。一方、IL-4 および IL-13 刺激下で M2 マクロファージに適用したが、抗炎症性メディエーターである IL-10 産生は若干の増加にとどまった (図 4)。実施した実験条件 (既発表の論文を参考とした) では、M2 マクロファージへの分極が十分でない可能性も考えられ、更なる検討を実施しているが、PSL は M1 マクロファージに対する抗炎症効果が強力であり、その結果、骨欠損部における M1/M2 マクロファージの分極バランスを早期に M2 マクロファージ優位に調節することにより、骨欠損部の治癒を促進する可能性が示唆された。

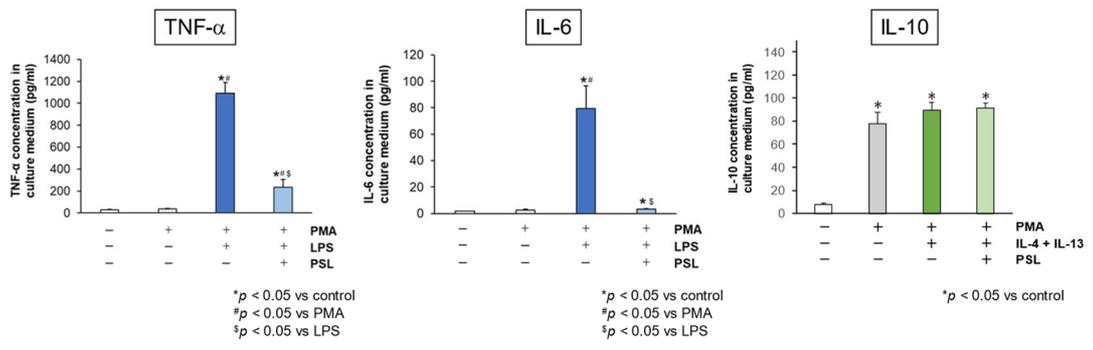


図4 M1/M2マクロファージマーカーの発現変動(ELISA)

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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuzaki E, Hirose H, Fujimasa S, Yoshimoto S, Yanagi T, Matsumoto K, Nikaido M, Minakami M, Matsumoto N, Anan H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate receptor 2 agonist induces bone formation in rat apicoectomy and bone defect model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 787-794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jds.2021.10.004	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 該当する

1. 著者名 Matsuzaki E, Hirose H, Matsumoto K, Matsumoto N, Fujimasa S, Hatakeyama J, Anan H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of root-end filling materials on vascular endothelial cell proliferation and tube formation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 1232-1237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jds.2021.12.006.	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 該当する

1. 著者名 Hirose H, Fujimasa S, Kanemaru S, Yoshimoto S, Matsumoto N, Anan H, Matsuzaki E.	4. 巻 19
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate receptor 1-mediated odontogenic differentiation of mouse apical papilla-derived stem cells.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 In press.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jds.2024.02.004.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤政清志朗, 廣瀬陽菜, 松本典祥, 金丸慎吾, 松崎英津子.
2. 発表標題 PSリボソームがM1/M2マクロファージの分極バランスに及ぼす影響.
3. 学会等名 第50回福岡歯科大学学会総会・学術大会プログラム予稿集, P19
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣瀬陽菜, 松崎英津子, 松本和磨, 松本典祥, 藤政清志朗, 畠山純子, 阿南壽
2. 発表標題 逆根管充填材が血管内皮細胞の増殖と管腔形成に及ぼす影響 第2報
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本典祥, 阿南壽, 廣瀬陽菜, 藤政清志朗, 金丸慎吾, 田中一郎, 島田将彦, 松崎英津子
2. 発表標題 加齢に伴うS1P受容体細胞の動態変化 ラット根尖部/歯髄腔における解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 17. 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・教授 (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
---------	---------