

令和 6 年 9 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03098

研究課題名(和文) 頭蓋冠幹細胞ニッチと骨修復時のメカノシグナルによる細胞動態制御

研究課題名(英文) Cellular dynamics in calvarial bone healing

研究代表者

井関 祥子 (ISEKI, Sachiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80251544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス頭蓋冠骨欠損修復モデルでは、FGF18のBMP2への添加が、BMP2の骨修復効果を促進させる。BMP2/FGF18投与群では、修復開始時期において組織修復性のM2マクロファージの浸潤を示唆する遺伝子発現が認められ、マクロファージのin vivoでの除去は、FGF18の促進効果を解除した。骨髄細胞を分離してFGF18を作用させるとM2マクロファージの極性化は促進され、FGF18が骨髄間質細胞にCCL2を中心としたマクロファージ誘導因子の発現を上昇させることで誘導された。CCL2の受容体であるCcr2遺伝子を欠失するマウスでは、BMP2/FGF18による骨欠損修復の促進は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋骨の欠損は修復が難しく再生医療の重要なターゲットとなっている。また、一方で、頭蓋縫合早期癒合症などの先天性疾患では、癒合した縫合部では過剰な骨形成が見られる。頭蓋は脳を収容し保護しているために、頭蓋骨に関わる疾患は、重度の神経症状を招くことが多く、これらの予防や治療は率先して取り組むべき課題の一つである。その中で、本研究申請では、頭蓋骨修復に関わる因子の一つであるFGF18の分子細胞学的なメカニズムを明らかにでき、これらの知見は、今後再生医療の現場において応用可能であり、医療を通じた社会的貢献を達成できたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mouse critical-sized calvarial defect healing was stabilized by addition of fibroblast growth factor 18 (FGF18) to bone morphogenetic protein 2 (BMP2)-induced healing model. We found that the expression of anti-inflammatory markers, including those related to tissue healing M2 macrophage prior to mineralization. The depletion of macrophages with clodronate liposome hindered the FGF18 effect. By using mouse primary bone marrow (BM) cells composed of macrophage precursors and BM stromal cells (BMSCs) we revealed that FGF18 indirectly induces M2-macrophage polarization by affecting BMSCs. Chemoattractant chemokine (c-c motif) ligand 2 (CCL2) secreted from BMSC was the major mediator for M2 macrophage polarization. FGF18-augmented activity was diminished in the calvarial defect healing in knockout mouse of Ccr2, a receptor for CCL2. We suggest a novel role of FGF18 in M2-macrophage modulation via stimulation of CCL2 production in calvarial bone healing.

研究分野：硬組織修復

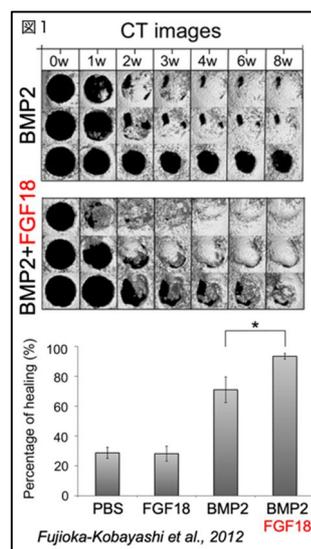
キーワード：マウス頭蓋冠 膜性骨 骨修復 FGF18 BMP2 M2マクロファージ 骨髄間質細胞

1. 研究開始当初の背景

頭蓋冠骨欠損の修復は困難で、再生医療の重要なターゲットとなっており、その中で人工骨やバイオマテリアルを用いた骨修復（骨形成）の促進が試みられている。一方、症候群性の頭蓋縫合早期癒合症では、手術による癒合部の分離後の再癒合が高頻度で起き、骨形成を抑制する方針が望まれる。骨修復において、縫合部に存在する頭蓋冠幹細胞の修復部位への動員、炎症から組織修復過程への転化段階での組織修復型マクロファージの出現などが予想されるが、これらの細胞群の骨修復過程における動態やそれを制御する分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究計画では、マウス頭蓋冠骨修復過程におけるこれらの細胞動態を明らかにし、生体材料や機能分子を用いてこの動態を制御した理想的な骨修復の可能性を検討する。

2. 研究の目的

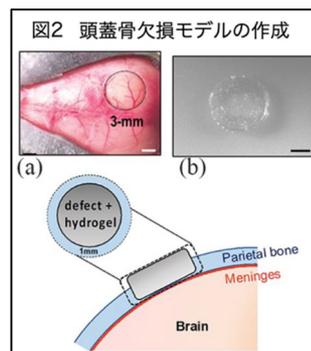
これまで申請者らの先行研究によって、マウスの頭蓋冠の欠損部にハイドロゲルを用いて bone morphogenetic protein 2(BMP2)に fibroblast growth factor 18 (FGF18)を追加して添加すると、BMP2 を単独で添加した場合に比べて骨修復が促進されることがわかっていった(図1)。しかしながら FGF18 添加による骨修復の促進に關する細胞群や分子メカニズムに関しては不明であった。そこで、本モデルを用いて頭蓋骨修復過程における FGF18 の作用を分子細胞学的な観点から理解することを目的とした。まず、遺伝子発現の変動から、主に關与している細胞群を予測し、実際に組織解析を通して同定することを試みた。また、炎症細胞との關連性を調べるために、*in vivo* において、マクロファージを枯渇させ、BMP2 + FGF18 添加下の頭蓋骨修復に及ぼす影響を調べた。さらには、マクロファージや關与する細胞における FGF18 の作用を *in vitro* において検証し、頭蓋骨の再生や骨修復の調整に役立つような分子機構を明らかにすることを目指した。



3. 研究の方法

1) 頭蓋骨修復過程における遺伝子発現の変化と組織修復マクロファージの分布

4週齢のマウスの頭蓋骨に、直径3mmのバイオプシーパンチを用いて骨欠損部を作成し、欠損部と同じサイズのハイドロゲルにPBSのみ、BMP2のみ、BMP2+FGF18をそれぞれ添加し、骨欠損部を覆うように配置した(図2)。手術後5日目にそれぞれのグループの頭蓋骨修復部とその周辺部を摘出し(図2)、遺伝子発現を解析した。さらに修復部におけるマクロファージの存局を確認するために、手術後5日目の頭蓋骨修復部の組織切片を非脱灰凍結法によって作成し、F4/80とCD206の免疫染色によってマクロファージを検出した。



2) FGF18添加下の頭蓋骨修復過程におけるマクロファージ枯渇の影響とFGF18の作用の解析

手術後、1~2週間クロドネートを投与し、FGF18添加下の頭蓋骨修復過程においてマクロファージの枯渇が及ぼす影響を、マイクロCTによる解析で評価した。さらにマウス骨髄由来単球細胞と骨髄間質細胞を採取し、*in vitro* において FGF18 がマクロファージの極性変化や間質細胞の分化に關与しているかを検討した。FGF18のマクロファージへの作用は骨髄間質細胞を介したものであることが示唆されたために、FGF18を作用させた骨髄間質細胞の培養上清を用いて、骨髄由来単球細胞から分化させたマクロファージを培養し、極性変化に効果があるかどうかを検討した。これらの解析において、遺伝子発現の変化はリアルタイムPCRおよびDNAアレイにより解析し、マクロファージの極性変化は免疫染色を行って検討した。

3) FGF18の骨修復促進作用におけるCCL2-CCR2シグナルの關与の検討

CCL2-CCR2シグナルはマクロファージの炎症局所への遊走や極性の転換に關与することが知られている。本モデルにおいても、上述の解析からCCL2-CCR2シグナルの關与が疑われたために、骨髄由来マクロファージにCCL2と骨髄間質細胞の培養上清およびCCL2の中和抗体を作用させて遺伝子発現の変化をリアルタイムPCRによる解析で比較した。

最終的に *Ccr2* のノックアウトマウスを用いて、頭蓋骨欠損モデルを作成し、FGF18 の骨修復促進作用にどのような影響を与えるかを修復過程の経時的マイクロ CT 解析によって評価した。

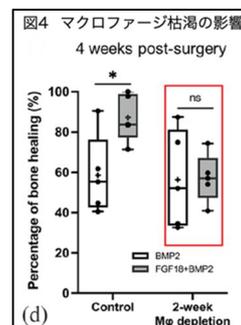
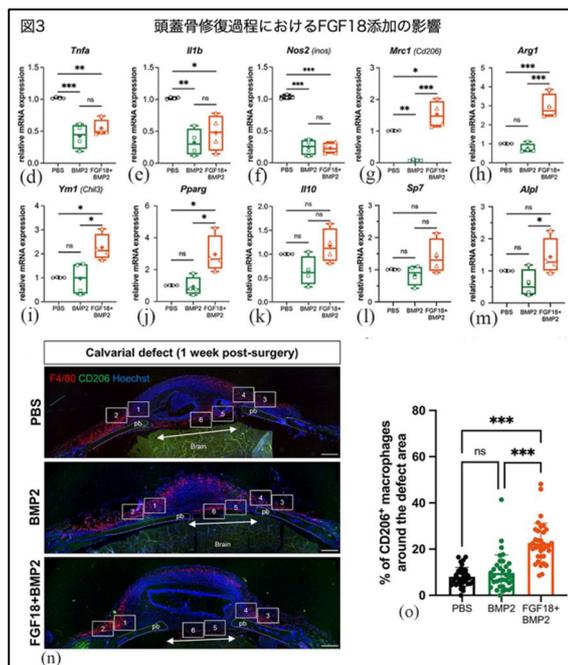
4. 研究成果

1) 頭蓋骨修復過程における FGF18 添加による遺伝子発現の変化と修復部における CD206⁺マクロファージの局在の増加

BMP2 に加えて FGF18 を添加した場合、頭蓋骨修復過程において有意に組織修復型マクロファージマーカーの遺伝子発現が増加していた。また、修復中の組織において CD206⁺組織修復型マクロファージの数が BMP2 単独投与群と比較して有意に上昇していたことから(図3)、BMP2 に加えて FGF18 を添加したことによる骨修復促進において、CD206⁺マクロファージの関与が強示唆された。

2) FGF18 添加下の頭蓋骨修復過程におけるマクロファージの影響と FGF18 の作用

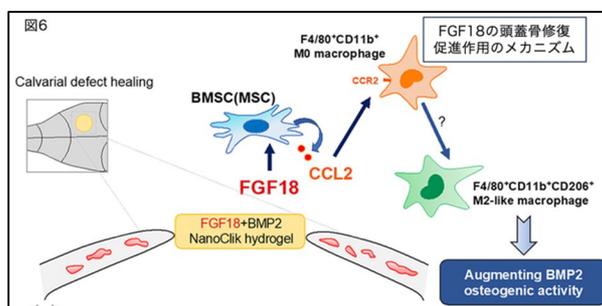
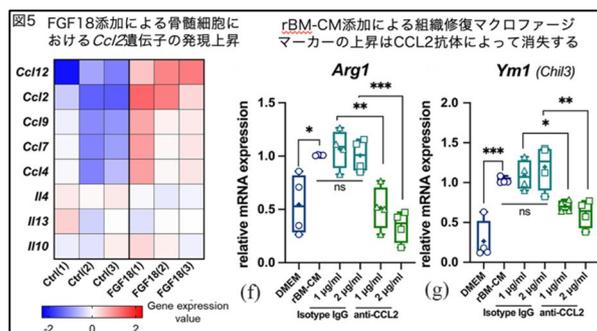
次に FGF18 添加下におけるマクロファージの関与を検討した。クロドロネート添加により手術後マクロファージ枯渇させた群では、コントロールと比較して、FGF18 添加による修復促進がキャンセルされた(図4)。次に、マクロファージの動態に対する FGF18 の作用を、*in vitro* において検討した。FGF18 は骨髄から分離培養したマクロファージに対して直接的な作用を示さなかったが、骨髄間質細胞との共培養や骨髄間質細胞の培養上清添加時には CD206⁺マクロファージが増加したため、FGF18 のマクロファージに対する作用は骨髄間質細胞を介することが示唆された。そこで、骨髄間質細胞における FGF18 の作用を調べたところ、*Ccl2*をはじめとする CC chemokine family 遺伝子が上昇していた。中でも *Ccl2* は組織修復型マクロファージへの極性を誘導することが報告されており、**骨欠損後の BMP2/FGF18 の適用で *Ccl2* の発現は修復組織においても mRNA レベルで上昇していた。**



3) FGF18 の骨修復促進作用における CCL2-CCR2 シグナルの関与

骨髄から分離した間質細胞に *in vitro* において CCL2 を添加して培養を継続すると、組織修復マクロファージマーカーの発現が上昇するが、一部の遺伝子は CCL2 の中和抗体によって上昇が抑えられた。よって FGF18 添加時に骨髄間質細胞は CCL2-CCR2

シグナルを介して組織修復マクロファージを誘導していることが示唆された(図5)。最終的に CCL2-CCR2 シグナルが作用しない CCR2 ノックアウトマウスを用いて頭蓋骨修復を作成し FGF18 の作用における CCL2-CCR2 シグナルの *in vivo* での関与を検討したところ、BMP2+FGF18 投与による骨修復の促進は見られなかった。つまり、FGF18 は頭蓋骨修復時に骨髄間質細胞に働きかけ CCL2 の産生を促し、CCL2-CCR2 シグナルを介することによって組織修復マクロファージを動員し、結果的に骨修復を促進していることが示唆された(図6)。



本研究によって得られた成果は、頭蓋骨の再生に応用可能な知見であり、将来的にも臨床応用への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nuri T., Ota M., Ueda K., Iseki S.	4. 巻 149
2. 論文標題 Quantitative Morphologic Analysis of Cranial Vault in Twist1+/- Mice: Implications in Craniosynostosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg	6. 最初と最後の頁 28e-37e
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PRS.00000000000008665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hoshino Y, Takechi M, Moazen M, Steacy M, Koyabu D, Furutera T, Ninomiya Y, Nuri T, Pauws E, Iseki S.	4. 巻 242
2. 論文標題 Synchondrosis fusion contributes to the progression of postnatal craniofacial dysmorphology in syndromic craniosynostosis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Anat	6. 最初と最後の頁 387-401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/joa.13790.	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 Takenoshita Manami, Takechi Masaki, Vu Hoang Tri, Furutera Toshiko, Akagawa Chisaki, Namangkalakul Worachat, Aoto Kazushi, Kume Tsutomu, Miyashin Michiyo, Iwamoto Tsutomu, Iseki Sachiko	4. 巻 250
2. 論文標題 Cell lineage and expression based inference of the roles of forkhead box transcription factor <scp> <i>Foxc2</i> </scp> in craniofacial development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1125 ~ 1139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.324	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Guo L, Iida A, Bhavani G-S, Gowrishankar K, Wang Z, Xue J, Wang J, Miyake N, Matsumoto N, Hasegawa T, Iizuka Y, Matsuda M, Nakashima T, Takechi M, Iseki S, Yambe S, Nishimura G, Koseki H, Shukunami C, Girisha Katta M, Ikegawa S	4. 巻 12
2. 論文標題 Deficiency of TMEM53 causes a previously unknown sclerosing bone disorder by dysregulation of BMP-SMAD signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22340-8	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 Vu Tri H., Takechi Masaki, Shimizu Miki, Kitazawa Taro, Higashiyama Hiroki, Iwase Akiyasu, Kurihara Hiroki, Iseki Sachiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Dlx5-augmentation in neural crest cells reveals early development and differentiation potential of mouse apical head mesenchyme	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81434-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Namangkalakul Worachat, Nagai Shigenori, Jin Chengxue, Nakahama Ken-ichi, Yoshimoto Yuki, Ueha Satoshi, Akiyoshi Kazunari, Matsushima Kouji, Nakashima Tomoki, Takechi Masaki, Iseki Sachiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Augmented effect of fibroblast growth factor 18 in bone morphogenetic protein 2-induced calvarial bone healing by activation of CCL2/CCR2 axis on M2 macrophage polarization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/20417314231187960	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6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 井関祥子
2. 発表標題 Craniosynostosisの発症メカニズム
3. 学会等名 第65回日本形成外科学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Worachat Namangkalakul, Shigenori Nagai, Ken-ichi Nakahama, Chengxue Jin, Satoshi Ueha, Kazunari Akiyoshi, Kouji Matsushima, Masaki Takechi and Sachiko Iseki
2. 発表標題 FGF18 modulates M2-like macrophage polarization by inducing CCL2-CCR2 signaling in calvarial bone healing
3. 学会等名 Gordon Research Conference -Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Takechi, Yukiko Hoshino, Mehran Moazen, Daisuke Koyabu, Sachiko Iseki
2. 発表標題 Ontogenic trajectories of cranial growth in syndromic craniosynostosis mouse models
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukiko Hoshino, Masaki Takechi, Mehran Moazen, Daisuke Koyabu, Toshiko Furutera, Youichiro Ninomiya, Erwin Pauws6, Takashi Nuri, Sachiko Iseki
2. 発表標題 Ontogenic trajectories of cranial growth in syndromic craniosynostosis mouse models
3. 学会等名 2nd Advances in Craniosynostosis Basic Science to Clinical Practice (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野裕紀子、武智正樹、Mehran Moazen、小藪大輔、井関祥子
2. 発表標題 頭蓋縫合早期癒合症モデルマウスの成長に伴う頭蓋形態変化の定量的解析
3. 学会等名 第81回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Worachat Namangkalakul, Shigenori Nagai, Ken-ichi Nakahama, Kazunari Akiyoshi, Masaki Takechi, Sachiko Iseki
2. 発表標題 Effects of Indirect Activity of Fibroblast Growth Factor 18 on M2-like Macrophage Polarization in Calvarial Bone Healing
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021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	武智 正樹 (Takechi Masaki) (10455355)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師 (12602)	
研究分担者	足立 礼孝 (Adachi Noritaka) (10631533)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究分担者	塗 隆志 (Nuri Takashi) (40445995)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	永井 重徳 (Nagai Shigenori) (50348801)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	
研究分担者	上田 晃一 (Ueda Koichi) (90257858)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	
研究分担者	由井 伸彦 (Yui Nobuhiko) (70182665)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授 (12602)	
研究分担者	有坂 慶紀 (Arisaka Yoshinori) (70590115)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教 (12602)	

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