

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09927

研究課題名(和文) 修復性マクロファージの賦活化を介したRANKL逆経路活性化による骨再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of bone regeneration therapy by activating the RANKL reverse pathway through activation of reparative macrophages.

研究代表者

松本 典祥 (Matsumoto, Noriyoshi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：80597948

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)：ラット頭蓋骨骨欠損窩洞を作製し、Phosphatidylserine Liposomes(PSL)とBioactive Glass(BAG)の併用群とBAG単独群の骨形成過程を比較し、マクロファージの局在を確認するために組織学的な解析を行った。

8週目ではBAG・PSL併用群で、BAG単独群よりも厚く緻密な骨が形成された。また、BAG単独群の4週目でED1陽性細胞の減少がみられた。

PSLは破骨細胞の成熟を抑制することが報告されている。これらのことから、PSL・BAG併用群では、PSLにより、マクロファージの分極に差異が生じ、それが骨形成に関与した可能性が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯内療法・歯周病領域における骨再生医療の開発に向け、細胞、シグナル因子、足場、すなわち再生の3要素に関する研究が行われている。本研究は、これらと異なり、炎症部位において破壊から修復・治癒へとスイッチするマクロファージに着目し、骨芽細胞の自己修復能力を最大限に利用した骨組織再生技術の開発を目標とする点に、学術的独自性がある。これまでPSリボソームの骨吸収抑制作用については報告があったが、未だ明らかとなっていない骨形成促進メカニズムについて、PSリボソームによるM2マクロファージの賦活化が骨芽細胞に作用し、RANKL逆シグナル活性化と骨芽細胞分化促進作用を発揮するという仮説を検討した。

研究成果の概要(英文)：Histological analysis was performed by forming a cavity in the skull of rats to compare the bone formation process between the combination group of phosphatidylserine Liposomes(PSL) and bioactive glass(BAG) and the group with BAG alone, and to confirm the localization of macrophages. At week 8, thicker and denser bones were formed in the combined BAG+PSL group than in the BAG alone group. In addition, there was a decrease in ED1-positive cells at week 4 in the BAG alone group.

PSL has been reported to inhibit osteoclast maturation. These results suggest that PSL may have caused a difference in the polarization of macrophages in the PSL+BAG combination group, which may have been involved in bone formation.

研究分野：歯内治療学

キーワード：生体活性ガラス ホスファチジルセリンリポソーム 骨再生療法 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎等により失われた歯槽骨の再生を可能とする治療法の確立は、歯の保存に有用である。細胞膜リン脂質のホスファチジルセリンを含有するリポソーム(Phosphatidylserine liposomes: 以下 PSL) は、投与後に PS 受容体を有するマクロファージへの取り込みが増大することにより、ドラッグキャリア機能が発揮される。慢性関節リウマチの動物モデルにおいては、抗炎症作用と破骨細胞分化抑制による骨吸収抑制作用が報告されている。一方、骨組織における炎症とその治癒過程において、機能が異なる M1 (炎症性) /M2 (抗炎症性) マクロファージの分化とバランスが重要であることはよく知られている。当教室では PSL と足場材である生体活性ガラス(Bioactive glass; BAG)による骨形成作用を見出しているが、その際 BAG に隣接した骨形成の局所で、マクロファージのマーカーである ED1 陽性の細胞が発現することを観察した。そこで、PSL が M2 マクロファージを賦活化することで骨形成に関与するのではないかと仮説を立て、PSL が M1/M2 マクロファージの分極化に及ぼす影響を検証することとした。

2. 研究の目的

本研究では、*in vitro*、*in vivo* における PS リポソームによる M2 マクロファージ賦活化を介した RANKL 逆シグナルによる骨芽細胞分化促進機構の解明と骨形成を目的とする。

歯内療法・歯周病領域における骨再生医療の開発に向けて、これまでに細胞、シグナル因子、足場、すなわち再生の 3 要素に関する研究が活発に行われている。本研究は、それらとは一線を画し、炎症部位において破壊から修復・治癒へとスイッチするマクロファージに着目し、骨形成担当細胞である骨芽細胞の自己修復能力を最大限に利用した骨組織再生技術の開発を目標とするものであった。

これまで PS リポソームの骨吸収抑制作用については報告があったが、未だ明らかとなっていない骨形成促進メカニズムについて、PS リポソームによる M2 マクロファージの賦活化が骨芽細胞に作用し、RANKL 逆シグナル活性化と骨芽細胞分化促進作用を発揮するという仮説をたてた。

3. 研究の方法

1) 動物モデルにおける骨再生 ; PS リポソームによる M1/M2 マクロファージの動態と骨形成作用の検証

実験には 10 週齢雄性 Wistar 系ラットを用い、頭蓋骨に直径 5 mm の穿通性の骨欠損窩洞を作製した。その後、骨欠損窩洞に、PSL・BAG 併用群、BAG 単独群、骨欠損部に何も埋入しない対照群、3 種類のモデルを作製した。処置後 2, 4, 8 週間後に標本を採取し、HE 染色および ED1 免疫染色(Mouse Anti Rat CD68)による組織学的解析を行った(福岡歯科大学動物実験承認番号: 21015)

2) PS リポソームの M1/M2 マクロファージ分化に関する検証

In vitro の検証では、PS リポソームのマクロファージによる貪食と、M1/M2 への分化について検討した。実験にはヒト単球系 U937 細胞を用いた。通常に従い PMA によりマクロファージに分化させ、その後 PSL を 24 時間添加した。M1 マクロファージへの分極には LPS(*E. coli* 由来)、M2 マクロファージへの分極には Interleukin (IL)-4 および IL-13 を用いた。その後、上清を回収し M1/M2 マクロファージのマーカーである IL-6、Tumor necrosis factor (TNF)- α 、IL-10 の産生について ELISA 法を用いて検討した。

4. 研究成果

1) 動物モデルにおける骨再生 ; PS リポソームによる M1/M2 マクロファージの動態と骨形成作用の検証

HE 染色像において、対照群では 8 週目に至るまで、窩洞内に骨様硬組織の形成は認められなかった。一方、BAG 単独群では 2 週目から、主に BAG 粒子周辺に骨様硬組織の形成を認め、4 週目にはその傾向が顕著になった。8 週目には窩洞内に新生骨の形成が認められた。PSL・BAG 併用群においても、同様に 2 週目から BAG 粒子の周辺に骨様硬組織の形成が認められたが、2 週目、4 週目では、BAG 単独群と比較して、その形成量は少なく、形成された骨様硬組織は島状であり、BAG 粒子周辺は肉芽組織に被覆されていた。しかしながら、8 週目には窩洞に新生骨が形成され

ており、BAG 群と比較して厚く、緻密な骨組織が観察された。

ED1 免疫染色像において、BAG 単独群では 2 週目に、形成された骨様硬組織や BAG 粒子周辺に多核の ED1 陽性細胞が多数観察されたが、4 週目では減少傾向を認めた。PSL・BAG 併用群では 2 週目に BAG 群と同様に、形成された骨様硬組織や BAG 粒子周辺で多核の ED1 陽性細胞が数多く観察され、4 週目でも同様の数多くの ED1 陽性細胞が観察された。

PSL は破骨細胞前駆細胞に取り込まれた後、Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)ならびに Prostaglandin E2 (PGE2)の産生分泌を誘導し、破骨細胞への成熟に必須な因子 (RANKL ならびに RANK) の発現を抑制することが報告されている。これらのことから、PSL・BAG 併用群では、PSL により、初期のマクロファージの分極に差異が生じ、このことが骨形成の過程に関与した可能性が推察された。現在、免疫組織染色を行い、M1 および M2 マクロファージの局在の確認を検討中である。

2) PS リポソームの M1/M2 マクロファージ分化

PSL 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 TNF- α および IL-6 の産生は著明に抑制された。一方、IL-4/IL-13 刺激下で M2 マクロファージに適用すると抗炎症性メディエーター IL-10 産生は若干増加した。以上のことから、PSL は M1 マクロファージに対する強力な抗炎症効果を示したことが推察された。一方、PSL による M2 マクロファージへの直接的な賦活化は当初の予測に反して得られず、これによる RANKL 逆シグナル経路の活性化が骨芽細胞の分化促進を導くという実験系を構築できなかった。現在、M1 マクロファージ分化から M2 へ分化させた細胞について検討を加えているが、*in vivo* データの補完を細胞で引き続き継続して実施する。

学会発表

1. 廣瀬陽菜, 松崎英津子, 松本和磨, 水上正彦, 牛尾悟志, 二階堂美咲, 松本典祥, 阿南 壽. 各種逆根管充填材が血管内皮細胞の血管新生に及ぼす影響. 日歯保存誌 2021; 日本歯科保存学会春季学術大会(第 154 回)抄録集: 139, P66.
2. 松崎英津子, 廣瀬陽菜, 藤政清志朗, 二階堂美咲, 水上正彦, 松本典祥, 阿南 壽. S1P および BMP-9 がマウス歯乳頭由来幹細胞の骨芽細胞/象牙芽細胞分化に及ぼす影響. 日歯保存誌 2021; 日本歯科保存学会秋季学術大会(第 155 回)抄録集, P55.
3. Haruna Hirose, Etsuko Matsuzaki, Seishiro Fujimasa, Kazuma Matsumoto, Satoshi Ushio, Misaki Nikaido1, Masahiko Minakami, Noriyoshi Matsumoto, Hisashi Anan. The effects of retrograde filling materials on the endothelial cell tube formation. 第 19 回日韓歯内療法学会学術大会(Web) e ポスター 2021 年 10 月 29 日 ~ 11 月 4 日
4. 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. 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~. 日歯保存誌 2022; 日本歯科保存学会春季学術大会(第 156 回)抄録集, P29 .
5. 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. 加齢に伴う S1P 受容体細胞の動態変化 ラット根尖部/歯髓腔における解析 . 日歯保存誌 2022; 日本歯科保存学会秋季学術大会(第 157 回)抄録集, P91 .
6. 藤政清志朗, 廣瀬陽菜, 松本典祥, 金丸慎吾, 松崎英津子. PS リポソームが M1/M2 マクロファージの分極バランスに及ぼす影響. 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.
7. 松本典祥, 吉本尚平, 藤政清志朗, 廣瀬陽菜, 金丸慎吾, 松崎英津子, ホスファチジルセリン含有リポソームと生体活性ガラスによる骨形成におけるマクロファージの局在 .日歯保存誌 2024; 日本歯科保存学会春季学術大会(第 160 回)抄録集, P96.

発表論文

1. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 agonist induces bone formation in rat apicoectomy and bone defect model. Matsuzaki E, Hirose H, Fujimasa S, Yoshimoto S, Yanagi T, Matsumoto K, Nikaido M, Minakami M, Matsumoto N, Anan H. *Journal of Dental Sciences* 17 査読有 : 787-794. (2022)
2. Effects of root-end filling materials on vascular endothelial cell proliferation and tube formation. Matsuzaki E, Hirose H, Matsumoto K, Matsumoto N, Fujimasa S, Hatakeyama J, Anan H. *Journal of Dental Sciences* 17 査読有 : 1232-1237. (2022)
3. Sphingosine-1-phosphate receptor 1-mediated odontogenic differentiation of mouse apical papilla-derived stem cells. Hirose H, Fujimasa S, Kanemaru S, Yoshimoto S, Matsumoto N, Anan H, Matsuzaki E. *Journal of Dental Sciences* 査読有 : In press. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2024.02.004>. (2024)

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 0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 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 Hirose H, Fujimasa S, Kanemaru S, Yoshimoto S, Matsumoto N, Anan H, Matsuzaki E.	4. 巻 In press.
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣瀬陽菜, 松崎英津子, 松本和磨, 水上正彦, 牛尾悟志, 二階堂美咲, 松本典祥, 阿南 壽.
2. 発表標題 各種逆根管充填材が血管内皮細胞の血管新生に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本歯科保存学会春季学術大会(第154回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎英津子, 廣瀬陽菜, 藤政清志朗, 二階堂美咲, 水上正彦, 松本典祥, 阿南 壽.
2. 発表標題 S1PおよびBMP-9がマウス歯乳頭由来幹細胞の骨芽細胞/象牙芽細胞分化に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本歯科保存学会秋季学術大会(第155回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruna Hirose, Etsuko Matsuzaki, Seishiro Fujimasa, Kazuma Matsumoto, Satoshi Ushio, Misaki Nikaido1, Masahiko Minakami, Noriyoshi Matsumoto, Hisashi Anan.
2. 発表標題 The effects of retrograde filling materials on the endothelial cell tube formation.
3. 学会等名 第19回日韓歯内療法学会学術大会(Web)
4. 発表年 2021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 日本歯科保存学会春季学術大会(第156回)
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 日本歯科保存学会秋季学術大会(第157回)抄録集,
4. 発表年 2022年

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リポソームが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
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 7. 松本典祥, 吉本尚平, 藤政清志朗, 廣瀬陽菜, 金丸慎吾, 松崎英津子.
2. 発表標題 ホスファチジルセリン含有リポソームと生体活性ガラスによる骨形成におけるマクロファージの局在.
3. 学会等名 日本歯科保存学会春季学術大会(第160回)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松本典祥, 吉本尚平, 藤政清志朗, 廣瀬陽菜, 金丸慎吾, 松崎英津子
2. 発表標題 ホスファチジルセリン含有リポソームと生体活性ガラスの骨形成におけるマクロファージの局在
3. 学会等名 日本歯科保存学会2024年度春季学術大会(第160回)
4. 発表年 2024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)	

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	吉本 尚平 (Yoshimoto Syouhei) (70780188)	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