

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17009

研究課題名（和文）メラトニン徐放性連通多孔体アパタイトー骨芽細胞複合体の骨形成能に関する研究

研究課題名（英文）A study on the osteogenetic capacity of Melatonin sustained release continuous interconnected porous hydroxyapatite ceramics and osteoblast complex

研究代表者

室積 博（Murozumi, Hiroshi）

広島大学・医系科学研究科（歯）・専門研究員

研究者番号：10881295

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：メラトニンは、ヒト顎骨由来骨芽細胞においてRunx2の発現を誘導することにより、骨分化誘導を促進させる。また、連通多孔体ハイドロキシアパタイト(IP-CHA)は、骨芽細胞の足場として機能し、骨芽細胞と複合体を形成することで生体親和性および骨伝導能を有し、骨組織再生を促進することをこれまでに報告してきた。

今回、メラトニン溶液にIP-CHAを浸漬することにより、長期間にわたるメラトニンの徐放性を有するメラトニン徐放性IP-CHAを作成した。メラトニン徐放性IP-CHA内で培養されたヒト顎骨由来骨芽細胞は、メラトニン非徐放性IP-CHAと比較して骨分化誘導に影響を及ぼすことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

松果体より分泌されるホルモンであるメラトニンは、未分化間葉細胞の分化や前骨芽細胞の分化を促進し骨形成に重要な役割を担うことが報告されている。また、IP-CHAは優れた骨伝導能を有する骨補填材として広く臨床応用されており、本材料と骨原性細胞複合体の研究も行われている。本研究ではメラトニン徐放性を有するIP-CHAを作成すること、及びヒト顎骨由来骨芽細胞の複合体を作成することにより、ヒト顎骨由来骨芽細胞の石灰化能を促進することを目的としており、新規の顎骨再生医療の開発につながる可能性も期待される。

研究成果の概要（英文）：Melatonin promotes osteogenic differentiation by inducing Runx2 expression in human jawbone-derived osteoblasts. In addition, We reported that Interconnected Porous Hydroxyapatite Ceramics(IP-CHA) function as a scaffold for osteoblasts and promote bone tissue regeneration has biocompatibility and osteoconductivity by forming a complex with osteoblasts. In this study, we created a melatonin sustained release IP-CHA that can sustain melatonin release over a long time by soaking IP-CHA in melatonin solution. It was revealed that human jawbone-derived osteoblasts cultured in melatonin sustained-release IP-CHA had a greater effect on osteogenic differentiation than melatonin non-sustained release IP-CHA.

研究分野：口腔外科学

キーワード：IP-CHA マイクロRNA 骨芽細胞複合体 メラトニン 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

咬合再建が不十分であると、摂食障害・構音障害などの機能的障害を惹起することとなり、QOL が低下する。近年、骨吸収の進行を伴った歯の欠損に対して、骨再生および歯科インプラントを応用した顎骨再建および咬合再建が必要とされてきている。これまで我々は、メラトニンが未分化間葉細胞の分化や前骨芽細胞の分化を促進し骨形成に重要な役割を担うことに着目し、メラトニンが MC3T3-E1 の石灰化の亢進や、インプラント周囲の新生骨の形成およびオッセオインテグレーションの促進に関与することを明らかとしてきた。また、メラトニンにより誘導される miR-181c-5p は Notch2 を標的遺伝子とし、Notch2 の転写を抑制することにより Runx2 の発現を促進し、その結果ヒト顎骨由来骨芽細胞の分化が促進されることを明らかとした。一方で、microRNA が、ヒト顎骨由来骨芽細胞の骨分化に及ぼす影響は十分に検討されていない。そのため、microRNA によるヒト顎骨骨芽細胞の分化制御機構の解明をおこなうこととした。さらにハイドロキシアパタイトなどの生体活性セラミックスは、機械的強度と細胞接着性を有している。その中でも連通気孔を有する多孔体ハイドロキシアパタイト (Interconnected Porous Hydroxyapatite Ceramics : IP-CHA) は気泡ゲル化技術の応用により製造され、その連通多孔対体構造により気孔内深部まで細胞が速やかに侵入することができ、すぐれた骨伝導能および骨形成能を示す骨補填材として、広く臨床応用されている。そのため申請者は、メラトニンなどの骨形成に関係する因子を IP-CHA 内に導入することにより、さらにヒト顎骨由来骨芽細胞の石灰化が促進される可能性があると考え、メラトニン徐放能を有する IP-CHA を作製し、IP-CHA 内で培養したヒト顎骨由来骨芽細胞の石灰化能についての検討を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、メラトニンやメラトニンにより誘導される microRNA を IP-CHA 内に導入することにより、ヒト顎骨由来骨芽細胞の石灰化能を促進させることを目的としている。また、ヒト顎骨由来骨芽細胞と IP-CHA の複合体の臨床応用や、microRNA によるヒト顎骨由来骨芽細胞の分化制御機構の解明により、microRNA を用いた新規の顎骨再生医療へ繋がる可能性も期待している。

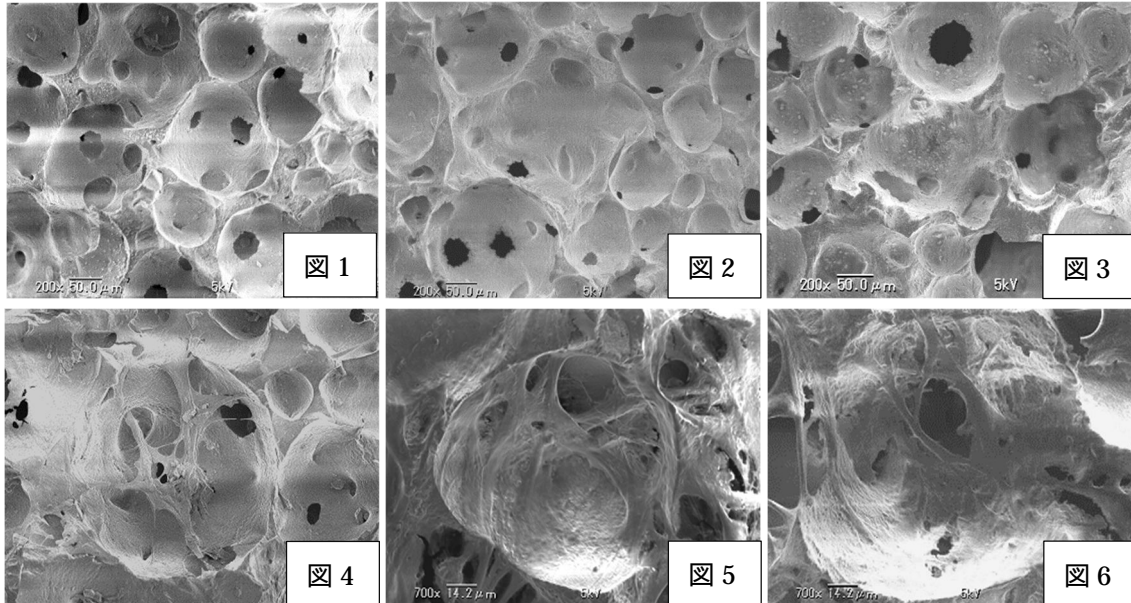
3. 研究の方法

本研究では、直径 7 mm 高さ 5 mm のディスク状の IP-CHA を用いた。メラトニンをジメチルスルホキシドに溶解し、PBS で希釈することにより調整したメラトニン溶液に IP-CHA を浸漬した後、常温にて 100mmHg の真空中に 24 時間静置することにより、メラトニン徐放性 IP-CHA を作製した。作製したメラトニン徐放性 IP-CHA を -MEM 培地に静置し、4 日毎の培地の交換および回収を 28 日間継続した。採取した培地を、ELISA 法を用いてメラトニンの濃度を測定した。また、作製したメラトニン徐放性 IP-CHA 上に、-MEM 培地を用いて懸濁したヒト顎骨由来骨芽細胞を滴下し 48 時間細胞培養を行うことにより、細胞導入を行った。細胞導入を行ったメラトニン徐放性 IP-CHA は、中性緩衝ホルマリンによる固定処理後、走査型電子顕微鏡による観察および Alizarin red 溶液を加え石灰化基質の測定を行った。また、10% 酢酸および 20% エタノール混合液を添加し得られた抽出液の波長 405nm における吸光度を測定した。

4. 研究成果

2021 年度は、1 μ M および 10 μ M 濃度のメラトニン溶液に浸漬したメラトニン徐放性の IP-CHA を作製した。1 μ M 濃度のメラトニン溶液に浸漬したメラトニン徐放性 IP-CHA において、4 日目では 31.5ng/ml、8 日目では 32.8ng/ml、12 日目では 6.2ng/ml、16 日目では 1.5ng/ml のメラトニンの徐放を認めた。20 日目ではメラトニンの徐放は確認されなかった。10 μ M 濃度のメラトニン溶液に浸漬したメラトニン徐放性 IP-CHA は、4 日目、8 日目ではメラトニンの濃度測定は困難であったが、12 日目では 522.4ng/ml、16 日目では 405.3ng/ml、20 日目では 112.4ng/ml、24 日目では 30.5ng/ml、28 日目では 5.3ng/ml と、高濃度のメラトニンが長期間にわたり放出されることが確認された。

2022 年度は、メラトニン非徐放性 IP-CHA と、メラトニン徐放性 IP-CHA 上にヒト顎骨由来骨芽細胞を播種し、IP-CHA およびヒト顎骨由来骨芽細胞複合体を作製した。メラトニン非徐放性 IP-CHA (図 1)、1 μ M 濃度のメラトニン溶液に浸漬したメラトニン徐放性 IP-CHA (図 2) および 10 μ M 濃度のメラトニン溶液に浸漬したメラトニン徐放性 IP-CHA (図 3) ならびにメラトニン非徐放性 IP-CHA とヒト顎骨由来骨芽細胞複合体 (図 4)、1 μ M 濃度のメラトニン溶液に浸漬したメラトニン徐放性 IP-CHA とヒト顎骨由来骨芽細胞複合体 (図 5)、10 μ M 濃度のメラトニン溶液に浸漬したメラトニン徐放性 IP-CHA とヒト顎骨由来骨芽細胞複合体 (図 6) を、走査型電子顕微鏡を用いて IP-CHA の表面性状の観察やヒト顎骨由来骨芽細胞の形態観察を行い、いずれの IP-CHA 内においてもヒト顎骨由来骨芽細胞が生着することを確認した。



2023年度は、メラトニン徐放性 IP-CHA 内において、石灰化誘導培地を用いて培養したヒト顎骨由来骨芽細胞における Runx2 の発現を蛍光免疫染色にて検討した。メラトニン非徐放性 IP-CHA 内では Runx2 の発現を認めなかった(図 7)。一方で、 $1\mu\text{M}$ 濃度のメラトニン溶液に浸漬したメラトニン徐放性 IP-CHA 内において、ヒト顎骨由来骨芽細胞の核内に Runx2 の発現を確認した(図 8)。メラトニン徐放性 IP-CHA またはメラトニン非徐放性 IP-CHA 内でヒト顎骨由来骨芽細胞を培養し、IP-CHA の断面を Alizarin red S にて染色した。 $1\mu\text{M}$ 濃度および $10\mu\text{M}$ 濃度のメラトニン溶液に浸漬したメラトニン徐放性 IP-CHA の断面において Alizarin red S の染色性が確認された(図 9)。さらに、比色定量法による Alizarin red 染色の定量を行った結果、メラトニン徐放性 IP-CHA は、メラトニン非徐放性 IP-CHA と比較して、OD 値が優位に高かった。

Runx2

DAPI

F-actin

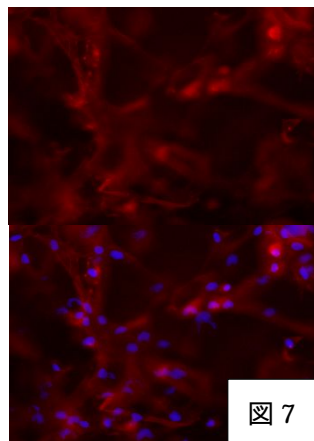


図 7

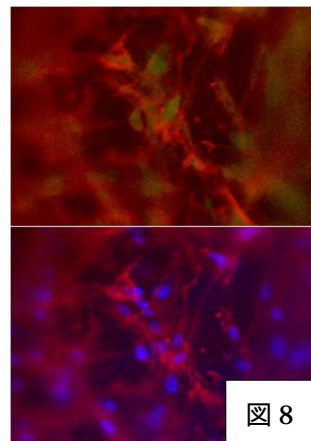


図 8

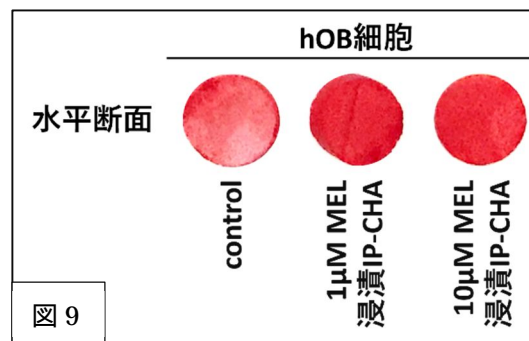


図 9

本研究を総括すると、メラトニン徐放性 IP-CHA は長期間にわたるメラトニンの徐放性を有しており、ヒト顎骨由来骨芽細胞の有用なスキャホールドであることが示唆された。

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