

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592218
 研究課題名（和文） 骨再生機序解明へのアプローチ -高気圧酸素負荷環境が骨代謝に与える影響-
 研究課題名（英文） Approach to the elucidation of bone regeneration mechanism -the effect of hyperbaric oxygen environment on bone metabolism-
 研究代表者
 佐々木 匡理（MASANORI SASAKI）
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：30346803

研究成果の概要（和文）：本研究では、高気圧酸素負荷環境が与えるさまざまな影響について、細胞レベルと動物実験モデルでの解析を行った。細胞レベルでは、高気圧環境、高濃度酸素環境は破骨細胞の増殖、分化に異なる作用機序で影響を与えることが示された。動物実験モデルでは、高濃度酸素環境が骨再生初期には新生骨形成を促進し、高気圧環境が新生骨形成を抑制する、相反した作用を持つことが示された。高気圧酸素環境は、両方の影響を反映しながら、骨再生に複雑に作用することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed for the various effects of hyperbaric oxygen environment affected the bone regeneration at the cellular level and animal models. At the cellular level, it suggested that hyperbaric air environment and high concentration oxygen environment were affected the different effects on the proliferation and differentiation of osteoclasts. In animal models, it was shown the conflicting effects that high concentration oxygen environment promotes new bone formation in initial period of bone regeneration, and hyperbaric air environment inhibits new bone formation. While reflecting the effects of both environments, it suggested that hyperbaric oxygen environment affects intricately to the bone regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科学研究費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：高気圧酸素負荷、骨再生

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域においては、1) 歯科インプラント関連手術、2) 顎変形症に対して行う骨形成術、3) 外傷や悪性腫瘍の手術によって生じる骨欠損部に対して行う骨移植術な

どのように骨に関する手術が多くの施設で行われている。これらの手術において、十分な骨形成や移植骨の生着を得るために、様々な施設で研究がなされており、骨代謝メカニズムの解明は極めて重要な課題である。

骨髄炎、循環障害、ガス壊疽、脊髄神経疾患、広範囲熱傷、皮膚移植など様々な疾患では、高気圧酸素療法を他の治療とともに行うことにより、治療効果を上げる手助けとなっている。多くの研究により、高気圧酸素療法の治療効果は血行障害の改善、低酸素状態の改善、またそれに伴う薬物の組織移行を良くすることによることが報告されている。また、近年では骨折の治療にも多く用いられており、治癒期間の短縮にもつながっている。このことから、血行や低酸素状態の改善などの機序以外に骨再生自体にも何らかの作用を及ぼしていることが十分に考えられ、高気圧酸素負荷環境が骨代謝に与える影響について研究することは十分に意義があると思われる。

平成 18~20 年度基盤研究 (C)「骨再生機序解明への新しい戦略—高気圧酸素負荷環境下における骨代謝について—」において、高気圧酸素負荷環境下での骨代謝に与える影響を骨芽細胞株、破骨細胞株を用いて研究を行ってきた。高気圧酸素負荷環境下では破骨細胞株の分化能が軽度増加し、成長因子・サイトカイン発現を調整して破骨細胞の分化抑制に関与する可能性が考えられた。さらに、骨移植モデルの動物実験では、高気圧酸素負荷環境下ではほとんど骨吸収が認められなかった。

これまでの研究結果から、高気圧酸素負荷環境が骨代謝に対して直接的に影響していることが示唆されたため、これらの結果について検証を行い、骨再生機序の解明への足がかりにしていきたいと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、高気圧酸素負荷環境において、酸素、圧がどのように骨代謝に影響しているか、動物実験モデルと細胞レベルで解析を行い、骨再生機序を解明することを目的としている。

本研究の第一の目的は、高気圧酸素負荷環境が骨代謝に及ぼす影響について、動物実験モデルでの骨形成状態と細胞レベルに対する効果を解析することにより、骨再生機序の解明の足がかりとすることである。第二の目的は、歯科インプラント関連手術、骨形成術や骨移植術などの術後への高気圧酸素療法の臨床応用を目的としている。

その方法としては、高濃度酸素負荷 (HCO) (95%O₂・5%CO₂)、高気圧負荷 (HBA) (room air/1.4 あるいは 2.0 気圧)、高気圧酸素負荷 (HBO) (95%O₂・5%CO₂/1.4 あるいは 2.0 気圧) の条件下における骨芽細胞株および破骨細胞株の増殖能、分化能 (分化マーカーなど)、各種成長因子やサイトカイン発現に対する解析を行い、圧や酸素濃度の影響について検討する。また、骨移植・骨形成モデルの動物

実験において、同様に負荷環境を変化させた時の骨形成状態を病理組織学的に評価する。最終的には、本研究の結果をもとに、骨再生を期待する様々な疾患に対する高気圧酸素療法の臨床応用への発展させていくことを考えている。

3. 研究の方法

われわれが開発した高気圧酸素負荷を与えられるチャンバー (図 1) を利用して以下の実験を行った。



図 1 実験用加圧チャンバー

(1) 動物実験モデルにおける骨形成に高気圧酸素負荷が与える影響

C57B6J マウス 6 週齢に対して、右側大腿骨にラウンドバーで φ1.2 mm 半球状の骨削除を行い、骨欠損モデルを作成する (図 2)。

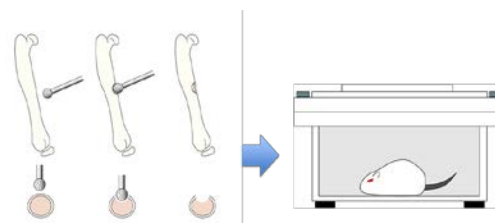


図 2 骨欠損モデルの作製

処置後翌日から、加圧チャンバーを用いて HBA (room air/1.4 あるいは 2.0 気圧)、HBO (95% O₂・5%CO₂/1.4 あるいは 2.0 気圧) 1 時間、または HCO (95% O₂・5%CO₂のみ) 1 時間を 1 日 1 回/14 日間行った。骨形成状態を刺激後に micro-CT scanner (Skyscan 1076: 東洋テクニカ、東京) を用いて CT 撮影を毎日行い、Skyscan 1076 専用の解析ソフト CT-analyser と CT-volume を用いて解析を行う。骨形成能は各マウスの Bone volume (BV) / Tissue volume (TV) を測定することにより評価した。また、各刺激後 5 日目もしくは 10 日目に大腿骨を取り出し、病理組織学的に比較検討する。コントロールとして同チャンバーを用いて、room air で加圧なしの状態のものを同様に解析して評価を行う。

(2) 高気圧酸素負荷環境における圧と酸素が細胞レベルに与える影響

マウスマクロファージ由来細胞株 RAW 264.7 (破骨細胞) を用いて以下の研究を行う。

① 細胞増殖に及ぼす刺激の影響

MTS アッセイ法を用いて、刺激条件下における RAW264.7 細胞の増殖能を評価した。RAW264.7 細胞を 96 穴プレートに各 3×10^3 個播種し、 α -MEM (100 μ l/穴) 中にて、37°C、5%CO₂、気相下で 12 時間培養を行い、翌日から HBA (room air/1.4 気圧)、HBO (95% O₂・5%CO₂/1.4 気圧)、HCO (95% O₂・5%CO₂のみ) で 20 分×1 日、20 分×3 日、20 分×7 日、60 分×1 日、60 分×3 日、60 分×7 日刺激を与えた。PBS (137 mM 塩化ナトリウム/8.10 mM リン酸水素二ナトリウム 12 水和物/1.47 mM リン酸二水素ナトリウム) で洗浄し、培養液 100 μ l と CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI, USA) 20 μ l を加え、37°C、5% CO₂、気相下で 3 時間インキュベートした後、その上清 100 μ l を新たな 96 穴プレートに採取し、マイクロプレートリーダー (東ソー、山口) で 595 nm の吸光度を測定した。

② 分化能に及ぼす刺激の影響

各刺激条件下での RAW264.7 細胞の分化能を、成熟破骨マーカーである TRAP 活性を計測することにより解析した。これには TRAP 染色キット (ホクド、北海道) を用いた。①と同様にプロトコールに従い、培養後に各刺激を与えた。培養後、培養上清 30 μ l に TRAP 染色キット中の発色基質溶液 170 μ l を加え、37°C で 3 時間加温し、その反応液の吸光度をマイクロプレートリーダーで、540 nm の吸光度を測定した。

③ mRNA 発現への影響

RAW264.7 細胞を 10 cm プレートに 4.5×10^5 個播種し、RANKL 100 ng/ml を加えた α -MEM (10 ml/枚) 中にて、37°C、5% CO₂、気相下で 12 時間培養を行った。①と同様に翌日からプロトコールに従い刺激を与えた。培養後、細胞を PBS にて一回洗浄後、TRIZOL® (Invitrogen) 1 ml を加えて室温で 5 分間インキュベートした。その後、クロロホルム 200 μ l を加えて 15 秒間激しく攪拌し、室温でさらに 3 分間インキュベート後、4°C、14,500 rpm、15 分間遠心して RNA を含む水層を約 600 μ l 採取した。この水溶液にイソプロピルアルコール 300 μ l を加えて混合し、室温で 10 分間インキュベート後、4°C、14,500 rpm、30 分間遠心して RNA を沈殿させた。上清を除去後、75% エタノール 1 ml でペレットを洗浄し、4°C、11,500 rpm、5 分間遠心してペレットを回収した。同ペレットを乾燥させた後、DDW 20

μ l に溶解した。その後、60°C で 10 分間加温し、3 分間氷冷した。分光光度計 (Ultraspec 3300 pro, Amersham Biosciences, USA) により RNA の濃度を測定した後、Light-cycler (Roche, 東京) を用いて測定を行った。プライマーの塩基配列、アニーリング温度、サイクル数は下記に示す (表.1)。

表 1 プライマーの塩基配列、アニーリング温度、サイクル数

遺伝子名	方向	塩基配列 (5'-3')	アニーリング温度 (°C)	サイクル数
β -actin	sense	5'-AGCACCATGAAGATCAAG-3'	64°C	45
	anti-sense	5'-GTAAACCCAGCTCAGTAA-3'		
NFATc1	sense	5'-GGGAGATGGAAAGCAAGACT-3'	66°C	55
	anti-sense	5'-AAGGTACGTGAAACGCTGG-3'		
c-Fos	sense	5'-CTGTCCGCTCTAGTCCCACTE-3'	66°C	55
	anti-sense	5'-AICTGTCTCCGCTTGGAGCGTAE-3'		
TRAP	sense	5'-ACGTGCCCACTGCTACA-3'	64°C	45
	anti-sense	5'-GGGGTCATCAACGAGTCTE-3'		
RANK	sense	5'-CATCACTCCGGGTTTAC-3'	64°C	45
	anti-sense	5'-GATACCTTACACACTCTTGG-3'		
TNF- α	sense	5'-CTCTTCTCATTCCTGCTTG-3'	64°C	45
	anti-sense	5'-GTCTGGGCCATAGACTGAE-3'		
C-FMS	sense	5'-ACAAGGCAGGCTGGAATA-3'	64°C	45
	anti-sense	5'-CCAGAGACGTCACAGAACAG-3'		

④ c-Fos と NFATc1 発現への影響

③と同様にプロトコールに従い、培養後に各刺激を与えた。培養後、細胞を PBS で洗浄し、Lysedlysis buffer 1000 μ l を加えて細胞を溶解し、10%Triton 100 μ l を加えて細胞のタンパク質抽出液を得た。この抽出液のタンパク質濃度を、分光光度計を用いて測定後、4°C、14,500 rpm、30 分間遠心し、上清に同量の Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, CA, USA) を加えて 5 分間煮沸し、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、20% メタノール/20 mM、トリリス/150 mM、グリシン (pH 8.8) 溶液内で、ニトロセルロース紙に 50 mV で 10 時間転写した。抗体のニトロセルロース紙への非特異的結合をさけるために、まずニトロセルロース紙を 5% スキムミルクで 1 時間前処理し、一次抗体として 200 倍希釈した NFATc1 抗体、c-Fos 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を 4°C で 24 時間作用させた。その後ペルオキシダーゼ標識二次抗体にて、1 時間反応後、Enhanced Chemiluminescence Reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) を作用させ、ChemiDoc XRS-J (Bio-Rad) にてバンドを撮影し、Quantity One software (Bio-Rad) にて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 動物実験モデルにおける骨形成に高気圧酸素負荷が与える影響

① 組織学的所見

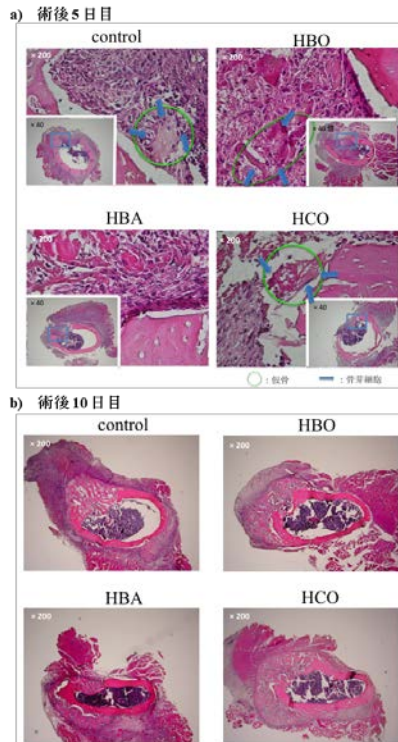


図 3 組織学的所見 (1.4 気圧)

図 3 に示すように、術後 5 日目においては各群の皮質骨削合部の断端表面に骨造成、吸収はみられなかったが、HBO 群、HCO 群、コントロール群において母床骨に連続しない骨芽細胞を伴う少量の仮骨の形成がみられた。HBA 群の骨欠損部は線維性結合組織で満たされており、仮骨の形成はみられなかった。各群において血管新生を認めた。術後 10 日目では、骨欠損部には、各群において明らかな差はなく、多量の新生骨が形成されていた。また、HBO 群、HBA 群、HCO 群では骨膜反応がみられたのに対し、コントロール群ではみられなかった。2.0 気圧も同様の結果であった。

② micro-CT による骨形成過程の評価

骨形成能は各マウスの Bone volume (BV) / Tissue volume (TV) を計測し、コントロールと比較して各群の平均 %BV/TV にて評価を行った。図 4 に示すように、HBO 群 (1.4 気圧) と HCO 群で術後 1 日目から 10 日目において有意に高く、HBA 群 (1.4 気圧) では術後 1 日から 21 日目まで有意に低かった。しかしながら、HCO 群は 11 日目以降から低い傾向を示した。それぞれの平均 %BV/TV は、HBO 群 (1.4 気圧) の 4、7、14 日目で

それぞれ 9.4%、24.6%、69.6%、HBA 群 (1.4 気圧) の 4、7、14 日目でそれぞれ 7.0%、21.0%、61.7%、HCO 群の 4、7、14 日目でそれぞれ 13.7%、25.9%、58.7%、コントロール群の 4、7、14 日目でそれぞれ 7.2%、22.3%、64.1% であった。それ以降の日数においては、各群とコントロール群との間に有意差はみられなかった。

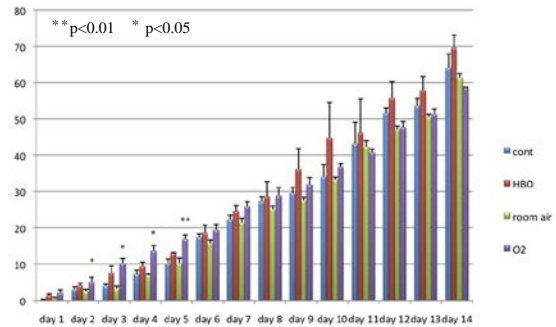


図 4 各群の平均 % BV/TV (1.4 気圧)

同様の解析を 2.0 気圧下で行ったところ、HBO 群 (2.0 気圧) はコントロール群と比較し術後 7 日目までは低く、術後 8 日目以降は常に高い傾向を示した。HBA 群 (2.0 気圧) ではコントロール群と比較し常に抑制傾向を示した。HCO 群の術後 4 日目からコントロール群と比較して高く、13 日目までは高い傾向を示すが、14 日目以降から抑制傾向を示した。それぞれの平均 % BV/TV は、HBO 群の 4、7、14 日目でそれぞれ 14.8%、22.2%、71.5%、HBA 群の 4、7、14 日目でそれぞれ 16.4%、17.8%、53.2%、HCO 群の 4、7、14 日目でそれぞれ 18.9%、32.9%、59.0%、コントロール群の 4、7、14 日目でそれぞれ 16.3%、24.6%、63.5% であり、1.4 気圧での解析結果と同様の結果が得られた。

以上の結果より、高濃度酸素環境が骨再生初期には新生骨形成を促進し、高気圧環境が新生骨形成を抑制する相反した作用を示しており、高気圧酸素環境はこの二つの影響を反映しながら骨再生に複雑に作用すると考えられた。

(3) 高気圧酸素負荷環境における圧と酸素が細胞レベルに与える影響

① 細胞増殖に及ぼす刺激の影響

MTS アッセイによる各群の吸光度の結果をコントロールと比較するために、コントロールを 100% として %コントロールで示し、各群間の比較を行った (図 5)。

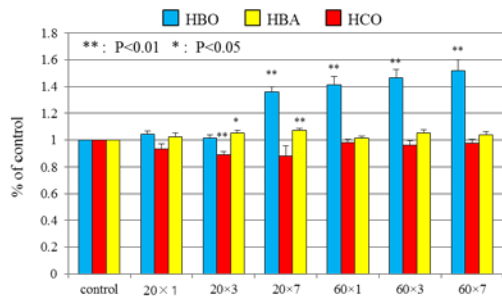


図 5 細胞増殖能に及ぼす影響

HBO 群においては、20 分 × 7 日、60 分 × 1 日、60 分 × 3 日、60 分 × 7 日で有意に高く、回数依存的に上昇がみられたが、20 分 × 1 日、20 分 × 3 日では有意差は認められなかった。HBA 群においては、20 分 × 3 日で有意に低く、その他では有意差は認められなかった。HCO 群においては、20 分 × 3 日、20 分 × 7 日で有意に高く、回数依存的に上昇がみられたが、その他では有意差はなかった。細胞増殖に及ぼす刺激の影響は、HBO 群、HCO 群で有意に増殖の促進がみられ、HBA 群においては 20 分 × 3 日で有意に低いものの、その他では有意差は認められなかった。

② 分化能に及ぼす刺激の影響

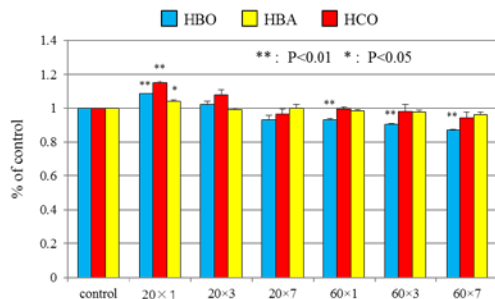


図 6 分化能に及ぼす影響

TRAP アッセイによる各群の吸光度の結果をコントロールと比較するために、コントロールを 100% として % コントロールで示し、各群間の比較を行った (図 6)。各刺激下において、HBO 群ではコントロールと比較すると 20 分で有意に高かったが、60 分 × 1 日、60 分 × 3 日、60 分 × 7 日では有意に低かった。HBA 群においては、コントロールと比較すると 20 分 × 1 日にて有意に高かったが、その他では有意差は認められなかった。HCO 群においては、コントロールと比較すると 20 分 × 1 日にて有意に高かったが、その他では有意差は認められなかった。分化能に及ぼす刺激の影響は、各群において 20 分の単回刺激で分化が促進されるが、回数依存的に抑制的に働く傾向があることが示された。

③ mRNA 発現への影響

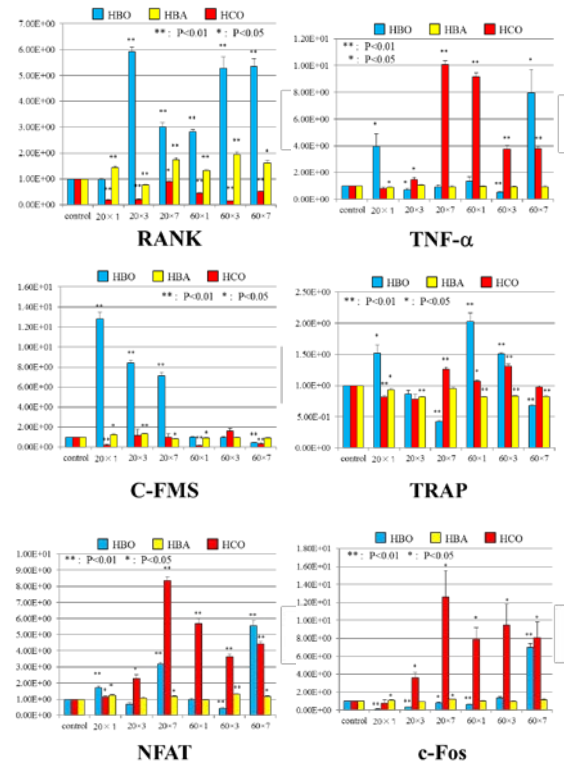


図 7 各刺激後の mRNA の解析

RAW264.7 細胞における RANK、c-Fos、NFATc1、TRAP、TNF- α 、C-FMS の発現を real time PCR にて評価を行い、% コントロールで解析してコントロールと比較した (図 7)。RANK の mRNA の発現は HBO 群、HCO 群において有意に増加し、HBA 群において有意に減少した。c-Fos は HBO 群の 20 分 × 1 日、20 分 × 3 日、60 分 × 1 日にて有意に減少したが、回数依存的に発現の増加がみられ、60 分 × 3 日、60 分 × 7 日においては有意に増加していた。また、HBA 群と HCO 群においても有意に発現の増加が認められた。NFATc1 は HBO 群の 60 分 × 3 日を除いて、すべての群において有意に発現の増加が認められた。TRAP は HBO 群において、単回刺激にて一度発現の増加が認められた後、回数依存的に減少していた。HBA 群においては 20 分 × 7 日、60 分 × 1 日、60 分 × 3 日で有意に増加したが、HCO 群において発現は有意に減少していた。TNF- α は HBO 群において、20 分 × 1 日、60 分 × 7 日にて有意に増加しており、HBA 群においても発現は有意に増加していたが、HCO 群においては 20 分 × 1 日で発現は有意に減少していた。C-FMS は HBO 群において、20 分 × 1 日、20 分 × 3 日、20 分 × 7 日で発現は有意に増加し、HBA 群において、20 分 × 1 日、60 分 × 1 日、60 分 × 7 日にて発現は有意に減少していた。HCO 群において、20 分 × 1 日、20 分 × 3 日にて発現は有意に増加し、20 分 × 7 日、60

分 × 1 日で有意に減少していた。

④ c-Fos と NFATc1 発現への影響

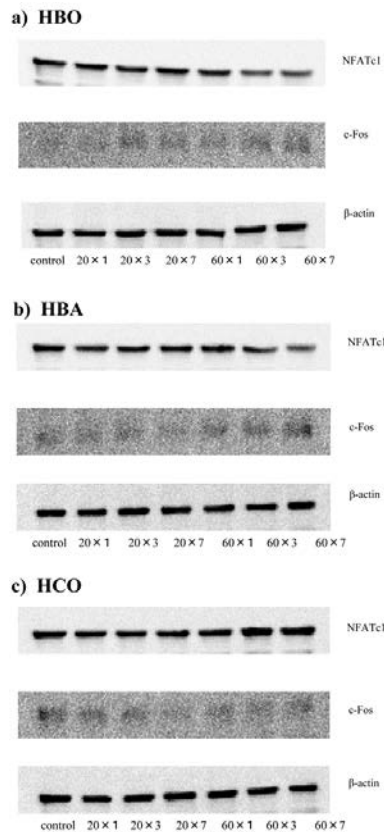


図 8 c-Fos と NFATc1 タンパク質発現への影響

c-Fos と NFATc1 の発現について Western blot assay を行った (図 8)。c-Fos は 42～50-kDa、NFATc1 は 83～119-kDa の間に発現がみられた。c-Fos は real time PCR の結果と同様の傾向を示したが、NFATc1 に関しては real time PCR の結果と反する傾向を示した。

以上の結果により、各刺激は異なる作用機序で骨再生に関与することが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 匡理 (SASAKI MASANORI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30346803

(2)研究分担者

高橋 富美 (FUMI TAKAHASHI)

九州大学・医学(系)研究院(研究科)・
講師

研究者番号：50274436

梶岡 俊一 (SHUNICHI KAJIOKA)

九州大学・医学(系)研究院(研究科)・
特任准教授

研究者番号：90274472