

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17064

研究課題名（和文）フィブリンゲルによるM2マクロファージ誘導機構の解明と根尖歯周組織再生への応用

研究課題名（英文）Mechanisms of M2 macrophages Induction by fibrin hydrogels and their application in apical periodontal tissue regeneration

研究代表者

相原 良亮（Aihara, Ryosuke）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60886711

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）：フィブリンゲルを骨欠損部位に埋入することで、創傷部位にM2マクロファージを誘導し、炎症抑制の方向へ働きかけることで骨再生が増進されるということがわかった。またフィブリンゲルには炎症急性期の組織状態、つまりはLPSが組織中に存在している環境でも、M2マクロファージ優位のような炎症抑制の状態へ移行させる機能があるということがわかった。また、象牙芽細胞株とフィブリンゲルを共培養した場合のRNA-seqを行った。その結果、フィブリンゲルと共培養した場合の細胞株と、通常の培養方法では明らかに発現する遺伝子が異なっており、特に炎症や分化などの面で影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者の血液からフィブリンゲルを作成して再生治療に用いた症例が報告されているが、治療効果が不安定なため現状では再生医用材料としては不十分である。フィブリンゲルによる安定した効果が得られない理由として、組織創傷部位へのフィブリンゲルの作用機序が十分に解析されていないことが挙げられる。しかし我々の研究結果により、*vitro*で作成したフィブリンゲルでも強いM2マクロファージ誘導能があり、それによって骨再生が増強されるということが示唆された。この結果はフィブリンゲルの再生医用材料への応用においても有意義であるが、フィブリンの生体機能の解明という点でも学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Our research revealed that by implanting fibrin hydrogels into bone defect sites, M2 macrophages were induced at the wound site, promoting bone regeneration by acting towards inflammation suppression. Additionally, fibrin gel has the function of transitioning the tissue state during the acute phase of inflammation, specifically in environments where LPS is present in the tissue, to an inflammation-suppressing state dominated by M2 macrophages. Furthermore, RNA-seq was performed on odontoblast cell lines co-cultured with fibrin hydrogels. The results showed that the genes expressed in the cell lines co-cultured with fibrin gel were significantly different from those in the standard culture method, suggesting a potential impact on inflammation and differentiation.

研究分野：歯内治療学

キーワード：M2マクロファージ フィブリンゲル 骨再生 炎症制御

## 1. 研究開始当初の背景

適切な歯内療法により根尖部の骨吸収は創傷治癒するが、炎症応答・免疫応答が亢進し骨吸収がクリティカルサイズ(直径 10 mm)を超えると癒痕化し骨組織が元に戻らないことが臨床上の大きな課題となっている。病的な骨吸収は過剰な炎症応答・免疫応答の結果であり、根尖性歯周炎における骨吸収は細菌を含む根管内容物が抗原として根尖歯周組織の免疫細胞に認識されることから始まる。免疫応答が始まると、外来異物に対する食細胞動員、細菌除去、サイトカイン産生とその調節、そして抗原提示細胞による T 細胞活性化などが生じる。

炎症応答・免疫応答の過程では、マクロファージが産生する IL-1 や TNF- $\alpha$  などのサイトカインによって破骨細胞が活性化され骨吸収が進むが、近年、マクロファージは炎症促進のみではなく、少なくとも 2 つのサブタイプ、すなわち M1 マクロファージ(炎症性マクロファージ)と M2 マクロファージ(抗炎症性マクロファージ)が存在し異なる機能を発揮することが明らかにされた。M2 マクロファージは、ヘルパー T 細胞である Th2 から分泌される IL-4 および IL-13 により誘導され、IL-10 を産生することで炎症制御や炎症後の組織修復などに関与する。

近年、患者の血液から作成されるフィブリンを用いて行われる多血小板血漿療法が様々な再生医療の現場で使用されていたが、詳しいメカニズムは解明されていなかった。しかし共同研究者である京都大学・田畑らによって、フィブリンゲルが M2 マクロファージを誘導することが明らかにされている。

## 2. 研究の目的

申請者が所属する研究グループでは、生体活性バイオセラミックスである Bioactive Glass (BG) に着目し、歯髄・根尖歯周組織の創傷治癒・再生治療用の BG 配合生体材料の開発を進めている。現在、BG と生体吸収性バイオセラミックスである TCP から両者の特徴を併せ持つ粒子を作成し、再生医用材料であるゼラチン・ハイドロゲルと組み合わせた根尖歯周組織再生用スキャフォールドを開発している。これが実用化されれば直径 10 mm 以上の骨欠損にも応用できる。一方で、組織再生にとって最適な環境構築に必須である炎症制御に関する研究はこれまで十分に行われていない。

本研究の目的は、積極的に炎症制御を行うことが可能であることが示されているフィブリンゲルによる M2 マクロファージ誘導メカニズムの基礎的解明を行うとともに、フィブリンゲル誘導性 M2 マクロファージが産生するサイトカインが骨を含む根尖歯周組織に及ぼす影響を明らかにすることである。生体親和性の高いフィブリンゲルを応用し、局所に生じている炎症優位なステージから組織再生ステージに移行させるシステムを解明することにより、上記のような再生医用材料がより生着しやすくなることを目的とする。

## 3. 研究の方法

【計画 1: LPS 存在下におけるフィブリンゲルの未分化マクロファージに及ぼす影響の検証】

フィブリンゲルでコーティングした細胞培養ウェル上に未分化マクロファージを播種し、共培養する際に M1 マクロファージへ分化するのに十分な濃度の LPS を添加する。比較対象として未分化マクロファージへ LPS のみ添加した群と、フィブリンゲル上に未分化マクロファージを播種した群を作成した。3 日間培養した後、ELISA 法によりそれぞれの培養液中の TNF- $\alpha$  および IL-10 を確認した。その際、TNF- $\alpha$  を産生する細胞を M1 マクロファージ、IL-10 を産生する細胞を M2 マクロファージとして解析を行った。

【計画 2: フィブリンゲルを用いた動物実験】

既に動物実験モデルとして確立されているラット頭蓋冠骨欠損モデルにフィブリンゲルを埋入した。比較対照群には何も埋入しなかった。11 週間後にラットを屠殺し、当該組織を採取した。その後、軟エックス線撮影および HE 染色にて骨再生の程度を比較した。

さらに、骨欠損部位に M2 マクロファージが増加しているかを検証するため、ラット頭蓋冠骨欠損モデルを作成した後から 1 週間後に、骨欠損部位の軟組織を採取して RNA を抽出した。その RNA を用いて M2 マクロファージのマーカーである CD163、CD204、CD206 の発現を Real-Time PCR にて control 群と比較した。

【計画 3: フィブリンゲルがマクロファージ及び硬組織形成細胞に与える影響の解析】

フィブリンゲルでコーティングした培養ウェルでラット象牙芽細胞様細胞株 (KN-3) を 3 日間培養し回収した。その後、RNA シーケンスによる網羅的解析を行った。今後はマウス骨髄由来マクロファージ (BMDMs)、ヒト骨芽細胞 (HOB)、ヒトセメント芽細胞 (HCEM)、ヒト歯根膜細胞 (HPDLC) で同様の実験を行う予定である。

## 4. 研究成果

計画 1: LPS が存在する環境下においてフィブリンゲル上で未分化マクロファージを培養すると、フィブリンゲルが存在しない場合と比べて M1 マクロファージが減少し、M2 マクロファージが増加するということがわかった。この結果により、創傷部位が急性炎症下であってもフィブ

リングルが M2 マクロファージへ移行させる可能性が示唆された (図 1)。

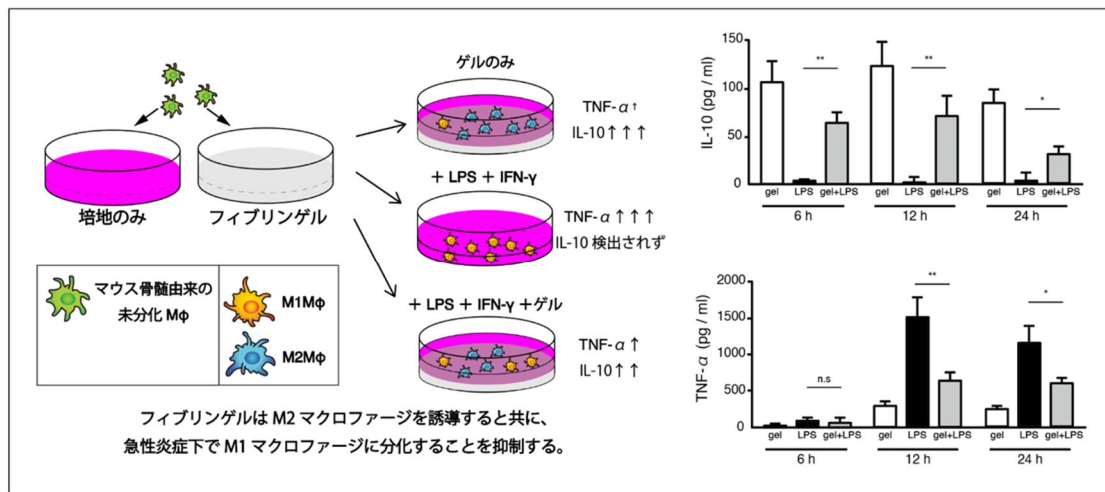


図 1

計画 2 : ラット頭蓋冠骨欠損モデルにフィブリンゲルを埋入し、11 週後に組織を回収した。軟エックス線で回収した組織を撮影し、ImageJ にて骨組織の再生量を解析したところ、ゲルを埋入した側で骨再生の増強が確認された (図 2)。フィブリンゲルを埋入する際は、組織が入り込む隙間を与えるため、骨欠損内にあえて空間を作るように配置した。HE 染色でも同様の結果が得られたがデータは割愛する。

またフィブリンゲルを埋入してから 1 週間後に骨欠損部の組織を回収して Real-Time PCR を行ったところ、ゲル埋入側で CD163、CD204、CD206 の発現が上昇した。このことは M2 マクロファージがゲル埋入側で増殖していることを示唆しており、フィブリンゲルが M2 マクロファージを誘導した

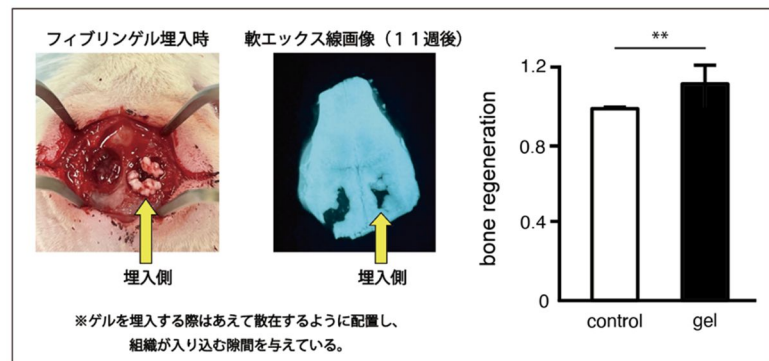


図 2

したことにより組織の炎症が抑制され、骨再生が促進されたことが示された。

計画 3 : フィブリンゲルとラット象牙芽細胞様細胞株 (KN-3) を 3 日間培養した RNA を用いて RNA-seq を行ったところ、細胞株のみで培養した control 群と比較して遺伝子発現が全く異なっていることが明らかになった (図 3)。

さらに GO 解析を行ったところ、ゲルと共培養した群では免疫応答に関する遺伝子や細胞の接着に関わる遺伝子が増加していた。さらに細胞増殖に関する遺伝子が低下し、分化に関する遺伝子は増加していた。この結果により、KN-3 がフィブリンゲルと接着したことにより異物に対する反応が起こり、細胞が分化したのではと考えている。今後はこの遺伝子群をさらに詳しく解析するとともに、他の細胞でも同様の RNA-seq を行っていく。最終的には RNA-seq で得られたヒントをもとに、フィブリンゲルと口腔組織細胞とを繋げる遺伝子を詳しく解析する予定である。

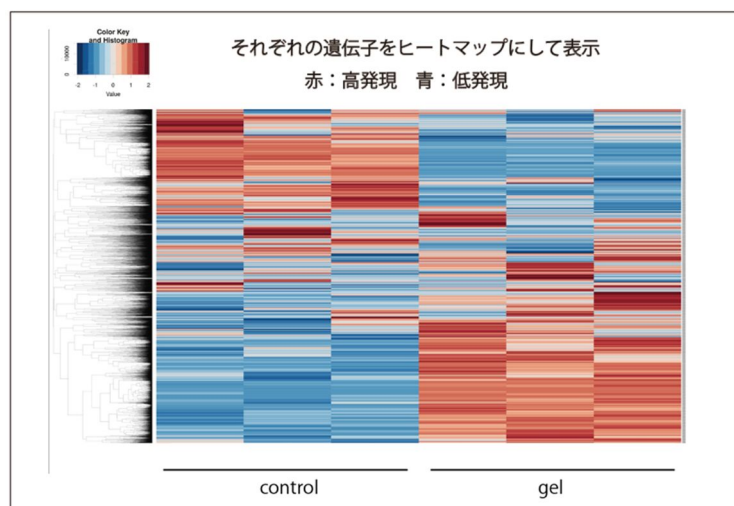


図 3

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 相原良亮
2．発表標題 ラット頭蓋骨欠損部の創傷治癒プロセスに及ぼすフィブリンゲルの影響
3．学会等名 日本歯科保存学会2022年度秋季学術大会
4．発表年 2022年

1．発表者名 相原良亮
2．発表標題 フィブリンゲルによって変化する骨欠損部位の組織再生
3．学会等名 日本歯科保存学会2023年度秋季学術大会
4．発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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