

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792215

研究課題名(和文) 抗アポトーシスタンパクHSP27の細胞内導入法を用いた効果的な骨造成法の開発

研究課題名(英文) Development of the effective bone augmentation using intracellular transfection of an anti-apoptosis protein HSP27

研究代表者

川崎 真依子 (Kawasaki, Maiko)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40584587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は骨増成法に併用される細胞移植時の移植細胞アポトーシスを抑制する方法として抗アポトーシスタンパクHSP27の移植骨芽細胞への影響を解析した。マウス骨芽細胞を用いたin vitroの実験系においてHSP27一過性過剰発現は分化能、石灰化能に大きな変化はみられなかったが、骨芽細胞のアポトーシスを抑制した。さらに、移植細胞への影響を解析するために行ったラット頭蓋欠損部細胞移植実験では、移植細胞のアポトーシスが抑制および生存細胞中の細胞増殖マーカーの発現上昇が確認された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, to explore a new way of cell transplantation for bone augmentation, we evaluate the application of HSP27, an anti-apoptotic protein to the transplanted cell. The over expression of HSP27 did not affect the cell proliferation and mineralization ability of osteoblast, however, apoptosis was diminished by the over expression of HSP27. Furthermore, transplanted cell apoptosis was also inhibited and proliferation marker expressing cells were increased at the initial stage of cell transplantation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：HSP27 骨芽細胞 アポトーシス トランスフェクション法 骨増成

1. 研究開始当初の背景

歯槽骨における骨増成法はデンタルインプラントの適応症例を大幅に拡大する方法として広く使われている方法である。自家骨移植以外の骨増成法として骨形成を担う骨芽細胞の移植、骨伝道能を有する材料の移植、骨芽細胞の分化を促進する増殖因子の添加およびこれらの方法の組合せが試みられてきた。新潟大学医歯学総合病院インプラント治療部では、デンタルインプラントの前処置として行われる骨増成手術の際、事前に患者より採取した骨膜組織を実験室にて細胞シートとして増殖させ、自家移植材として使用して良好な臨床結果を得ている。

骨増成を期する細胞移植の際、移植細胞の早期生着ならびにその活性は臨床的予後を左右する大きな要因の一つである。しかしながら、骨移植過程において細胞はストレス環境にさらされ、アポトーシスにより移植細胞が減少し、移植の効果を制限している可能性がある。

Heat Shock Protein (HSP) は各種刺激に誘導されるストレスタンパクの1つで、抗アポトーシス作用を示すことが知られている。その中でも分子量 27kDa 付近の HSP27 はこれまでの我々の研究から非刺激時での骨芽細胞における発現量が極めて低いのに対し、各種刺激に応答して発現することが確認されており、骨芽細胞においてストレス応答に関与している可能性が考えられる。

以上の背景を踏まえ、我々は移植前に抗アポトーシスタンパク HSP27 を細胞内に事前に発現させることでアポトーシスを抑制し効果的な骨増成のための細胞移植法を開発できる可能性があるとして着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞移植における移植細胞の初期の挙動を明らかにするとともに、ストレスタンパク Heat Shock Protein (HSP)

27 の導入による骨芽細胞への影響を解析し、新規細胞移植法確立への可能性を探る事である。

3. 研究の方法

1) 骨芽細胞における HSP27 の影響解析

骨芽細胞株 MC3T3-E1 に HSP27 一過性発現ベクター、pCMV-SPORT6-mHSP27 を一過性に導入し、HSP27 の過剰発現を行った。HSP27 過剰発現骨芽細胞における細胞増殖能の評価は MTS 法にて行い、骨芽細胞分化の評価には Alkaline Phosphatase (ALP) 活性染色を、石灰化能の評価には Alizarin Red 染色を用いた。各種骨芽細胞分化マーカーの発現解析は *realtime* PCR にて解析した。アポトーシスは TNF- α 及び H₂O₂ にて誘導した。アポトーシスの検出には TUNEL 染色を用い、総細胞数あたりの TUNEL 陽性細胞率を算出した。

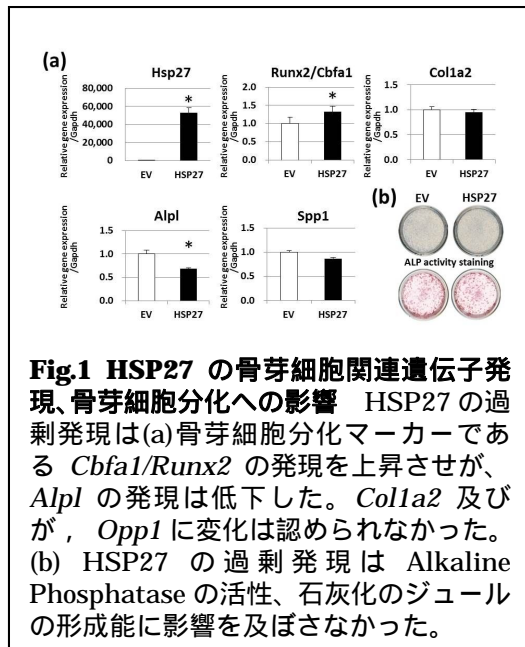
2) 移植骨芽細胞への HSP27 の影響解析

細胞移植実験には、雄性 9 週齢免疫不全ラット (F344/NJcl-rmu) を使用し、トレファンバーにて頭蓋骨に直径 4.3mm の骨欠損を作成した。HSP27 過剰発現骨芽細胞をコラーゲンに混和したものを移植体とし、欠損部に移植した。1、3、7、28 および 42 日目に屠殺し、骨形成を μ -CT および組織学的手法により評価した。

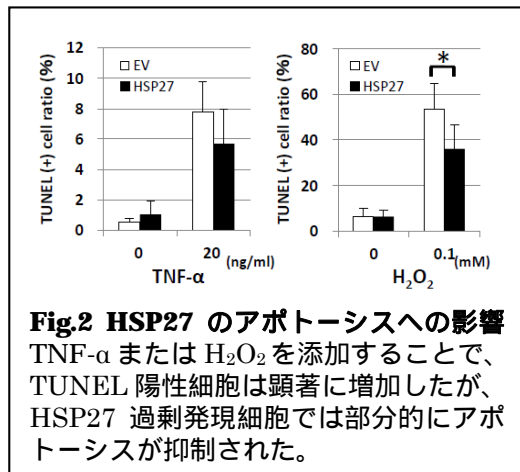
4. 研究成果

1) 骨芽細胞における HSP27 の影響

一過性過剰発現ベクターを用いた HSP27 の過剰発現は骨芽細胞増殖能に影響を及ぼさなかった。骨芽細胞分化については、HSP27 過剰発現により Runx2/Cbfa1 遺伝子の発現量は増加したものの、Alpl 遺伝子は減少していた。ALP 活性および石灰化能に影響は認められなかった。(Fig.1)



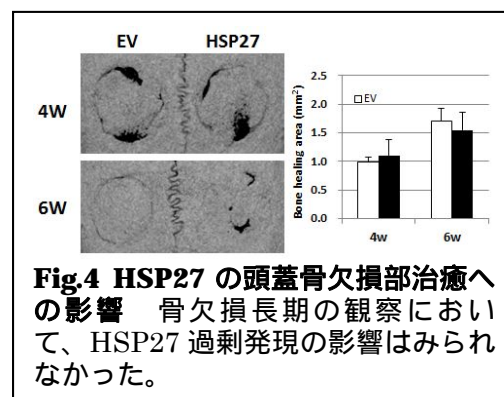
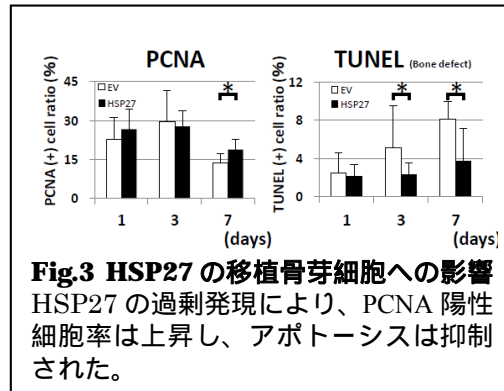
また HSP27 の過剰発現は H_2O_2 に誘導されるアポトーシスを有意に抑制したものの、TNF-alpha に誘導されるアポトーシスの抑制について統計的有意差は認められなかった。(Fig.2)



さらに、HSP27 過剰発現骨芽細胞のラット頭蓋骨欠損部への移植野におけるアポトーシスを TUNEL 染色にて検出したところ、3 および 7 日後においては HSP27 過剰発現により TUNEL 陽性細胞率が有意に減少していた。細胞増殖能を示す PCNA 陽性細胞率は移植 7 日後において HSP27 過剰発現細胞が有意に高値を示した。(Fig.3)

しかしながら、移植 4, 6 週後の移植野における新生骨量をマイクロ CT にて解析したところ、両群間において有意差は認めら

れなかった。(Fig.4)



本研究では抗アポトーシス遺伝子である HSP27 を移植骨芽細胞に導入して、より効果的な骨増成を期する試みを行ったが、細胞の生存率は向上したものの、最終的な新生骨量に変化は見られなかった。骨形成能を有する細胞の移植は盛んに試みられているものの、本研究結果でも見られるように、その効果については依然として議論が分かれるところである。移植細胞の生存率を改善することによる効率的な骨増成を今後臨床応用に直接結び付けるためには、より長期的な解析と、骨形成の場における移植細胞の直接的な寄与についても検討することが必要であろう。

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 7 件)

1. Kawasaki M, Porntaveetus T, Kawasaki K, Oommen S, Otsuka-Tanaka Y, Hishinuma M, Nomoto T, Maeda T, Takubo K, Suda T, Sharpe PT, Ohazama A: R-spondins/Lgrs expression in tooth development. Dev Dyn. 2014 Mar 10. doi: 10.1002/dvdy.24124. [Epub ahead of print] 査読有り

2. Angelova Volponi A, Kawasaki M, Sharpe PT: Adult Human Gingival Epithelial Cells as a Source for Whole-tooth Bioengineering. J Dent Res. 2013 Apr;92(4):329-34. doi: 10.1177/0022034513481041. Epub 2013 Mar 4. 査読有り

3. Khonsari RH, Ohazama A, Raouf R, Kawasaki M, Kawasaki K, Porntaveetus T, Ghafoor S, Hammond P, Suttie M, Odri GA, Sandford RN, Wood JN, Sharpe PT. Multiple postnatal craniofacial anomalies are characterized by conditional loss of polycystic kidney disease 2 (Pkd2). Hum Mol Genet. 2013 May 1;22(9):1873-85. doi: 10.1093/hmg/ddt041. Epub 2013 Feb 5. 査読有り

4. Khonsari RH, Seppala M, Pradel A, Dutel H, Clément G, Lebedev O, Ghafoor S, Rothova M, Tucker A, Maisey JG, Fan CM, Kawasaki M, Ohazama A, Tafforeau P, Franco B, Helms J, Haycraft CJ, David A, Janvier P, Cobourne MT, Sharpe PT: The buccohypophyseal canal is an ancestral vertebrate trait maintained by modulation in sonic hedgehog signaling. BMC Biol. 2013 Mar 28;11(1):27. 査読有り

5. Otsuka-Tanaka Y, Oommen S, Kawasaki M, Kawasaki K, Imam N, Jalani-Ghazani F, Hindges R, Sharpe PT, Ohazama A: Oral lining mucosa development depends on mesenchymal microRNAs. J Dent Res. 2013 Mar;92(3):229-34. doi: 10.1177/0022034512470830. Epub 2012 Dec 14. 査読有り

6. Oommen S, Francois M, Kawasaki M, Murrell M, Kawasaki K, Porntaveetus T, Ghafoor S, Young NJ, Okamatsu Y, McGrath J, Koopman P, Sharpe PT, Ohazama A: Cytoplasmic plaque formation in hemidesmosome development is dependent on SoxF transcription factor function. PLoS One. 2012;7(9):e43857. doi: 10.1371/journal.pone.0043857. Epub 2012 Sep 4. 査読有り

7. Oommen S, Otsuka-Tanaka Y, Imam N, Kawasaki M, Kawasaki K, Jalani-Ghazani F, Anderegg A, Awatramani R, Hindges R, Sharpe PT, Ohazama A: Distinct roles of microRNAs in epithelium and mesenchyme during tooth development. Dev Dyn. 2012 Sep;241(9):1465-72. doi:

10.1002/dvdy.23828. Epub 2012 Jul 24. 査読有り

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
川崎 真依子(Maiko Kawasaki) (新潟大学・医歯学総合病院・助教)

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：