

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593054

研究課題名(和文)骨内環境再現システムを利用した骨粗鬆症治療モデルの開発

研究課題名(英文)Development of a treatment model for osteoporosis using an inner bone environment system

研究代表者

山近 英樹(Yamachika, Eiki)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：10294422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の研究期間全体を通じては、(1)間葉系幹細胞のなかでも骨系細胞へ誘導しやすい細胞は、CD34+, c-Kit+, Sca1+細胞であること。(2)間葉系幹細胞のスキャホールドとしては、1200℃で焼成したβ-TCPに直径300 μmの貫通孔を付与したものが有効であること。(3)これに間葉系幹細胞を含む骨由来細胞を貫通孔に入れ込み移植体とした「骨内環境再現システム」を用いた実験より、骨粗鬆症とその治療薬によりT細胞が影響を受けており、特にγ-T細胞が影響を受けていること、そしてそこにはWnt10bが影響している可能性があること。などを解明した。

研究成果の概要(英文)：Our 3-year research study described that (1) CD34+, c-kit+, Sca1+ mesenchymal stem cells were easy to be differentiated to bone like cells. (2) Most suitable conditions for making beta-TCP as a mesenchymal stem cells scaffold were 1200C calcination temperature and through-holes structure with diameters of 300 micro-m. (3) Results from the study of our inner bone environments system showed that T cells especially gamma-delta T cells were affected by anti-osteoporosis drug and this mechanism may be explained by the Wnt10b cell signaling.

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨 骨粗鬆症 間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は骨恒常性の不調和により骨吸収が骨増生に勝る疾患である。内分泌系、神経系、免疫系システムが複雑に関連しており病態の全容は未だ解明されていない。研究開始当初、骨細胞が骨内環境の恒常性維持に重要な役割をはたす報告や(引用文献)、骨内膜ニッシュにより造血幹細胞が制御される報告(引用文献)があり、骨恒常性維持には骨細胞、骨内膜ニッシュ、造血幹細胞などの相互作用の重要性が認識されるようになっていた。また我々はすでに、骨内環境の恒常性維持に重大な役割をはたす骨内膜細胞を骨組織から単離する方法を確立しており、さらに骨内微小環境を再現可能な貫通孔をもつハニカム-TCPの開発にも成功していた。

### 2. 研究の目的

本研究は、樹立した骨内膜細胞と開発したハニカム-TCPを用いて「骨内環境再現システム」を構築し、生体内に骨髄を有する骨組織を機能させて骨粗鬆症の病態解明と治療モデルの開発を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨内膜細胞の採取および細胞膜抗原精査

マウス骨内膜細胞を BD FACSAria II により CD34+, c-Kit+, Sca1+ 細胞を cell sorting system により分取した。その後 CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105, CD117, Nanog の発現を確認し間葉系幹細胞を単離した。

#### (2) 骨系前駆細胞への誘導

上記で得られた細胞を骨芽細胞誘導培地および我々が開発している固定化 rhBMP-2 により骨系前駆細胞へ誘導した。

#### (3) 骨系前駆細胞への分化確認

上記で得られた細胞群を骨誘導ゲル培地内で培養して、骨関連タンパク、遺伝子などの発現を確認した。骨関連タンパクの発現は、ALP、Type I collagen, Osteopontin, Osteocalcin, などを培養細胞の免疫組織染色、培養液の ELIZA により確認した。またこれらの mRNA 発現については、RT-PCR にて確認した。

#### (4) -TCP の構造、性状の検討

リン酸水素カルシウムをリン酸カルシウムと混ぜ、直径 300 μm の貫通孔を付与し、1 mm × 4 mm × 4 mm の長方形とした slurry を、焼成温度を 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1500 として焼成した。得られた -TCP は、X 線回折および SEM による解析にて表面性状を検討した。

#### (5) 「骨内環境再現システム(スキャホールド)」での細胞間相互作用の確認

骨系前駆細胞へ誘導した細胞を -TCP 内に混和し作成した「骨内環境再現システム(スキャホールド)」を、マウスに移植して、移植したシステムに対する生体反応を組織学

的に観察した。

#### (6) 骨粗鬆症および骨粗鬆症治療薬がマウスリンパ球に与える影響の精査

卵巣摘出(OVX)にて作製した骨粗鬆症マウスに、骨粗鬆症治療薬を投与し末梢血および脾臓細胞、胸腺細胞について CD45, CD3e, CD19, CD49b, CD11c, CD4, CD8a でラベルし FACS Canto で解析をおこなった。また大腿骨を組織学的および μCT による X 線学的解析、さらにマウス末梢血の血清より G-CSF, IFN, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL7, IL9, IL10, IL12(p40), IL-12(p70), IL-15, IL-17, VEGF, TNF の血中濃度測定を行った。

#### (7) 骨粗鬆症および骨粗鬆症治療薬がマウス造血細胞に与える影響の精査

卵巣摘出(OVX)にて作製した骨粗鬆症マウスに、骨粗鬆症治療薬を投与し、骨髄細胞を Notch1, CD3, CD45, Ikaros, Pax5, でラベリングを行い、骨粗鬆症の病態が造血幹細胞にあたる影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 骨髄細胞および骨内膜細胞を採取し播種し培養した 12 時間後の細胞の形状は、骨髄細胞では少数の小型類円形の細胞と少数の線維芽細胞様細胞を認めた。一方骨内膜細胞では、多数の小型立方細胞と少数の小型類円形の細胞と線維芽細胞様細胞を認めた。フラスコ上に接着し培養できる細胞は骨内膜細胞の方が骨髄細胞より多かった。3 日間培養後の細胞の形状については、骨髄細胞では多数の小型で類円形の細胞と少数の線維芽細胞様細胞を認めた。一方、骨内膜細胞では多数の線維芽細胞様細胞、小型立方細胞が混在しており、一部に線維芽細胞様細胞を feeder 細胞とするかのように小型類円形、小型立方細胞が重層する部位を認めた。培養後のフラスコ上に観察できる細胞は、骨内膜細胞の方が多く、とくに線維芽細胞様細胞、小型立方細胞が多かった。

こうして培養して得られた細胞をそれぞれフローサイトメトリーにて解析すると、骨髄由来細胞では血液細胞 lineage 陽性率は約 90%、骨内膜細胞では血液細胞 lineage 陽性率は約 40% で有意差を認めた。

骨髄細胞、骨内膜細胞のそれぞれを lineage 陰性細胞と lineage 陽性細胞に分けてソーティングすると、lineage 陰性細胞は線維芽細胞様でプラスチックプレートに強い接着性を示した。一方 lineage 陽性細胞はプラスチックプレートに接着しない小型の円形細胞が大部分を示した。

ソーティングで、マウス 1 匹より得られる大腿骨骨髄由来 lineage 陰性細胞は平均約 1 万個であったが、大腿骨内骨膜由来 lineage 陰性細胞は平均約 40 万個で有意差を認めた。この骨内骨膜由来 lineage 陰性細胞は、CD34+, c-Kit+, Sca1+ 細胞であることが確認された。

(2)上記で作製される、CD34+、c-Kit+、Sca1+、lineage-細胞をグリセロフォスフェートおよびアスコルビン酸含有の骨誘導培地およびrhBMP-2により、骨芽細胞へと誘導し培養した。この細胞が骨芽細胞への誘導能を持つことはアリザリンレッド染色により確認された。

なお、このCD34+、c-Kit+、Sca1+、lineage-細胞は軟骨誘導培地および脂肪誘導培地によってもそれぞれに誘導されることが確認された。

(3)骨誘導ゲル培地内による異所性骨形成実験では、担体へマウス1匹分の大腿骨骨髓由来 lineage 陰性細胞約1万個を移植した実験群における骨形成は確認されなかった。しかし、担体へマウス1匹分の大腿骨内骨膜由来 lineage 陰性細胞約40万個を移植した実験系では、小型の骨様構造の形成を認めた。また、一部に骨髓腔様の構造をもつ骨が形成された。さらに、形成された骨においては骨芽細胞様細胞、骨細胞様細胞のいずれも GFP 陽性(ドナー由来)であった。しかしながら破骨細胞様細胞は GFP 陰性(レシピエント由来)であった。

(4)焼成温度がTCPにあたる影響についてX線回折により以下の様なことがわかった。焼成温度が1100、1150、1200では-TCPのみが焼成された。しかしながら焼成温度を1250に上げると-TCPが混入するようになった。さらに焼成温度を1500まで上げるとすべて-TCPが焼成されるようになった。このように焼成温度を1200以上にすることが-TCPの混入を生み、純度の高い-TCP作製には焼成温度を1200以下にすることが重要であると思われた。

さらにSEMによる表面性状の検討をおこなった。作製したTCPスキャホールドは、焼成温度1100では細かな顆粒体の構造を多数表面にとどめている。しかしながら焼成温度の上昇に伴い、その顆粒体が大きくなり焼成温度が1250を超えると表面の顆粒体同士が融合しはじめることがわかった。そして焼成温度1500では、表面に顆粒体構造は見られなくなり完全に平滑な面構造となった。このことから焼成温度の上昇にともないTCPの表面構造は微細な顆粒状構造から、平滑な面構造へと変化し、結果的に表面積を減少することがわかった。

(5)骨系前駆細胞へ誘導した細胞を-TCP内に混和し作成した「骨内環境再現システム(スキャホールド)」を外耳道の前壁に移植し骨の新生能を検討した。まずTCPの焼成温度の違いによる比較では1100および1150で焼成したTCPを用いた「骨内環境再現システム(スキャホールド)」では、好中球、マクロファージ、リンパ球を中心とする炎症性細胞の浸潤、膿瘍の形成を認めた。すなわち1100、1150で焼成したTCPには高度の異物反応がおり骨の新生は認められなかった。1200、1250で焼成したTCPでは、炎症性細胞の浸

潤や膿瘍、肉芽の形成を認めず、さらにこのシステム(スキャホールド)の周囲に骨の新生を認めた。またスキャホールド内の貫通孔は成熟した新生骨で充満しており、新生血管の侵入を認めた。すなわち1200、1250で焼成したTCPでは異物反応が起こらず、生体親和性が高く骨新生に有効と思われた。さらに焼成温度を上げて、1300、1500で焼成したTCPでは再びリンパ球を主体とする炎症性細胞の浸潤が認められるようになり、1500で焼成したTCPでは高度の炎症反応のためTCP自体が分解されるようになった。

(6)卵巣摘出(OVX)にて作製した骨粗鬆症マウスに、骨粗鬆症治療薬を投与し末梢血および脾臓細胞、胸腺細胞についてフローサイトメトリーにて解析すると、コントロール群のリンパ球についてT細胞が32%であるのに対して、OVX群では18%とTリンパ球が減少していた。しかしOVX群に骨粗鬆症治療薬であるリゼドロネートを投与したところT細胞は26%まで増加した。T細胞のサブクラスについては、OVX処理や骨粗鬆症治療薬の投与はCD3、CD45のサブクラスには影響を与えていなかった。サイトカインの解析では、OVX処理によりIL-6、IL-7、IL-10、IL-12、MIG(CXCL-9)など炎症性サイトカインを中心としたサイトカインの上昇を認めた。一方リゼドロネート投与群ではG-CSFが上昇を認め、IL-1a、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、MIG(CXCL-9)などが減少していた。組織学的および放射線学的解析では、OVX群では骨髓腔の拡大に伴い骨梁の萎縮や減少が認められたが、リゼドロネート投与群では骨梁の萎縮・減少は改善していた。この抗骨粗鬆症効果はリゼドロネートがテリパラチドに勝っていた。

(7)CD3+細胞(T細胞)はリゼドロネート投与群およびテリパラチド投与群の大腿骨骨髓中で増加していた。しかしOVX群(骨粗鬆症モデル)では骨髓中にほとんどT細胞を認めなかった。しかしT細胞の分化に不可欠なNotch1はコントロール群では若干の出現をみとめているが、OVX処理により発現をみなくなり、リゼドロネート投与群やテリパラチド投与群に発現してくることはなかった。ただしT細胞、B細胞のいずれの分化にも作用するIkarosはOVX処理群で発現が弱く、B細胞の転写因子であるPax5、PU.1はリゼドロネート群、テリパラチド群でOVX群より発現が多かった。

これら(6)、(7)よりOVX群(骨粗鬆症モデル)は、末梢血および骨髓内のリンパ球分画に影響を与えていることが確認された。そしてこれらに骨粗鬆症治療薬であるリゼドロネートやテリパラチドを投与することにより、末梢血および骨髓内のリンパ球分画が変動することが確認された。

<引用文献>

T Nakashima et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nat Med 2011

17(10) :1231-1234

Y Nakamura etc. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood* (2010) 116:1422-1432

#### 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 6 件)

Hemoglobin receptor protein from *Porphyromonas gingivalis* induces interleukin-8 production in human gingival epithelial cells through stimulation of the mitogen-activated protein kinase and NF- $\kappa$ B signal transduction pathways. Fujita Y, Nakayama M, Naito M, Yamachika E, Inoue T, Nakayama K, Iida S, Ohara N. *Infection and Immunity* 査読有 2014 82(1):202-211 doi10.1128/IAI.01140-12

Effect of geometry and microstructure of honeycomb TCP scaffolds on bone regeneration. Takabatake K, Yamachika E, Tsujigiwa H, Takeda Y, Kimura M, Takagi S, Nagatsuka H, Iida S. *J Biomed Mater Res A*. 査読有 2014 Sep;102(9):2952-60 doi: 10.1002/jbm.a.34966.

Bone regeneration from mesenchymal stem cells(MSCs) and compact bone-derived MSCs as an animal model Eiki Yamachika, Seiji Iida *Japanese Dental Science Review* 査読有 49(1-2):35-44 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2012.11.003>

Establishment of odontoblastic cells, which indicate odontoblast features both in vivo and in vitro. Tsujigiwa H, Katase N, Lefeuvre M, Yamachika E, Tamamura R, Ito S, Takebe Y, Matsuda H, Nagatsuka H. *J Oral Pathol Med*. 査読有 2013

Nov;42(10):799-806. doi:10.1111/jop.12080.

マウス皮質骨由来細胞による骨再生 山近英樹, 松原正和, 喜多憲一郎, 高島清文, 藤田佑貴, 松村達志, 平田泰久, 飯田征二 *日本口腔外科学会雑誌* 査読有 (0021-5163)59 巻 4 号 Page223-229(2013.04)

Basic fibroblast growth factor supports expansion of mouse compact bone-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and regeneration of bone from MSC in vivo. Yamachika E, Tsujigiwa H, Matsubara M, Hirata Y, Kita K, Takabatake K, Mizukawa N, Kaneda Y, Nagatsuka H, Iida S. *J Mol Histol*. 査読有

2012

Apr;43(2):223-33. doi:10.1007/s10735-011-9385-8.

〔学会発表〕(計 8 件)

The effects of risedronate and teriparatide to lymphocyte ratio Eiki Yamachika, Kiyofumi Takabatake, Masakazu Matsubara, Yuuichi Matsui, Youhei Kataoka, Yuuki Fujita, Atsushi Ikeda, Nobuhisa Ishida, Hidetsugu Tsujigiwa, Hitoshi Nagatsuka, Seiji Iida American association of oral and maxillofacial surgeons 96th annual meeting Honolulu HI USA 2014年09月09日~2014年09月13日

骨組織再建における八ニカム TCP の形状や微細構造の影響 高島清文, 山近英樹, 飯田征二, 第 58 回日本口腔外科学会総会 福岡 2013年10月11日~2013年10月13日

八ニカム TCP 細胞外微小環境下での硬組織形成 伊藤聡, 片瀬直樹, 玉村亮, 武部祐一郎, 山近英樹, 高木慎, 長塚仁 第 58 回日本口腔外科学会総会 福岡 2013年10月11日~2013年10月13日

ラット歯髄組織からの硬組織再生に関する基礎的研究 山近英樹, 高島清文, 松原正和, 藤田佑貴, 森谷徳文, 山本祐也, 有村友紀, 池田篤司, 水谷雅英, 飯田征二 第 58 回日本口腔外科学会総会 福岡 2013年10月11日~2013年10月13日

マウス骨髄由来細胞および皮質骨由来細胞による骨再生 山近英樹, 喜多憲一郎, 松原正和, 高島清文, 仲田直樹, 石田展久, 水川展吉, 松村達志, 高木 慎, 飯田征二 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会 横浜 2012年10月19日~2012年10月20日

OVX マウスにおける DHNA の骨吸収抑制効果 第二報 骨量に対する統計学的解析 喜多憲一郎, 山近英樹, 松原正和, 石田展久, 森谷徳文, 松村達志, 藤田佑貴, 高島清文, 飯田征二 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会 横浜 2012年10月19日~2012年10月20日

bFGF によるマウス骨由来間葉系幹細胞の増殖 高島清文, 山近英樹, 喜多憲一郎, 金田祥弘, 妹尾昌紀, 片岡陽平, 飯田征二 第 10 回日本再生歯科医学会総会 神戸 2012年9月12日

骨粗鬆症モデルマウスにおける 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)の骨吸収抑制効果についての検討 喜多憲一郎, 山近英樹, 松原正和, 石田展久, 平田泰久, 藤田佑貴, 高島清文, 辻極秀次, 長塚 仁, 飯田征二 第 66 回 NPO 法人 日本口腔科学会学術集会 広島 2012年5月17日~2012年5月18日

〔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：  
出願年月日：  
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

山近 英樹 (YAMACHIKA Eiki)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号：10294422

##### (2) 研究分担者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA Hidetsugu)  
岡山理科大学・理学部・教授  
研究者番号：70335628

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：