

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670834

研究課題名(和文) 骨代謝異常に対応可能な骨代替材料と破骨細胞前駆細胞による次世代骨再生医療の展開

研究課題名(英文) Bone regeneration with bone substitute and cells in osteoclast lineage

研究代表者

池田 通 (IKEDA, Tohru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：00211029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、骨欠損部位にセラミック顆粒と骨芽細胞に分化する骨髄間葉系幹細胞及び破骨細胞を移植することで、骨再生を促進することを目指して行われた。骨髄間葉系細胞移植は骨形成と破骨細胞誘導を同時にもち、移植物の骨組織への置換に単独で寄与することを示した。また、水熱法で作製された柱状粒子ハイドロキシアパタイトを移植すると、骨髄間葉系細胞を移植しなくても破骨細胞に近い形質の多核巨細胞が形成され、さらに、移植条件により破骨細胞に近い形質のものから異物巨細胞に近い形質のものまで異なる巨細胞が形成されることを示し、破骨細胞と異物巨細胞の分化機構に関する重要な細胞生物学的知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We tried to show importance of osteoclasts for bone regeneration in the region implanted with bone substitutes and osteoblast progenitor cells. We implanted granules of biodegradable bone substitute, beta tricalcium phosphate (β -TCP) in rat subcutaneous tissue with or without bone marrow mesenchymal cells, which include osteoblast progenitor cells. Implantation of bone marrow mesenchymal cells induced not only osteogenesis, but also osteoclastogenesis. Osteoclastogenesis stimulated resorption of β -TCP. These results showed that implantation of bone marrow mesenchymal cells stimulated replacement of bone substitute to the bone. In addition, we found that hydroxyapatite composed of rod shaped particles induced osteoclast-like multinucleated giant cells without implantation of bone marrow mesenchymal cells. Furthermore, we showed divergence of multinucleated giant cells induced around hydroxyapatite granules implanted in the rat subcutaneous tissue.

研究分野：口腔病理学

キーワード：骨欠損 再生医療 破骨細胞 異物巨細胞 肉芽腫

1. 研究開始当初の背景

歯科医師と材料科学者からなる我々の研究グループは、水熱法という独創的な方法により開発したハイドロキシアパタイト (HA) 及びベータリン酸三カルシウム (β -TCP) を骨代替材料として使用するために、一連の研究を行ってきた。水熱法を応用して開発した柱状粒子 HA と柱状粒子 β -TCP は、通常の HA や β -TCP が球状の粒子から構成されるのに対し、細い柱状の粒子から構成されており、骨欠損部位に移植すると通常の HA や β -TCP に比べて有意に多く骨を形成させる (Biomaterials 28:2612-2621, 2007; Biomaterials 29:2719-2728, 2008; Biomaterials 30:4390-4400, 2009)。またこの現象は、骨芽細胞に抑制がかかった非働化モデルラットに移植した場合にも同様に起こり (Acta Histochem. Cytochem. 45:283-292, 2012)、卵巣摘出ラットに移植した場合、通常の β -TCP を移植したものでは移植部位にも破壊的な骨吸収が引き起こされるのに対し、柱状粒子 β -TCP を移植したものでは生理的な骨梁構造を保つ上、対照の卵巣非摘出擬似手術ラットと比較しても移植部位の骨形成量が全く減少しないという画期的な結果をもたらした (J. Orthop. Res. 32:189-196, 2014)。また、骨形成促進作用の高い柱状粒子 HA には長期間強い破骨細胞保持能力が見られること及び、これらの破骨細胞が骨芽細胞を活性化する因子を出すことによって骨形成に積極的に関与することを示した (Biomaterials 30:4390-4400, 2009)。

今日再生医療において幹細胞移植が行われているが、骨の再生医療分野では細胞の担体となるスキャホールドの開発も不可欠である。今までの研究成果をもとに、各種骨疾患患者の骨再生医療にも対応できるスキャホールド及び幹細胞の移植方法を開発すべく新たな研究を開始することとした。

2. 研究の目的

本研究課題では、骨髄間葉系幹細胞に破骨細胞前駆細胞を加えた 2 系統移植を行うことで、より効率的な骨再生をもたらすことを目指す。さらに、担体と破骨細胞前駆細胞のみの移植で、骨外間葉系幹細胞から効率的に骨組織を誘導することにチャレンジする。

骨外組織に骨組織を誘導するためには、硬組織に囲まれた閉鎖空間である骨欠損への条件とは異なり、スキャホールドと幹細胞をまとめるまたは保護するための担体も必要となる。そこで、顆粒状セラミック及び幹細胞を一つにまとめるための担体についても骨の再生医療に最適なものを見出すことを目的に研究を進めることとした。

3. 研究の方法

ラット皮下組織で骨誘導が起こる条件を解析することを目的として、破骨細胞に最も激しく吸収される β -TCP 焼結体顆粒及び、水

熱処理を施した柱状粒子 β -TCP について、骨髄間葉系幹細胞の有無により骨誘導及び破骨細胞誘導がどのように起こるかを解析することとした。次に、骨欠損部位に移植すると破骨細胞を多数長期間維持することができる、水熱処理を施した HA に加え、対照として HA 焼結体について同様の解析をした。また、これらの結果を受けて破骨細胞を同時に移植する 2 系統移植を実施することとした。

(1) セラミック顆粒及びディスク試料の作製及び評価

スラリー滴下法及び水熱処理応用により、柱状粒子 HA 及び柱状粒子 β -TCP 球状顆粒 (直径 0.4-0.6 mm) を作製した。具体的には、 α -TCP 粉末をゼラチン水溶液と混合しスラリーとし、これを 80 の油中に滴下し攪拌する。攪拌しながら油を冷却し、 α -TCP とゼラチンの複合顆粒を得た。得られた顆粒を 1200 で焼成して α -TCP 顆粒とし、これをオートクレーブ中で水熱蒸気処理することで、柱状粒子 HA 球状顆粒を得た。柱状粒子 β -TCP 球状顆粒については、柱状粒子 HA 球状顆粒を 900 で焼成することにより得た。 β -TCP 焼結体は、上記と同様の滴下法で β -TCP を出発材料とする球状顆粒を作成し、乾燥後、1000 で 2 時間焼結することにより得た。HA 焼結体については、HA を出発材料とする球状顆粒を同様の滴下法で作成し、乾燥後に 1000 2 時間焼結することにより得た。In vitro 実験に用いるディスク試料については、上記と同様の出発材料を金型に挿入、200 MPa で圧迫したものを型から出し、上記と同様の水熱または焼結処理を行って作成した。

作製した試料については、微細構造を走査型電子顕微鏡で確認し (図 1) X 線回折 (XRD) にて結晶相の同定を行い、いずれも純粋な β -TCP 及び HA であることを確認した。

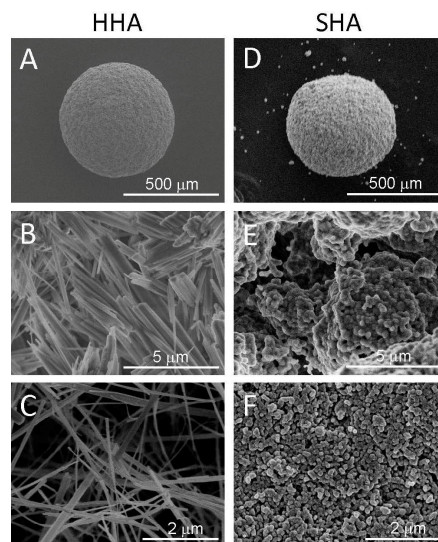


図 1

HHA: 柱状粒子 HA SHA: HA 焼結体
B, E: 球状顆粒微細構造
C, F: ディスク微細構造

(2) ラット皮下組織への移植実験

生後 4 週齢オスの F344/DuCrIj 系ラットの大腿骨及び頸骨から骨髓を無菌的に採取した。骨髓組織をピペティングにより分離し、10%ウシ胎仔血清入り培養液で 1 週間培養した。1 週間後、細胞を Trypsin/EDTA で剥がし、10 枚のシャーレにさらに 2 週間培養し、骨髓間葉系幹細胞を得た。

作成されたセラミック顆粒を乾熱滅菌後それぞれ 40 mg ずつ 1.5 ml エッペンドルフチューブにり、そのチューブに 1 本あたり 600 μ l の培養液に懸濁した 2×10^6 個の骨髓間葉系幹細胞を添加し、37 $^{\circ}$ C で 3 時間静置した。培養液を吸引廃棄し、100 μ l の F344 ラットの血漿を加え、10 μ l の 3.3%塩化カルシウム溶液を添加することでチューブ内の混合物を血漿で固めた。また、血漿でなく精製フィブリン製剤 Bolheal (化血研) で固めたものも同様に移植実験に用いた。

生後 10 週齢 F344/DuCrIj 系ラットの背部皮下に 2 か所 / 匹 移植し、1 週毎にマイクロ CT 撮影し、経過観察した。移植 4 週、8 週または 12 週後に動物を安楽死させ、移植部位を摘出し、中性緩衝ホルマリンにて固定した。

(3) 脱灰及び非脱灰組織標本の作成

固定後組織を半割し、一方は脱水後に 2-hydroxyethyl methacrylate/methyl methacrylate/2-hydroxyethyl acrylate の混合液に浸漬し、その後重合することで非脱灰組織を包埋し、硬組織ミクロトームを用いて 3 μ m 非脱灰硬組織切片を作成した。

もう一方は 0.5 M EDTA 液で 4 下振とうしながら 2-3 週間脱灰し、脱灰後中性緩衝ホルマリンで後固定を施した後に脱水、パラフィン包埋した。パラフィン包埋標本は通常のコミクロトームを用いて 3 μ m の組織切片を作成した。

非脱灰組織切片はギムザ液または、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性の染色を施した (J. Orthop. Res. 32:189-196, 2014 参照)。脱灰組織切片については、ラットカテプシン K に対する抗体 (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA) を用いてポリマー法 (DAKO EnVision Plus) で免疫組織化学染色を施した。

多核巨細胞数は、ほぼ全ての標本の占める領域を観察可能な 100 倍の倍率にて 3 視野中の多核巨細胞数をカウントした。統計学的有意差検定は、*t*-test で行った。

(4) PCR 解析

移植実験の組織学的評価を行った過程で、セラミックが破骨細胞誘導に関与する可能性が出てきたため、セラミックディスク上でマクロファージを培養し、破骨細胞のマーカーの発現を PCR で解析することにした。(1) で作成したセラミックディスク (直径約 10 mm) を 24 穴タイプの培養ウェルに挿入し、

その上に 5 週齢 ddY マウス大腿骨及び脛骨から採取した骨髓マクロファージを 5×10^4 個播種し、30 ng/ml の M-CSF 添加培養液中で 6 日間培養した。

培養後細胞を TRIzol 液で処理し、total RNA を抽出後、直ちに逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。定量的 PCR 法 [Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (Takara, Shiga, Japan)] で、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH): Mm99999915_g1, TRAP: Mm00475698_m1, CTSK: Mm00484039_m1, NFATc1: Mm00479445_m1, carbonic anhydrase 2 (Car2): Mm00501576_m1, c-Fms: Mm01266652_m1, RANK: Mm00437132_m1, (Applied BioSystems, Waltham, MA) について定量的 PCR 解析を行った。

4. 研究成果

(1) ラット皮下へのセラミック移植に対する骨髓間葉系細胞移植の意義

本研究は、骨芽細胞前駆細胞のみならず破骨細胞前駆細胞も同時に存在する方が骨再生に有利であるという仮説に基づいている。そのため、まず一般的な骨髓間葉系細胞移植の効果を確認した。その結果、4 種類のセラミック顆粒の種類には全く影響されず、骨髓間葉系細胞とセラミック顆粒とともに皮下移植した群の一部に骨組織の誘導が認められた。一方、骨髓間葉系細胞を用いずにセラミック顆粒を血漿または生成フィブリンで固めたものを移植した群では、骨組織の誘導は全く起こらなかった。骨髓間葉系細胞を移植した群については、セラミック顆粒周囲に破骨細胞が誘導されており、かつ、その部位のセラミックが他の部位に比べて強く吸収されていることが確認された。そこで、4 種類のセラミック顆粒のうち最も破骨細胞の吸収を受けやすい β -TCP 焼結体を移植する系を用いて、骨髓間葉系細胞移植の意義の解析を進めることにした。

β -TCP 焼結体顆粒と骨髓間葉系細胞を血漿で固めて移植し、12 週後の所見を解析したところ、骨髓間葉系細胞をセラミック顆粒とともに移植した群ではマイクロ CT にて骨組織の誘導によるセラミック顆粒の融合所見 (図 2a 点線内) 及び、セラミック顆粒の吸収所見 (図 2b 点線内) を認める部位があった。

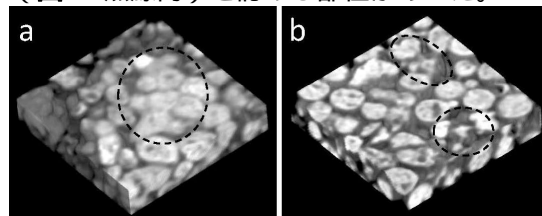
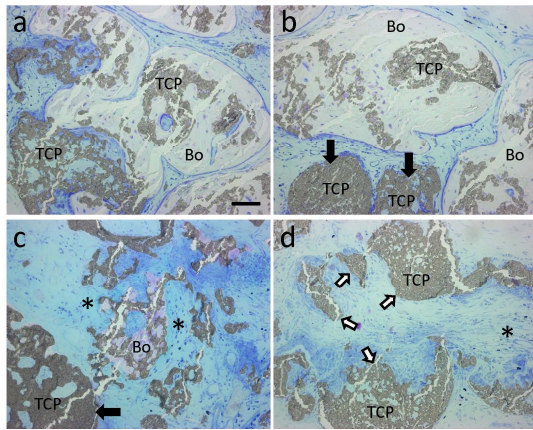


図 2

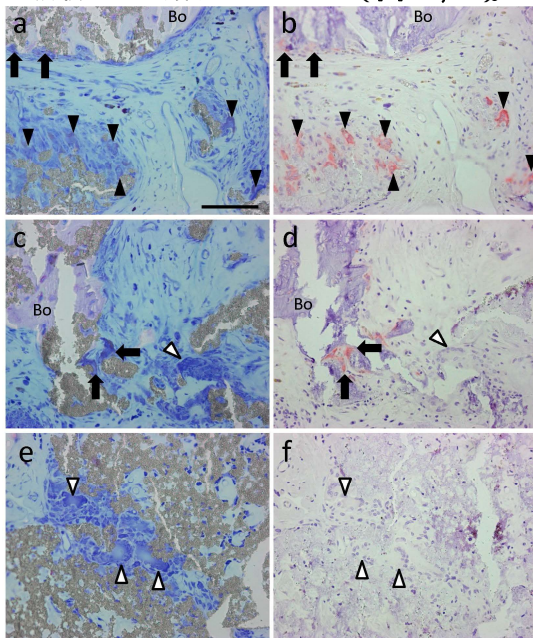
さらに組織学的評価を非脱灰骨組織切片で行ったところ、骨髓間葉系細胞を移植した群では一部の標本に明確な骨組織の誘導が認められた (図 3a, 3b)。骨組織が誘導された周囲では、 β -TCP 顆粒の顕著な吸収が認め

られた(図3c, *)。骨組織の誘導が見られない部分では、一見吸収されたように見える部位も、実は移植したβ-TCP が破折分離したものが多く(図3d, 矢印) 吸収はあっても骨組織が誘導された部位に比較すると顕著ではなかった(図3d, *)。



TCP: 残留β-TCP Bo: 骨組織
図3

TRAP 染色標本では、骨が誘導された周囲のみ TRAP 陽性の破骨細胞が見られ(図4a-d) 骨髄間葉系細胞の一部が骨芽細胞に分化して骨組織を誘導するとともに、骨芽細胞が破骨細胞誘導因子 RANKL を発現することで TRAP 陽性の破骨細胞をさらに誘導し、移植したβ-TCP を強く吸収したと判断された。一方、骨髄間葉系細胞を移植しなかった群ではβ-TCP 周囲に形成された多核巨細胞は TRAP 陰性の異物巨細胞であり、かつ、移植したβ-TCP の吸収もより緩やかであった(図4e, f)。



Bo: 骨組織; 黒矢印: 骨に接した破骨細胞; 黒矢頭: 骨近傍の破骨細胞; 白矢頭: 異物巨細胞

a, d, e: ギムザ染色
b, d, f: TRAP 染色

図4

移植物を固める担体として用いた血漿成

分が何らかの影響を及ぼしている可能性も考えられたため、骨髄間葉系細胞を用いないでβ-TCP 顆粒を血漿で固めて移植したものと、精製フィブリンで固めて移植したものとで多核巨細胞の形質を比較した。その結果、骨髄間葉系細胞がないと骨誘導が起こらないこと、かつ、TRAP 陽性の破骨細胞が誘導されないことが明らかとなった。一方、β-TCP 顆粒の周囲に形成された TRAP 陰性の異物巨細胞のうち、血漿で固めて移植したものはほぼ全ての異物巨細胞が CTSK 陽性であり、精製フィブリンで固めた異物巨細胞は CTSK が陰性であることを発見した(図5)。

[Fibrin: Bolheal (化血研)]

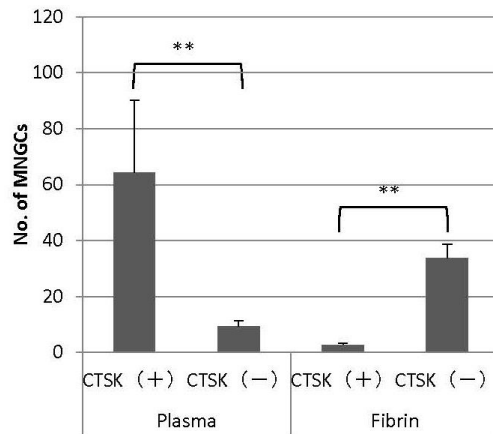


図5

In vitro でマクロファージをβ-TCP ディスク上で6日間培養しても、PCR 解析の結果から破骨細胞のマーカーの発現上昇は見られず、β-TCP 自体は破骨細胞の誘導には積極的に関与していないことが示唆された。

これらの結果から、骨髄間葉系細胞をβ-TCP 顆粒とともに移植することで、骨誘導のみならず破骨細胞も誘導され、その結果、骨形成と移植したセラミックの吸収と骨組織への置換が促されるという二重の効果があることが考えられた。さらに、血漿成分内には、CTSK を誘導する働きがある因子が含まれており、かつ、骨吸収でも重要な役割をする CTSK の誘導が異物巨細胞にも誘導されることが判明した。本研究成果は、論文としてまとめられ、国際学術雑誌に採択された。

(2) セラミック微細構造及び血漿成分に依存した異種の多核巨細胞誘導

柱状粒子 HA、柱状粒子β-TCP、HA 焼結体、及びβ-TCP 焼結体の4種類のセラミック顆粒をラット皮下組織に移植した場合、いずれも骨髄間葉系細胞をとともに移植しなければ骨組織が誘導されなかった。しかし、柱状粒子 HA 顆粒については、骨組織の誘導が内にもかかわらずセラミック周囲に TRAP 陽性の多核巨細胞の形成が認められた。このことから、柱状粒子 HA 自体に破骨細胞誘導能があるのではないかと疑われた。

この結果から、柱状粒子 HA を骨欠損部位に移植すれば破骨細胞前駆細胞を移植することなしにより多くの破骨細胞が誘導され、骨の再生につながるのではないかと考えられた。このような想定していなかった結果が出たことから、柱状粒子 HA 及び HA 焼結体を移植した実験系を用いてさらに詳細にセラミック周囲に出現する多核巨細胞の解析を行うことに方針を変えることにした。それにより、骨芽細胞前駆細胞及び破骨細胞前駆細胞の2系統を移植するのと同様な効果を柱状粒子 HA 及び骨髄間葉系細胞移植により実現する可能性が出てきたからである。

柱状粒子 HA 周囲には確かに TRAP 陽性多核巨細胞の出現が多く認められたのに対し、対照として用いた HA 焼結体周囲には、移植4週後、8週後、12週後のいずれにおいても TRAP 陽性多核巨細胞がほとんど出現しなかったことから、TRAP 陽性多核巨細胞の誘導は柱状粒子 HA に特異的な現象であることが示唆された。また、(1)の成果に基づき、TRAP 陽性多核巨細胞及び CTSK 陽性多核巨細胞の出現に血漿成分が関与している可能性があるため、精製フィブリンでなくラットの血漿でセラミック顆粒を固めて移植した実験も行った。その結果は(1)の結果と矛盾するものではなく、TRAP 陽性多核巨細胞の出現には血漿成分が、そして、CTSK 陽性多核巨細胞の出現には、HA の柱状粒子及び血漿成分がともに関与していることが示唆された(図6)。

柱状粒子 HA 及び HA 焼結体ディスク上で6日間マクロファージを培養し、破骨細胞のマーカータンパク質発現を PCR で確認したところ、柱状粒子 HA 及び HA 焼結体ディスク上で培養したマクロファージに種々の破骨細胞マ-

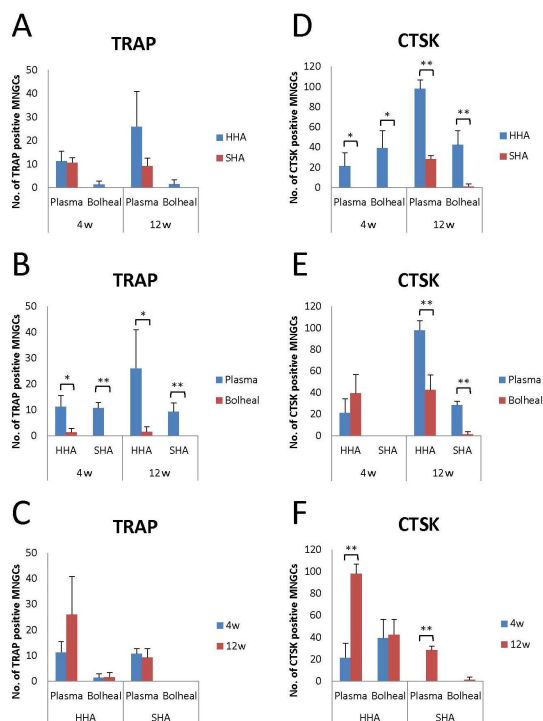


図6

カーの発現上昇が認められた。特に、柱状粒子 HA には CTSK の発現刺激効果があり、また、どちらの HA にもプラスチックシャーレ上で培養したマクロファージに比べて TRAP 活性を刺激する作用があると考えられた。一方、M-CSF 受容体である c-Fms の発現は HA 上では低下する傾向が見られた(図7)。

これらの結果から、柱状粒子 HA には破骨細胞マーカーの発現を刺激し、破骨細胞誘導を促す作用があることが考えられた。以前我々は、柱状粒子 HA は HA 焼結体と血清蛋白の吸着能が異なり、特にビタミン D 結合蛋白に対する親和性が高いこと、ビタミン D 結合蛋白が糖鎖切断を受けて活性型のマクロファージ刺激因子になると、破骨細胞誘導を促進することを報告したが(J. Cell. Mol. Med. 18:170-180, 2014)。この結果と考え合わせると、本研究で得られた柱状粒子 HA による TRAP や CTSK の発現刺激作用には血漿中に含まれるビタミン D 結合蛋白が関与していることが疑われた。

本研究では、柱状粒子 HA を骨髄間葉系細胞とともに移植することでラット皮下組織に骨組織が誘導されたものの、他の3種類のセラミック顆粒を移植した場合と骨形成量に差が認められなかった。このことは、柱状粒子 HA に破骨細胞誘導促進能があり、それを通して骨誘導をも刺激する能力があるとしても、その作用は補助的であり、骨外における骨誘導をもたらすほど強いものではないと考えられた。しかし、今までの我々の一

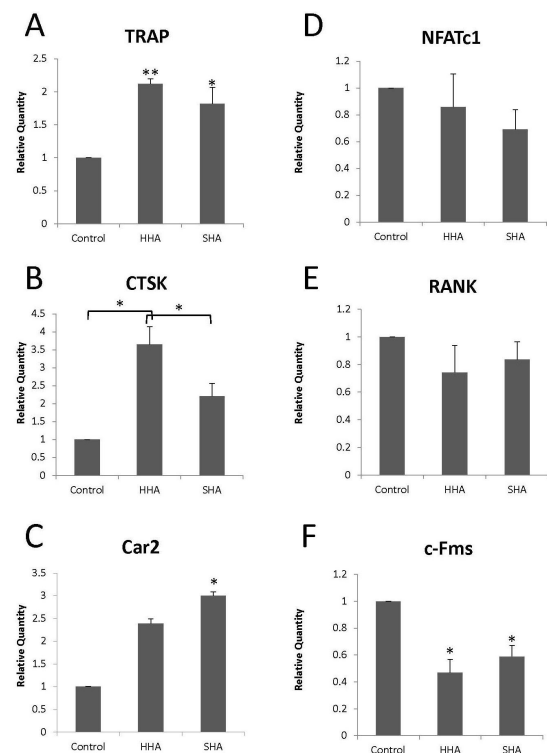


図7

連の骨欠損部位への移植実験結果と合わせて考えると、骨欠損部位に移植した場合には他のセラミックと比較して骨の誘導や移植

物の吸収と骨組織への置換に有利に働くと考えられた。

本研究成果により、思いがけなくも皮下に移植したセラミック周囲に誘導される多核巨細胞に複数の表現形質があり、その誘導条件の一端を明らかにすることができた。これにより、破骨細胞と異物巨細胞の分化誘導機構、さらには肉芽腫性病変の形成機構を解明するために重要な情報になったと考えている。類似した研究はほとんど見あたらず、独創性が高い本研究成果は、著名な国際学術雑誌に掲載された。

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2件)

Gazi Jased Ahmed, Eri Tatsukawa, Kota Morishita, Yasuaki Shibata, Fumio Suehiro, Masanobu Kamitakahara, Taishi Yokoi, Takehiko Koji, Masahiro Umeda, Masahiro Nishimura, and Tohru Ikeda. Regulation and biological significance of formation of osteoclasts and foreign body giant cells in an extraskeletal implantation model. Acta Histochem. Cytochem., 2016, in press.

査読有

Kota Morishita, Eri Tatsukawa, Yasuaki Shibata, Fumio Suehiro, Masanobu Kamitakahara, Taishi Yokoi, Koji Ioku, Masahiro Umeda, Masahiro Nishimura and Tohru Ikeda. Diversity of multinucleated giant cells by microstructures of hydroxyapatite and plasma components in extraskeletal implantation model. Acta Biomater. 39:180-191, 2016.

DOI: 10.1016/j.actbio.2016.05.002.

査読有

[学会発表](計2件)

森下廣太, 柴田恭明, 立川絵里, 上高原理暢, Gazi Jased Ahmed, 梅田正博, 池田通. セラミック皮下移植実験系を用いた破骨細胞及び異物巨細胞形成機構の検討. 第26回日本臨床口腔病理学会, 2015年7月29-31日, 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市).

森下廣太, 柴田恭明, 立川絵里, 上高原理暢, Gazi Jased Ahmed, 梅田正博, 池田通. セラミック皮下移植実験系による骨芽細胞非存在下での破骨細胞形成. 第33回日本骨代謝学会学術集会, 2015年7月23-25日, 京王プラザホテル(東京都・新宿区).

[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

池田 通 (IKEDA, Tohru)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授
研究者番号: 00211029

(2) 研究分担者

西村 正宏 (NISHIMURA, Masahiro)
鹿児島大学・医歯学総合研究科(歯学系)・教授
研究者番号: 00294570

上高原 理暢 (KAMITAKAHARA, Masanobu)
東北大学・環境科学研究科・准教授
研究者番号: 80362854

井奥 洪二 (IOKU, Koji)
慶応義塾大学・経済学部・教授
研究者番号: 60212726

(3) 連携研究者

立川 絵里 (ERI, Tatsukawa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員
研究者番号: 60534534