

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462915

研究課題名(和文)多機能性エピジェネティクス低分子化合物を用いた骨増成機構への多面的アプローチ

研究課題名(英文) Bone Augmentation Strategy with epigenetics small molecules

研究代表者

秋葉 陽介 (AKIBA, YOSUKE)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70547512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はエピジェネティクス低分子化合物による炎症制御、細胞遊走促進、骨芽細胞分化促進の作用を検討し、多面的な骨欠損治癒、骨形成促進作用の検討を行うことを目的とする。本研究により確実性、安全性、予知性に優れた骨増生法を開発することを目的とする。HDACiであるバルプロ酸によって処理した細胞に分化刺激を加えることにより、骨芽細胞文化マーカー遺伝子の発現は対照群に比較して有意に発現の上昇が認められた。さらに細胞遊走因子の遺伝子発現の上昇、及び血管形成促進因子の遺伝子発現の上昇を示した。また、処理細胞を頭蓋骨骨欠損モデルに移植したところ、未処理細胞移植窩洞よりも骨形成の有意な促進が観測された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate epigenetics small molecule effect on acceleration of bone formation through regulation of inflammation, cell migration, and osteoblast differentiation. This study would help to establish bone augmentation therapy with multiple approach such as increasing of cell recruitment, vascularization, and mineralization. Valproic acid which had HDACi effect was used as epigenetic small molecule. VPA treatment with osteogenic differentiation stimulation showed significant increase in expressions of osteogenic marker gene compare to the osteogenic differentiation stimulation alone. VPA treatment also increased cell recruitment related gene and vascularization related gene expressions. VPA treated cell transplantation to the calvarias cavity showed more bone formation than control cell transplantation.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：エピジェネティクス 骨増生

1. 研究開始当初の背景

骨組織再生医療の特徴

組織再生医療において骨組織再生が他の組織再生療法と大きく異なるのは再生組織の主体が骨細胞ではなく「骨芽細胞によって形成された硬組織」という点である。骨組織は添加と吸収のバランスを取って存在しており、リモデリングをもって生着と見なす点で他の組織と異なる。骨組織再生では細胞が機能し、骨生成しやすい環境、生成された骨量が減少しない状態を創出することが重要となる。

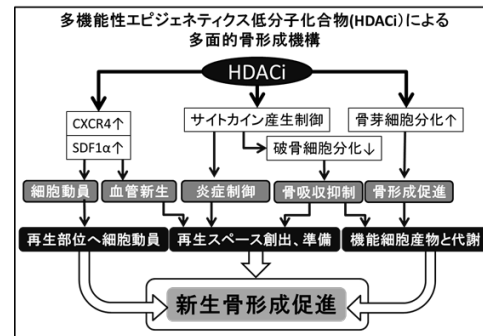
骨増成法における移植細胞の機能[再生スペースの創出と準備]

臨床において骨増成に細胞移植が有効であるという知見は多い。移植細胞に期待される機能としては骨形成系細胞の供給、スペースメンテナンスなどが考えられているが、十分に明らかにはなっていない。一方で、骨再生誘導法(GBR)法のように細胞の移植を伴わず、母床の細胞による骨再生を期待する方法も一定の臨床成績を残している。実験的には骨膜の拳上のみによる骨形成も確認されている (J. Tissue. Eng, 2012)。これらの知見は、足場や細胞成分は骨再生において直接的に骨形成に寄与するのみならず、細胞、細胞生成物によって「再生の場」を「創出」し、「整える」ことによって、骨再生、骨形成が促進されることを示唆していると考えられる。

創傷治癒と骨増成[炎症の制御と再生部位への細胞動員(ホーミング)]

創傷部位において過剰な炎症反応は組織傷害を起し治癒を遅延させる。一方、炎症で産生されるサイトカインは組織再生、細胞動員の起点となる (Stem Cells Trans. Med, 2012)。つまり適度な炎症制御は骨組織再生において重要な役割を果たすのである (J. Dent. Res 2011)。さらに、骨折等の創傷治癒部位へは治癒組織近傍、または遠隔の組織からの細胞動員が組織再生に寄与することが知られており、近年、骨髄由来細胞による組

織修復機構が注目され、その一部が明らかになり始めている(Regen. Med, 2012)。血球系幹細胞で知られている SDF-1 による CXCR4 陽性細胞の動員、ホーミング、血管新生の促進が骨髄間葉系幹細胞による骨形成においても機能する可能性が報告されている(Stem Cell 2008)。



多機能性エピジェネティクス低分子化合物による多面的骨増成法開発

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) は遺伝子発現を後遺伝学的に制御し得る低分子化合物として抗癌剤や、抗てんかん薬、近年では iPS 細胞の効率的な作成などに応用されている。我々は HDACi の骨形成能賦活化に着目し *in vivo*, *in vitro* における研究を行ってきた。HDACi による骨形成能賦活化は遺伝子配列変化を伴わない比較的安全かつ、既存の成長因子等による活性化より上流における制御機構であることがその理由である。

我々の *in vivo* における HDACi 全身投与実験では円筒形骨欠損修復能力の明らかな活性化がみられたが、その詳細なメカニズム解明には至っていない。さらに、*in vitro* における骨芽細胞の分化促進研究では HDACi による骨芽細胞分化促進作用を認め、*in vivo* 実験データを裏付けているが、*in vivo* で観察される新生骨形成促進作用を十分説明するには至っていない。

我々の *in vitro* *in vivo* の実験データ、先行文献、近年の HDACi を用いた研究から HDACi の多機能性による骨形成の促進について以下の仮説を得るに至った。仮説 HDACi の

骨芽細胞の石灰化機能促進、破骨細胞の機能抑制【機能細胞産物と代謝の制御】、仮説

HDACi の炎症制御による過剰な組織傷害抑制と炎症性サイトカイン産生制御による組織再生の促進【炎症制御による組織再生の促進】、仮説 HDACi の間葉系幹細胞における CXCR4 発現増強、SDF1 発現促進による細胞動員活性化、栄養血管新生【再生部位への細胞の動員、栄養供給】、仮説 HDACi の炎症制御、細胞動員、血管新生作用による骨再生部位環境整備【再生スペースの創出と準備】、である。これらの HDACi の多機能性による多面的な骨再生、骨形成、骨増成機構は明らかにはなっておらず、さらにこれらの多機能性を複合的に応用する多面的アプローチを期待した骨増成法は存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨形成、骨増成に対し多様な機能を有すると思われるエピジェネティクス低分子化合物を用いて、より確実性、安全性、予知性に優れた骨増成法を開発することである。人工生体材料等を用いた従来の骨増成の発想は主に細胞、足場材、サイトカインを併用するもので、長期残存や汎用性など未だ多くの問題点が残されている。比較的安価、安全なエピジェネティクス低分子化合物による骨形成、骨増成促進作用が証明できれば、基礎及び臨床歯科医学的意義は高いと考えられる。研究の最終的な目標はインプラント治療の適応症の拡大と成功率、生存率のさらなる向上である。本研究はエピジェネティクス低分子化合物による炎症制御、細胞遊走促進、骨形成促進の解明によって構成される。

3. 研究の方法

【研究目標(1)】HDACi による骨欠損修復促進作用の解明：(仮説の検討と現象解析)

上顎骨欠損修復モデル作成

4 週齢ラットの上顎第一、第二臼歯を抜歯、4 週間治癒を待ち、第一臼歯部へ直径 1.7 mm のピーソリーマーを

用いて円筒形骨欠損形成。

頭蓋骨限界径欠損修復モデル作成

12 週ラットの頭蓋骨にトレフィンバーを用いて直径 5 mm の限界径骨欠損を形成、

欠損部に直径 5 mm、厚み 1.5 mm のアテロコラーゲンスポンジ(KOKEN)を移植。

治癒細胞ホーミング解析モデル作成

上記の欠損修復モデル処置 3 週前に 線照射、骨髄細胞を死滅させ尾静脈より

GFP ラットより採取した骨髄細胞を移植、GFP 細胞生着後に各欠損形成手術を施行する。

HDACi 投与方法

HDACi: パルプロ酸 (Valproic acid: VPA) を使用、対照群は PBS を使用

・全身投与: 濃度 (300 mg/kg/2 times/day)

投与期間 (欠損形成前 7 日間腹腔内投与)

・局所投与: 濃度 (500 μ M/100 μ L/day)

投与期間 (欠損形成後 3 日間欠損部)

・処理細胞移植: 濃度 (500 μ M)

処理期間 (骨芽細胞分化処理後 48 時間)

移植方法 (アテロコラーゲンスポンジに播種後、欠損部へ移植)

骨修復部位解剖学的解析

・解析方法: μ CT 画像解析 (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp) H-E 染色組織解析

免疫組織化学染色解析 (骨代謝、血管新生、細胞動員、炎症反応、各マーカー、GFP)

【研究目標(2)】HDACi による多面的骨欠損修復促進のメカニズム解析: (現象の機序解明と検証)

組織学的解析: 大腿骨、肝臓、腎臓 (免疫組織化学染色解析)

遺伝子発現解析: 骨髄、肝臓、腎臓、上顎骨および頭蓋骨骨欠損治癒部位

(網羅的: マイクロアレイ解析、定量的: Real time PCR 解析)

タンパク質発現解析: 血清、欠損治癒部位採取組織 (Elisa 解析)

培養細胞を用いた HDACi による多面的骨形成機構解析

細胞: 骨髄間質細胞、骨膜細胞(モデル動物由来)、骨芽細胞、破骨細胞(細胞株より分化誘導)

機能細胞産物と代謝解析: 骨形成能、骨吸収能の解析、遺伝子発現解析

炎症制御解析: 各種サイトカイン、LPS刺激による炎症系遺伝子発現解析

細胞誘導、動員解析: 細胞遊走能解析、細胞遊走マーカー発現解析

血管新生解析: 血管新生定量アッセイ、遺伝子解析 VEGF 発現解析

【研究目標(3)】HDACiによる臨床モデルへの効果の解明:(臨床応用)

上顎骨垂直的骨増成モデル(秋葉陽介: 代表者、江口香里: 大学院生)

垂直的骨増成モデルにHDACiを応用し、骨形成促進作用を解析

4週齢ラットの第一、第二臼歯を抜歯4週間の治癒を待ち、抜歯部に免疫不全ラットより採取した大腿骨ブロックもしくは細胞含有コラーゲンスポンジをアンレーグラフト様に顎堤部に移植、固定。同ラット頭蓋骨を露出、骨膜を剥離、免疫不全ラット頭蓋骨、大腿骨ブロックを移植、固定。移植前7日間全身投与によりHDACiを投与(濃度、300 mg/kg/2 times/day)、骨増成における移植骨に対するHDACiの効果について組織学的に検証する。

インプラント埋入モデル

インプラント埋入モデルにHDACiを応用し、オッセオインテグレーション促進作用を解析
4週齢ラットの第一、第二臼歯を抜歯4週間の治癒を待ち、抜歯部 1.7 mmピーソ-リーマ でインプラント窩洞形成、同部位に直径2 mmスクリュータイプカスタムインプラントを埋入、4週間オッセオインテグレーション獲得を待って組織学的(骨-インプラント接触率)、力学的(リバーストレス計測)に評価する。

オーギュメンテーションモデル作成

上記の2モデルを組み合わせた、垂直的骨増成を行った部位へのインプラント埋入モデ

ル作成

実際の臨床応用に極めて近い状態を想定した術式における効果の検証。

4. 研究成果

骨髄由来細胞を骨芽細胞分化培地において培養し、HDACiを添加した群、添加しない群で遺伝子発現を比較した。骨芽細胞分化マーカーであるRunx2, Osteopontin, Osteocalcin, ALPの発現は非添加群に比較して添加群で有意に上昇した。さらに、細胞誘導因子であるCXCR12や血管誘導因子の一つであるAngp1の上昇も観察された。次にHDACiの添加、非添加群における石灰化能の違いについて検索した。HDACi添加群において、日添加群に比較して有意に石灰化の上昇が観察されている。またALP活性も有意な上昇を示した。細胞培養上清を採取し、マイグレーションチャンバー下部に設置、チャンバー上部簿メッシュに骨髄細胞を播種し、細胞誘導培養上清による細胞誘導能を検証した。HDACi添加群において、非添加群と比較して有意に遊走細胞数の増加が検出された。頭蓋骨欠損モデルの欠損部に細胞移植を行う欠損修復モデルにおいて、HDACi処理細胞移植を行った欠損部は非処理の細胞移植欠損部よりも有意に治癒促進像、新生骨形成像をしめした。現在、誘導細胞由来の検討と血管新生促進に検討を組織学的に行っている。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

1. Akiba Y, Eguchi K, Akiba N, Uoshima K. Biological Evaluation of Implant Drill made from Zirconium Dioxid. Clinical Imp. Dent. Related Res. 19(2):306-315. 2016(査読有)
2. Akiba Y, Watanabe M, Mine A, Ikedo I, Nikawa H. With the Aim of Treatment Guideline Development For Dental Metal Allergy and Related Disease. Ann. Jpn. Prosthodont Soc. 8(4):327-339. 2016(査読)

- 有)
3. Akiba Y, Mizuta A, Kakihara Y, Nakata J, Nihara J, Saito I, Egusa H, The inhibitors of cyclin-dependent kinases and GSK-3 enhance osteoclastogenesis. *Biochemistry and Biophysics Reports* (5):253-258. 2016 (査読有)
 4. Kaku M, Akiba Y, Akiyama K, Akita D, Nishimura M: Cell-based bone regeneration for alveolar ridge augmentation - Cell source, endogenous cell recruitment and immunomodulatory function. *J Prosthodont Res* 59(2):96-112, 2015. (査読有)
 5. Kaku M, Rosales M, Kitami M, Ida T, Akiba Y, Yamauchi M, Uosjima K. Mechanical Loading Stimulates Expression of Collagen Cross-Linking Associated Enzymes in Periodontal Ligament. *Journal of Cellular Physiology* 231(4):926-933, 2015 (査読有)
 6. 秋葉陽介, 江口香里, 秋葉奈美, Rashid MD Mamunur, 加来 賢, 魚島勝美: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACI) を用いたエピジェネティクス制御による細胞分化制御を利用した新規骨増成法に関する研究. *日歯医学会誌* 33:44-48, 2014. (査読有) [学会発表] (計 18 件)
- 1) 江口香里, 秋葉陽介, 秋葉奈美, 魚島勝美: IGFBP-3 による骨芽細胞分化制御機構の解析. 第 6 回補綴若手研究会, 萩本陣 (山口県・萩市), 2017 年 3 月 11 日
 - 2) Kaori Eguchi, Akiba Y, Nagasawa M, Aoyagi Y, Uoshima K: IGFBP3 effects osteoblast differentiation independent of IGF signaling, International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment. Samui, (Thailand), Feb 11, 2017.
 - 3) Takaoka Y, Akiba Y, Nagasawa M, Aoyagi Y, Uoshima K: Analysis of metal allergy patients visited Niigata University Medical and Dental Hospital. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment. Samui, (Thailand), Feb 12, 2017.
 - 4) Akiba Y: Acceleration of osteogenesis through cell recruitment and angiogenesis. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment. Samui, (Thailand), Feb 11, 2017.
 - 5) A. Kawamura, M Nagasawa, Y. Akiba, M. Takashima, Y. Arai, K. Uoshima: Validation of an Implant Removal Method by Local Heating. EAO Congress 2016. Paris (France) 2016. 9.30.
 - 6) 河村篤志, 秋葉陽介, 長澤麻沙子, 高嶋真樹子, 永井康介, 山崎裕太, 荒井良明, 魚島勝美: 加熱によるデンタルインプラント除去法の有効性検証. 第 46 回日本口腔インプラント学会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2016 年 9 月 18 日.
 - 7) 加来 賢, 北見恩美, JM Rosales Rocabado, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美: SDF-1/CXCR4 による歯根膜への骨髄由来細胞の誘導, 第 125 回日本補綴歯科学会学術大会, 石川県立音楽堂 (石川県・金沢市), 2016 年 7 月 8 日,
 - 8) 江口香里, 秋葉陽介, 秋葉奈美, 長澤麻沙子, リンドン F. クーパー, 魚島勝美: IGFBP-3 は BMP-2 シグナルを介して IGF 非依存的に骨形成を抑制する, 日本補綴歯科学会第 125 回学術大会, 2016 年 7 月 8 日 ~ 10 日, 石川県立音楽堂 (石川県・金沢市).
 - 9) 秋葉陽介, 江口香里, 秋葉奈美, 魚島勝美: 機能特化プライミング細胞カクテル移植による骨再生法, 日本補綴歯科学会第 125 回学術大会, 2016 年 7 月 8 日 ~ 10 日, 石川県立音楽堂 (石川県・金沢市).
 - 10) Kaori Eguchi, Yosuke Akiba, Nami Akiba,

- Masako Nagasawa, Lyndon F. Cooper, Katsumi Uoshima: IGFBP-3 Suppresses Osteoblast Differentiation Through BMP-2 Signaling. 94th General Session & Exhibition of the IADR. Seoul, (Korea), June 22-25, 2016.
- 11) 秋葉陽介:機能特化プライミング細胞カクテル移植による骨再生法. 第5回補綴若手研究会, KKR 鎌倉 (神奈川県・鎌倉市), 2016年2月27日,
 - 12) 江口香里, 秋葉陽介, 長澤麻沙子, 水島一尊, クーパー リンドン, 魚島勝美: IGF binding protein 3 はBMP 2 シグナルを介してIGF非依存的に骨形成を抑制する. 平成27年度新潟歯学会第2回例会, 新潟大学 (新潟県・新潟市), 2015年11月7日.
 - 13) 河村篤志, 荒井良明, 秋葉陽介, 長澤麻沙子, 高嶋真樹子, 魚島勝美, 加熱によるデンタルインプラント除去法の有効性検証, 新潟歯学会第2回例会, 新潟大学 (新潟県・新潟市), 2015年11月7日, 2015.
 - 14) 秋葉陽介: 歯科金属アレルギーと関連疾患に関するガイドライン策定を目指して, 第124回日本補綴歯科学会学術大会, 大宮ソニックシティー (栃木県・大宮市), 2015年5月30日.
 - 15) 加来 賢, 北見恩美, JM Rosales, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美: 歯根膜には大腿骨骨髓に由来する幹細胞が存在する. 第123回日本補綴歯科学会, 仙台国際センター (宮城県・仙台市), 2014年5月24日.
 - 16) 秋葉陽介, 江口香織, 秋葉奈美, 北見恩美, Rocabado JMR, 加来 賢, 魚島勝美: 多機能性エピジェネティクス化合物による骨増成法への多面的アプローチ. 第123回日本補綴歯科学会学術大会, 仙台国際センター (宮城県・仙台市), 2014年5月24日.
 - 17) 秋葉陽介, バルプロ酸 (VPA) による新生骨形成促進作用の検討, 第3回あしなが予防医学研究会, 弘前大学 (青森県・弘前市), 2014年10月4日.

- 18) 秋葉陽介, 幹細胞を用いた組織再生法の新機軸 - 内在性幹細胞の動員 - イブニングセッション. 第123回日本補綴歯科学会学術大会, 仙台国際センター (宮城県・仙台市), 2014年5月24日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋葉 陽介 (AKIBA, Yosuke)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 30547542