

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11743

研究課題名（和文）長期骨量維持を目指したプライミング細胞カクテル移植による多面的骨再生療法の開発

研究課題名（英文）Bone regeneration with priming cell cocktail transplantation

研究代表者

秋葉 奈美（Nami, Akiba）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：00584591

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：未処置骨髄由来細胞を骨芽細胞分化誘導、血管新生分化誘導、細胞誘導分化誘導などの分化方向に分化処理した細胞と共培養し、セルソーターで分離、未処置骨髄由来細胞の遺伝子発現を解析したところ、各分化マーカーの発現上昇が確認され、分化細胞の影響が未分化細胞に波及し、未分化細胞の分化マーカー上昇を引き起こしていると予想している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の骨増生法は一定の結果を得ているが、形成骨の吸収が問題になっている。現在臨床応用されている骨増生法では十分なインプラントの適応症拡大に寄与仕切れていない。生理的骨形成を模倣した新規骨増生法を確立し、骨代謝による吸収を受けにくい新生骨形成法を確立し、デンタルインプラントの適応症を拡大することは、口腔の機能性、審美性を向上させ、QOLの向上に寄与する。国民生活を長期的に、高齢者となっても維持することができる。

研究成果の概要（英文）：Osteogenic differentiation treatment, cell recruitment differentiation treatment and blood vessel differentiation treatment could affected to untreated cell in the co-culture conditions.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨増生法 インプラント ティッシュエンジニアリング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

既存の骨増生法の課題:

歯、インプラント、義歯などの支持組織である顎骨の欠損、骨量減少に対する骨増生法は、顎口腔機能の回復に寄与し、QOL 向上に必須である。

既存の骨増生法は骨芽細胞による骨形成促進が中心となっており、骨形成促進に効果を上げているが、増生後の骨量の減少が問題となっている。申請者らの先行研究でも骨形成促進は達成したが、形成骨の長期維持は達成できていない。増生骨の急激な減少は、骨増生における骨形成の過程が原因である可能性がある。

骨折治癒における骨形成:

成人後に骨形成がみられる生理現象に骨折治癒がある。骨折治癒部位における生理現象は、炎症制御、軟骨形成、宿主細胞の誘導、血管新生、骨形成、骨吸収、成長因子放出など多彩である。

骨折治癒部位の新生形成骨はリモデリングによる形成骨量の減少などは見られない。骨折治癒の骨形成と骨芽細胞活性化による骨増生における違いは骨芽細胞の生理活性上昇だけでなく、宿主細胞の誘導、成長因子放出、血管新生などの骨芽細胞以外の生理活性も上昇する点である。

移植細胞の機能:

細胞移植を伴う骨増生法において、移植細胞自体の直接的な骨形成を期待する方法が研究、開発され、これを支持する報告がある一方で、骨形成後の移植細胞の消失等、移植細胞自体の骨形成に否定的な報告も存在しており、移植細胞の機能は未だ明らかになっていない。

我々は *in vitro* において

石灰化しない未処理骨髄由来細胞、

石灰化する分化骨髄由来細胞、

石灰化しない未処理骨膜由来細胞

石灰化しない分化骨膜細胞

以上の4条件の細胞をそれぞれ頭蓋骨欠損修復モデルに移植した。

この実験より *in vitro* での石灰化能に関わらず骨形成は促進される事、石灰化能を有する により最も骨形成が促進される事、骨形成は移植細胞と宿主細胞双方によって行われている事、移植細胞により宿主細胞の誘導が促進されている事、などを明らかにした。

移植細胞の機能と多面的骨増生法:

我々の先行研究より骨増生法における移植細胞の機能として、移植細胞自身の骨形成、宿主細胞の誘導、細胞、栄養の供給路、老廃物排出路のための血管新生への寄与の可能性が示された。

これまでに移植細胞の機能を詳細に解析した研究は見られない。さらに既存の骨増生法において、移植細胞に期待される機能をすべて促進させることを目的とした骨増生法は無く、現行の成長因子や骨補填材もこれら生理機能を同時にすべて活性化し得る能力を有するものはない。

移植細胞を生理機能に合わせて活性化し、骨形成を多面的に促進する骨増生法の必要性から本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は

- ・細胞移植を伴う骨増生法における移植細胞の機能を解明すること、
- ・移植細胞を個別に種々の条件、薬剤等で刺激し、各細胞の骨形成、細胞誘導、血管新生、成長因子放出などの生理機能を亢進させ(プライミング)、これらを混和した細胞塊(プライミング細胞カクテル)を作製し、機能を評価すること、

・ “プライミング細胞カクテル”移植による、多面的アプローチによる骨増生効果を検証する  
 以上の3点を目的とする。最終的にはリモデリングによる骨量の減少を受けない骨量維持の可能な骨の形成を目標としている。

研究期間内に何をどこまで明らかにするのか

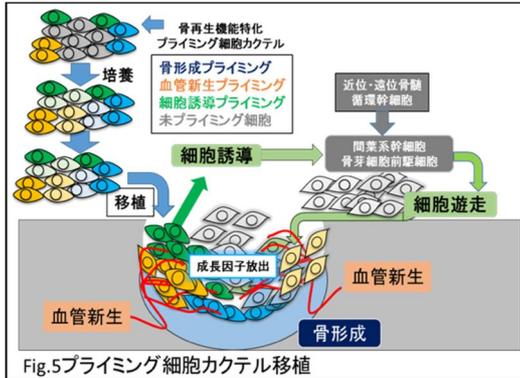
本研究において研究目的達成のために、以下の4点の課題を設定する。

課題(1)移植細胞の機能の確認(移植細胞の骨増生部位からの単離と機能解析)

課題(2)プライミングによる機能亢進の確認(各プライミング処理の効果解析)

課題(3)宿主由来細胞へのプライミング細胞効果確認(プライミング細胞-未処理細胞間相互作用解析)

課題(4)プライミング細胞カクテル移植による骨形成促進と骨量維持確認(モデル動物解析)



課題	研究方法	アウトカム
(1)	・頭蓋骨欠損修復モデル 組織学的解析 遺伝子、蛋白質の発現解析	(細胞移植による骨欠損修復の移植細胞の機能を確認) 治癒組織、再生組織に関わる由来細胞の同定 欠損治癒組織における生理現象を担う発現遺伝子、機能蛋白同定
(2)	・培養細胞実験 石灰化プライミング 血管新生プライミング 細胞誘導プライミング	(プライミング処理による生理機能促進作用を確認) 石灰化亢進、骨芽細胞マーカー遺伝子発現促進の確認 血管新生促進、血管新生マーカー遺伝子発現促進の確認 細胞誘導関連ケモカインの検出、細胞遊走確認
(3)	・プライミングGFP細胞と 未処置細胞の混和培養系 ・プライミング細胞混和系	(プライミング細胞による未処理細胞に対する機能特化作用を確認) 移植細胞の宿主由来細胞に対する機能特化作用の検証 プライミング細胞間相互作用を確認
(4)	・頭蓋骨欠損修復モデルへ プライミング細胞カクテル移植	移植部位の骨再生促進を確認、 組織学的解析よりプライミング細胞の骨増成促進機能を確認

### 3. 研究の方法

本研究は細胞移植を伴う骨増生法における移植細胞の機能の確認、機能ごとに活性化したプライミング細胞の作製と評価、プライミング細胞カクテルを移植した骨増生法の開発、を目的としている。研究実施計画は研究課題に従って(1)移植細胞の機能的意義の確認(平成 29 年度)、(2)プライミングによる機能亢進の確認(平成 30 年度)(3)内因性誘導細胞へのプライミング効果確認(平成 30 年度)、(4)プライミング細胞カクテル移植による骨形成促進と骨量維持確認(平成 31 年度)を実施する予定であった。以上の計画遂行にはラットより採取した初代培養細胞、頭蓋骨欠損修復モデル、垂直性骨増成モデルを使用する。プライミングには生理活性物質、薬剤、分化刺激の他、低酸素刺激、温度刺激、加圧刺激など、生理現象に近い刺激条件も検討する。

#### GFP 細胞移植を伴う骨増生法とラット頭蓋骨欠損修復モデル作成(分担者:秋葉陽介)

12 週齢ラット頭蓋骨に直径 5 mm のトレフィンバーを用いて自己修復不可能な直径 5 mm の限界径骨欠損を形成、欠損部に GFP ラット(SD-Tg) 骨髄より採取し、接着性細胞のみを単離した骨髄由来細胞をコラーゲンゲルに播種して移植、GFP 細胞移植頭蓋骨欠損修復モデルを作製する。頭蓋骨欠損部では細胞移植により 3 週間程度で新生骨形成による欠損修復が観察される。移植細胞は GFP 標識されており組織学的解析により、移植細胞による骨形成、血管形成などの組織形成部位と、内因細胞誘導による形成組織とを区別、同定できる。

#### 骨形成部位における移植細胞の機能の検索(代表者:秋葉奈美)

- 組織学的解析:ラット頭蓋骨欠損修復モデルの欠損部へ GFP 細胞を移植し、移植後

3、7、14、21 日後の標本を採取し GFP 陽性細胞(移植細胞)、GFP 陰性細胞(宿主由来細胞)を組織学的に同定し、細胞移植を伴う骨増生法における新生組織形成の由来細胞を検索する。

- **細胞移植部位からの移植細胞単離と網羅的遺伝子発現解析**: 頭蓋骨欠損修復モデルの欠損修復部位より移植後 7、14、21 日後に組織を採取、破碎し細胞成分を抽出し、共同実験室所有のセルソーターを用いて GFP 陽性細胞と陰性細胞に分離、更に骨分化マーカーで分離し、網羅的遺伝子発現解析を行い、移植細胞、宿主由来細胞の骨形成能と血管形成や細胞誘導など、骨形成以外の機能を遺伝子発現からスクリーニングする。

- **マイクロダイセクションによる移植細胞の遺伝子発現解析**: 組織学的解析から細胞移植、新生組織形成部位の GFP 陽性細胞と、陰性細胞を共同実験室設置のレーザーマイクロダイセクション(Leica: LMD6500/7000)を使用して組織切片より抽出し、骨芽細胞分化移植細胞、血管内皮細胞分化移植細胞などの部位特異的な発現遺伝子について検証する。移植細胞は未分化な細胞が多く細胞の部位、近傍の組織によって分化誘導を受け、発現遺伝子や移植細胞の機能は異なるものと予測される。

#### 4. 研究成果

未分化骨髄由来細胞を個別に低酸素条件、パルプロ酸処理、骨芽細胞分化誘導、血管新生分化誘導を実施し、分化マーカー遺伝子発現をリアルタイム P C R によって計測したところ、各刺激に応じて、分化処理細胞における、骨分化誘導マーカーである Runx2 や、血管新生促進マーカーである Vegf、細胞誘導能を持った Cxcl12 の遺伝子発現の上昇が観察された。

さらに細胞誘導刺激を加えた細胞培養上澄には、細胞誘導時に培養液中に分泌されたと思われる細胞誘導物質による細胞誘導作用が観察されている。この作用は被誘導細胞側のレセプター阻害剤によって、阻害される。

分化細胞の周辺細胞への影響を調べるために未分化骨髄由来細胞と各分化処理した G F P 遺伝子導入ラット骨髄由来細胞と共培養した。

一定期間共培養した後、セルソーターで分化処理細胞と未処置細胞を分離し、未処置骨髄由来細胞の遺伝子発現を解析したところ、各分化処理によって発現上昇が認められた分化マーカーの遺伝子発現上昇が未処置骨髄由来細胞でも確認された。

これは、分化処置を行った細胞の影響が共培養された未処置骨髄由来細胞に波及し、未分化細胞の分化マーカー上昇を引き起こしている可能性を示唆している。

現在、各種分化処置細胞と未処置細胞を混和した細胞を蛍光標識し、ラット頭蓋骨限界径欠損部に移植し、新生骨組織、新生血管の由来細胞同定に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiozawa Mayuko, Takeuchi Haruka, Akiba Yosuke, Eguchi Kaori, Akiba Nami, Aoyagi Yujin, Nagasawa Masako, Kuwae Hiroyuki, Izumi Kenji, Uoshima Katsumi, Mizuno Jun	4. 巻 10
2. 論文標題 Biological reaction control using topography regulation of nanostructured titanium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2438-2445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59395-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	秋葉 陽介  (Akiba Yosuke)  (70547512)	新潟大学・医歯学総合病院・講師    (13101)	
研究分担者	泉 健次  (Izumi Kenji)  (80242436)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	