

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592340

研究課題名(和文) ソノポレーション法を用いた顎骨延長法の確立

研究課題名(英文) Gene therapy using sonoporation for maxillofacial distraction

研究代表者

吉岡 泉(YOSHIOKA IZUMI)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10305823

研究成果の概要(和文)：顎骨延長法を効果的に行うために、延長部に対し副甲状腺ホルモンを導入し、骨硬化促進を解析することを目的とした。一部予定を変更し、骨形成たんぱく質とヒアルロン酸を用いて骨芽細胞の分化を促進させる方法を評価した。

ヒアルロン酸の添加により骨形成たんぱく質の受容体である物質のリン酸化の抑制が引き起こされ、それにより骨形成たんぱく質の活性が増強される可能性が、強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) is expected to be utilized to fill bone defects and promote healing of fractures. However, it is unable to generate an adequate clinical response for use in bone regeneration. Recently, it was reported that glycosaminoglycans, including heparin, heparan sulfate, keratan sulfate, dermatan sulfate, chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfate, and hyaluronic acid (HA), regulate BMP-2 activity, though the mechanism by which HA regulates osteogenic activities has not been fully elucidated. The aim of this study was to investigate the effects of HA on osteoblast differentiation induced by BMP-2. Monolayer cultures of osteoblastic lineage MG63 cells were incubated with BMP-2 and HA for various time periods. To determine osteoblastic differentiation, alkaline phosphatase (ALP) activity in the cell lysates was quantified. Phosphorylation of Smad 1/5/8, p38, and ERK proteins was determined by Western blot analysis. To elucidate the nuclear translocation of phosphorylated Smad 1/5/8, stimulated cells were subjected to immunofluorescence microscopy. To further elucidate the role of HA in enhancement of BMP-2-induced Smad signaling, mRNA expressions of the BMP-2 receptor antagonists noggin and follistatin were detected using real-time RT-PCR. BMP-2-induced ALP activation, Smad 1/5/8 phosphorylation, and nuclear translocation were up-regulated when MG63 cells were cultured with both BMP-2 and HA. Western blot analysis revealed that phosphorylation of ERK protein was diminished by HA. Furthermore, the mRNA expressions of noggin and follistatin induced by BMP-2 were preferentially blocked by HA. These results indicate that HA enhanced BMP-2 induces osteoblastic differentiation in MG63 cells via down-regulation of BMP-2 antagonists and ERK phosphorylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔外科学
科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学
キーワード：顎骨延長法 BMP

1. 研究開始当初の背景

骨延長法の治療期間短縮化への研究は様々な方法で行われている。その一つは、骨硬化期間における骨延長部への刺激を与え、創傷治癒促進、骨硬化促進を獲得する方法である。この刺激として、骨形成因子(BMP)の局所注入がある。しかしヒトではBMPに対する反応性が低く、よく骨形成を誘発し、骨再生を完成するためには多量のBMPが必要となる。その結果BMPによる骨再生は高価な治療法となる。

2. 研究の目的

骨延長法は骨の造成だけでなく、筋や神経血管などの周囲軟組織も同時に延長されることから、従来の骨欠損部位に対する自家骨移植術にはない利点を有する。しかし骨移植法に比べ治療期間が長いことが大きな欠点とされている。近年、骨延長法の治療期間の短期化を目的とした骨硬化促進の研究がなされている。本研究では顎骨に骨延長法を行い、延長部に対し副甲状腺ホルモン(PTH)を超音波遺伝子法にて骨芽細胞に導入し、骨硬化促進を解析する。

近年、さまざまな先天性疾患や、悪性腫瘍を対象に遺伝子治療の研究が進みつつある。その基本的手技である遺伝子導入法として、ウィルスベクター法と化学的あるいは物理的操作による非ウィルスベクター法がある。しかし導入率が高く、安全でしかも細胞障害性の少ない、決定的な遺伝子導入法は確立されていない。超音波エネルギーを利用した遺伝子導入法はより損傷が少なく、簡単に遺伝子導入できる方法として注目されている。そこで申請者はマイクロバブルと超音波照射を併用したソノポレーション法に着目した。

3. 研究の方法

骨芽細胞様細胞株であるMG63を用い、BMP-2とHAを添加し、ALP活性を測定した。

細胞内情報伝達分子である、リン酸化Smad1/5/8, p38, ERKタンパクの発現をウエスタンブロットにて解析を行った。この内、リン酸化Smad1/5/8に関しては核内移行を、免疫蛍光染色後に蛍光顕微鏡で観察した。加えて、BMP-2誘導によるHAの役割を明らかにするために、BMP-2レセプターアンタゴニストであるnoggin, follistatinのmRNA発現をreal-time RT-PCRにて測定した。

4. 研究成果

MG63細胞におけるBMP-2存在下のALP活性は、BMP-2とHAで刺激時に増強された。またBMP-2存在下でSmad1/5/8のリン酸化と核内移行は、HAで刺激することにより増強された。

ウエスタンブロット解析では、BMP-2によって発現したERKのリン酸化がHAの添加により抑制された。BMP-2存在下におけるnoggin, follistatinのmRNA発現は、HA添加により有意に抑制された。BMP-2存在下における骨芽細胞分化はHAによって促進されることが明らかになった。

さらにHAの添加によりnoggin, follistatinおよびERKのリン酸化の抑制が引き起こされ、それによりBMP-2の活性が増強される可能性が、強く示唆された。

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6件)

1. I. Yoshioka, A. Khanal, N. Furuta, M. Kodama, K. Tominaga. Post-operative skeletal stability and accuracy of a new combined Le Fort I and horseshoe osteotomy for superior repositioning of the maxilla Int J Oral Maxillofac Surg 38 1250-1255

2009

2 . Michinao Kawano, Wataru Ariyoshi, Kenjiro Iwanaga, Toshinori Okinaga, Manabu Habu, Izumi Yoshioka, Kazuhiro Tominaga, Mechanism involved in enhancement of osteoblast differentiation by hyaluronic acid. Biochemical and Biophysical Research Communications 25 575-580 2011.

3 . Kazuoki Hayashi, Izumi Yoshioka, Norihiko Furuta, Amit Khanal, Kazuhiro Tominaga. Effects of latency on bone formation during rabbit mandibular distraction osteogenesis. Asian Journal of Oral and Maxillofac Surg 20 5 - 11 2008.

4 . Yoshioka I, Tanaka T, Khanal A, Habu M, Kito S, Kodama M, Oda M, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Fukai Y, Tokitsu T, Tomikawa M, Seta Y, Tominaga K, Morimoto Y: Relationship Between Inferior Alveolar Nerve Canal Position at Mandibular Second Molar in Patients With Prognathism and Possible Occurrence of Neurosensory Disturbance After Sagittal Split Ramus Osteotomy J Oral Maxillofac Surg. 68 3022-3027 2010

5 . 山中雅博、吉岡 泉、土生 学、富永和宏：ラット下顎骨延長法におけるSmadの動態九州歯科会誌 63:268-276 2010 .

6 . I. Yoshioka, Y. Yamashita, A. Khanal, M. Kodama, T. Takahashi, K. Tominaga Maxillary reconstruction using an angular branch of scapula Int J Oral Maxillofac Surg 38 1311-1315 2009.

〔学会発表〕(計 2 件)

1 . 第 55 回(社)日本口腔外科学会総会・学術集会(2010.10.16-18)千葉市 吉岡 泉、井川加織、高森晃一、永田順子、鹿嶋光司、迫田隅男：ポリグリコール酸シートとフィブリン糊スプレーを用いた創面被覆法の使用

経験 .

2 . 第 20 回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会(2010.6.15-16)札幌市

吉岡 泉、副島和久、井川加織、鹿嶋光司、迫田隅男：歌舞伎メーカーキャップ症候群に伴った唇顎口蓋裂を有する骨格性反対咬合の 1 例 .

〔図書〕(計 1 件)

吉岡 泉：歯と歯周組織の発生と解剖 . よくわかる歯科医学・口腔ケア 医学情報社 (喜久田利弘 楠川仁悟 編集) 医学情報社 10-11 2011 .

〔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

吉岡 泉 (YOSHOKA IZUMI)
宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10305823

(2)研究分担者

迫田 隅男 (SAKODA SUMIO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：20118079

井川 加織 (IGAWA KAORI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90423722

(3)連携研究者

研究者番号：