

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05036

研究課題名(和文) 強力な骨形成タンパクBMP-9と脂肪組織由来細胞を活用した新規再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of new regeneration therapy using strong osteoplasty protein BMP-9 and cells derived from adipose tissue

研究代表者

野口 和行 (NOGUCHI, Kazuyuki)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：90218298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、口腔内疾患により失われた歯周・顎骨組織の再生のために、シグナル分子としてBMP-9とFK506を併用し、細胞移植のソースとして、脂肪組織に由来する幹細胞(ADSC)および脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた新規治療法の開発を目的としている。In vitroにおいて、BMP-9とFK-506で共刺激することでrADSCおよびrDFATの骨芽細胞様分化が促進することが認められた。またラット頭蓋骨欠損モデルにおいてBMP-9とFK-506共刺激rDFAT培養上清の移植は骨再生の可能性を示唆した。

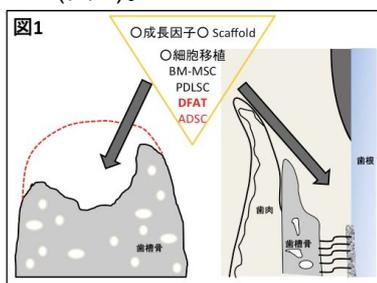
研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was development of new regenerative therapy for lost bone tissues due to periodontal and oral disease by using FK506 together with BMP-9 for signal molecules and stem cells (ADSC) and dedifferentiated fat cells(DFAT) which derived from adipose tissue as a source of cell transplant. In vitro study demonstrated that BMP-9 and FK506 costimulation induces promotion of osteoblasts-like differentiation in both rat ADSC and rat DFAT. Furthermore, we demonstrated that rDFAT cells culture supernatant of BMP-9 and FK506 costimulation have bone regenerative potential in rat calvarial defects model.

研究分野：歯周病学

キーワード：DFAT BMP-9 歯周病 骨組織再生 歯周組織再生 細胞移植 培養上清 再生療法

1. 研究開始当初の背景

歯周病により破壊される歯周組織は歯槽骨、セメント質、歯根膜といった複数の異なる組織によって構成される。また歯科疾患により歯が失われると、歯槽骨は次第に吸収し、口腔機能回復に様々な制約が生じる場合が多い。このような喪失した歯周組織の再生や顎骨の造成を行う治療法としては、様々な骨移植材(自家骨・合成骨・異種骨)やシグナル分子 (PDGF, enamel matrix derivative など)を作用させる等の手法がとられている。しかし、適応症が狭い満足のいく予知性が得られないなど様々な問題が残されており、さらなる適応症の拡大と、効率的で理想的な歯周組織・顎骨組織の再生を目的として Tissue engineering の3要素の観点から、A:シグナル分子 B:細胞 C:Scaffold について様々な研究が行われている(図1)。



BMP-9は、骨形成 BMP である BMP-2, BMP-6, BMP-7 よりも高い骨分化誘導能を有し、Noggin や BMP-3 による骨形成抑制のコントロールを受けないユニークな特徴を有し、近年注目されている因子である (Luu HH et al., J Orthop Res, 2007)。免疫抑制剤である FK506 はいくつかの研究により骨形成作用がある可能性が示されている (Kang KY et al., Rheumatol Int, 2013)。また細胞移植のための細胞ソースとして骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) や歯根膜由来細胞などいくつかの細胞種が研究されているが、例えば BM-MSC を用いた場合には、細胞の採取には患者に多大な侵襲を伴い、採取される幹細胞数も限定され、複数回の採取が困難などの欠点がある。歯根膜細胞移植療法の有効性も報告されているが、歯根膜細胞の入手には抜歯する歯が必要であり、限界がある。そこで申請者は脂肪組織由来細胞に注目している。脂肪組織は脂肪吸引技術の進歩により容易に入手可能であり、脂肪組織からは2種類の組織幹細胞が分離できる。その一つは間質・血管系画分 (stromal-vascular fraction, SVF) から分離される脂肪由来幹細胞 (ADSC) である。ADSC は様々な組織において研究が進められ、細胞源としてその有効性が示されている。歯周組織再生においても ADSC を用いた歯周組織再生の有効を示す報告があるが、まだ十分に解析されているとは言えない。もう一つの脂肪組織由来の組織幹細胞として、Matsumotoら (J Cell Physiol, 2008) によ

って報告された、成熟脂肪細胞の天井培養により得られる線維芽細胞様細胞群: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) がある。DFAT は高い増殖能と多分化能を有し、MSC と同様のポテンシャルを持つことが明らかとなり、有望な細胞移植のソースとして考えられる。また、DFAT の特徴として、BM-MSC や ADSC に比べ、純度の高い細胞が入手可能で、組織採取量が微量ですむことから、高齢者からも調整可能である。申請者は、既にラット頭蓋骨欠損モデルを用いて、ラット DFAT 移植により骨再生が誘導されることを報告し (Shirakata et al., J Mater Sci: Mater Med, 2014)、さらにラット DFAT を用いて、BMP-9 と FK506 の共刺激が BMP-2 刺激よりも著しく骨芽細胞様細胞に分化させることを明らかにしている (Nakamura T et al., Biochem Biophys Res Commun, 2013)。DFAT を用いた歯周組織再生の可能性が最近示唆された (Sugawara et al., Human cell, 2014) が、さらに発展・展開させる必要がある。また、ADSC と DFAT のどちらを用いた方が歯周組織再生あるいは骨再生に有効なのか、あるいはどちらも同じ脂肪組織から得られることから両者の適切な割合での混合がさらに有効となる可能性もあり、解析する必要があると考える。一方、Inukaiら (Biochem Biophys Res Commun, 2013) や Osugiら (Tissue Eng Part A, 2012) は BM-MSC の培養上清を用いて動物実験において歯周組織再生および骨再生が生じることを報告している。すなわち、組織幹細胞を直接移植せず、組織幹細胞の産生する成長因子を含む複合的因子を用いることによって組織再生が可能であることを示している。このようなことから、BMP-9 と FK506 の刺激後の ADSC および DFAT の培養上清を用いた歯周組織再生および骨再生についても検討する。

2. 研究の目的

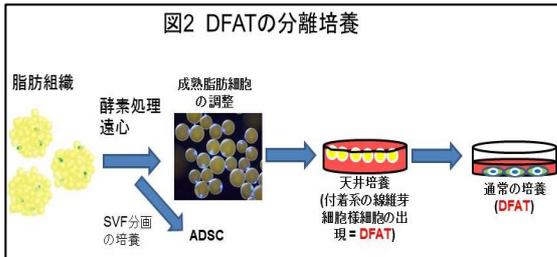
現在行われている歯周病により失われた歯周組織の再生療法やインプラント治療時の顎骨の骨造成には、適応症の限界、自家骨・他家骨移植に伴う問題、さらに組織再生量の限界など、様々な問題が残されており、重度の歯周組織または顎骨欠損に対し応用可能な安全で効率的な再生療法の開発が求められている。これらの問題点を解決するために細胞移植療法の開発研究が進められているが、組織再生に有効な成長因子と倫理的問題を克服し、かつ比較的容易に採取可能である自家細胞を用いた移植を適切に選択することが極めて重要と考えられる。本研究では、細胞へのシグナル分子として BMP-9 と FK506 を併用し、細胞移植のソースとして、脂肪組織に由来する幹細胞 (ADSC) および脱分化脂肪細胞 (De-differentiated fat cells: DFAT) に着目し、歯周組織再生および顎骨再生への新規治療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

本研究は鹿児島大学動物実験委員会 (D13008, D14022, D14023, D15016)の承認のうえ、実施された。

(1)DFAT の分離培養(図2)

Wistar 系ラットの鼠径部より脂肪組織採取
 0.1% Collagenase I を用いて、37℃, 1時間 gentle shaking
 Filtrate 後、135g で3分間遠心
 維持培地にて1週間天井培養後、フラスコを反転し、継続して培養 rDFAT
 底に沈んだペレットを通常培養 rADSC



(2)骨芽細胞様分化解析

rDFAT, rADSC および歯根膜由来線維芽細胞 (PDLFs) を様々な条件下で培養し、ALP 染色および ALP 活性を行った。ALP 活性についてはタンパク定量後、総タンパク量にて補正を行った。hPDLFs の石灰化物形成は alizarin Red S 染色・定量にて評価した。また hPDLFs の smad1/5/8 のリン酸化は western blot 法にて解析した。

(3)rDFAT 培養上清解析

rDFAT を様々な条件下で培養後、無血清培地に交換、培養上清回収し、ELISA 法にて IGF-1, VEGF, TGF- β 1, HGF に関して定量的に解析した。

(4)ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた rDFAT 培養上清の骨形成能の評価

麻酔下にて、トレフィンバー(直径5mm)を用いて、Wistar 系ラットの頭蓋骨左右に5mmの骨欠損を外科的に作製し、骨欠損を以下の2つの実験群に分けてパイロット的に処置を行った。

アテロコラーゲンスポンジ (ACS)+rDFAT 培養上清(無刺激), ACS+rDFAT 培養上清 (BMP-9+FK-506 刺激)

8週後に屠殺し、マイクロCT(SKYSCAN1174)撮影後、放射線学的解析を行った。

(5)hPDLFs 遺伝子発現解析

hPDLFs を様々な条件下で培養後、total RNA を抽出し、RT-PCR 法または Real-Time PCR 法を用いて各種遺伝子発現を解析した。

(6)ラット頭蓋骨欠損を用いた BMP-2 と BMP-9 の骨形成能の比較

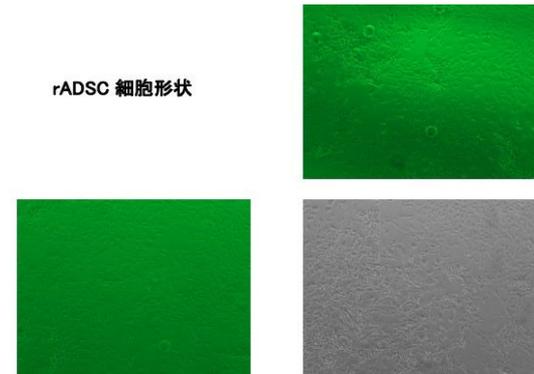
麻酔下にて、トレフィンバー(直径5mm)を用いて、Wistar 系ラットの頭蓋骨左右に5mmの骨欠損を外科的に作製し、骨欠損を以下の4つの実験群に分け処置を行った。

Control(Scaffoldなし), ACS, ACS+rhBMP-2, ACS+rhBMP-9

2週、8週後に屠殺し、マイクロCT(SKYSCAN1174)撮影後、放射線学的解析を行った。その後、通法に従いパラフィン切片作成後、HE染色を行い、骨形成について組織学的観察・解析を行った。

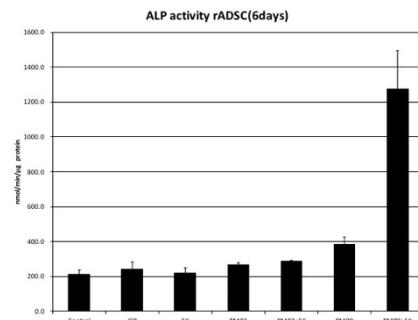
4. 研究成果

(1)rADSC 分離・培養



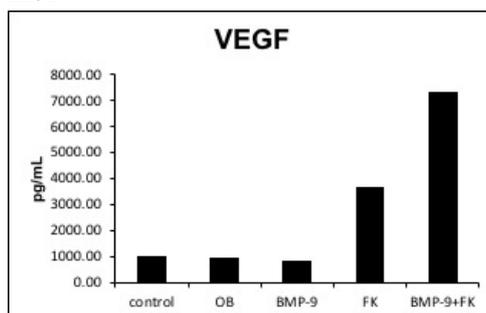
rDFAT と同様に線維芽細胞様の細胞が認められた。

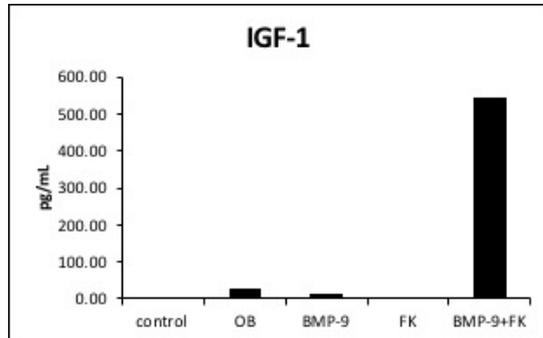
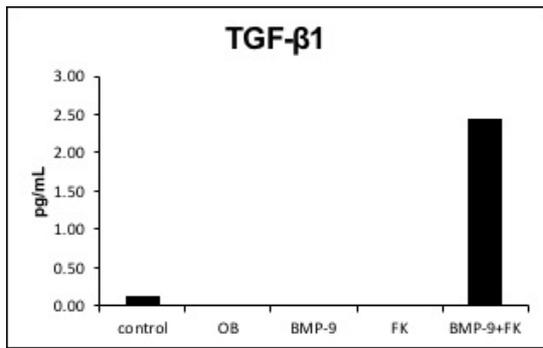
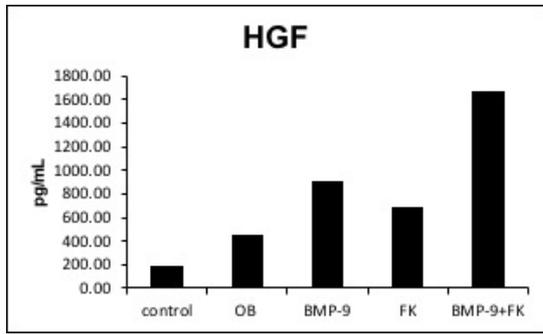
(2) rDFAT, rADSC の BMP-2, BMP-9 および FK-506 共刺激下における ALP 染色, ALP 活性



rDFAT, rADSC の両細胞において、BMP-9 と FK-506 共刺激群は単独刺激群と比較して著しく ALP 染色が亢進し、rADSC では ALP 活性においても著しい上昇を認めた。

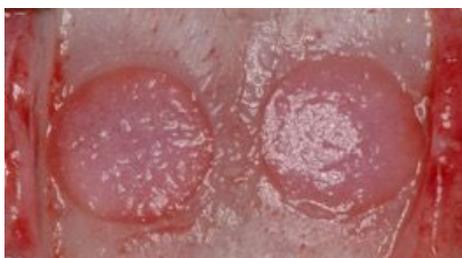
(3) rDFAT の BMP-9 および FK-506 共刺激下における培養上清中のサイトカインの定量化



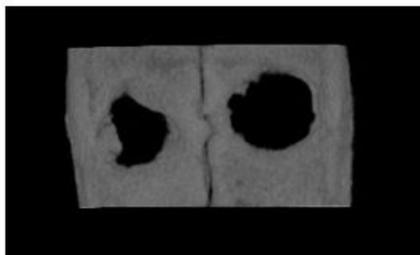


BMP-9 と FK-506 で共刺激した rDFAT 培養上清中における VEGF, HGF, TGF- 1, IGF-1 の量は他群と比較し著しく増加していることが認められた。

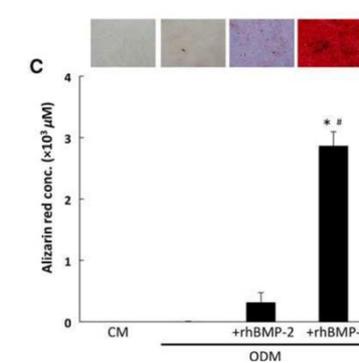
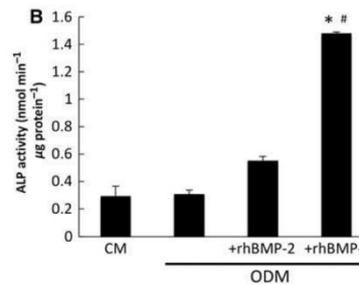
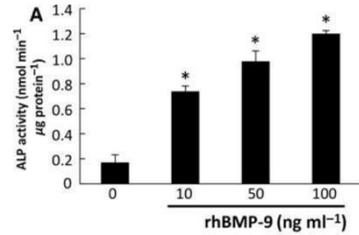
(4) ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた BMP-9 と FK-506 共刺激 rDFAT 培養上清の骨形成能の放射線学的観察



BMP-9 + FK506 培養上清 Control 培養上清

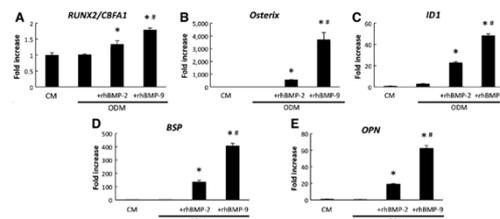


術後 8 週における ACS+rDFAT 培養上清 (BMP-9+FK-506 共刺激) のマイクロ CT 像では、ACS+rDFAT 培養上清 (無刺激) と比較し、骨欠損部の辺縁から中央部に向けて申請骨の形成が認められた。
(5) hPDLFs の BMP-2 および BMP-9 刺激時の ALP 活性、石灰化物の変化



BMP-9 の濃度依存的に ALP 活性が亢進した。ODM 単独、あるいは BMP-2 刺激と比較して、BMP-9 刺激では有意に ALP 活性が亢進した。CM や ODM 単独では、石灰化物形成はほとんど認められず、BMP-2 刺激ではわずかに、BMP-9 刺激では著しい石灰化物形成が認められた。

(6) hPDLFs の BMP-2, BMP-9 刺激下における骨関連遺伝子

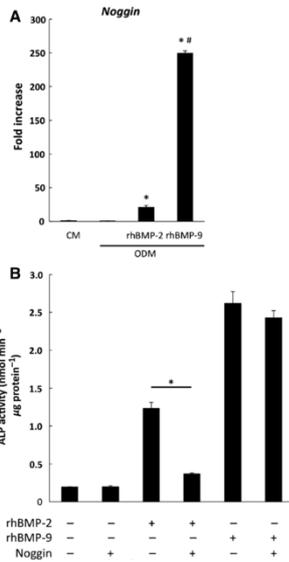


Runx2, osterix, ID1, BSP, OPN いずれも、ODM 単独、BMP-2 刺激と比較して、BMP-9 刺激で有意に遺伝子発現が亢進した。

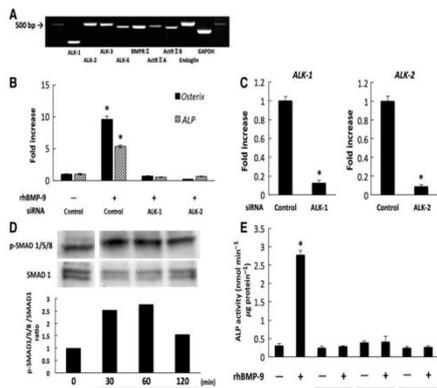
(7) hPDLFs における noggin の遺伝子発現および ALP 活性への影響

BMP-2, BMP-9 刺激により noggin の遺伝子発現亢進が認められた。BMP-2 と noggin 共刺激時は BMP-2 単独刺激時と比較して、ALP

活性が有意に減少したのに対し、BMP-9 と noggin 共刺激時は BMP-9 単独刺激時と比較して有意差はなく、BMP-9 刺激による ALP 活性は、noggin の影響を受けないことが示された。



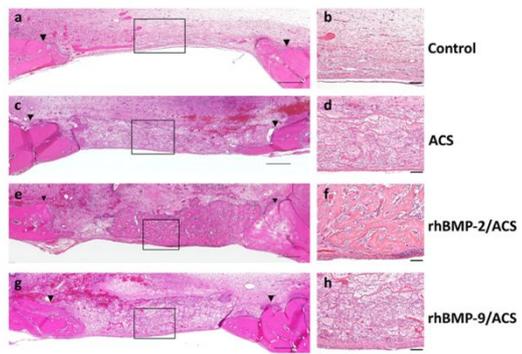
(8) hPDLFs 各種 BMP 受容体の遺伝子発現、ALK-1, 2 の遺伝子抑制による変化、hPDLFs の BMP-9 刺激下における smad1/5/8 のリン酸化、p38, JNK, ERK1/2 選択的阻害剤を用いた ALP 活性の評価



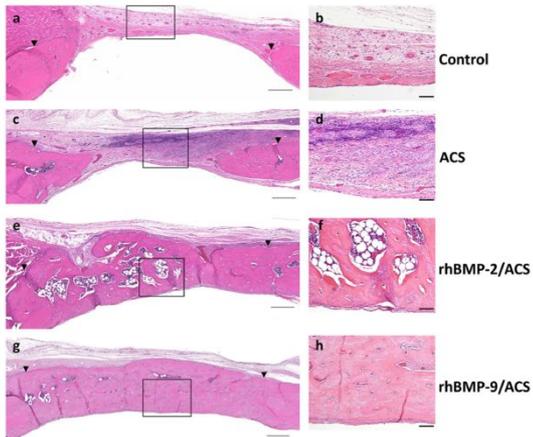
BMP-9 の受容体として ALK-1, -2, 型レセプター、型レセプターおよび endoglin の発現が確認された。osterix, ALP とともに、BMP-9 添加により亢進した遺伝子発現は、ALK-1, -2 の遺伝子抑制により、BMP-9 未添加時と同等レベルまで発現が抑えられ、BMP-9 のシグナル伝達に ALK-1, -2 が重要な働きをすることが示された。BMP-9 刺激後 30~60min にかけて顕著なリン酸化が認められ、SMAD を介したシグナル伝達が行われていることが確認された。BMP-9 添加により亢進した ALP 活性が、各種阻害剤の添加により、BMP-9 未添加時と同等レベルまで活性が抑えられ、MAPK を介したシグナル伝達も行われていることが確認された。

(9) ラット頭蓋骨欠損を用いた BMP-2 と BMP-9 の骨形成能の比較

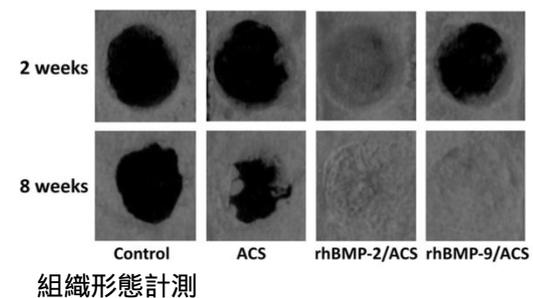
術後 2 週における各群の組織像 (HE 染色)



術後 8 週における各群の組織像 (HE 染色)



術後 2, 8 週における各群のマイクロ CT 像



Histomorphometric parameter	Experimental condition			
	Control	ACS	rhBMP-2/ACS	rhBMP-9/ACS
2 weeks				
	N = 7	N = 7	N = 7	N = 7
DL (mm)	4.95 ± 0.06	4.99 ± 0.03	4.93 ± 0.03	4.91 ± 0.10
DC (mm)	2.09 ± 0.30	2.13 ± 0.97	4.23 ± 1.34	2.89 ± 1.03
TA (mm ²)	4.76 ± 0.21	4.97 ± 0.25	5.01 ± 0.28	1.18 ± 0.44
NBA (mm ²)	0.90 ± 0.12	0.96 ± 0.43	2.34 ± 1.00	1.18 ± 0.44
8 weeks				
	N = 7	N = 7	N = 7	N = 7
DL (mm)	4.99 ± 0.04	4.94 ± 0.06	4.93 ± 0.11	4.96 ± 0.05
DC (mm)	2.75 ± 1.14	3.84 ± 0.86	4.89 ± 0.15	4.95 ± 0.06
TA (mm ²)	4.83 ± 0.13	4.84 ± 0.14	4.96 ± 0.11	4.84 ± 0.12
NBA (mm ²)	1.67 ± 0.64	2.27 ± 0.92	3.44 ± 0.57	3.31 ± 0.55
BMA (mm ²)	0.01 ± 0.01	0.07 ± 0.06	0.51 ± 0.17	0.23 ± 0.19
ATA (mm ²)	0.00 ± 0.01	0.02 ± 0.03	0.31 ± 0.12	0.12 ± 0.12

術後 2 週における rhBMP-2/ACS 群の骨欠損閉鎖率、新生骨面積率は他の 3 群より高かった。術後 8 週では、rhBMP-2/ACS 群と rhBMP-9/ACS 群の骨欠損閉鎖率、骨欠損中心部の骨の厚みが他の 2 群より有意に高か

った。また、新生骨面積率は rhBMP-2/ACS 群と rhBMP-9/ACS 群が Control 群と比較し有意に高かった。

(10) まとめ

DFAT および ADSC の骨分化刺激因子として BMP-9 と FK-506 の共刺激の有効性が示唆された。

BMP-9 と FK-506 の共刺激 DFAT 培養上清の骨欠損移植における骨再生の有用性がラット頭蓋骨欠損モデルにおいて示唆された。

BMP-9 は hPDLFs の骨芽細胞様分化を強力に促進する因子で、その作用には SMAD、MAPK の両経路が関与することが示された。

ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて BMP-2 は術後 2 週と早期に新生骨形成を認め、術後 8 週では BMP-9 では BMP-2 と比較し、脂肪組織の少ない新生骨形成を認めた。

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 4 件)

(1) Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Hasegawa-Nakamura K, Fujioka-Kobayashi M, Noguchi K.

Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects. Clin Oral Investig. 2017 Dec;21(9):2671-2679. doi: 10.1007/s00784-017-2069-3. 査読有り

(2) Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Furue K, Noguchi K. Osteogenic potential of recombinant human bone morphogenetic protein-9/absorbable collagen sponge (rhBMP-9/ACS) in rat critical size calvarial defects. Clin Oral Investig. 2017 Jun;21(5):1659-1665. doi: 10.1007/s00784-016-1963-4. 査読有り

(3) Shinohara Y, Nakamura T, Shirakata Y, Noguchi K. Bone healing capabilities of recombinant human bone morphogenetic protein-9 (rhBMP-9) with a chitosan or collagen carrier in rat calvarial defects. Dent Mater J. 2016;35(3):454-60. doi: 10.4012/dmj.2015-242. 査読有り

(4) Fuchigami S, Nakamura T, Furue K, Sena K, Shinohara Y, Noguchi K. Recombinant human bone morphogenetic protein-9 potently induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. Eur J Oral Sci. 2016 Apr;124(2):151-7. doi:10.1111/eos.12249. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

(1) Toshiaki Nakamura, Yoshinori Shirakata, Yukiya Shinohara, RJ Miron, Kozue Hasegawa-Nakamura, Kazuyuki Noguchi A comparative study of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical size defects. Osteology Japan 2017 年

(2) 古江きらら、瀬名浩太郎、中村利明、迫田賢二、野口和行 Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) の歯根膜由来線維芽細胞の機能への影響 平成 28 年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会 2016 年 11 月

(3) 中村利明、白方良典、野口和行 ラット頭蓋骨欠損における rhBMP-9 と rhBMP-2 の骨形成効果に対する比較研究 第 46 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 2016 年 09 月

(4) 篠原敬哉、中村利明、白方良典、古江きらら、野口和行 Recombinant human bone morphogenetic protein-9/コラーゲン担体がラット頭蓋骨欠損の骨形成に及ぼす影響 第 59 回春季日本歯周病学会 2016 年 05 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 和行 (NOGUCHI Kazuyuki)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号: 90218298

(2) 研究分担者

白方 良典 (SHIRAKATA Yoshinori)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号: 60359982

中村 利明 (NAKAMURA Toshiaki)

鹿児島大学・医歯学域付属病院・講師

研究者番号: 60381183

瀬名 浩太郎 (SENA Kotaro)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号: 60701117

迫田 賢二 (SAKODA Kenji)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号: 70419654

(3) 連携研究者

なし。

(4) 研究協力者

なし。