

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11062

研究課題名(和文)新規骨誘導性DNAスカフォールドによる骨形成促進作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)The Mechanism of New Bone Regeneration in New Salmon DNA Scaffold

研究代表者

鍛冶屋 浩(KAJIYA, HIROSHI)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：80177378

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)：我々は、サケ白子由来のDNAとプロタミン(P)を用いて作製したDNA/Pスカフォールドは頭蓋骨欠損部モデル動物において骨伝導能を持つことを報告した。しかしながら、このDNAの新生骨の誘導作用機序に関しては不明である。そこで、骨芽細胞に対するDNAの骨分化関連分子及びその分解産物のリン酸輸送能の効果に関し検討した。DNAは骨芽細胞において骨分化分子の発現を増大させ、同時にリン酸濃度が増加することが明らかになった。又、DNAの添加は骨芽細胞の遊走能を増強した。骨欠損部へのDNA埋入は骨再生を促進した。以上よりDNAはリン酸輸送の活性化と骨形成細胞の遊走を介し骨再生を促進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We previously reported the promotion of bone regeneration in calvarial defects of rats, with DNA/protamine scaffold. However, the method by which this DNA-based scaffold promotes bone formation is still not understood. We examined the effects of salmon DNA on osteoblastic differentiation and calcification in mouse and human preosteoblasts cells in vitro and bone regeneration in a calvarial defect model of in vivo. The DNA was upregulated the expression of the osteogenic markers in preosteoblasts. The DNA scaffold degraded phosphate ions were released to the cell cultures. Furthermore, DNA enhanced migration and upregulated the expression of Na/Pi cotransporters in preosteoblasts. The rodent bone defects implanted with DNA disks promoted new bone formation. Our results indicate that the phosphate released from DNA activated the Na/Pi cotransporters and the migration of osteogenic cells, resulting in the promotion of bone regeneration.

研究分野：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：骨再生 骨芽細胞 DNA 細胞遊走能 リン酸輸送体

1.研究開始当初の背景

硬組織再生には、足場、骨分化・形成のための細胞(骨芽細胞や間葉系幹細胞)及び形成促進作用を有する生物活性因子(サイトカイン類)の3つの要素が必要であることが知られている。又、新生骨再生過程において骨基質形成のための骨芽細胞前駆細胞が骨欠損部へ遊走することにより開始されることも知られている。我々は、サケ白子由来のDNAとプロタミンを用いて作製したDNA/プロタミン(D/P)スcaffoldは正常及び骨粗鬆症モデルの頭蓋骨欠損部モデル動物において骨伝導能を持つことを報告した。しかしながら、このDNAのscaffoldの新生骨の誘導作用機序に関しては不明である。

2.研究の目的

そこで、DNAによる骨芽細胞に対する骨分化・基質分泌関連分子及びDNA分解産物であるリン酸の溶解とこの輸送に関わる分子の発現変化について検討した。さらに、DNAによる骨欠損部の新生骨形成過程の形態組織学的解析とDNAによる骨芽細胞の骨分化・基質分泌能への効果についても検討した。

3 . 研究の方法

マウス骨芽細胞株MC3T3-E1細胞をサケ白子由来のDNA存在下で培養し、骨分化関連分子DNAとその分解産物であるリン酸遊離能およびこの輸送に関わる分子の発現変化について検討した。さらに、ヒト骨芽細胞株MG63細胞を用いDNA存在下で培養し、骨分化関連分子及び遊走性について検討した。

さらに、ラット及び加齢マウスの頭蓋骨骨欠損モデルを作製し、骨再生過程における

DNAの効果についてmicro-CT法を用いて検討した。

4 . 研究の成果

DNA は骨分化誘導過程においてコントロールと比較し、マウス及びヒト骨芽細胞株において骨分化関連分子(ALP, Runx2, Osterix)の発現を有意に増大させた(図1)。

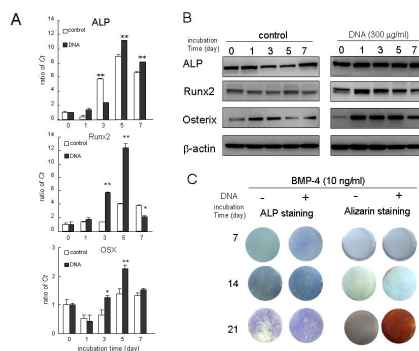


図1 DNAによる骨分化促進作用

又、DNA自身は培養5日後にほぼ分解され、培養液中のリン酸濃度が増加することが明らかになった。そこで、リン酸輸送体に着目したところ、DNA刺激依存性に骨芽細胞のNa⁺依存性リン酸輸送体(SLC20A1、SLC34A2)の発現が増大した逆にリン酸輸送体阻害剤の投与はDNA刺激によるリン酸輸送体の発現の減少を伴って骨分化関連分子の発現も減少させた(図2)。

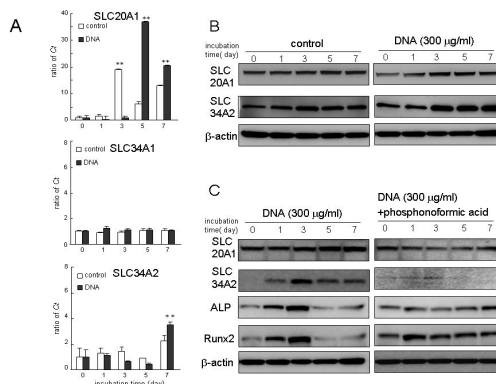


図2 DNAによるリン酸輸送体発現作用

さらに、DNA はヒト骨芽細胞の遊走性を増強した。さらに、頭蓋骨骨欠損モデルラットにおいて、DNA 埋入部周囲に間葉系幹細胞のマーカ-1つである ADH1 陽性細胞が多く存在し、欠損部から結合性組織へ置換された部位に Osterix が多く観察され、最終的に骨再生が DNA により有意に促進された(図 3)。

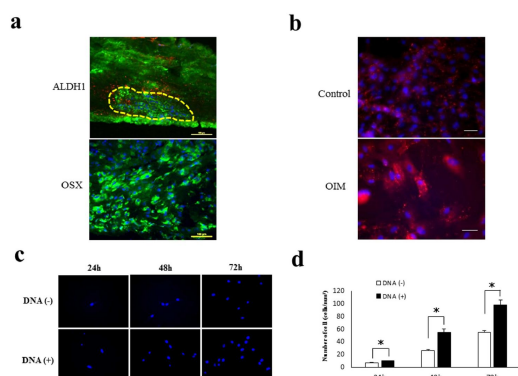


図 3 DNA による間葉系幹細胞遊走性の集積と細胞遊走能

又、加齢マウスの頭蓋骨骨欠損モデルにおいても DNA 埋入により骨再生率の増加、成熟骨の増加及び線維性結合組織の減少が認められた

<考察>

サケ白子由来の新規骨伝導性を持つ DNA/プロタミン(D/P)スcaffoldsによる骨形成促進作用は DNA 分解産物のリン酸濃度増加によりリン酸輸送体の発現が促進され、骨分化と基質形成が促進されることが示唆された。これらの結果は、DNA は骨形成のための細胞を欠損部へ遊走させると共に、骨分化を促進し、結果的に新生骨再生が促進されることが明らかになった

5. 主な発表論文等

雑誌論文

1. Rab44, a novel large Rab GTPase, negatively regulates osteoclast differentiation by modulating intracellular calcium levels followed by NFATc1 activation. Yamaguchi Y, Sakai E, Okamoto K, Kajiya H, Okabe K, Naito M, Kadowaki T, Tsukuba T*. *Cell Mol Life Sci.* 2017. doi:10.1007/s00018-017-2607-9.(査読有り)
2. Dynamics of M1 macrophages in oral mucosal lesions during the development of acute graft-versus-host disease in rats. Seno K, Yasunaga M, Kajiya H, Izaki-Hagio K, Morita H, Yoneda M, Hirofuji T, Ohno J*. *Clin Exp Immunol.* 2017. doi:10.1111/cei.13043. (査読有り)
3. Salmon DNA Accelerates Bone Regeneration by Inducing Osteoblast Migration. Sato A, Kajiya H, Mori N, Sato H, Fukushima T, Kido H, Ohno J*. *PLoS One.* 2017;12:e0169522. doi: 10.1371/journal.pone.0169522. (査読有り)
4. Hyperocclusion stimulates the expression of collagen type XII in periodontal ligament. Tsuzuki T, Kajiya H*, Goto-T K, Tsutsumi T, Nemoto T, Okabe K, Takahashi Y. *Arch Oral Biol.* 66:86-91, 2016. (査読有り)
5. In vivo evaluation of bone regeneration by DNA/protamine complex treatment with photothermal stress stimulation in an aged rat calvarial defect model. Kawaguchi M*, Mori K, Kajiya H, Ikebe T, and Fukushima T. *J Oral Tissue Engin* 13:67-76, 2015. (査読有り)
6. A salmon DNA scaffold promotes osteogenesis through activation of sodium-dependent phosphate cotransporters. Katsumata Y, Kajiya H*, Okabe K, Fukushima T, Ikebe T. *Biochem Biophys Res Commun.* 468:622-628, 2015. (査読有り)
7. Photothermal stress triggered by near-infrared-irradiated carbon nanotubes up-regulates osteogenesis and mineral deposition in tooth-extracted sockets. Kajiya H*, Katsumata Y, Sasaki M, Tsutsumi T, Kawaguchi M, Fukushima T. *Int J Hyperthermia.* 31:635-642, 2015. (査読有り)
8. Mevalonates restore zoledronic acid-induced osteoclastogenesis inhibition. Nagaoka Y, Kajiya H*, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K. *J Dent Res.* 94:594-601, 2015. (査読有り)

9. Photothermal stress triggered by near infrared-irradiated carbon nanotubes promotes bone deposition in rat calvarial defects.

Yanagi T, Kajiya H*, Kawaguchi M, Kido H, Fukushima T. *J Biomater Appl.* 29:1109-1118, 2015. (査読有り)

学会発表

1. 佐藤絢子, 松本彩子, 柳束, 大野純, 鍛冶屋浩, 城戸寛史, 橋本修一. 骨伝導能を有する多孔性DNAスキャフォールドの開発. 第15回日本再生医療学会総会, 2016年3月16日(東京)
2. 勝俣由里, 鍛冶屋浩, 首藤俊一, 池崎晶二郎, 田中文恵, 永島勝之, 永沼香織, 見立英史, 米津博文, 泉喜和子, 平木昭光, 池辺哲郎. サケDNAスカフォールドはリン酸輸送体の活性を介して骨形成を促進する. 第71回日本口腔科学会学 2017年4月27日. (愛媛)
3. Yanagi T, Kakura K, Fujisaki S, Isobe Y, Kajiya H, Ohno J, Kido H. Drastic effect of the new cell transplantation strategy for bone regeneration. liACD Annual Conference, 2017年5月5. (New York)
4. 脱分化脂肪細胞による3次元スフェロイドを応用した骨再生効果 柳束, 鍛冶屋浩, 今村彩香, 加倉加恵, 岡部幸司, 城戸寛史, 大野純 第35日本骨代謝学会, 2017年7月28日. (福岡)
5. 今村彩香, 鍛冶屋浩, 小島寛, 岡部幸司, 大野純. 3次元培養による間葉系幹細胞の骨形成におけるβ-cateninの相互作用. 第59回歯科基礎医学会, 2017年9月16日. (塩尻市)
6. 利光拓也, 小島寛, 鍛冶屋浩, 大野純. Wntによるスフェロイド培養細胞への骨分化誘導効果. 第59回歯科基礎医学会, 2017年9月16日. (塩尻市)
7. 今村彩香, 鍛冶屋浩, 柳束, 藤崎誠一, 小島寛, 岡部幸司, 大野純. 3Dスフェロイドを形成した間葉系幹細胞のβ-cateninを介する骨分化促進作用. 第17回日本再生医療学会, 2018年3月21日. (横浜市)
8. 利光拓也, 小島寛, 鍛冶屋浩, 大野純. Wnt3aがスフェロイド培養ヒト歯根膜幹細胞の骨分化誘導に及ぼす影響. 第17回

日本再生医療学会, 2018年3月21日. (横浜市)

[雑誌論文](計 9件)

[学会発表](計 8件)

[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]

ナシ

6. 研究組織

(1)研究代表者

鍛冶屋 浩(KAJIYA HIROSHI)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号: 80177373

(2)研究分担者

大野 順 (OHNO JUN)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号: 10152208

(3)研究協力者

福岡歯科大学・口腔歯学部・大学院

今村 彩香(IMAMURA AYAKA)