

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20453

研究課題名(和文)微小環境制御による硬組織再建方法の開発

研究課題名(英文) Establishment of Bone Reconstructio treatment by micro environmental control

研究代表者

館 慶太 (Tachi, Keita)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90585671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Bone morphogenetic protein (BMP)は骨の再建に有用と考えられてきた。しかし臨床的には活性が弱く大量のBMPを用いるため、コスト面等の問題が実用化の障壁となっている。申請者らはBMP-2と Transforming growth factor-1 (TGF-1)を併用することによりBMP-2の骨形成能を増強することがわかり、低酸素誘導因子であるHypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)の発現が関わっている事がわかった。Deferoxamine (DFO)を用い低酸素状態にしたところ骨芽細胞分化は抑制され破骨細胞分化は促進した。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic protein induced ectopic bone formation. However, the detailed mechanism of ectopic bone formation have not been fully understood. We examined the effects of TGF-BETA on bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation using amouse experimental model. HIF-1a mRNA expression levels in ectopic bone tissues at 5 days after implantaion induced by BMP-2 + TGF-BETA was enhanced. Enhancement of bone formation by TGF-BETA was suggested that enhances bone metabolism via expression of HIF-1.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨再生 BMP-2 HIF-1 DFO 骨芽細胞 破骨細胞

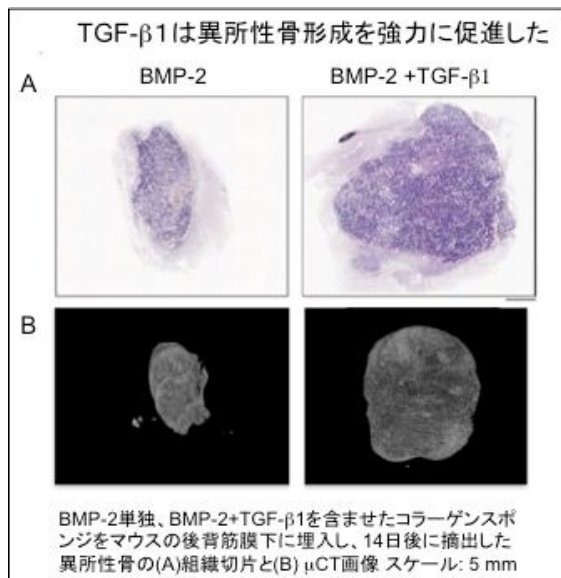
1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科治療における骨増生の必要性

歯科医療において骨吸収や骨欠損は歯科インプラント埋入や補綴治療を困難にする。現在はβ-TCP等で骨増生を試みているが生着が悪く、長期的な予後も十分な結果を残しているとは言いがたい。そのため、優れた骨再建技術の開発が望まれている。

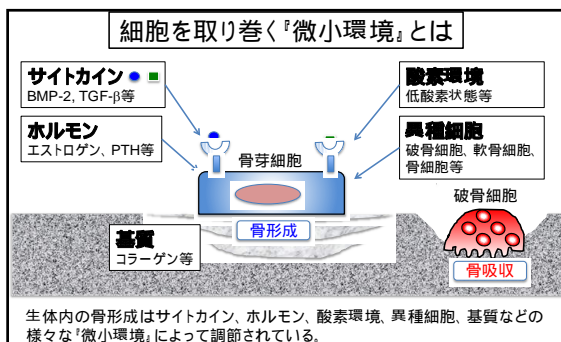
(2) 再生医療における BMP の利用と問題点

Bone morphogenetic protein (BMP) は1965年 Urist により発見され [Urist, M. R. et al. *Science* 150(689):893-899 (1965)] 骨形成能を有しており、皮下や筋肉内に埋入することにより、異所性の骨化物を誘導する。しかし臨床的に必要な骨量を誘導するには、BMPの生体内活性が弱く大量のBMPが必要となる。そこでBMPの作用が増強される因子が常に求められてきた。我々は独自の方法によりBMPの骨形成作用を促進する因子を探索した結果TGF-β1がBMP-2の骨形成を大きく促進することを明らかにした。



(3) 低酸素状態との関連性

BMP-2とTGF-β1によって骨形成が促進されたものの初期細胞塊の遺伝子解析を行い、TGF-β1添加群はBMP-2単独群に比較し、低酸素誘導因子のHIF-1の遺伝子発現が優位に高くなっていることがわかった。



2. 研究の目的

本研究の目的はBMP-2による骨形成とサイトカインや低酸素、異種細胞、ホルモン等の周囲の微小環境との関連性を明らかにし、それらを制御することによってBMPの生体内活性を高め、骨の欠損を再建する新しい治療を確立することである。本研究の特徴は、独自の細胞工学技術を利用した先進的な取り組みであること、そして近い将来骨欠損などの骨再建治療に革新的な進歩をもたらす可能性を持つことである。

3. 研究の方法

低酸素状態の骨形成促進のメカニズム解明
(1) 低酸素と組織塊を構成する細胞の関連性の検討

Deferoxamine (DFO)はFe²⁺のキレート剤としてHIF-1αの分解経路を阻害することにより、通常酸素濃度でHIF-1を増強することで知られている(引用文献より)。つまりDFOを添加することで強制的に擬似低酸素環境を作り出せる。HIF-1と組織塊構成細胞の骨芽細胞と破骨細胞の関連性を検討するため、骨芽細胞培養中にDFOを添加し骨芽細胞分化に及ぼす効果を検討した。同様に骨髄細胞にRANKLを添加し破骨細胞分化誘導中にDFOを添加し破骨細胞分化に及ぼす効果を検討した

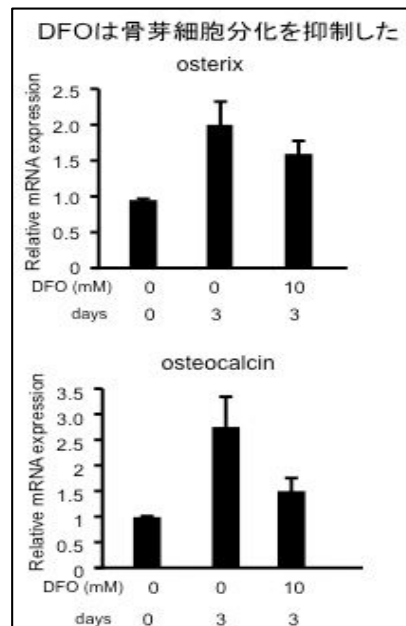
(2) 低酸素状態における胃所生骨形成の検討

低酸素状態でのBMP-2異所生骨形成を検討するため、コラーゲンスポンジにBMP-2のみ含ませたものとBMP-2とDFOを同時に含ませたものをマウスの後背筋膜下に埋入し、14日後組織塊を摘出する。

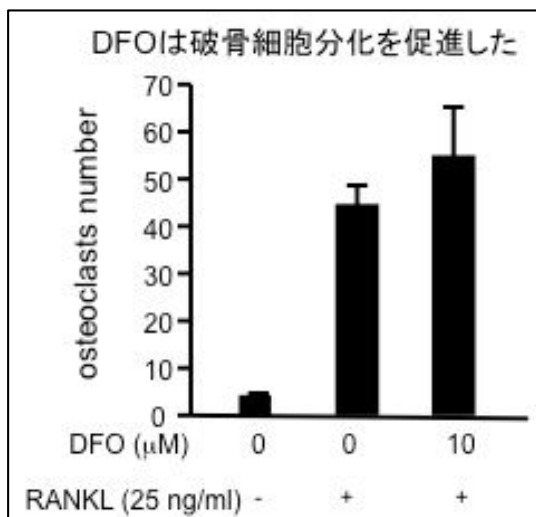
4. 研究成果

(1) 低酸素と組織塊を構成する細胞の関連性の検討

骨芽細胞にDFO(10mM)を添加し、72時間後RT-PCR法を用いて遺伝子解析をおこなったところ、DFO添加群の方が非添加群に比較してosteocalcinやosterixの骨芽細胞分化マーカーの発現は抑制されていた。



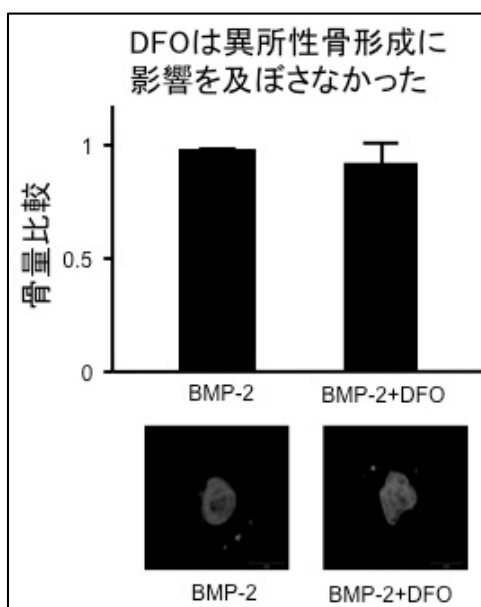
また骨髄細胞に RANKL と M-CSF を添加し破骨細胞を誘導し、そこに DFO(10mM)を添加したところ、DFO 添加群は破骨細胞数が増加していた。



これらの結果より異所性骨形成における HIF-1 の役割は骨芽細胞分化を抑制し破骨細胞分化を促進し骨代謝をあげる可能性が示唆された。

(2) 低酸素状態における胃所生骨形成の検討

低酸素状態での BMP-2 異所生骨形成を検討するため、コラーゲンスポンジに BMP-2 のみ含まれたものと BMP-2 と DFO を同時に含まれたものをマウスの後背筋膜下に埋入し、14 日後組織塊を摘出し、DFO 添加群と非添加群を比較したが組織塊の大きさや骨量に変化はなかった。



この結果を踏まえ、BMP-2 とともに埋入した DFO の組織内の活性を調べる必要があると考える。またそのほかの低酸素状態を持続する方法を考える必要がある。また HIF-1 の SiRNA を用いて腹腔内注射や尾静脈注射を

おこない BMP-2 の胃所生骨形成に対する低酸素状態の効果を検討したい。

(引用文献)

Wan C Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, Ramaswamy G, Jacobsen KA, Alaql ZS, Eberhardt AW, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Deng L, Clemens TL. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jan 15;105(2):686-91. doi: 10.1073/pnas.0708474105. Epub 2008 Jan 9.

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 2 件)

(1) Takayama T, Dai J, Tachi K, Shohara R, Kasai H, Imamura K, Yamano S. The potential of stromal cell-derived factor-1 delivery using a collagen membrane for bone regeneration. J Biomater Appl. 査読有 2017Feb;31(7):1049-1061. doi: 10.1177/0885328216686727. Epub 2017 Jan 5.

(2) Oshima Y, Iwasa F, Tachi K, Baba K. Effect of Nanofeatured Topography on Ceria-Stabilized Zirconia/Alumina Nanocomposite on Osteogenesis and Osseointegration. Int J Oral Maxillofac Implants. 査読有 2017 Jan/Feb;32(1):81-91. doi: 10.11607/jomi.4366.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

館 慶太 (Keita Tachi)

昭和大学・歯科補綴学講座・助教

研究者番号：90585671