

令和元年6月14日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20419

研究課題名(和文) RANKL結合ペプチドを用いた口蓋裂部における骨再生の検討

研究課題名(英文) Examination of bone regeneration in cleft palate using RANKL binding peptide

研究代表者

加藤 玄樹 (KATO, Genki)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：00770231

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)：口蓋裂患者に対する骨量造成法の開発を目指し注射法で造成された骨の経時的变化を検討した。足場材料にはゼラチンハイドロゲル(京都大学再生医科学研究所 生体材料学分野提供)を用いた。8週齢雄性マウス上顎骨にBMP-2を足場と共に注射する非侵襲的な骨造成法を試みても骨に沿って足場材料が流れた分以上には骨は盛り上がらなかったが、BMP-2にRANKL結合ペプチドを加えると骨の厚みが増した。注射しやすい20 μmより小さな粒子径の足場でも盛り上がった骨は7週間かけて骨密度を増した。注射で骨を誘導した際の母骨(マウス上顎骨)の骨密度は、誘導をかけなかった場合の母骨に比べて有意な骨密度の上昇が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は日々の歯科医療に必要な骨造成法の開発であり、特に幼い頃から何度も観血処置をしなければならない口蓋裂患者の非侵襲的な骨造成法の開発につながる研究でもある。本研究により、手術をせずに注射で骨を増やす方法が発展した。経時的な骨の成熟度合いが明らかとなったことにより、注射法の臨床応用に期待が高まった。また、局所の骨形成促進剤であるBMP-2では不可能であった足場材料よりも厚みのある骨を造成することをRANKL分子に結合するペプチドの添加により可能にした。そのペプチドの骨形成促進メカニズムは、我々が2018年にNatureに掲載された新たな骨形成メカニズムにより説明でき、学術的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the time-course study after the injection of bone formation materials toward the application of a bone-reconstruction method to the cleft-palate patients. The gelatin hydrogel, the carrier of bone formation materials, was provided from the department of regeneration science and engineering of biomaterials, Institute for frontier medical sciences, Kyoto University. The thickness of the maxilla bone in 8-week-old male mice did not increase by an injection of BMP-2 incorporated with the carrier, but it increased by BMP-2 with RANKL-binding peptide. The bone mineral density was increased gradually in 7 weeks after the injections even when we used granule type of carrier whose diameter was less than 20 μm. The bone mineral density of basal bone (mouse maxilla) after the injection of bone-forming material was significantly higher when compared to the non-injection case.

研究分野：硬組織薬理学

キーワード：非侵襲的骨再生 RANKL結合ペプチド BMP-2 ゼラチンハイドロゲル 粒子状担体 注射

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂患者は、顎裂部を塞ぐために幼い時から成人に至るまで何度も手術を繰り返すため、手術の侵襲をなるべく避ける骨造成法の開発が望まれている。我々は最近、BMP-2 と RANKL 結合ペプチドとをゼラチンハイドロゲルをキャリアーとして組み合わせて粘膜下に注射し、骨を造成させる新規骨造成法を開発した。この注射による骨造成法は、BMP-2 タンパクの用量を抑え、炎症などの副作用を軽減させた状態で骨形成促進ペプチドを併用することにより、担体の大きさよりも大きな骨が造成できる画期的な方法である。上顎骨に応用した場合、骨面に対して高さあるいは幅を増やすことができ、臨床応用が期待されている。しかし、まだ実験結果は4週間までの結果しかなく、実際の臨床応用を鑑みた場合に、まだまだ明らかにすべき点が多く存在する。

まず、注射法で骨造成された骨と上顎骨が一体化しているかどうかを明らかにすることである。次に、「4週間以降、新生骨がどの程度維持されるか」という問題に対して検討する必要がある。力がかからない骨は無くなっていくと考えられるが、インプラントなどを植立し、力を加えれば骨は吸収しにくくなるのかなど、非侵襲的に造成された骨の予後を検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、観血処置をせずとも骨幅を増やす注射法（非侵襲的骨造成法）により形成された局所の骨が経時的にどのように変化するかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 骨造成方法と蛍光ラベリングスケジュール

8週齢雄性 C57BL/6J マウスを用いた。Uehara らの方法にならって注射法による骨形成を上顎骨第1臼歯前方に誘導した (T Uehara et al., Delivery of RANKL-Binding Peptide OP3-4 Promotes BMP-2-Induced Maxillary Bone Regeneration. J. Dent. Res.. 95(6), 665-672, 2016. <https://doi.org/10.1177/0022034516633170>)。ただし、用いた足場材料は Uehara らの方法よりも小さな粒子（直径 20 μm 以下）を用いた（京都大学再生医科学研究所 生体材料学分野 田畑泰彦博士提供）。

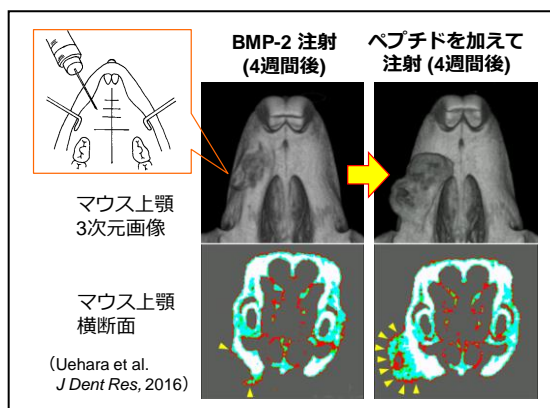


図1 粒子状再生材料を粘膜下に注射

BMP-2 は足場材料の形以上には骨をすることができないとされるが、注射できるよう足場材料を粒子状のゼラチンハイドロゲルとしたため、粘膜下に流れた足場の形に骨ができたものと思われる。一方、RANKL 結合ペプチドを加えると厚みのある骨が造成された。

骨形成の指標をとって安楽死 25 日前にカルセイン (20 mg/kg) を 5 日前にアリザリン (20 mg/kg) を皮下注射した。

注射 8 週間後に安楽死をさせ、4%ホルマリン/PBS による固定後、水洗、UT2000F (Leica Microsystems, Tokyo, Japan)を用いた凍結後、ミクロトーム (CM3050sIV, Leica Biosystems, Nussloch, Germany)を用いて川本法による厚さ 5 μ m の非脱灰切片を作成した (Kawamoto et al., Arch Histol Cytol 66:123-143, 2003)。

(2) 骨密度解析

① μ CT による骨密度解析

骨密度は生きたまま動物の骨密度が測定できる in vivo μ CT (R_mCT2 ; リガク社製) を用いた。 μ CT の解析はラトック社製 TRI 3D Bone を用いて行い、骨密度 (BMD) と骨塩量 (BMC) を 1 週間ごとに計測した。

② pQCT による骨密度解析

正確な骨密度測定装置である pQCT (XCT Research SA + , Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany) を用いて安楽死後固定水洗した標本を用いて解析を行った。海綿骨密度と皮質骨密度を分けて計測したが、その閾値を 690 mg/cm³ とした。

(3) 非脱灰薄切切片による骨形態計測

新しく形成された骨と接する母骨 (上顎骨) を蛍光顕微鏡を用いてカルセインとアリザリンの 2 重標識像を撮影し、mineral apposition rate (MAR) と 25 日前の骨形成活性を示すカルセインのラベルされた長さ、5 日前の骨形成活性を示すアリザリンでラベルされた長さから bone surface に対する mineralizing surface の割合を計算した。MAR = カルセインラベルとアリザリンラベル間の平均幅/20、BFR = MAR x (カルセインラベル長 + アリザリンラベル長) / (2 x 皮質骨面)

4. 研究成果

(1) 研究の主な結果

まず、前項で示した 2016 年に確立された Uehara らによる非侵襲的骨造成法の再現性が得られたことを特筆したい。本研究では、足場材料に用いた粒子状のゼラチンハイドロゲルの直径を Uehara らが用いた 20 μ m と 20 μ m より小さな粒子と 2 種類で行ったが、どちらの方法においても骨は造成された。ただ、小さな粒子の足場を使うと注射自体は抵抗が少なく打ちやすくなったが、造成される骨の場所を一定にするためには注射の手技の訓練が必要となった。

本実験で得られた主な結果とその考察は以下のとおりである。

- ① 注射後 7 週間までの形成された骨の密度は上昇し続けた (図 2, 3)。
 - ② 新生骨の骨密度だけでなく、骨を注射した母骨の骨密度も上昇した (図 4)。
 - ③ 後半の 4 週間の骨形成活性は対照群と比べて有意な亢進は認められなかった (図 5, 6)。
- これらの結果から、2016 年に発表された Uehara らの非侵襲的骨造成法による 4 週までの結果の再現性が取れたことと共に、4 週間後からも経時的に 8 週間まで骨密度が上昇すること、さら

に、注射をした母骨の骨密度も共に上昇することが明らかとなった。注射 4 週以降の骨形成活性が亢進していなかったことから、骨密度上昇の原因が骨吸収抑制にあるかどうか今後検討する必要がある。また、母骨の骨密度もなぜ上昇してきたのかも明らかにする必要がある。

詳細なデータを以下に示す。

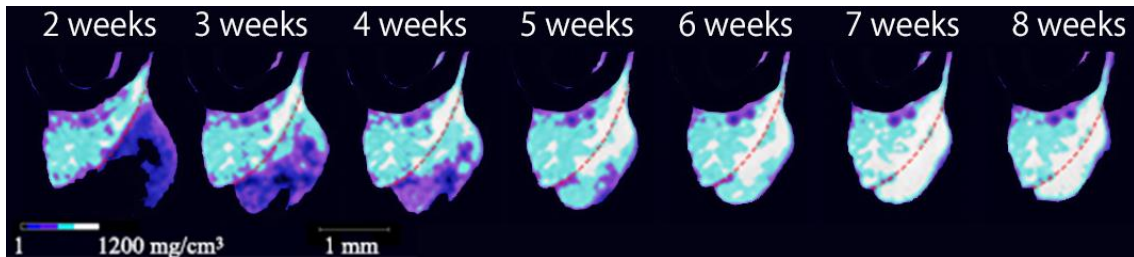


図 2 in vivo μ CT 像による代表的な骨密度の経時的変化（注射してからの週を上に表示）
母骨（上顎骨）と新生骨部の境界線を赤い点線で示す。点線よりも下側の部分を新生骨とした。

図 2 に示すように、注射後 4 週間目で造成された骨は海綿骨を示す骨密度であったが、その後 4 週間で皮質骨の骨密度に移行してきたことがわかる。図 3 の定量解析結果もこの観察結果を裏付けており、注射後の週令が進むと骨密度がさらに上昇し 8 週目になると骨密度の上昇が落ち着いてくることが明らかとなった。

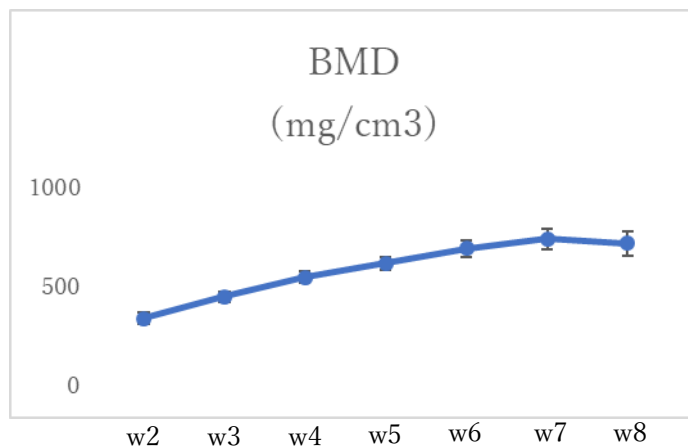


図 3 in vivo μ CT による新生骨部の骨密度の注射後 2 週から 8 週後までの経時的変化
X 軸は注射後の経過週を示す。W:week after injections
Error bar は SD を示す (n=7)。

新生骨のハイドロキシアパタイト当量は骨塩量としても解析したが、最初の 4 週間までは大分ばらつきがあり、5 週間を過ぎてからはほぼ同じ量を保っていた。

今回驚いたことに図 4 に示すように対照群に比べて

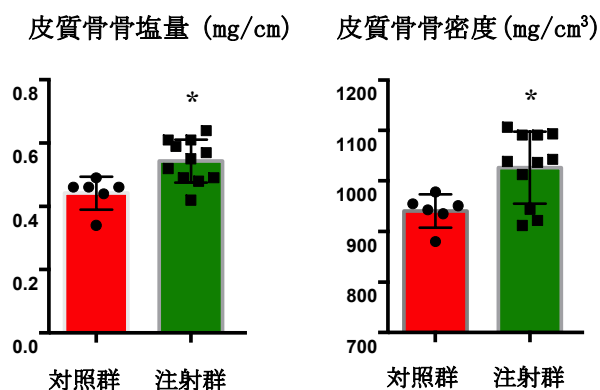


図 4 注射後 8 週後の新生骨部に隣接する上顎骨（母骨）の骨密度と対照群（反対側）の骨密度の比較

Error bar は SD を示す (n=6 対照群, n=11 注射群)。* $p < 0.05$ vs 対照群 unpaired student t-test.

非脱灰切片を作成し、動的パラメーターを計測した結果を最後に示す。

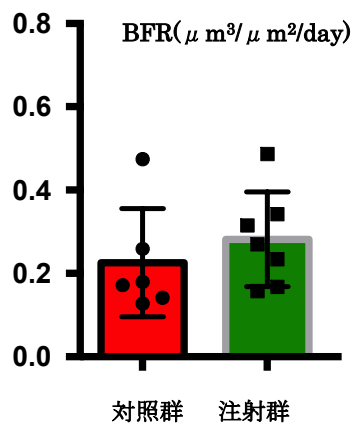
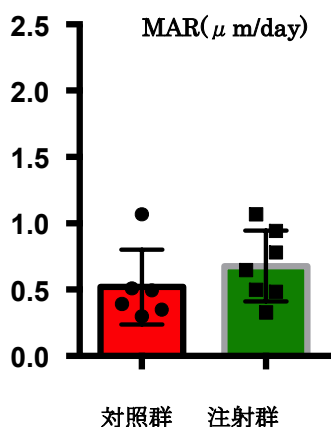
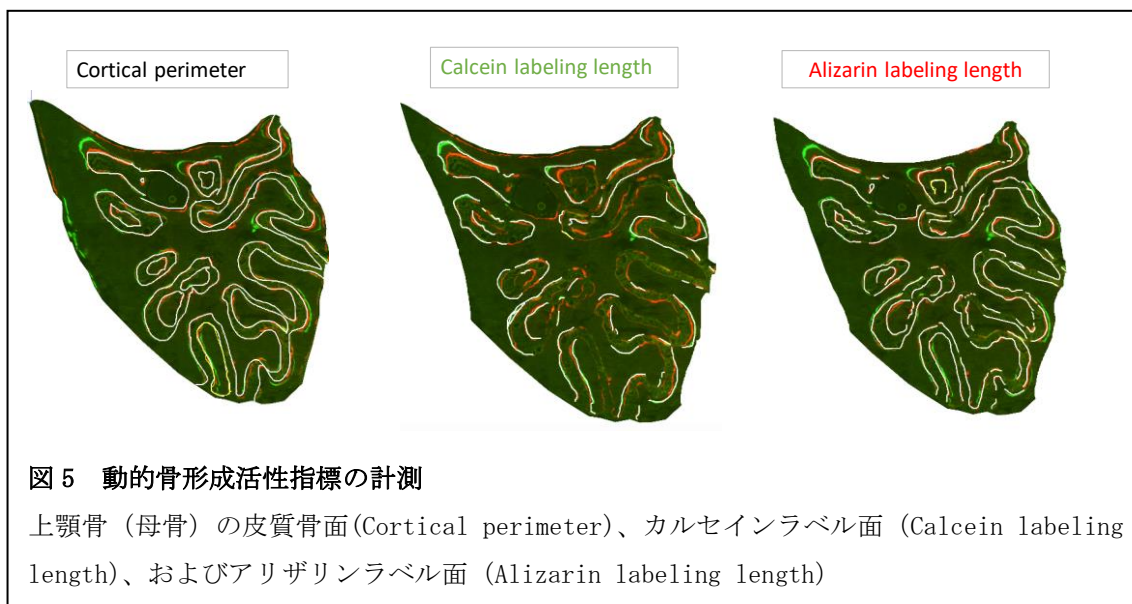


図 6 注射後 8 週後の新生骨部に隣接する上顎骨（母骨）の骨形成活性
 Error bar は SD を示す (n=6 対照群, n=7 注射群)。

(2) 国内外における位置づけと今後の展望

現在、最も再現性が良く歯科臨床において用いられている骨造成法は、自家骨移植であり、次にセラミックや脱灰骨などの各種骨補填剤を用いる方法、FGF-2 や BMP-2 などのサイトカインを足場材料に含ませて用いる、あるいは、血小板やエナメルタンパク抽出物を用いる方法など多くの方法が臨床応用されているが、どの骨造成法も観血的処置を伴い、患者に負担がかかる。本研究で用いている 2016 年に我々が開発した Uehara らの非侵襲的骨造成法が実用化されれば、観血処置をせずに骨が欲しい局所に骨造成を誘導でき、日々の歯科臨床において頻繁に使用する画期的な骨造成法になるとと思われる。また、RANKL 結合ペプチドの作用機序が 2018 年の Nature 誌で明らかとなり、今後、骨芽細胞膜上 RANKL をターゲットとした創薬により、現在用いているペプチドより骨誘導能が高い薬剤が開発されることが期待される（主な発表論文①参照）。

今回、口蓋裂患者の新たな骨量造成法の開発を目指して、いままで骨造成材料を注射後 4 週間までの結果しかなかったところを 8 週間までの経過を生きのまま骨密度計測可能な in vivo μ CT を用いることにより、解析することができた。このため、注射後 7 週間まで骨密度が上昇して骨が成熟していく過程を明らかに示すことができた。

骨の形態は力学的に安定する形に保たれているものと考えられる。8 週間目には骨密度の上昇が落ち着いた新生骨も、その後の経過を追えば、おそらく結局は必要のない骨として吸収すると思われる。このため、今後の実験は、骨密度の上昇が安定期に入るとされる注射後 8 週目でインプラントを植立するなど力を誘導した新生骨にかけることにより、骨が力に応じて長期間骨幅を保つことができるか否かを明らかにする実験を行いたい。歯科臨床の現場を意識しながら研究を進めていくことにより、歯科疾患を患う人に優しい骨量造成法の応用展開が期待できると信じる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ikebuchi Yuki, Aoki Shigeki, Honma Masashi, Hayashi Madoka, Sugamori Yasutaka, Khan Masud, Kariya Yoshiaki, **Kato Genki**, Tabata Yasuhiko, Penninger Josef M., Udagawa Nobuyuki, Aoki Kazuhiro, Suzuki Hiroshi. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling NATURE 査読有 2018.09; 561 (7722): 195-200.
DOI: 10.1038/s41586-018-0482-7
- ② Yasuhiro Shimizu, Masud Khan, **Genki Kato**, Kazuhiro Aoki & Takashi Ono. Occlusal disharmony-induced stress causes osteopenia of the lumbar vertebrae and long bones in mice. Scientific Reports 査読有 2018.01; 8 (173): 1-9.
DOI: 10.1038/s41598-017-18037-y

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：青木 和広
ローマ字氏名：(AOKI, Kazuhiro)

※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。