

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20482

研究課題名(和文)破骨細胞 骨芽細胞間クロストークを賦活化する骨再生治療法の開発

研究課題名(英文)Development of bone regenerative therapy which can activate osteoclast-osteoblast crosstalk

研究代表者

塩飽 由香利 (Shiwaku, Yukari)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80736190

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)：吸収性人工骨補填材を用いた骨再生の過程では、破骨細胞と骨芽細胞が材料表面に出現し、材料の吸収と新生骨の形成が生じる。しかしながら、バイオマテリアル上において破骨細胞がどのように骨芽細胞とカップリングし、骨形成を促進するののかについては不明であった。近年、破骨細胞はカップリング因子の分泌を介して、直接的に骨芽細胞分化を調節していることが報告された。本研究では、人工骨補填材料の物理化学的性質とカップリング因子調節の相関について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究により、破骨細胞によって吸収されやすいリン酸カルシウム材料ほど早期に骨再生を促すことが報告されてきた。しかしながら、人工骨補填材料の物理化学的性質と骨リモデリングの関連性について詳細は明らかとなっていなかった。本研究により、リン酸カルシウムの種類や溶解性が破骨細胞によるカップリング因子の発現に影響を与えることが明らかとなった。これらの知見は、新規人工骨補填材料の開発や機能向上に貢献すると予測される。

研究成果の概要(英文)：During the process of bone regeneration using resorbable bone substitute materials, osteoclasts and osteoblasts appear on the surface of the material, occurring resorption of the material and formation of new bone. However, it was still unclear how osteoclasts couple to osteoblasts and promote osteogenesis on biomaterials. Recently, it has been reported that osteoclasts can directly regulate osteoblast differentiation through the secretion of coupling factors. In this study, we clarified the correlation between the physicochemical properties of bone substitute materials and the regulation of coupling factors.

研究分野：補綴・理工系歯学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 クロストーク リン酸カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍、唇顎口蓋裂、または歯周病などに伴う広範な骨欠損の修復を図る上で、優れた骨再生能を有する人工骨の創製が求められている。従来、リン酸カルシウム系人工骨補填材であるハイドロキシアパタイト (HA) や β -リン酸三カルシウム (β -TCP) が臨床において用いられてきた。近年では、間葉系幹細胞を人工材料上に播種し、骨芽細胞分化の促進により骨形成を促す複合材料の開発も行われてきた。しかしながら、人工骨の骨再生能は未だ自家骨には及ばないのが現状であり、新たな観点・手法を用いて骨再生医療を進展させる必要がある。

そこで、人工骨の骨再生能を向上させる一つのアプローチとして、破骨細胞による骨形成促進に着目した。人工骨補填材を用いた骨再生の過程では、破骨細胞と骨芽細胞がカップリングし、骨欠損部に埋入した材料が破骨細胞により吸収され、吸収部位が骨芽細胞によって新生骨に置換される。これまでに、破骨細胞によって吸収されやすい材料ほど早期に骨再生を促すことが報告されてきたが、バイオマテリアル上において破骨細胞が骨形成を促進するメカニズムは不明であった。最近になって、破骨細胞は骨吸収を調節するだけでなく、様々なサイトカイン (カップリング因子) の分泌を介して、直接的に骨芽細胞分化を調節していることが明らかとなってきた。

先行研究において、バイオマテリアル上における破骨細胞-骨芽細胞間クロストークについて解析した。一般臨床で用いられている非吸収性 HA 及び吸収性 β -TCP を実験材料として使用した。 β -TCP では HA に比べ破骨細胞の分化が促進され、カップリング因子 SPHK1, Cthrc1 の発現が上昇した。さらに、 β -TCP から回収した破骨細胞の培養上清は骨芽細胞分化及び石灰化を促進した。このことから、バイオマテリアル上の破骨細胞から分泌されたカップリング因子が骨再生に貢献している可能性が示唆された (Shiwaku Y et al., PLoS One 2015)。

本研究では、バイオマテリアルを自ら合成し、材料学的なパラメータを変化させることによって、人工材料の物理化学的性質が破骨細胞-骨芽細胞間クロストークに与える影響を解析した。

2. 研究の目的

本研究では、種類と混合比の異なるリン酸カルシウムを自ら作製し、材料の物理化学的性質が破骨細胞-骨芽細胞間クロストークに与える影響を細胞レベル、個体レベルで明らかにする。また、破骨細胞を移植した人工骨により破骨細胞-骨芽細胞間クロストークを賦活化する骨再生治療法の開発を目標とする。

3. 研究の方法

1) リン酸カルシウムの作製

吸収性のリン酸八カルシウム (OCP)、 β -TCP 及び非吸収性 HA を研究室で合成した。各粉末を異なる比率 (0:100, 20:80, 60:40, 100:0) で混合し、金型に充填後、一軸加圧成形にて直径 15 mm のディスクを作製した。

2) 破骨細胞-骨芽細胞間クロストークの解析

OCP、 β -TCP、HA ディスク上にマウス骨髄マクロファージを播種し、RANKL 存在下にて破骨細胞形成を促進させた。培養 7 日目において TRAP 染色を行うとともに、リアルタイム PCR を用いて、各ディスク上における破骨細胞分化能とカップリング因子 (EfnB2, SPHK1/2, Cthrc1, C3a, Sema4D) の発現について検討した。

3) 破骨細胞培養前後の結晶構造変化

破骨細胞培養前後における各リン酸カルシウムの結晶構造変化を X 線回折 (XRD)、及びフーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) にて評価した。破骨細胞培養上清中におけるカルシウムイオン、及びリン酸イオンの継時的濃度変化を比色法にて定量した。また、破骨細胞培養上清中における pH 変化を pH メーターにて測定した。さらに、破骨細胞培養前後における各リン酸カルシウムの結晶形態の変化を透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察した。

4. 研究成果

1) リン酸カルシウム上における破骨細胞分化能

マウス骨髄マクロファージに RANKL を添加し、培養 7 日目におけるリン酸カルシウムディスク上の TRAP 染色を検討した。その結果、HA20OCP80、HA20TCP80、OCP 及び β -TCP ディスク上では、TRAP 陽性多核細胞が多数観察された。大型の多核破骨細胞数は、 β -TCP 含量に依存して増加する傾向が認められた。同様に、OCP 含量に依存して大型の多核破骨細胞形成を促進する傾向も確認できた。また、OCP の破骨細胞形成能は β -TCP と同程度であった。

次に、リアルタイム PCR を用いて、破骨細胞分化マーカーの発現を定量した。早期の破骨細胞分化マーカーである NFATc1 の発現は、HA、OCP 及び β -TCP の間で差は認められなかった。一方、TRAP 及び CTSK の発現レベルは、HA と比較して、HA/TCP 混合物または TCP におい

て有意に上昇した。

2) リン酸カルシウム上におけるカップリング因子の発現

各リン酸カルシウムディスク上における破骨細胞由来カップリング因子の発現は、因子ごとに発現のパターンが大きく異なった。SPHK2, Sema4D はどの結晶相においても同程度の発現を示した。また、EfnB2, SPHK1, Cthrc1 は、OCP 及び HA/OCP 混合物において β -TCP に比べ低い発現を示した。一方、C3a は、OCP および HA/OCP 混合物において β -TCP に比べ高い発現を示した。

3) 破骨細胞培養上清中のカルシウム・リン酸イオン濃度、及び pH の変化

OCP は、カルシウムやリン酸イオンなど周囲の無機イオンを交換することで HA に転換することが知られている (Suzuki O et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006)。そこで、本研究では、培養上清中のイオン濃度変化に着目した。リン酸イオン濃度は、HA/OCP 混合物または OCP 上で破骨細胞を培養した培地中で上昇し、培養時間に伴って次第に減少した。一方、HA、HA/TCP 混合物、 β -TCP の培地中ではリン酸イオン濃度は 1 mM 未満であった。

カルシウムイオン濃度は、HA、HA/TCP 混合物、 β -TCP の培養上清中において、 β -TCP 含量に依存して増加する傾向が認められた。一方、HA/OCP 混合物及び OCP の培養上清中においては、OCP 含量にかかわらず大きな変化は認められなかった。

破骨細胞培養上清中の pH は、HA/TCP 混合物及び TCP においてわずかにアルカリ性に傾く傾向が認められた。一方、HA/OCP 混合物及び OCP の培養上清中の pH は、わずかに酸性に傾く傾向が認められた。

4) 破骨細胞培養前後のリン酸カルシウムディスクの結晶構造及び結晶形態の変化

破骨細胞培養前後のリン酸カルシウムディスクの結晶構造を XRD にて解析した。その結果、HA、HA60TCP40、HA20TCP80、及び β -TCP の XRD 回折像は、培養前後で著しく変化することなくほぼ維持された。一方、HA/OCP 混合物と OCP では、OCP の (100) に由来する低角測の特徴的なピークは減少したが、完全に消失したのではなく残存も認められた。以上より、破骨細胞培養中において OCP は HA に転換される傾向が認められるが、一部 OCP の結晶構造も維持していることが示唆された。

また、OCP-HA 転換の詳細を確認するため、破骨細胞培養前後の HA/OCP 混合物及び OCP の結晶構造は FTIR によっても解析した。OCP では、波長 1000–1100 cm^{-1} 付近において ν_3 P-O に由来するいくつかのバンドが観察される。また、OCP の加水分解が進行し、HA になるにつれてこれらのピークが変化することが報告されている。本研究では、培養前後において、HA20OCP80 および OCP において、OCP 特有の複数のピークが観察された。一方、HA と HA60OCP40 では、1000–1100 cm^{-1} 付近に HA に由来する P-O のバンドのみが観察され、培養前後での変化は認められなかった。

さらに、破骨細胞培養前後における結晶形態の変化を TEM にて観察した。HA 顆粒は、米粒状のナノ結晶で構成された。OCP は数マイクロメートルの長さの板状の形態を示した。HA/OCP 混合物では、HA と OCP が均一に分散していた。 β -TCP は長さが 200 nm のテトラポッド型の結晶を示した。破骨細胞培養の前後において、HA、HA60OCP40、HA20OCP80、OCP、及び HA60TCP40 粒子の結晶形態には大きな変化は認められなかった。

以上より、人工骨補填材であるリン酸カルシウムは、その物理化学的性質 (結晶の種類、混合比) によって破骨細胞由来カップリング因子の発現を変化させることが示唆された。このことから、生体材料の材料学的性質や化学的環境は、破骨細胞 - 骨芽細胞間クロストークに影響を与えることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、新規人工骨補填材料の開発や機能向上に貢献すると予測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiwaku Y, Tsuchiya K, Xiao L, Suzuki O.	4. 巻 107
2. 論文標題 Effect of calcium phosphate phases affecting the crosstalk between osteoblasts and osteoclasts in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res A.	6. 最初と最後の頁 1001-1013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.36626.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirayama B, Anada T, Shiwaku Y, Miyatake N, Tsuchiya K, Nakamura M, Takahashi T, Suzuki O.	4. 巻 6
2. 論文標題 Immune cell response and subsequent bone formation induced by implantation of octacalcium phosphate in a rat tibia defect.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 RSC Adv	6. 最初と最後の頁 57475-57484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C6RA10834B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shiwaku Y, Tsuchiya K, Xiao L, Sasaki K, Suzuki O.
2. 発表標題 Crosstalk between osteoclasts and osteoblasts affected by OCP crystals
3. 学会等名 2019 IADR/AADR/CADR General Session (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiwaku Y, Tsuchiya K, Xiao L, Sasaki K, Suzuki O.
2. 発表標題 Effect of Crystal Phases of Calcium Phosphates on Osteoblast-Osteoclast Crosstalk
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development (iLIM-4) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 治, 塩飽 由香利, 土屋 香織, 肖 凌浩, 佐々木 啓一
2. 発表標題 生体吸収性骨補填材OCPと -TCPの溶解性と破骨細胞の骨芽細胞調節因子発現の関連性
3. 学会等名 第41回バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩飽 由香利, 鈴木 治
2. 発表標題 生体吸収性セラミックスOCP及び -TCPの材料学的特性は 破骨細胞由来カップリング因子の発現を変化させる
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiwaku Y, Xiao L, Suzuki O.
2. 発表標題 Effect of OCP on the crosstalk between osteoclasts and osteoblasts
3. 学会等名 Bioceramics30 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩飽 由香利, 肖 凌浩, 佐々木 啓一, 鈴木 治
2. 発表標題 リン酸オクタカルシウムの材料化学的性質が破骨細胞-骨芽細胞間クロストークに与える影響
3. 学会等名 第72回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 治, 塩飽 由香利, 土屋 香織, 肖 凌浩, 佐々木 啓一
2. 発表標題 リン酸オクタカルシウムが破骨細胞 - 骨芽細胞間クロストークに与える効果
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩飽 由香利, 肖 凌浩, 鈴木 治
2. 発表標題 リン酸オクタカルシウムの転換挙動が破骨細胞 - 骨芽細胞間クロストークに与える効果
3. 学会等名 日本セラミックス協会 2018年年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩飽 由香利, 平山 聞一, 穴田 貴久, 宮武 尚央, 土屋 香織, 中村 雅典, 高橋 哲, 鈴木 治 .
2. 発表標題 リン酸オクタカルシウムとハイドロキシアパタイトの炎症性細胞浸潤の比較
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会東北地域講演会 バイオマテリアル研究若手交流会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 塩飽 由香利, 平山 聞一, 穴田 貴久, 宮武 尚央, 土屋 香織, 中村 雅典, 高橋 哲, 鈴木 治 .
2. 発表標題 リン酸オクタカルシウムの初期炎症反応と骨再生への効果
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shiwaku Y, Suzuki O.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 17-36
3. 書名 Octacalcium phosphate effects on the systemic and local factors that regulate bone-cell activity. In Chapter 2, Octacalcium Phosphate Biomaterials, Edits: Suzuki, O., Insley, G.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----