

平成30年6月22日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20543

研究課題名(和文)人為的に誘導した幹細胞を用いての硬組織再建方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new method for regeneration of hard tissue using stem cells

研究代表者

松本 光史 (Matsumoto, Akifumi)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：50736486

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)：BMP (bone morphogenetic protein)は、筋組織に埋入すると異所性の骨形成を誘導する。我々はTGFが BMP-2の異所性骨形成能を強力に促進する一方、菌体や、菌体成分であるLPSがそれを抑制することを見いだした。解析の結果、TGFの添加により骨芽細胞数と軟骨細胞数が増加し、破骨細胞数が半減していた。一方、菌体やLPSによって骨体積は、50%以下に減少したがIL-1欠損マウスでは回避された。さらに、異所性骨形成初期の組織から回収した培養細胞にIL-1を添加すると、細胞の増殖が抑制されたため、LPSの骨形成抑制作用はIL-1を介していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：BMP (bone morphogenetic protein) induces ectopic bone formation when it was implanted into the muscle tissues. We found that TGF strongly enhances ectopic bone formation by BMP-2, while LPS inhibits it. From the analysis data, TGF increased the number of osteoblasts and chondrocytes but reduced the number of osteoclasts. On the other hand, LPS reduced the ectopic bone volume less than 50%, but it was failed in IL-1 deficient mice. In addition, IL-1 inhibited the proliferation of the cells obtained from the ectopic bone, suggesting that LPS suppresses ectopic bone formation via IL-1.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨 BMP LPS IL-1 TGF 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

BMP (bone morphogenetic protein)は生理的骨形成に必須の役割を担い、異所性の骨形成誘導を有することから、従来より骨欠損修復治療に応用可能なタンパクとして注目を集めてきた。しかし現状では大量生産が不可能なため高価であり、コスト抑制のためには、少量の BMP で効果的に骨形成を実現する新たな手法が求められている。また、口腔内での応用を想定すると術中・術直後に起こりうる細菌感染が BMP 骨形成能に対していかなる影響を及ぼすかについても理解する必要がある。

2. 研究の目的

我々はすでにマウスの後背筋膜下における BMP-2の異所性骨形成能が TGF 添加により強力に促進されることを見いだした。今回さらに、黄色ブドウ球菌などの菌体や、菌体成分である LPS が骨形成誘導作用に及ぼす影響とその分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 後背筋膜下および頭蓋骨欠損部位における骨形成誘導とその解析：ヒト BMP-2 (5 μ g) およびヒト TGF- β 1 (50 ng) を含むブタ由来コラーゲンゲルに死菌体 (*S. aureus*, *P. gingivaris*) または LPS (0~1 mg) を添加し、凍結乾燥して得られたスポンジを直径約 5 mm、厚さ約 2 mm に形成した。これをマウスの後背筋膜下、または口径 4 mm のトレフィンバーで作製した頭蓋骨の骨欠損部位に埋入し、1~14 日後に筋膜下に形成された組織塊および頭蓋骨を μ CT を用いて解析した。また、組織塊における mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法と DNA マイクロアレイを用いて解析した。

(2) 組織塊を構成する細胞の採取と骨芽細胞への分化誘導：BMP-2 と TGF- β 1 を含むコ

ラーゲンスポンジを筋膜下に埋入し、5 日後（石灰化する前）に組織塊を摘出した。これを酵素処理（コラゲナーゼとディスパーゼ）により組織塊から細胞を分散させ、回収した細胞を間葉系幹細胞用培地中で培養し、経時的に細胞数を計測することにより各種因子が細胞増殖に与える影響について評価した。

4. 研究成果

TGF- β 1 と BMP-2 を含むコラーゲンスポンジをマウスの後背筋膜下に埋入したところ、翌日軟組織塊が誘導され、7 日目までその体積が増加した。その後 14 日目にかけて内部の石灰化が進み、骨が形成された。スポンジに菌体または LPS を添加したマウスでは、7 日目までの組織塊形成が抑制され、筋膜下に形成された骨の体積も 1/2 未満に減少した（図 1）。またスポンジ埋入による頭蓋骨欠損部位の骨修復も LPS の添加によって阻害された（図 2）。

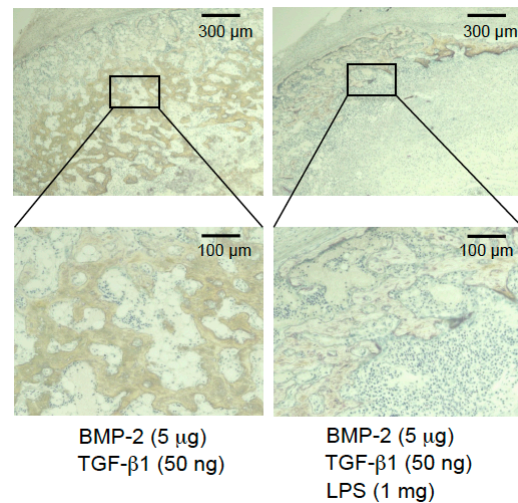


図 1 : LPSが骨形成に及ぼす影響

LPS の骨形成阻害機序を解明するため、5 日目の組織塊における mRNA 発現を網羅的に解析したところ、LPS 投与群では TNF- α および IL-1 α / β の mRNA 発現レベルが顕著に上昇していた。そこで LPS を添加したスポンジを TNF- α または IL-1 α / β 欠損マウスに埋入したところ、TNF- α 欠損マウスでは野生型と同

様に骨形成が抑制されたが、IL-1 α / β 欠損マウスでは抑制されなかった (図 3)。また、組織塊から採取した細胞は BMP-2 により骨芽細胞に分化する能力をもち IL-1 β の存在下で培養するとその細胞増殖が完全に抑制された (図 4)。

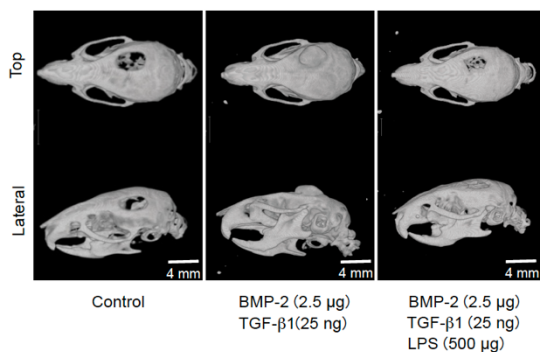


図 2 : LPS が骨修復に及ぼす影響

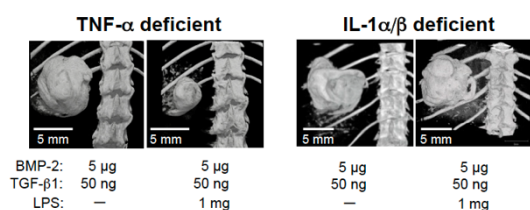


図 3 : TNF- α と IL-1 α / β 欠損マウスにおける骨形成に対する LPS の影響

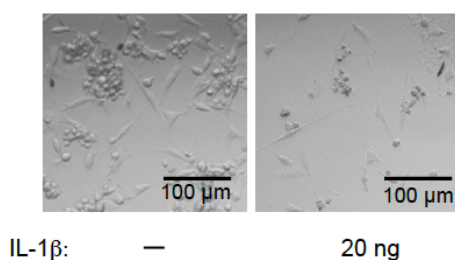


図 4 : IL-1 による増殖抑制作用

以上の結果から、細菌感染が BMP-2 と TGF- β 1 による骨形成能を阻害する可能性が示唆された。また、この骨形成阻害作用は、産生された IL-1 β による細胞増殖抑制を介しており、IL-1 の活性を制御することにより、細

菌感染による骨形成阻害作用を回避できる可能性が示された。

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 1 件)

Urano-Morisawa, E., Takami, M., Suzawa, T., Matsumoto, A., Osumi, N., Baba, K., Kamijo, R. Induction of osteoblastic differentiation of neural crest-derived stem cells from hair follicles. (2017) PLoS ONE, 12 (4), art. no. e0174940.

DOI: 10.1371/journal.pone.0174940

【査読あり】

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 光史 (MATSUMOTO, Akifumi)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：50736486

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし

()