

令和元年6月10日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21308

研究課題名(和文)炎症性刺激に影響されない細胞内シグナルを利用した新規骨再生療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel bone regeneration therapy utilizing combination of multiple growth factors not susceptible to inflammatory mediator

研究代表者

横田 潤 (Yokota, Jun)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：60733730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：成長因子を利用した骨再生療法を想定する際、細胞生物学的な根拠を基に骨芽細胞の増殖や分化促進のために最も効果的な因子を上げるとすれば骨形成誘導因子であるbone morphogenetic protein (BMP)があげられる。しかしながら、外科的処置を併用したBMP投与による骨再生処置には必ず炎症反応が伴うため、in vitroで観察されるようなBMPによる良好な骨形成反応がin vivoでは期待できないことが明らかとされている。そこで、本研究では、BMPとは異なる作用様式を有する複数の成長因子を組み合わせることで、炎症性刺激に影響されない間葉系幹細胞の骨芽細胞分化誘導技術を樹立する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BMP-2は細胞内シグナル系を介して顕著に骨芽細胞へと分化させるが、実際の骨欠損部や外科的侵襲を受けた組織には一時的な炎症反応が起き、様々な炎症性サイトカイン産生が誘導されることで、局所の細胞増殖、分化に関わり、創傷治癒ならびに骨形成に重大な影響を及ぼす。とくにこれらの炎症性刺激はBMP-2に関するシグナル系の活性化を阻害して骨芽細胞分化ならびに骨形成を抑制することがわかっている。本研究で着目しているBMP以外の複数の成長因子を組み合わせることで炎症反応に影響されない骨再生技術確立の試みについては未だ報告がなく、臨床応用可能で画期的な骨再生技術の確立に繋がる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic proteins (BMPs) is reported that the most effective factor for promoting proliferation and differentiation for osteoblast when assuming bone regeneration therapy. However, it has been clarified that BMP is not expected a satisfactory bone formation reaction, because of inflammatory reaction with surgical treatment in vivo.

Therefore, we attempt to establish novel bone regeneration therapy utilizing combination of multiple growth factors which having an acting mechanism different from BMP signal pathway.

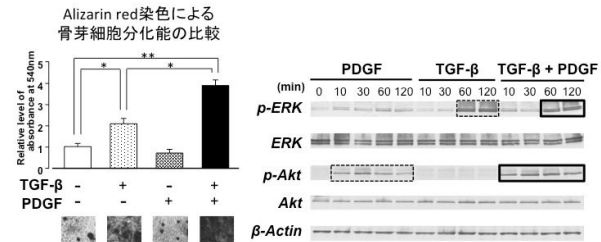
研究分野：再生医療

キーワード：骨再生法 サイトカイン BMP-2 炎症性刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯を喪失した場合の機能回復の方法として、近年は治療効果と予後の観点からデンタルインプラントが適用となる症例が激増している。一方、骨量の有無が重要なポイントとなるため、抜歯後の顎骨・歯槽骨の維持または回復が重要視されている。しかしながら、抜歯後または、抜歯に至る過程ですでに骨吸収が亢進し、歯槽骨が失われている症例も多々見受けられる。失われた歯槽骨の回復手段として自家骨移植がゴールド・スタンダードとされているが、患者への侵襲や負担は決して小さくはない。このような背景から、現在まで骨芽細胞を活性化させる新規生体材料の開発や各種成長因子の利用等、様々な試みがなされている。近年、多血小板血漿 platelet-rich plasma (PRP) や次世代 PRP として知られる concentrated growth factor (CGF) は硬組織再生のみならず軟組織再生も促進するとされ、注目されている。PRP や CGF といった血小板濃縮血漿にはとりわけ主要成長因子として vascular endothelial growth factor (VEGF)、platelet derived growth factor (PDGF)、insulin-like growth factor-I (IGF-I)、transforming growth factor- β (TGF- β) が豊富に存在しており、これら成長因子の働きによって骨再生促進作用を發揮することが示唆されている。また近年、ラット骨欠損モデルへ PRP ならびに多分化能を有する間葉系幹細胞 mesenchymal stem cells (MSC) を併用して移植し、良好な骨再生能を示したと報告されている。



我々は複数の成長因子の相乗効果について着目し、これまでに MSC の骨芽細胞分化におよぼす影響を評価した。その結果、MSC における TGF- β 誘導性の骨芽細胞分化は MEK/ERK 経路に依存すること、さらにこの骨芽細胞分化は PDGF 刺激による PI3K/Akt 経路の活性化に伴って相乗的に促進されることを明らかにした。申請者が報告した PDGF 以外には IGF-I が TGF- β 誘導性の骨芽細胞分化を促進するという報告のみである。また申請者は現在、TGF- β と VEGF との相乗作用による MSC での骨芽細胞分化能促進効果についても明らかとした。これまでの分子細胞生物学的な報告を根拠として判断するならば、骨芽細胞の増殖や分化促進のために最も効果的な因子は骨形成誘導因子 bone morphogenetic protein (BMP) である。しかしながら、外科的処置を併用した BMP 投与による骨再生処置には必ず炎症反応が伴うため、*in vitro* で観察されるような BMP による良好な骨形成反応は *in vivo* では期待できないことが以下のように明らかとされている。骨補填材料や間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) を外科処置に伴って骨再生予定部分に埋入する場合には、必ずその場には、IL-1 β や IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカイン産生が誘導される。このような炎症組織中では BMP-2 による骨芽細胞分化促進シグナルは、炎症性サイトカインにより阻害されると報告されている。また MSC の培養条件によっても細胞動態は大きく異なり、当講座では純チタン表面に陽極酸化・水熱処理を行うことで、陽極酸化被膜上にハイドロキシアパタイト (HA) 結晶を析出させる表面処理法 (SA 処理) の検討を行い、インプラント臨床への有用性を報告してきた。また骨-インプラント界面部でのインテグレーションにおいて、骨再生を促進する MSC は培養環境によりその増殖・分化能へ影響を与えることが報告されている。しかし、これまでに我々が発見した PDGF、VEGF ならびに TGF- β の組合せ刺激による MSC の骨芽細胞分化促進効果に利用される細胞内シグナル伝達経路 (MEK/ERK ならびに PI3K/Akt 経路) は、BMP による同様の効果のために利用される細胞内シグナル伝達経路 (Smad1/5 ならびに p38 MAPK) とは全く異なることが明らかとされている。以上の事実から、我々が発見した BMP 以外の成長因子の組み合わせによる MSC の骨芽細胞分化促進効果は炎症性サイトカインにより影響を受けない可能性が強く示唆されるが、未だ明らかとされていない。

本研究で着目している BMP 以外の複数の成長因子を組み合わせることで炎症反応に影響されない骨再生技術確立の試みについては未だ報告がなく、本研究成果が臨床応用可能な画期的な骨再生技術の確立に繋がる可能性が高い。

2. 研究の目的

- (1) BMP 以外の複数の成長因子の組み合わせによる MSC に対する骨芽細胞分化促進効果に炎症性刺激がどのように影響するかどうか BMP による効果と比較して *in vitro* で調査する。
- (2) (1)の研究により明らかとされた炎症性刺激で阻害されない骨芽細胞分化促進効果を示す BMP 以外の成長因子の組み合わせが *in vivo* で高い骨形成能力を発現することを確認する。
- (3) 炎症性刺激の細胞内シグナル伝達の中心を担う NF- κ B シグナルを阻害する IKK インヒビターを添加した場合、BMP 以外の成長因子の組み合わせあるいは BMP 自身による *in vivo* 骨形成誘導効果が増強されるかどうかについて比較検討して明らかとする。

以上の研究により、炎症性刺激に影響されない成長因子を利用した新たな骨再生療法を確立するための分子基盤樹立を目指して以下の内容を明らかとすることを目的とした。

hMSC ならびにマウス MSC へ複数の成長因子を組み合わせることで投与し骨芽細胞分化能促進効果を BMP 投与と比較して検証する。その際、TNF- α 、IL-1、-6 などの炎症性サイトカ

インによる刺激が、これらの骨芽細胞分化能促進効果にどのように影響するか比較調査
 純チタンインプラント体表面への SA 処理の効果が、MSC へ与える影響を検索すること
 を目的として、SA 処理チタン表面上における MSC の増殖・分化能
 赤色蛍光強発現遺伝子導入マウス(以下 td Tomato マウス)の蛍光反応を利用することで、
 生体内に移植した組織の細胞動態を体表から観察することを可能とし、さらにヌードマウ
 スの骨欠損部に td Tomato マウスの骨片を移植して、蛍光反応を追跡することによる、
 骨移植後の治癒機構と細胞動態の解明

3. 研究の方法

- (1) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (UE7T-13 : JCRB no. 1154, Japan Health Sciences Foundation, Tokyo, Japan) を播種後、各種成長因子刺激前に LPS 10ng/ml 添加して炎症性刺激を与えた。6 時間後 a) 10% FBS 含有 D-MEM 培地 b) 骨分化誘導培地(100nM dexamethasone、50µg/ml ascorbic acid、10mM β-glycerophosphate) c) b)+BMP-2 (10ng/ml) d) b)+PDGF (10ng/ml) + TGF-β (5ng/ml) で 1 週間培養した。hMSC の骨芽細胞分化能は ALP 染色、Alzarin Red 染色を用いて評価するとともに、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量の変動をリアルタイム RT-PCR にて検討した。
- (2) 純チタン(チタン) 純チタン表面を β-グリセロリン酸ナトリウム (0.01mol/l) と酢酸カルシウム (0.15mol/l) からなる電解質溶液中にて放電陽極酸化処理 (350V、50mA/cm²) を施したもの (AO 処理チタン) その後水熱処理 (300℃、2 時間) を施したもの (SA 処理チタン) を用いた。これらの試料上にマウスの骨髄から樹立した MSC 株 (SG 2) を播種し、1) WST-1 assay による細胞増殖能、2) 培養 1、2、4 週後にリアルタイム RT-PCR による骨分化マーカー遺伝子 (ALPL、RUNX2、OSTERIX、OCN) の mRNA 発現量の変動について解析した。
- (3) 8 週齢雄性 (以下同様に) ヌードマウス頭蓋骨正中に直径 4 mm の骨欠損を形成し、8 週齢 td Tomato マウスより採取した同径の頭蓋骨を、骨欠損部に移植した。移植部位の形態学的評価は、経時的にマイクロ CT による撮影、さらに IVIS® Lumina Imaging System(以下 IVIS)を用いて蛍光イメージングを行った。IVIS における評価は Image J にて、蛍光強度および蛍光発現部位の面積を測定、評価した垂直的骨量回復を想定し、8 週齢ヌードマウスの頭蓋骨上へ td Tomato マウスより採取した直径 4 mm の頭蓋骨を移植後、既存骨と移植骨界面における骨再生能をマイクロ CT および IVIS にて評価した。16 週齢でマウスを屠殺し、組織切片を作成後、免疫染色を行った。

4. 研究成果

実験 (1)

・培養 3 日までは実験各群で増殖能に差を認めなかったが、培養 7 日では PDGF + TGF-β 群で有意に細胞増殖能が低下した。

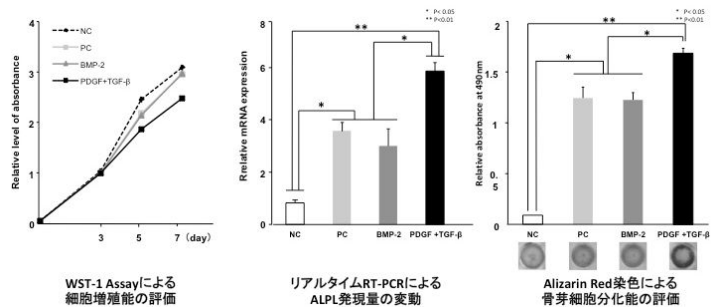
・骨分化誘導培地添加群と比較して、BMP-2 添加群は骨芽細胞分化能において有意な差が認められなかった。一方、PDGF + TGF-β 群は骨芽細胞分化能を有意に促進させた。

・培養 3 日では NC と比較して PC、BMP-2、PDGF + TGF-β 群で初期の骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼが有意に上昇し、各群で LPS による影響は認められなかった。一方、培養 7 日では PC 群、BMP-2 群と比較して PDGF + TGF-β 群で有意に上昇した。

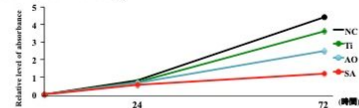
上記の結果より、炎症性刺激が存在すると BMP-2 による Smad 経路が抑制され、骨芽細胞分化促進能が抑制されたと考えられる。一方、PDGF + TGF-β 群は MEK/ERK 及び PI3K/AKT 経路が主な細胞内シグナルであり、炎症性刺激による骨芽細胞分化の影響がなかったと示唆される。

実験 (2)

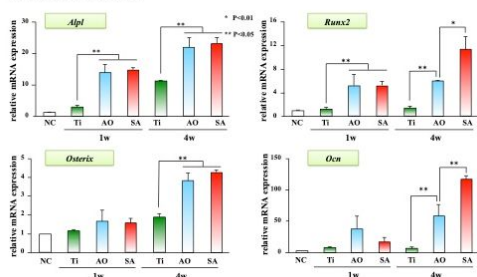
1. 細胞増殖能解析では、チタン群と比較して AO 処理チタン群で細胞増殖能の低下を認め、SA 処理チタン群ではさらに低下することが明らかとなった。
2. 遺伝子発現量解析では、チタン群と比較して AO 処理チタン、SA 処理チタン群では培養 4 週目において ALPL、RUNX2 の mRNA 発現量が有意に増加した。一方、OSTERIX、OCN



1. Proliferation (WST-1 assay)



2. real time RT-PCR

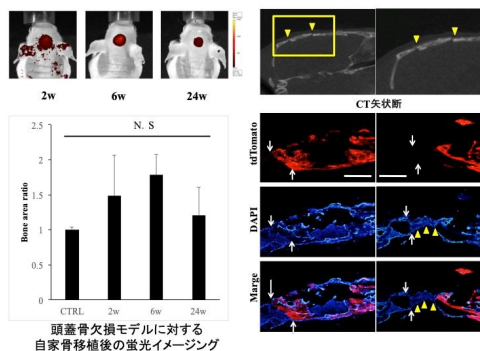


は1週目で各群に有意な差は認められなかったが、培養4週目ではSA処理チタンで有意に促進された。

以上よりSA処理チタンはMSCの細胞内シグナル伝達経路を介して、その細胞増殖能を抑制させ、骨芽細胞の分化誘導能を促進させる効果があることが明らかとなった。

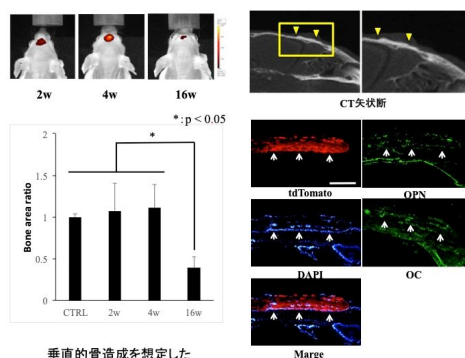
実験(3)

・ヌードマウス頭蓋骨欠損部と移植骨界面において、明らかな新生骨の存在は確認できない。接触面においては新生骨様組織が一部確認された。また赤色蛍光発現部位の蛍光強度を測定した結果、移植後24週経過後においても蛍光反応は持続していた。移植後の骨面積比に有意差はなかった。赤色の細胞が既存骨内へ浸潤していく像は観察できない。また移植片内部には赤色蛍光の発現は認められないがDAPIを発現する部位が存在した。



頭蓋骨欠損モデルに対する自家骨移植後の蛍光イメージング

・欠損部作成モデルの場合と比較すると、新生骨様組織が顕著に確認できた。移植後16週では2週と比較し辺縁骨周囲は明らかに丸みを帯び、骨接触面の一部に見られた新生骨様組織の面積は増大している。また蛍光イメージングによる骨面積比は4週までと比較し16週でおよそ1/2まで減少している。既存骨内に赤色蛍光反応を示す細胞(移植片由来細胞)は認められない。既存骨と移植片の骨接触部分に面する移植片内にはOsteopontin(OPN)やOCNの発現を同時に示す細胞が認められた。骨接触部分の新生骨形成領域には、緑色蛍光(OPNやOC)を発現する細胞が多く確認された。



垂直的骨造成を想定した自家骨移植後の蛍光イメージング

以上より欠損部に移植したtdTomatoマウス頭蓋骨は24週経過後においても、蛍光反応を示していたことから、移植された組織は壊死することなく、その骨片自らが代謝を維持していると考えられる。また、移植片は新生骨形成のための骨系細胞の足場として働いていることが示唆された。本実験では、既存骨からの骨芽細胞による骨形成が移植骨により助長される可能性が示されており、移植骨による間接的な骨形成誘導効果の一端が明らかとされた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Ikeda K., Taira M., Yokota J., Hattori M., Ishisaki A., Kondo H. Effects of Addition of Nano-hydroxyapatite to Highly pressed Collagen on Osteogenic Differentiation in Osteoblastic SaOS-2 Cells. Nano Biomedicine. 2016, 8(2): 91-100. 査読有

[学会発表](計9件)

Kyoko Takafuji, Hidemichi Kihara, Wataru Hatakeyama, Jun Yokota, Kenta Oriso, Hisatomo Kondo. Long-term cases of sinus floor elevation using the plate shaped bone substitute. 2018 EAO European Association For Osteointegration Congress 27th Annual Scientific Meeting. 2018.

高藤 恭子, 夏堀 礼二, 小山田 勇太郎, 鬼原 英道, 高橋 敏幸, 横田 潤, 折祖 研太, 近藤 尚知. デジタル技術によるソケットブリザベーションの効果の定量的評価. 第48回日本口腔インプラント学会学術大会. 2018年.

YOKOTA J., TAKAFUJI K, KONDO H. Effects of the physicochemical properties of anodized-hydrothermally treated titanium on in mesenchymal stem cell lines derived from the bone marrow of mice. ITI World Symposium 2017. 2017.

武部 純, 横田 潤, 秦 正樹, 青柳 敦士, 松川 良平, 帖佐 直幸, 石崎 明. 傾斜機能型ナノハイブリッドチタン上における間葉系幹細胞の影響. 第39回日本バイオマテリアル学会大会. 2017年.

小山田 勇太郎, 高藤 恭子, 鬼原 英道, 高橋 敏幸, 田邊 憲昌, 横田 潤, 近藤 尚知. ショートインプラント上部構造装着後の予後に関する臨床的調査. 平成29年度公益社団法人日本補綴歯科学会東北・北海道支部学術大会. 2017年.

横田 潤, 畠山 航, 池田 功司, 菅原 志帆, 石崎 明, 近藤 尚知. 炎症性刺激に影響されない複数の成長因子による骨芽細胞分化効果. 第47回日本口腔インプラント学会学術大会. 2017年.

小山田 勇太郎, 鬼原 英道, 高橋 敏幸, 高藤 恭子, 横田 潤, 折祖 研太, 西郷 慶悦, 近藤 尚知. デジタル技術を応用した抜歯後の骨吸収の三次元測定. 第47回日本口腔インプラント学会学術大会. 2017年.

井上 学, 横田 潤, 西尾俊彦, 松原 大, 高藤 恭子, 鬼原 英道, 石崎 明, 近藤 尚知. 赤

色蛍光強発現遺伝子導入マウスを用いた骨欠損部における移植骨周囲組織の治癒機構の解析. 公益社団法人日本口腔インプラント第 36 回東北・北海道支部大会. 2016 年.

YOKOTA J, MIURA S, KIHARA H, HATAKEYAMA W, KONDO H. Roles of TGF- β and VEGF on efficient bone formation by mesenchymal stem cells. 第 20 回 公益社団法人日本学顔面インプラント学会総会・学術大会. 2016 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。