

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11729

研究課題名(和文) S1Pによる骨形成-血管新生制御機構の解明と硬組織再生治療への臨床的展開

研究課題名(英文) Function of S1P signaling pathway in bone formation and angiogenesis and its application of hard tissue regeneration

研究代表者

松崎 英津子 (Matsuzaki, Etsuko)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：20432924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の作用により、骨芽細胞分化誘導における歯根膜幹細胞(HPLSCs)スフェロイドから放出される血管形成マーカーである、血管内皮増殖因子(VEGF)分泌量の増加を認めた。マウス脛骨局所においては、S1PR2作動薬により、アルカリホスファターゼ(ALP)、オステオポンチン(OPN)、骨シアロタンパク質(BSP)、オステオカルシン(OCN)の発現が増加した。一方、歯根尖切除・歯槽骨欠損動物モデルにおいては、S1PR2作動薬による骨量の増加および骨誘導能を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外科的歯内療法に適応となる広範囲な歯槽骨欠損の修復・再生を目指した、S1Pシグナルを標的としたアプローチを行っている。本研究では、骨芽細胞分化活性向上に加えて、術部に存在する幹細胞を賦活化し、血管形成マーカー因子分泌量を増加させること、また、歯根尖切除・歯槽骨欠損動物モデルにおいては、S1P受容体作動薬による骨誘導能を見出した。S1P受容体作動薬は、術部に形成される血餅を足場としつつ、同部に存在する幹細胞と血管内皮細胞の共存から機能的な骨再生に有用である可能性が示された。また、骨粗鬆症のような全身疾患に対する治療戦略にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P) increased the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is a marker of angiogenesis, in human periodontal ligament stem cells (HPLSCs) differentiation into osteoblast. On the other hand, pharmacological S1PR2 agonist increased the osteoblast differentiation markers such as alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), and osteocalcin (OCN) in mouse tibia. Additionally, we established an apical resection/alveolar bone defect model in rat, and found that S1PR2 agonist increased bone volume caused by osteoinduction.

研究分野：歯内療法学

キーワード：スフィンゴシン-1-リン酸 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の再生療法では、「細胞」と「足場」ならびに「シグナル分子」の三大要素を用いた研究が精力的に行われており、歯科領域でも、それに則った細胞シート作成による幹細胞移植やサイトカイン療法が注目されている。一方、創傷治癒の過程では、新たに形成された肉芽組織の構成成分に、血管内皮細胞による血管新生が認められる。血管新生は、慢性根尖性歯周炎の進展にも関与するが、とりわけ骨組織の再生において、血管内皮細胞による血管新生すなわち血管ネットワーク形成が重要な役割を担うことが明らかとなってきた。そのため、今後の骨組織再生医療の進展、すなわちより早く、より広く再生させるためには、骨形成・破壊分子メカニズムの解明のみならず、血管新生誘導による機能的な三次元骨組織再構成が必須である。

幹細胞の移植による再生療法は確実性が高い一方で、現時点では大きなコストがかかるため、シグナル分子や足場材等を応用し、生体内に存在する細胞の再生能力向上による再生誘導を確立することは有用かつ現実的であると考えられる。S1P は生体内、特に血液中に豊富に存在し、血管系細胞、骨系細胞のみならず、様々な細胞の細胞膜のリン脂質から作られ、プロスタグランジン同様、受容体を介して細胞分化・増殖・遊走等を制御する、いわゆる「シグナル分子」である。そこで、生体内に存在する細胞の再生能力を向上させるストラテジーのひとつとして、S1P および S1P シグナル伝達経路を用いたアプローチ法を用いて、骨形成・血管新生誘導による機能的な三次元骨組織形成への影響について検討を行うこととした。

2. 研究の目的

S1P シグナル伝達経路の活性化による骨芽細胞分化誘導に加えて、根尖部に存在する幹細胞から産生されるパラクライン因子が細胞間相互作用し、骨形成・血管新生作用を促進するという仮説をたて、S1P 作動薬による機能的な三次元骨組織形成について解析した。また、歯内療法領域における広範な骨欠損を想定し、外科的歯内療法動物モデルの作製と解析を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス脛骨局所における S1PR1、S1PR2 作動薬の骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現への影響
S1PR1 および S1PR2 受容体作動薬を投与したマウス脛骨から mRNA を抽出し、骨芽細胞分化マーカー因子の検出を qRT-PCR 法、ELISA 法により行った。

(2) ヒト歯根膜幹細胞 (HPLSCs) スフェロイドの骨芽細胞分化誘導における S1P の血管形成関連マーカー発現への影響

HPLSCs には、スフェロイド形成・骨芽細胞分化誘導の 24 時間前に S1P を添加し、スフェロイド形成後、3 日後、7 日後に mRNA 抽出と上清の回収を行った。骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を qRT-PCR 法、血管形成関連マーカー因子の産生を ELISA 法により検討した。

(3) ラット歯根尖切除/歯槽骨欠損モデルの作製と S1PR2 作動薬による骨形成作用の検討

10 週齢の雄性 Wistar 系ラットの下顎右側第一臼歯近心根をラバーダム防湿後、実体顕微鏡下にて抜髄・根管充填後、歯根尖を切除するとともに、直径 2mm、深さ 1mm の骨窩洞を形成した。その後、S1PR2 作動薬と基材を混合して骨窩洞内に注入、縫合してラット歯根尖切除/歯槽骨欠損モデルの確立を行った。欠損部骨組織の変化については micro-CT を用いて評価した。その後、同部の骨を脱灰し、組織切片を作製後、H-E 染色、S1P 受容体の免疫染色による組織解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス脛骨局所における S1PR1、S1PR2 作動薬の骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現への影響

骨芽細胞-血管内皮細胞相互作用の解析に先立ち、S1PR1 および S1PR2 受容体作動薬を投与したマウス脛骨から mRNA、血液から血清を抽出し、骨芽細胞分化マーカーの検出を qRT-PCR 法、ELISA 法により行った。S1PR1 作動薬により、アルカリホスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN)、骨シアロタンパク質 (BSP) の発現は有意に増加した。S1PR2 作動薬により、ALP、OPN、BSP に加えてオステオカルシンの発現が有意に増加した。とりわけ、S1PR2 作動薬により、後期の分化マーカーや骨基質形成に関与する遺伝子発現が著明に増加した¹⁾。骨芽細胞分化に重要な Runx2 に関しては、両作動薬により発現が増加傾向にあった。加えて、S1PR および S1PR2 受容体阻害薬を用いた同様の実験では、S1PR1 経路は BSP、S1PR2 経路は ALP、OPN、BSP の発現に関与することがわかった。

(2) ヒト歯根膜幹細胞 (HPLSCs) スフェロイドの骨芽細胞分化誘導における S1P の血管形成関連マーカー発現への影響

S1P により HPLSCs から放出されるパラクライン因子が細胞間相互作用し、骨形成・血管新生作用を促進するという仮説に関して、分子レベルで解析した。計画当初は、HPLSCs の通常培養を行い、S1P の影響を検討する予定であったが、臨床応用を鑑み、生体内環境に近く、高い骨形成能が得られる三次元培養を行った歯根膜幹細胞スフェロイドを用い、通常培養細胞との比較検討を行うよう変更した。具体的には、歯根膜幹細胞スフェロイドにおける S1P の作用と血管形成関連シグナルのパラクライン因子の検出を qRT-PCR 法、ELISA 法により検討した。S1P により骨

芽細胞分化マーカー遺伝子である Runx2、ALP、OCN の mRNA 発現が増加した。とりわけ S1P により Runx2 発現は分化誘導 3 日後に著明に増加した。また、骨芽細胞分化誘導における S1P による血管形成マーカー因子分泌量についても検討した。通常培養細胞では、S1P により血管形成マーカー因子のうち、培養 7 日目で、血管内皮増殖因子 (VEGF)、血管成長関連因子 (DLL4) 分泌量が有意に増加した。一方、スフェロイド形成細胞では、分化誘導 3 日目、S1P により、VEGF 分泌量が著明に増加した。すなわち、通常培養細胞と比較してスフェロイド形成細胞では、分化の早期に VEGF が有意に多く分泌されることが明らかとなった。

(3)ラット歯根尖切除/歯槽骨欠損モデルの作製と S1PR2 作動薬による骨形成作用の検討

S1P の歯内療法領域での歯槽骨再生に対する臨床応用を見据えて、広範な骨欠損を想定し、外科的歯内療法動物モデルの作製を行った。基材のみを填入した対照群と比較して、S1PR2 作動薬により骨量、骨梁数は有意な増加を認め、骨梁幅は増加傾向を認めた¹⁾。加えて、同部の H-E 染色、S1PR1、S1PR2 の免疫染色による組織解析を行ったところ、対照群と比較して実験群では血管様組織を伴う骨様組織が多く確認されたが、この組織形成は残存骨組織の部位から離れた部位に認められた。すなわち、S1PR2 作動薬は、骨を失った部位の周囲から骨芽細胞を誘導して骨形成を促す能力、骨誘導能を持つ可能性が示唆された。また、骨様組織形成部位には S1PR1 陽性細胞が、そこからやや離れた場所に S1PR2 陽性細胞が多く認められた。

S1PR2 作動薬による骨誘導能を認めたことから、S1PR2 作動薬は術部の幹細胞を賦活化し、幹細胞と血管内皮細胞の共存から機能的な骨再生を促すものと考えられた。また、術部に形成される血餅も足場として作用することが期待できると考えられる。

<引用文献>

1) 松崎英津子、阿南 壽、S1PR2 シグナル伝達経路を標的とした骨形成、日本歯内療法学会雑誌、41(2):71-76、2020

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 2件）

1. 著者名 松崎英津子、阿南 壽	4. 巻 41
2. 論文標題 S1PR2シグナル伝達経路を標的とした骨形成－歯槽骨欠損への応用－	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 71-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 松崎英津子、阿南 壽	4. 巻 41
2. 論文標題 歯内療法における新規歯槽骨再生療法の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 2-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.20817/jeajournal.41.1_2	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松崎英津子、松本典祥、水上正彦、松本和磨、畠山純子、高橋富美、阿南 壽
2. 発表標題 S1P/S1PR2 signaling pathway promotes bone formation on rat apicoectomy model
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎英津子、松本典祥、水上正彦、畠山純子、松雪 稜、高橋富美、平田雅人、阿南 壽
2. 発表標題 S1PR2作動薬による骨再生メカニズムの解明
3. 学会等名 第40回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎英津子、阿南 壽
2. 発表標題 骨形成の活性化に及ぼすスフィンゴシン-1-リン酸シグナル伝達経路の関与の解明
3. 学会等名 第40回日本歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎英津子
2. 発表標題 骨分化シグナルを標的とした新規再生療法の開発
3. 学会等名 第39回日本歯内療法学会学術大会（シンポジウム）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎英津子、松本和磨、阿南 壽
2. 発表標題 S1P signaling is a positive regulator of bone formation and is required for osteoblast differentiation
3. 学会等名 The 11th IFEA World Endodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎英津子、高橋富美、平田雅人、阿南 壽
2. 発表標題 マウス脛骨骨組織においてS1PRシグナル伝達経路が骨形成および骨芽細胞分化マーカーに及ぼす影響
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎英津子、東 克匡、橋本陽子、高橋富美、阿南 壽
2. 発表標題 マウス脛骨骨組織においてS1PR2シグナル伝達経路が骨芽細胞分化マーカーに及ぼす影響
3. 学会等名 第38回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	高橋 富美 (Takahashi-Yanaga Fumi) (50274436)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	
研究分担者	阿南 壽 (Anan Hisashi) (80158732)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	