

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006 年度～2008 年度  
 課題番号：18592187  
 研究課題名 (和文) 骨再生機序解明への新しい戦略 高気圧酸素負荷環境下における骨代謝について  
 研究課題名 (英文) A new strategy to the elucidation of bone regeneration mechanism - bone metabolism with hyperbaric oxygenation -  
 研究代表者  
 佐々木 匡理 (SASAKI MASANORI)  
 九州大学・大学病院・助教  
 研究者番号：30346803

## 研究成果の概要：

本研究では骨芽細胞・破骨細胞において、高気圧酸素負荷環境が与えるさまざまな影響について細胞レベルでの解析を行った。増殖能の解析では骨芽細胞、破骨細胞において異なる影響がみられ、分化能の解析では骨芽細胞の分化に影響がみられなかったが、破骨細胞の分化に影響を与えることが分かった。また、両細胞において各種成長因子やサイトカインの mRNA 発現を調整し、破骨細胞の分化に影響を与えることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生、高気圧酸素負荷、骨芽・破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域においては、近年外傷や悪性腫瘍の手術などによって生じる骨欠損部に対して行う骨移植術、骨格性下顎前突症などの顎変形症症例に対して行う骨形成手術などのように骨に関する手術が数多く行われている。さらに、最近ではインプラント治療が一般治療として認識されるようになってきたことより、インプラント前処置のためのサイナスリフトや GBR などの骨移植の需要が高まっており、全国的に増加傾向にある。これらの手術において、移植骨の生着や十分な骨形成を得るためには、まだまだ不明な点が

多く、現在も様々な施設にて研究がなされており、骨再生機序の解明は極めて重要な課題である。

骨髄炎、循環障害、ガス壊疽、脊髄神経疾患、広範囲熱傷、皮膚移植など様々な疾患では、高気圧酸素療法を他の治療とともに行うことにより、治療効果を上げる手助けとなっている。多くの研究により、高気圧酸素療法の治療効果は血行障害の改善、低酸素状態の改善、またそれに伴う薬物の組織移行を良くすることによることが報告されている。また、最近では骨折の治療にも多く用いられており、治癒期間の短縮にもつながっている。

このことから、血行や低酸素状態の改善などの機序以外に骨再生自体にも何らかの作用を及ぼしていることが十分に考えられ、高気圧酸素負荷環境が骨代謝に与える影響について研究することは十分に意義があると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨再生機序に対する高気圧酸素負荷の影響について解析を行う。本研究の目的は、高気圧酸素負荷環境が骨芽細胞および破骨細胞に対して与える影響について研究を行い、細胞レベルでの高気圧酸素負荷の効果を解明することを目的としている。その方法としては、申請者らが開発した高気圧酸素負荷環境を作り出すチャンパーを用いて、骨芽細胞および破骨細胞の増殖・分化能、成長因子、サイトカインなどの解析を行う。本研究の結果をもとに、骨移植や骨形成術の術後など、骨再生を期待する様々な疾患への高気圧酸素負荷の臨床応用を考えている。

## 3. 研究の方法

申請者らが開発した高気圧酸素負荷を与えるチャンパー（図1）を利用して以下の実験を行った。



図1 実験用加圧チャンパー

マウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7（破骨細胞）と、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1（骨芽細胞）を実験に用い、10% 牛胎仔血清、NaHCO<sub>3</sub>（0.22 g/l）、ペニシリン G（100 units/ml）および硫酸ストレプトマイシン（100 μg/ml）を加えたα-MEM 中で、37℃、5% CO<sub>2</sub> 気相下で培養を行った。継代はサブコンフルエントに達した単層の細胞を0.05%トリプシン/500mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）で処理することによって浮遊させた後、毎分1,000回転で5分間遠心分離を行い、α-MEM 中で培養を行った。

### (1) 各種細胞株における細胞増殖能の解析（MTS アッセイ）

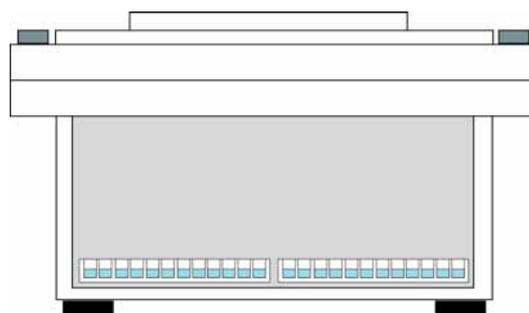


図2 加圧チャンパー内での高気圧酸素負荷

高気圧酸素負荷の効果を細胞レベルで解明することを目的に、各種細胞株（RAW264.7（破骨細胞）、MC3T3-E1（骨芽細胞））における細胞増殖能を解析した。RAW264.7、MC3T3-E1 を96穴プレートに $1 \times 10^4$ 個播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>、気相下で一晩培養を行い、翌日から加圧チャンパー内で100%酸素を加えて2.0気圧とした状態で20分、40分、60分、60分×2日、20分×3日高気圧酸素負荷を行った（図2）。その後、37℃インキュベーターにて3日間培養を行った。その後、PBSで洗浄し、100 μl α-MEM、20 μl の CellTiter 96<sup>®</sup>Aqueous One Solution Reagent を加え、37℃、5% CO<sub>2</sub> 気相下で3時間作用させた後、100 μl ずつ96穴プレートに採り、マイクロプレートリーダーで595nmの吸光度にて細胞増殖能を測定した。コントロールとして、37℃、5% CO<sub>2</sub> 気相下で培養したものを用いた。

### (2) 各種細胞株における分化能の解析

RAW264.7 を24穴プレート（100 μl α-MEM）に $1 \times 10^4$ 個播種し、RANKL 25 ng/ml、M-CSF 25 ng/ml を加えて、37℃、5% CO<sub>2</sub> 気相下で一晩培養を行った。1.と同様に翌日から加圧チャンパー内に100%酸素を入れて2.0、1.4気圧とした状態で、20分、20分×7日、60分、60分×3日、60分×7日高気圧酸素負荷を行った。酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（TRAP）アッセイキットを用いて、マイクロリーダーにて測定を行い、各種細胞株の分化能を解析した。

次いで、MC3T3-E1 には BMP-2 100 ng/ml を加えて1.4気圧とした状態で同様に負荷を行い、アルカリフォスファターゼ（ALP）活性アッセイキットを用いて解析を行った。コントロールは(1)と同様である。

### (3) RT-PCR 法による各種成長因子・サイトカインなどの解析

6 cm 培養ディッシュにて各細胞株を37℃、5% CO<sub>2</sub> 気相下で、サブコンフルエントの状態まで培養した後、加圧チャンパー内に100%酸素を入れて1.4気圧とした状態で、MC3T3-E1 は BMP-2 100 ng/ml、RAW264.7 は RANKL 25 ng/ml、M-CSF 25 ng/ml を加えて

37 インキュベーターにて 20 分、60 分、60 分×3 日、60 分×5 日、60 分×7 日培養を行った。その後、各種細胞株より mRNA を抽出し、MC3T3-E1 に関しては BMP-2、RANKL、OPG、M-CSF、TGF- $\beta$ 、RAW 264.7 に関しては RANK、TNF- $\alpha$  を RT-PCR 法にて解析した。PCR 産物は 1.8%アガロースゲルにて電気泳動を行い、イメージアナライザーで記録した。コントロールは (1)と同様である。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各種細胞株における増殖能の解析

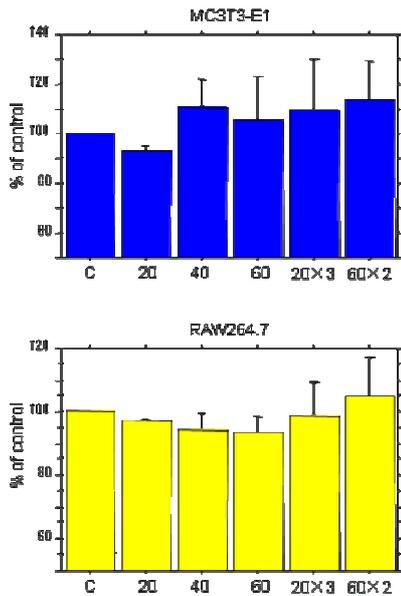


図3 各種細胞株の増殖能の解析(MTS アッセイ)

MTS アッセイでの各種細胞株の結果を%コントロールとして解析した(図3)。各高気圧酸素負荷環境下において、MC3T3-E1 では有意差はみられなかったが、コントロールに比べて加圧時間の増加に伴って増殖能の軽度増加がみられた。しかしながら、RAW264.7 では同様に有意差はみられなかったが、20、40、60 分と単回の加圧においては増殖能の軽度減少がみられ、加圧を反復して行った場合には増殖能の回復が認められた。この結果から、高気圧酸素負荷時間および回数によって、各細胞間で細胞増殖能に異なる影響を及ぼす可能性が考えられた。

##### (2) 各種細胞株における分化能の解析

RAW264.7 の酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性(TRAP) (図4)において、2.0 気圧環境下ではコントロールと比して負荷時間および期間でほとんど変化なく、有意差はみられなかった。1.4 気圧では、有意差はみられなかったものの、負荷を加えることによってコントロールに比して分化能の増加がみられた。

MC3T3-E1 のアルカリフォスファターゼ活性

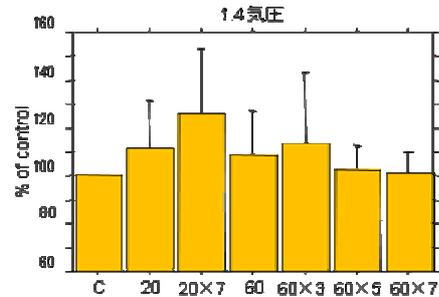
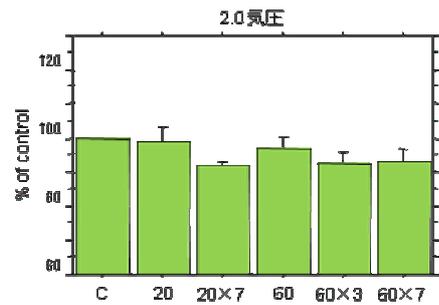


図4 RAW264.7における分化能の解析(TRAP 活性)

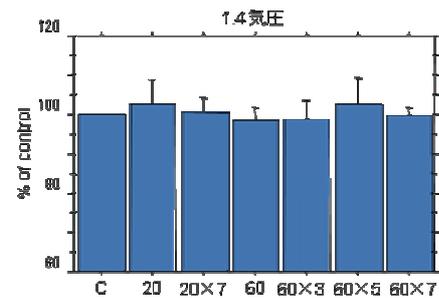


図5 MC3T3-E1における分化能の解析(ALP 活性)

(ALP)では、1.4 気圧での負荷環境下でコントロールに比して変化なく、有意差はみられなかった(図5)。これらの結果より、高気圧酸素負荷環境下が RAW264.7 の分化能に影響を与えることが考えられた。

##### (3) 各種細胞株における成長因子・サイトカインなどの解析

MC3T3-E1 において M-CSF、TGF- $\beta$  は負荷を加えるとコントロールよりも発現が増強されるが、負荷回数の増加に伴って発現の減少がみられた。OPG は 60 分単回負荷時のみ発現の増強がみられた。Osteopontin は変化なく、BMP-2 はコントロールも含めて発現がみられなかった。RANKL は 20 分単回負荷では発現の増加がみられたが、60 分負荷ではいずれもコントロールに比して発現量の減少がみられた。

RAW264.7 においては、RANK の発現はコントロールと変化ないが、TNF- $\alpha$  では負荷によって発現が増加され、負荷回数の増加に伴って減少がみられた。

以上の結果から、高気圧酸素負荷において骨芽細胞では M-CSF、TGF- $\beta$ 、RANKL mRNA の発現を調整し、破骨細胞では TNF- $\alpha$  mRNA 発現を調整し、破骨細胞の分化抑制に影響を与える可能性が考えられた。

なお、高気圧酸素負荷環境の負荷時間および回数によって様々な様相を呈することから、各種用途に合った負荷時間・回数の研究も行うことが重要と思われる。

今後、骨移植モデルなどの動物実験において高気圧酸素負荷を与えた時の骨形成状態などについて解析を行い、骨移植やインプラント治療後の治癒促進を目指した高気圧酸素負荷の臨床応用に向けてさらなる研究を行う必要がある。

#### 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)

なし

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

佐々木匡理 (SASAKI MASANORI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30346803

##### (2)研究分担者

白砂兼光 (SHIRASUNA KANEMITSU)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30093420

窪田泰孝 (KUBOTA YASUTAKA)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：60205151