

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19182

研究課題名(和文) G-CSF投与による骨リモデリング微小環境の破綻モデルの解析

研究課題名(英文) Analysis of the disfunction model of bone remodeling by G-CSF administration

研究代表者

上田 美帆 (Ueta, Miho)

兵庫医科大学・医学部・研究生

研究者番号：10774391

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)：顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF)の投与により、骨リモデリング微小環境の破綻が生じていると考えられる。マウスにG-CSFを皮下注射にて投与後に大腿骨および抜歯を行った顎骨を採取し、骨形態計測および病理組織学的に検討した。G-CSF投与群の大腿骨は対照群に比べ、骨量、骨梁数が有意に減少し、骨梁間隙が有意に増加していた。また、G-CSF投与群は対照群に比べ、抜歯窩の骨性治癒が遅延していた。G-CSF投与群の抜歯窩周囲の顎骨および大腿骨の破骨細胞数は減少し、骨細管数も減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

定常状態の骨リモデリング微小環境における破骨細胞と骨芽細胞とのカップリングに関する報告は多いが、この微小環境が破綻したモデルの報告はない。G-CSFを投与すると、骨芽細胞や骨細胞は抑制され、造血幹細胞が微小環境に留まるサポートシステムが減弱し、造血幹細胞は放出される。これは骨リモデリング微小環境の破綻モデルとなっていることに着目し、これを解明することは、骨リモデリングが低下した老化性骨量減少などの病態解明やマーカーを用いた診断・治療の進歩に大きくつながると考えている。

研究成果の概要(英文)：When granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is administered, osteoblasts and osteocytes are suppressed and the support system for hematopoietic stem cells to stay in the microenvironment is diminished. Then, the hematopoietic stem cells leave the bone marrow microenvironment and are released into the blood. As a result, the bone remodeling microenvironment may not function correctly. The purpose of this study is to investigate the effect of G-CSF administration on bone healing of the tooth extraction socket and to analysis the disfunction model of bone remodeling. Significant differences in BV/TV, Tb.N, and Tb.Sp were observed between the G-CSF and control groups. The trabecular bone of the femur was reduced in the G-CSF administration group compared with control group. Fibrous connective tissues were observed in the extraction socket and bone healing was delayed in the G-CSF administration group compared with control group.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨リモデリング G-CSF 骨微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢者社会とともに骨粗鬆症患者は増加し、重大な副作用のひとつとして、難治性の骨露出を特徴とする骨吸収抑制薬関連顎骨壊死が問題視されている。骨リモデリングにおいて正常では骨吸収と骨形成のバランスがとられている。骨粗鬆症は、形成はほぼ正常であるが吸収が亢進している高代謝回転状態である。一方、糖尿病や老化した骨では、形成・吸収双方が低下し、形成低下がより高度な低代謝回転を示す。

骨リモデリングは「古い骨を新しい骨に置き換えること」であるが、一連の過程はまだまだ解明されていない部分が多い。破骨細胞と骨芽細胞の連携が基盤となっていが、破骨細胞と骨芽細胞の連携が取れず、破骨細胞の分化抑制、骨細胞のネットワーク接続不良は、骨リモデリングにおける微小環境が破綻した状態である。

顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF) を投与すると、骨芽細胞や骨細胞は抑制され、造血幹細胞が微小環境に留まるサポートシステムが減弱し、造血幹細胞は血液中に放出され、骨リモデリング微小環境が破綻する。

この微小環境破綻モデルを再現・解析し、骨性治癒遷延の病態を解明するために本研究を計画した。

2. 研究の目的

- (1) G-CSF 投与による海綿骨・皮質骨への影響：海綿骨における骨量、骨梁数、皮質骨の多孔性などについて病理組織学的に明らかにするとともに、骨形態計測についてマウスを用いて検討する。また、骨リモデリングに関係する破骨細胞、骨細胞への影響を確認する。
- (2) G-CSF 投与によるマウス抜歯後組織の検討：G-CSF の投与による抜歯窩の骨性治癒への影響を病理組織学的に検討する。また、骨リモデリングに関係する破骨細胞、骨細胞への影響を確認する。

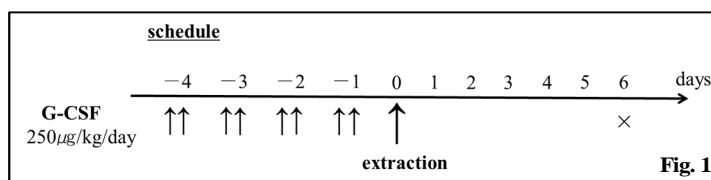
3. 研究の方法

6週齢の雄 C57BL/6J マウスを無作為に control 群 (n=3) と G-CSF 群 (n=3) に分け、G-CSF (125µg/kg/回) を 12 時間毎に皮下注射にて 4 日間投与した。

G-CSF の投与終了翌日に control 群と G-CSF 群のマウスの採血を行い、白血球数を測定した。その後、同マウスで上顎片側臼歯の抜歯を行った。

抜歯 6 日後に、control 群と G-CSF 群のマウスの大腿骨 (femur) および抜歯窩を含めた上顎骨 (maxilla) をイソフルランによる全身麻酔を施行後に採取した (Fig. 1)。

大腿骨 (femur) の µCT 撮影を行い骨形態計測評価し、骨端部の HE、TRAP、AgNOR 染色を行い、破骨細胞、骨細胞を観察した。また、µCT 撮影にて非抜歯側の大白歯歯根間の骨形態計測を行い、さらに抜歯窩周囲の HE、TRAP、AgNOR 染色を行い、骨性治癒への影響を病理組織学的に評価した。



4. 研究成果

- (1) 白血球数 (Leukocyte number): G-CSF 投与群では白血球数が有意に増加していた (Fig. 2)。
- (2) 大腿骨の骨形態計測: G-CSF 投与群では骨量 (BV/TV), 骨梁間隙 (Tb.Sp) が有意に増加し、骨梁数 (Tb.N) が有意に減少していた (Table)。

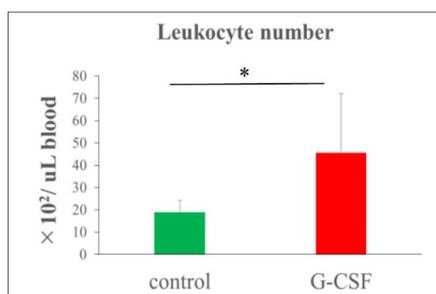


Fig. 2 * :P<0.05

大腿骨の骨形態計測				
Group	BV/TV (%)	Tb.Th (µm)	Tb.N (1/mm)	Tb.Sp (µm)
control	17.84 ± 1.638	38.46 ± 2.212	4.69 ± 0.202	175.67 ± 10.34
G-CSF	11.54 ± 1.37	37.64 ± 2.353	3.06 ± 0.196	290.31 ± 22.09

Table. Data are expressed as mean ± standard deviation. * :P<0.05

- (3) 上顎大臼歯歯根間の海綿骨の骨形態計測: G-CSF 投与群では骨量(BV/TV), 骨梁間隙(Tb.Sp)が有意に増加していた(Table)。
- (4) 病理組織学的評価(HE 染色):
G-CSF 投与群の大腿骨の海綿骨は control 群に比べて減少していた(Fig. 4A, B)。
G-CSF 投与群の上顎骨の抜歯窩では control 群に比べて線維性結合組織が多く観察され、骨性治癒の遅延が認められた(Fig. 4C, D)。

上顎大臼歯歯根間の海綿骨の骨形態計測				
Group	BV/TV (%)	Tb.Th (μm)	Tb.N (1/mm)	Tb.Sp (μm)
control	45.13 ± 8.018	62.73 ± 8.565	7.25 ± 1.06	77.98 ± 19.894
G-CSF	29.66 ± 5.013	53.82 ± 8.577	5.6 ± 1.084	131.1 ± 36.244

Table. Data are expressed as mean ± standard deviation. *: P < 0.05

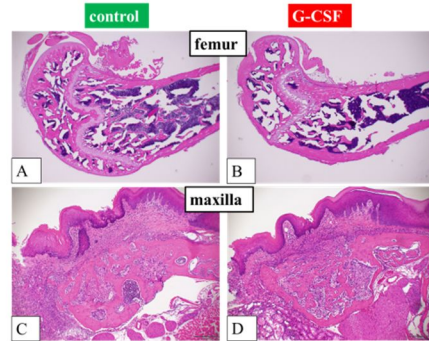


Fig. 4

- (5) 破骨細胞の観察(TRAP 染色):
TRAP 陽性の破骨細胞は大腿骨の骨端軟骨の周囲および上顎骨の抜歯窩周囲に認められた(Fig. 5A, B, C, D)。
大腿骨の TRAP 陽性の破骨細胞数は G-CSF 投与により減少した(Fig. 5E)。
上顎骨の TRAP 陽性の破骨細胞数は G-CSF 投与により有意に減少した(Fig. 5F)。

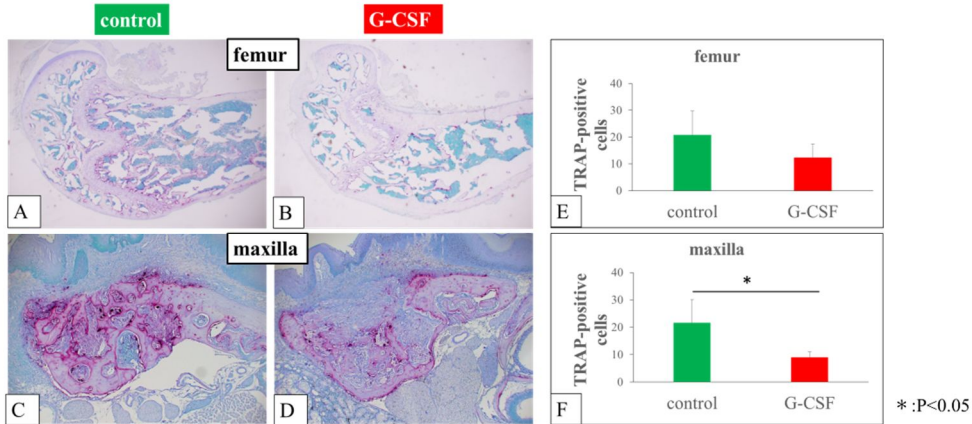


Fig. 5

- (6) 骨細胞の観察: AgNOR 染色を行い、大腿骨および上顎骨の形態学的変化を調べた(Fig. 6A)。大腿骨および上顎骨の骨細胞の骨細管数は G-CSF 投与群で有意に減少していた(Fig. 6B, C)。

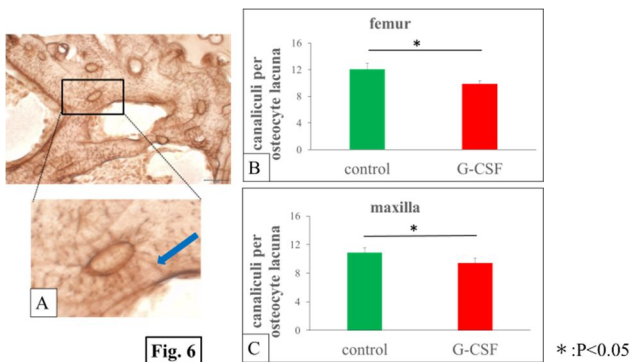


Fig. 6

*: P < 0.05

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 Ueta Miho, Takaoka Kazuki, Yamamura Michiyo, Maeda Hanako, Tamaoka Joji, Nakano Yoshioro, Noguchi Kazuma, Kishimoto Hiromitsu	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of TGF- 1 on the migration and morphology of RAW264.7 cells in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 4331-4339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2019.10662	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 Tamaoka Joji, Takaoka Kazuki, Hattori Hirokazu, Ueta Miho, Maeda Hanako, Yamamura Michiyo, Yamanegi Koji, Noguchi Kazuma, Kishimoto Hiromitsu	4. 巻 17
2. 論文標題 Osteonecrosis of the jaws caused by bisphosphonate treatment and oxidative stress in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1440-1448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2018.7076	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 押谷将之, 高岡一樹, 上田美帆, 富本康平, 服部洋一 玉岡丈二, 米田直道, 野口一馬, 岸本裕充
2. 発表標題 G-CSFの抜歯窩骨性治癒への影響
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------