

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890137

研究課題名（和文）

再生骨の立体構造制御における血管新生因子動態の解明と新規関連遺伝子の同定

研究課題名（英文）Elucidation of angiogenic factor dynamics in the structural control of regenerated bone and identification of new related genes

研究代表者

森谷 徳文（MORITANI NORIFUMI）

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：60467751

研究成果の概要（和文）：骨が最も活発に再生している時期，血管新生因子である VEGF，CCN2/CTGF タンパク質は，再生した骨周囲の骨芽細胞，血管内皮細胞，そして破骨細胞に局在しており，これらのタンパク質は，骨の添加と吸収をコントロールして，お互いに協調的に作用し，骨の再生を促進している因子として働いていることが示唆された．また，CCN2/CTGF 遺伝子と関連して変動する遺伝子の候補 171 個を抽出した．

研究成果の概要（英文）：During the phase when bone is most actively regenerating, the angiogenic factors - VEGF and CCN2/CTGF proteins - are localized in osteoblasts, vascular endothelial cells, and osteoclasts near the regenerated bone. These proteins have been suggested to control bone formation and resorption and to synergistically promote bone regeneration. One hundred seventy-one candidate genes were extracted whose expression changes were related to the CCN2/CTGF gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

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：VEGF, CCN2/CTGF, 血管新生因子, 結合組織成長因子, マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、当教室で確立したラッ

ト骨再生モデルを用いた研究で、血管新生因子として広く知られている VEGF の骨再生へ

の関与を示唆する結果を得ている。一方、CCN2/CTGF は多機能な成長因子であるが、軟骨内骨化促進や血管新生を促進する機能をもつことも明らかとしている。さらにこの2つの分子、VEGF と CCN2/CTGF は分子間相互作用をもち、調和のとれた血管新生をコーディネートしていることが示唆されている。

以上の経緯、研究成果を踏まえ、本研究は、VEGF、CCN2/CTGF が骨再生とその立体構造の制御に対してどのような役割を果たしているのかを、主に血管新生の観点から分子生物学的手法を用いて解析し、さらには、骨再生とその立体構造の制御に関する新規関連遺伝子を同定することによって、新規骨再生医療の開発に寄与する基盤的成果を得ようとするものであった。

2. 研究の目的

臨床現場において、例えば骨萎縮のためインプラント埋入前処置として、骨移植を行った場合、移植後の再生骨には、経時的に水平的・垂直的な骨吸収が認められ移植の効果がうすれてしまう。この問題を解決するために、移植骨の維持および再生に関する研究が広く行われてきている。

骨欠損部への骨移植において、移植骨が生着し組織が再生する過程には骨芽細胞に増殖・分化する幹細胞や、破骨細胞と、これら細胞の成長の足場となるコラーゲンやアパタイトなどの担体が密接に関連していることは広く知られている。したがって移植骨の再生に関する過去の研究動向は、骨を含めた移植組織または、担体である移植材に関するものに大きく偏っていた。

しかしながら骨を移植した場合、生着してもその後の段階で、再生骨は少なからず水平的・垂直的な骨吸収を受けるため、何らかの手段により骨の成長促進や吸収抑制を行い、立体構造を制御することが、臨床現場におい

て、強く求められている。

ところが過去の研究をみると、生体に存在する様々な組織成長因子が、骨の成長や吸収に複合的に関与することを示唆しているが、立体構造を維持制御する因子に関する研究は極めて少ない。

そこで、本研究では、移植骨の立体構造を制御する因子、特に骨の再生過程には必須の血管新生の観点から、この血管新生に関与する因子の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ラットの骨再生実験モデルを用い、*in vivo* において、骨再生から骨吸収までの過程を段階分けし、各段階での VEGF、CCN2/CTGF のタンパク質分布を組織学的手法により3次元的に明らかにする。その結果により VEGF、CCN2/CTGF の発現が立体構造制御にどのような役割を果たしているのかを推定する。これらの VEGF、CCN2/CTGF の分子動態の解析結果に基づき、再生骨の立体構造制御に関わる重要な段階、つまり再生・吸収の最も顕著な段階での VEGF、CCN2/CTGF が演ずる役割を明らかにする。さらに、解析した再生骨の立体構造制御に関わる重要な段階を、再生極期と吸収極期の2点として決定し、その2点間の遺伝子発現動態を、*microarray* 法を用いて網羅的に比較解析し、VEGF、CCN2/CTGF 以外の新規関連遺伝子を探索し同定する。

4. 研究成果

血管新生因子として VEGF、CCN2/CTGF に着目し検討したところ VEGF、CCN2/CTGF タンパク質は再生極期において、再生骨周囲の骨芽細胞、血管内皮細胞、そして破骨細胞に局在していることを発見した。これらの結果より VEGF、CCN2/CTGF タンパク質は骨再生の活発な時期に、血管内皮細胞、骨芽細胞、破骨細胞において発現し、骨の添加と吸収をコントロ

ールして、お互いに協調的に作用し、骨の再生を促進している因子として働いていることが示唆された。

実験モデルとの比較検討のため、再生骨の立体構造制御を臨床的に検討した。顎顔面領域で頻繁に行われる、口唇・口蓋裂に対する顎裂部腸骨移植術を施行した患者を検討の対称とした。その結果、腸骨移植後ほぼ全例で骨吸収を認め、骨吸収極期は移植約120日後であることが示唆された。さらに、移植後早期にインプラント体を埋入すれば骨吸収は抑制されることが示唆された。我々の検討では、ラット骨再生モデルの骨吸収極期は移植後約120日で、臨床例と同様であった。

移植骨が内軟骨性骨化により再生する過程において作用する因子を検討するため、軟骨細胞においてCCN2/CTGFの遺伝子発現がdexamethasone刺激で変動するとの過去の我々の報告に基づき、ヒト軟骨細胞様細胞株を用いて検討を行った。手法として、ヒト軟骨細胞様細胞株HCS-2/8細胞をdexamethasoneで刺激しマイクロアレイ法において変動する遺伝子を網羅的に検索した。その結果、171個の有意差のある発現変動遺伝子を認めた。CCN2/CTGF遺伝子は約2倍の発現上昇を認めたがVEGF遺伝子の発現に変動はなかった。また、転写因子群の著しい発現上昇を認めた。これはステロイドが軟骨に作用した際に変動する新規に確認された転写因子群であり非常に有意義な発見であると考えられ、今後はこれら転写因子群が骨・軟骨に果たす役割について解析を進め再生骨の制御メカニズムについて詳細な検討を行う予定としている。

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)

[雑誌論文] (計2件)

①植野高章, 平田あずみ, 脇本真理, 本多浩

三, 白数信明, 澤木聖子, 太田晃子, 加納みわ, 森谷徳文, 松村達志, 水川展吉, 菅原利夫. 超高気孔率ハイドロキシアパタイトのラット頭蓋骨骨欠損部での組織学的、X線学的観察 -骨形成過程の予備的研究-. 日本顎顔面インプラント学会雑誌. 2008; 6(3):205-211.

②植野高章, 平田あずみ, 脇本真理, 本多浩三, 白数信明, 澤木聖子, 太田晃子, 加納みわ, 森谷徳文, 松村達志, 水川展吉, 菅原利夫. 当科における歯科インプラント前処置としての骨増量術を行った症例の病診連携の検討. 日本顎顔面インプラント学会雑誌. 2008; 6(3):219-222.

[学会発表] (計2件)

①M. Wakimoto, T. Ueno, A. Hirata, T. Aghaloo, P.K. Moy, N. Shirasu, A. Ota, N. Moritani, M. Wakimoto, K. Sano, T. Yamada. Clinical and histological study in alveolar bone following post-extraction socket augmentation using Master Graft® granules. Academy of Osseointegration, Orland, March 4-6, 2010.

②森谷徳文, 再生骨の立体構造制御における血管新生因子動態の解明と新規関連遺伝子の同定, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 機能再生・再建科学専攻主催 ミニ・シンポジウム, 岡山大学, 2008年12月16日.

[図書] (計1件)

①N. Moritani, K. Mishima, T. Ueno, T. Yamada, Y. Ikeya, A. Ota, D. Janune, T. Matsumura, M. Wakimoto. Clinical

evaluation of dental implant
reconstruction of grafted alveolar clefts
in cleft lip and palate patients.
Transaction of 11th International Congress
on Cleft Palate and Related Craniofacial
Anomalies (Lee, S. T.), Academy of Medicine,
2009; 117-123.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森谷 徳文 (MORITANI NORIFUMI)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：60467751