

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10022

研究課題名（和文）マクロファージ由来骨再生因子の同定と歯槽骨再生医療への応用

研究課題名（英文）Identification of macrophage-derived bone regeneration factor and its application to alveolar bone regeneration

研究代表者

中村 浩彰（Nakamura, Hiroaki）

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50227930

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）： 抜歯窩治癒過程をマクロファージの動態に注目して、形態学的に解析した。7日後には骨形成が生じており、抜歯窩内のCD206陽性M2様マクロファージがTGF- $\beta$ 1を産生し、骨芽細胞の分化を促進する可能性が示唆された。また、クロドロネート-リポソーム投与によりマクロファージを枯渇後に抜歯を行ったところ、骨形成が抑制されており、抜歯窩治癒過程における組織修復型M2様マクロファージおよびマクロファージ由来のサイトカインの重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抜歯窩治癒過程における組織修復型M2マクロファージの役割についてはほとんど注目されていなかった。本研究により、マクロファージは細菌や死細胞の処理のみならず、組織修復に関連するサイトカインを誘導し、骨原性細胞を増殖・分化させることにより抜歯窩治癒を促進することを明らかにできた。また、マクロファージ由来骨再生因子が歯周病治療やインプラント治療に応用できる可能性を示唆できたことは社会的意義が高い。

研究成果の概要（英文）： We morphologically analyzed the healing process of the extraction socket, focusing on the dynamics of macrophages. Bone formation in the extraction socket suggests that CD206-positive M2-like macrophages produced TGF- $\beta$ 1 and promoted osteoblastic differentiation. In addition, when tooth extraction was performed after depletion of macrophages by clodronate-liposome administration, bone formation was suppressed. These results indicate that tissue-repairing M2-like macrophages and their cytokine production play an important role in the healing process of tooth extraction sockets.

研究分野：口腔組織学

キーワード： 抜歯窩治癒 歯槽骨再生 M2マクロファージ 骨原性細胞 免疫組織化学 TGF- $\beta$

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

健康長寿を目指すわが国においては、歯の咬合機能を終生にわたって維持することが Quality of Life (QOL)の向上に不可欠である。歯や歯槽骨を失うことは、咀嚼、嚥下機能などの健康面にも大きな支障をきたすが、歯周病やインプラント前治療において十分な歯槽骨再生を達成する治療は確立していない。したがって、将来の歯科医療において歯槽骨再生法の開発が急務となっている。

多くの骨代謝研究者は、骨折治癒過程を骨再生モデルとして用いている。しかし、このモデルは、軟骨内骨化様式を再現するモデルであり、歯槽骨の発生過程のような膜内骨化様式を再現するモデルとは異なっている。我々は、抜歯窩治癒過程が膜内骨化様式による骨再生モデルとして最適であると考え、過去の研究報告を検索した。しかし、ほとんどの研究は経時的に治癒過程を組織学的に報告したものであり、歯槽骨再生機序の解明を試みたものは見当たらなかった。

近年、マクロファージは M1 および M2 マクロファージの分類がなされ、M2 マクロファージは、上皮組織修復、周皮細胞の分化誘導、脂肪細胞の維持、肉芽組織形成などの血管新生に寄与し、組織修復型マクロファージとして注目されている。すなわち、M2 様マクロファージは新たな組織再生法を考案するにあたり、キーファクターとなる存在である。歯根膜組織にも間葉系細胞に加えて樹状細胞やマクロファージが存在する。しかしながら、その機能は死細胞や異物の処理とされ、歯根膜組織での M2 様マクロファージの概念は、いまだ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は、歯髓組織において積極的に硬組織形成環境を調節するマクロファージが存在することを明らかにしてきた。そこで、歯槽骨再生機序を明らかにするために、免疫組織化学的に再検討を試み、抜歯後3日目には多数の F4/80 マクロファージが抜歯窩に存在することを見出した。この現象は、これまで見過ごされていたことであり、抜歯後の歯槽骨再生においても組織修復型 M2 様マクロファージが重要な役割を担っているのではないかと仮説を立てた。

本研究は、抜歯後の歯槽骨再生過程に注目し、1) 抜歯窩治癒過程に出現するマクロファージのサブタイプを同定すること、2) 歯槽骨再生過程において組織常在型 M2 様マクロファージが微小環境を調節していることを明らかにすること、3) マクロファージ由来骨再生因子を同定して、歯周病治療やインプラント治療に応用できる可能性を探求することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抜歯窩治癒過程に出現するマクロファージのサブタイプの同定

マウスの上顎第一臼歯を抜去し、1日、3日、7日後に上顎骨を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、抜歯窩治癒過程を解析した。マイクロCTにて観察後、10%EDTAにて脱灰し、パラフィン切片を作製して免疫組織化学的に検討した。骨芽細胞系細胞のマーカーとして抗  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)抗体、抗 Runx2 抗体、抗 Osterix 抗体、マクロファージマーカーとして抗 F4/80 抗体、M2 様マクロファージマーカーとして抗 CD206 抗体を用いてそれぞれの陽性細胞の分布を検索した。さらに、マクロファージ由来のサイトカインに注目して、TGF- $\beta$ 1 局在および TGF- $\beta$  シグナルにより活性化されるリン酸化 Smad-3 局在についても検討した。

### (2) 歯槽骨再生におけるマクロファージの役割の検討

マウスにクロドロネート-リポソームを投与してマクロファージを枯渇させ、上顎第一臼歯を抜去後、2日、4日、7日後に上顎骨を採取し、マイクロCTによる観察および抜歯窩治癒過程の組織学的解析を行った。また、コントロール群としてはPBS-リポソームを投与した。組織学

的には H-E 染色による観察に加えて、骨芽細胞系細胞のマーカーとして抗  $\alpha$ -SMA 抗体、抗 Runx2 抗体、抗 Osterix 抗体、マクロファージマーカーとして抗 F4/80 抗体、抗 CD206 抗体を用いてそれぞれの陽性細胞の分布を検索した。さらに、抜歯部位を含めた組織から mRNA を採取し、real-time PCR 法にて炎症性サイトカイン発現と骨芽細胞分化に関連するサイトカイン発現を比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抜歯窩治癒過程に出現するマクロファージのサブタイプの同定

マイクロ CT 観察から抜歯 3 日後には抜歯窩に少量の不透過像がみられ、7 日後には抜歯窩全

体に骨形成を示す不透過像がみられた。(図 1) 骨芽細胞系細胞の動態は、3 日後には多くの  $\alpha$ -SMA 陽性細胞および Runx2 陽性細胞の侵入がみられ、7 日後では骨形成が生じている領域に Runx2 および Osterix 陽性骨芽細胞が多数認められた。(図 2) マクロファージ系細胞の分布については、抜歯 3 日および 7 日後のいずれにおいても F4/80 陽性マクロファージが多数みられ、その一部は CD206 を発現していた。(図 3) また、CD206 と TGF- $\beta$ 1 に対する蛍光二重免疫染色により、CD206 陽性 M2 様マクロファージは TGF- $\beta$ 1 を産生することがわかった。さらに、マクロファージ近傍の  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の核内にリン酸化 Smad-3 局在がみられたことから、抜歯窩治癒過程の骨芽細胞の分化にマクロファージ由来の TGF- $\beta$ 1 が拘わっていることが示唆された。(図 4)

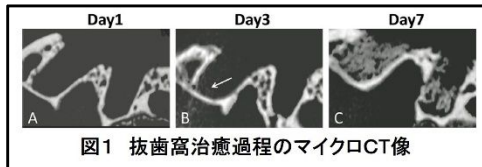


図1 抜歯窩治癒過程のマイクロCT像

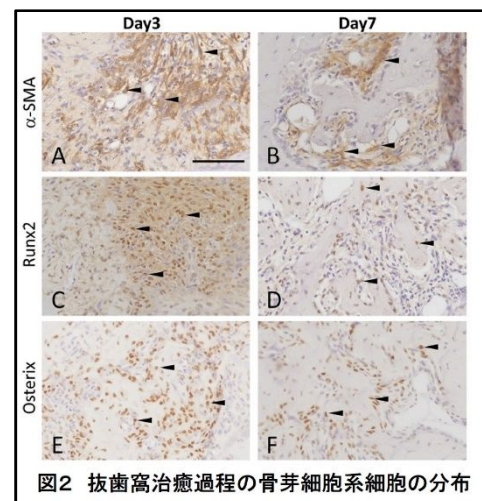


図2 抜歯窩治癒過程の骨芽細胞系細胞の分布

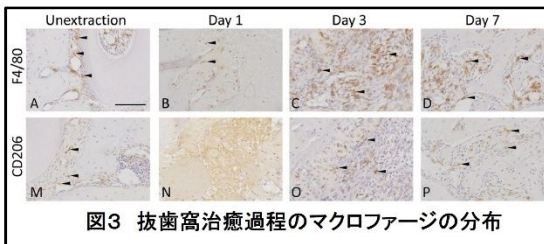


図3 抜歯窩治癒過程のマクロファージの分布

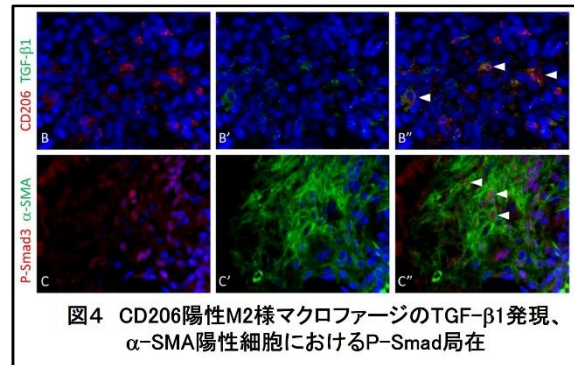


図4 CD206陽性M2様マクロファージのTGF- $\beta$ 1発現、 $\alpha$ -SMA陽性細胞におけるP-Smad局在

##### (2) 歯槽骨再生におけるマクロファージの役割の検討

クロドロネート-リポソーム投与によりマクロファージを枯渇させたところ、抜歯窩の上皮の被覆が不十分であり、7 日後でも歯槽骨が露出したままの個体が見られた。マイクロ CT 解析により、コントロール群では抜歯後 7 日の抜歯窩内に骨形成を示す不透過像がみられたのに対し、クロドロネート-リポソーム投与群では、不透過像が著しく減少し、骨形成が阻害されていた。(図 5) 組織学的観察により、抜歯 4 日後のクロドロネート-リポソーム投与群では抜歯窩内には血球系細胞や壊死細胞が残存しており、7 日後の骨形成もわずかに認められるのみであった。

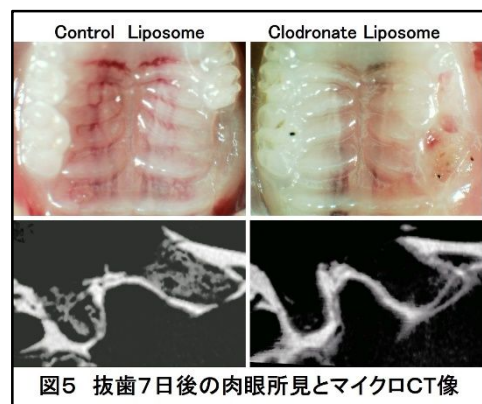


図5 抜歯7日後の肉眼所見とマイクロCT像

(図6)また、抜歯窩が上皮組織に覆われていない領域の歯槽骨では、骨細胞を含まない骨小腔が多数認められた。免疫組織化学的検討により、クロドロネート-リポソーム投与群では F4/80 陽性マクロファージ、CD206 陽性 M2 様マクロファージは著しく減少していた。骨芽細胞系細胞については、コントロール群では4日後に多くの  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の侵入がみられ、7日後には Runx2 および Osterix 陽性骨芽細胞が多数認められた。一方、クロドロネート-リポソーム投与群では4日後の  $\alpha$ -SMA 陽性細胞、7日後の Runx2 および Osterix 陽性細胞は著しく少なかった。(図7)マクロファージ枯渇により抜歯窩の治癒および骨形成が抑制されていたことから、抜歯窩治癒過程における組織修復型 M2 様マクロファージの重要性が示唆された。

一方、抜歯窩組織を用いた real-time PCR により、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 発現について検討したところ、コントロール群では抜歯後2日には炎症性サイトカイン発現は上昇するものの、4日、7日後には減少していた。TNF- $\alpha$  発現はクロドロネート-リポソーム投与群とコントロール群で差はみられなかったが、IL-1 $\beta$  と IL-6 については抜歯後2日と4日においてクロドロネート-リポソーム投与群で有意に低下していた。

(図8)また、骨組織修復に関わるサイトカインである TGF- $\beta$ 、BMP-2、PDGF-a、PDGF-b 発現はクロドロネート-リポソーム投与群において有意に低下していた。

(図9)以上のことから、マクロファージは細菌や死細胞の処理のみならず、組織修復に関連するサイトカインを誘導し、骨原性細胞を増殖・分化させることにより抜歯窩治癒を促進することが示唆された。

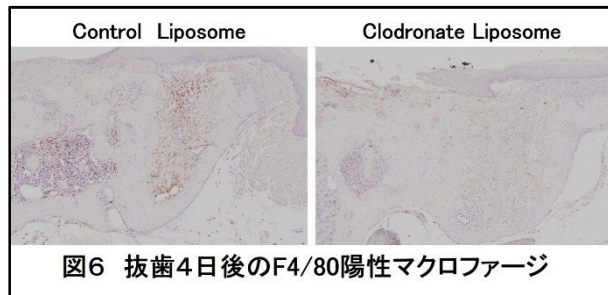


図6 抜歯4日後のF4/80陽性マクロファージ

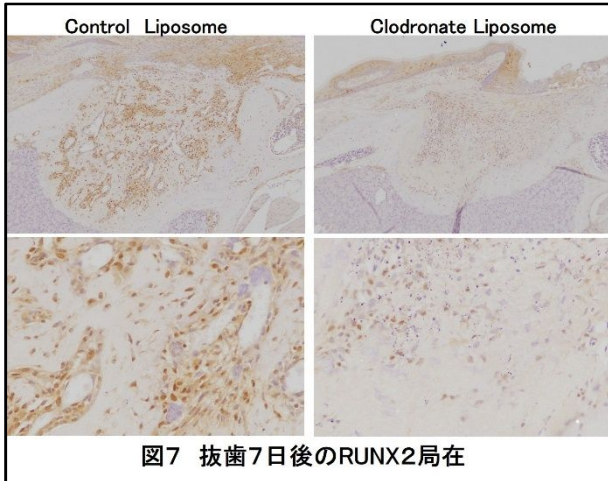


図7 抜歯7日後のRUNX2局在

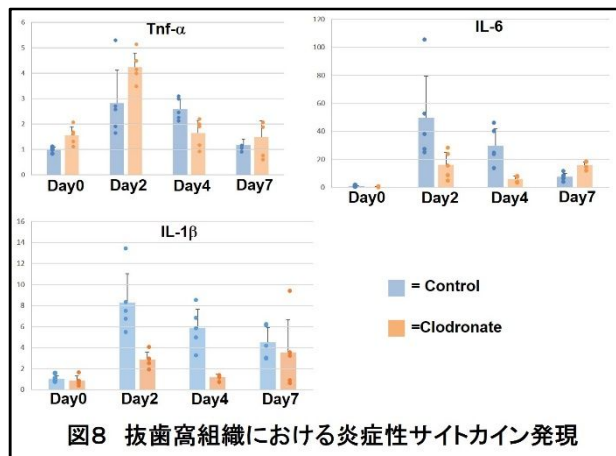


図8 抜歯窩組織における炎症性サイトカイン発現

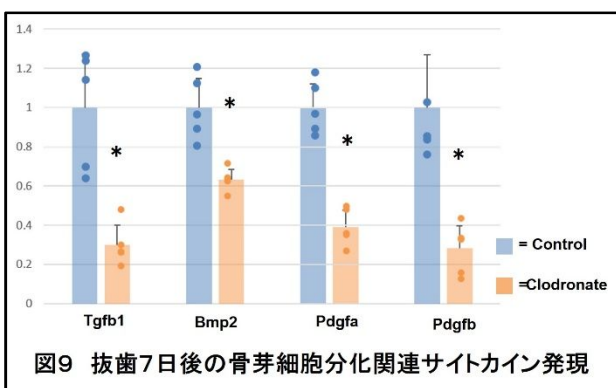


図9 抜歯7日後の骨芽細胞分化関連サイトカイン発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horibe K, Hara M and Nakamura H	4. 巻 123
2. 論文標題 M2-like macrophage infiltration and transforming growth factor- secretion during socket healing process in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol	6. 最初と最後の頁 105042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2021.105042	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀部寛治、西田大輔、中村浩彰
2. 発表標題 マウスの抜歯後治癒におけるマクロファージ枯渇の影響
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀部 寛治 , 原 弥勒力 , 中村 浩彰
2. 発表標題 抜歯窩治癒過程における M2 様マクロファージ浸潤と TGF-b分泌
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀部寛治、西田大輔、中村浩彰
2. 発表標題 歯周組織治癒過程における PTHrP および PTH1 受容体の遺伝子発現
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022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	堀部 寛治  (Horibe Kanji)  (70733509)	松本歯科大学・歯学部・講師   (33602)	
研究 分担者	雪田 聡  (Yukita Akira)  (80401214)	静岡大学・教育学部・准教授   (13801)	
研究 分担者	原 弥革力  (Hara Miroku)  (90846635)	松本歯科大学・歯学部・助教   (33602)	削除：2021年3月8日

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
---------	---------