

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10051

研究課題名(和文) 生理機能亢進細胞混合移植とレドックス制御による長期骨量維持可能な骨増生法開発

研究課題名(英文) Enhancing Bone Regeneration by Redox Control

研究代表者

秋葉 奈美 (Akiba, Nami)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：00584591

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)：EDA は、H2O2 による活性酸素種の生成とアポトーシスを抑制し、細胞生存率を回復しました。H2O2 による骨形成関連遺伝子の発現低下と石灰化は、EDA によって回復しました。EDA 治療により、術後 2 週間で新生骨量が増加しました。EDA 群では VEGF と CD31 の免疫蛍光も強くなりました。また、PKH26 とオステオカルシンの蛍光強度も強くなり、移植細胞の生存期間が延長し、骨形成細胞に分化したことがわかりました。EDA を用いた局所酸化還元制御は、局所環境の改善、生存期間の延長、移植細胞の骨形成能の増強、血管新生の促進などにより、骨再生を促進します。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞移植を用いた再生療法は多くに医療分野において期待されているが、細胞移植や、細胞移植後の血液の再循環の際に生じる活性酸素種によって多くの移植細胞が傷害されることが報告されている。移植細胞の生存率向上や移植後の機能維持は医療分野における課題である。我々が今回得た結果から、活性酸素種の制御を行うことによって移植細胞の生存率向上や移植細胞の機能維持が可能になれば、細胞移植を用いた再生医療の成功率や治療効率の向上に寄与することが期待される

研究成果の概要(英文)：EDA inhibited H2O2-induced reactive oxygen species production and apoptosis, and restored cell viability. The H2O2-induced decrease in bone formation-related gene expression and mineralization were restored by EDA. EDA treatment increased new bone mass 2 weeks after surgery. Immunofluorescence of VEGF and CD31 was also stronger in the EDA group. Fluorescence intensity of PKH26 and osteocalcin was also stronger, indicating that the survival time of transplanted cells was extended and they differentiated into osteogenic cells. Local redox control using EDA promotes bone regeneration by improving the local environment, extending survival time, enhancing the osteogenic ability of transplanted cells, and promoting angiogenesis.

研究分野：補綴歯学

キーワード：骨再生 骨増生 細胞移植 レドックス制御 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

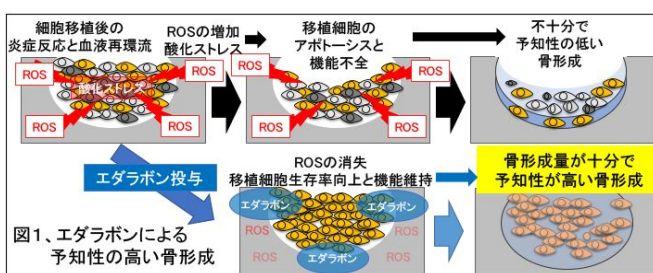
歯やインプラント、義歯など補綴装置の支持組織となる顎骨の欠損や骨量の不足は、補綴処置の選択肢を制限し、治療の難易度が上がり、治療の予後を大きく左右するため、患者のQOLを著しく低下させる。骨量不足を補う骨増生法において、現在一般的に行われている骨補填剤や成長因子を用いる骨増生法では、宿主から骨増生部位への細胞集積が必要であり、骨形成までに長い期間を要する。骨形成期間短縮のためには骨形成能を持つ細胞を移植する骨増生法が有効と思われる。しかし、移植細胞が骨形成に寄与する報告はあるが、移植細胞の生着率や生存率、増生骨量の予知性の低さが臨床的課題となっている。移植細胞を標識して追跡した我々の研究においても、移植細胞数と比較して、新生骨内の標識細胞数の減少が確認されている。他にも、移植細胞の多くが移植後の急性炎症や血液の灌流に伴う活性酸素種(ROS)により、アポトーシスや機能不全に陥る報告もあり、近年、骨増生法に細胞移植が用いられる頻度が低い理由の一つと考えられる。

エダラポンは強い抗酸化作用を持ち、脳虚血発作や脳梗塞において、治療に伴う血液再循環時に発生するROSから、神経細胞を保護する薬剤で、現在臨床応用され、高い効果をあげている。骨形成を移植細胞に期待する骨増生法においても、細胞移植後の急性炎症や、血液の灌流に伴って発生するROSを、エダラポンの投与によって除去できれば、移植細胞の酸化ストレスによるアポトーシス・機能不全を抑止できる可能性がある(図1)。

移植環境の酸化ストレス制御は、細胞移植の優位性を、再度見直し、組織工学的骨増生法をより発展させ得る方法論である。

申請者らの予備実験から、エダラポンはin vitroにおいて、骨髄由来細胞への細胞毒性がなく、骨髄由来細胞を過酸化水素水による酸化ストレスから保護し、生存率を向上させることが確認された。

本研究の目的はエダラポンにより移植部位の活性酸素種を除去し、移植細胞を長期生存・機能させ、効率的な骨形成促進を可能にする、予知性の高い骨増生法を開発することである。



2. 研究の目的

本研究の目的は以下の4点である。

- エダラポンの抗酸化作用による移植細胞長期生存の確認
- 移植細胞の長期生存・長期機能による骨形成促進の確認
- エダラポンによる骨芽細胞分化促進機序の確認
- 抗酸化作用による骨芽細胞分化促進機序の確認

3. 研究の方法

目的 エダラポンの抗酸化作用による移植細胞長期生存の確認

ラット骨髄より採取、培養増幅した細胞を標識し、ラット頭蓋骨限界径骨欠損部に自家細胞移植により移植する。移植直後から複数回、予備実験より安全性と有効性を確認した濃度のエダラポンを局所投与/全身投与し、未投与群との残存標識細胞数の違いを組織学的に比較し、エダラポンによるROS除去が移植細胞の生存率向上に与える影響を検索する。また、移植細胞の組織中でのアポトーシス解析、ROS解析によって、エダラポンの移植細胞保護効果を確認する。また形成骨周辺組織のM1/M2マクロファージの染色により、ROS除去が炎症フェーズから組織再生フェーズへのシフトにどのように関与するかを検索する。

目的 移植細胞の長期生存・長期機能による骨形成促進の確認

研究課題 と同様にラット骨髄より採取し、培養増幅した細胞を頭蓋骨に形成した限界径骨欠損部に自家細胞移植し、エダラポンを局所投与/全身投与し、未投与群と骨形成速度、骨量、骨密度などを比較する。新生形成骨計測には小型小動物用3DμX線CT機器を使用し、経時的な形成骨量を同一の実験動物を用いて計測する。さらに新生骨内の骨細胞の染色性を追跡し、新生骨内の由来が移植細胞か、宿主内から誘導された細胞によるものかを確認する。

研究課題 と研究課題 の結果とを併せて、エダラポンによる移植細胞の生存延長・機能維持が移植細胞の生着促進に寄与し、移植細胞が骨形成細胞として骨形成を促進させるか、という本研究の仮説を検証する。

目的 エダラポンによる骨芽細胞分化促進機序の確認

ラット骨髄由来細胞を採取し、予備実験において、抗酸化作用、骨形成促進作用を発現可能で、細胞毒性を示さない濃度のエダラポンにより処理を行い、処理/未処理細胞に対して網羅的遺伝子解析及びタンパク質質量分析を行い、得られた変動遺伝子群データ、変動タンパク質群データをマルチオミクス解析し、さらに研究課題 及び と同様の頭蓋骨欠損細胞移植修復モデルを

作成し、細胞移植部位、新生骨形成部位より遺伝子、タンパク質を採取し網羅的遺伝子解析及びタンパク質質量分析を実施得られた変動遺伝子群データ、変動タンパク質群データをマルチオミクス解析しエダラボンによる骨形成促進機構機序の推定を行う。得られるデータは、コンピューター解析上の予測値となるため、続く課題において実証実験で確認を行う。

課題において推定されるエダラボン誘導性骨形成促進機構及びその下流に含まれる発現上昇遺伝子群、タンパク質群に対して、in vitroにおけるRealtime PCRやWestern blotによる発現解析や、SiRNAやタンパク質機能阻害剤による機能阻害実験を実施し、in vivoでは、免疫染色を中心とした組織学的解析によってエダラボンによる抗酸化作用を介した骨形成促進機序について実証実験による確認を行う。

目的 抗酸化作用による骨芽細胞分化促進機序の確認

エダラボンには類似構造を持ち、抗酸化機能を持たない「類縁化合物」が存在する。類縁化合物の細胞毒性、抗酸化作用などを確認の上、骨髄由来細胞へ類縁化合物を添加し、抗酸化力によらないエダラボン構造特異的な骨形成促進作用の有無について、遺伝子発現解析や蛋白質発現解析を用いて確認する。

エダラボンは親水性と脂溶性の双方の特徴を持ち、細胞内・外、及び細胞膜上で電子供与によるROS除去が可能となっている。完全に同一の機能を持つ化合物は存在しないが、分子量が近似しており、それぞれ親水性、脂溶性を持つ抗酸化化合物「類似化合物」は存在する。類似化合物を使用して、骨髄由来細胞分化への影響を確認し、エダラボン非特異的・抗酸化作用特異的な骨形成促進作用について、遺伝子発現解析、蛋白質解析、抗酸化剤投与や細胞移植後の抗酸化剤投与と組織学的解析を用いて確認する。

4. 研究成果

申請者は、エダラボンの骨髄由来細胞に対する細胞毒性濃度、抗酸化作用発現濃度を in vitro の実験系を用いて確認した。

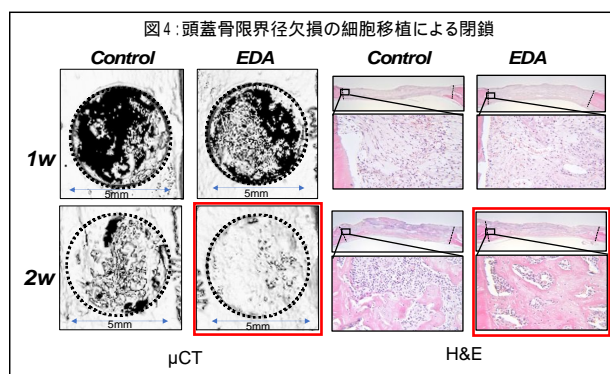
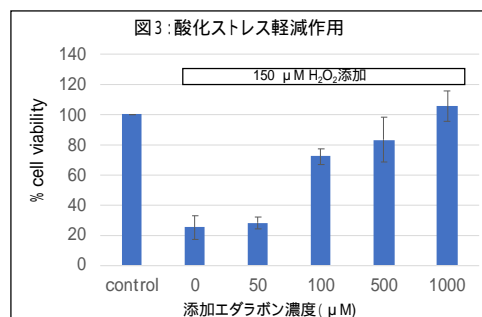
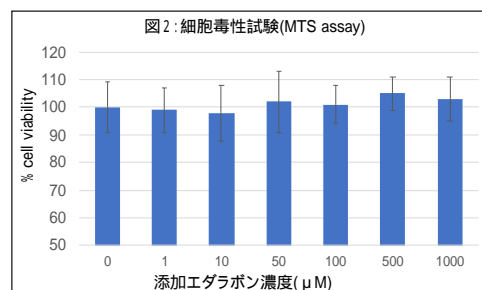
ラット大腿骨骨髄より採取した骨髄由来間質細胞を培養増幅し、増殖培地中で各種濃度のエダラボンを添加し、エダラボンの細胞毒性について検討した。エダラボンは骨髄由来細胞に対して 1000uM の高濃度添加においても細胞毒性が観察されないことを確認した(図2)。

さらに、骨髄由来間質細胞培養環境下に 150uM 過酸化水素水を添加し、酸化ストレス環境を形成し、種々の濃度のエダラボン添加による酸化ストレス軽減作用についても検討を行った。

エダラボン添加による細胞の生存率向上に関して細胞増殖解析から、100uM 以上のエダラボン添加濃度において、60%以上の細胞の生存が確認され、酸化ストレス環境におけるエダラボンの骨髄由来細胞保護作用が確認された(図3)。

さらに申請者は動物実験によって EDA の骨形成促進作用について確認している。ラット頭蓋骨に、直径 5 mm の限界径骨欠損を形成し、同部位に対してあらかじめ大腿骨より採取、培養増幅した自家細胞移植を実施し、細胞移植による骨形成を確認した。細胞移植のみを実施した対照群と比較して、EDA を添加した実験群(EDA)では、骨形成の促進がマイクロ CT 画像によって確認された。さらに、H-E 染色による組織学的解析において、成熟した骨形成による頭蓋骨欠損の閉鎖が確認された(図4)。

今後 EDA による骨形成促進の機構解明に関する実験を継続予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	魚島 勝美 (Uoshima Katsumi) (50213400)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	秋葉 陽介 (Akiba Yosuke) (70547512)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	
研究分担者	泉 健次 (Izumi Kenji) (80242436)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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