

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09944

研究課題名（和文）模擬微小重力環境下における前骨芽細胞の未分化性維持のメカニズム解明

研究課題名（英文）Mechanism of undifferentiated maintenance immature osteoblasts under microgravity environment

研究代表者

半田 慶介（Handa, Keisuke）

神奈川歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40433429

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では微小重力環境下における骨芽細胞の分化をマウス骨芽細胞様細胞KUSAにて遺伝子発現およびカルシウム沈着をアリザリンレッド染色にて調べることで骨芽細胞の分化を制御し、骨欠損状態にあった3Dプリンターを用いた3次元コラーゲンスキャフォールドに骨芽細胞を組み合わせた骨補填剤の開発を目指した。その結果、微小重力環境において細胞の分化を制御し、3次元コラーゲンスキャフォールド開発につながる研究が達成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって、重力と骨芽細胞の分化機構の詳細が明らかになることによってこれまで人工的に薬剤で分化制御を行ってきたが、重力による細胞自身の分化制御機構を利用することによって骨粗鬆症や骨折後の治癒促進剤の新規創薬に繋がる。

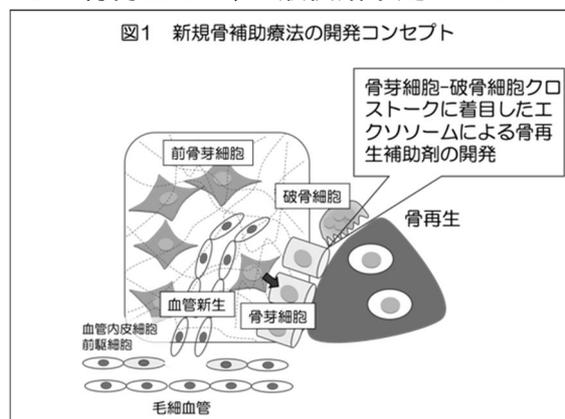
研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to control osteoblast differentiation under microgravity by examining gene expression and calcium deposition in mouse osteoblast-like cells, KUSA, using Alizarin Red staining, and to develop a bone filler that combines osteoblasts with a 3D collagen scaffold created using a 3D printer in a bone defect state. As a result, we were able to control cell differentiation in a microgravity environment and achieve research that will lead to the development of a 3D collagen scaffold.

研究分野：保存修復学

キーワード：細胞分化 微小重力環境

1. 研究開始当初の背景

2022年政府の示した骨太方針において、全身の健康維持につながる歯周病などの歯科疾患対策を目的とした国民皆健康診断の強化が掲げられている。歯周病を予防することは将来的に関連する全身疾患の予防、ひいては医療費削減に効果的なのは明々白白である。歯周病は歯を失う主な原因であり、歯周病原菌が脳細胞へのアミロイドベーターの蓄積を促進することから、歯周病を積極的に予防することで、咀嚼機能を維持するだけでなく認知症に関連するフレイル進行を未然に防ぐことができる。一旦歯周病によって支持組織である歯槽骨を失うと自然治癒は不可能なため、ブラッシングなどの歯周環境整備と既存療法である外科的に感染部位除去を行う対応がとられている。そのため歯周組織再生療法が広く臨床に浸透しているが、大規模に歯槽骨を失ったいわゆる水平性骨欠損の場合は、これまでの治療方法によって歯周組織を健全な状態まで治癒させることは困難であり、新規の再生療法によって歯周組織の改善が図られなければならない。また骨移植が必要な大規模骨欠損をターゲットにした骨再生では、血液供給不足による低酸素や低栄養、骨膜損傷、骨芽細胞の数的質的問題、移植体の不十分な固定、術後感染などのリスクから必ずしも満足が得られる結果ではない。これらの改善策として、現在新規足場材の新規開発と上市が始まり一部の症例で失った歯槽骨の回復が期待される。しかしながらこれら新規材料自体に積極的に骨欠損を治癒する能力が欠如するため、患者本人の治癒能力や治癒可能な環境を整え、再生能力を亢進する必要がある(図1)。



そのため免疫力や自然能力を高めるサプリが市販されているが、骨芽細胞に特化したサプリの販売例はない。これまで骨芽細胞-破骨細胞による石灰化メカニズムは Runx2、Osterix を中心とした転写因子の研究がめざましく発展を遂げた。その一方で骨芽細胞が発現するエクソソームに関する知見はまだ少なく、臨床応用は一部の美容外科を対象としたヒト幹細胞培養上清液を用いた再生療法に留まる。また生体試料には多種類のエクソソームが混在しており、それぞれのエクソソームの由来やその個別機能の分析は進んでいないのが現状である。そこで本申請では骨芽細胞が発現するエクソソームのシングルエクソソーム解析を行うことによって、骨芽細胞由来エクソソームを RNA 医薬品として使い、個人の骨再生能力を賦活化することが可能であると推測した。このことによって高齢者や骨代謝疾患を持つ患者の骨再生の補助療法となる可能性が高いと判断される。

2. 研究の目的

エクソソームはタンパク質、脂質、核酸などを含む直径 100nm 前後の膜小胞で、種々の細胞から分泌される。エクソソームにはマイクロ RNA(miRNA)が含まれており、エクソソームを取り込んだ細胞に miRNA が送達されることで、遺伝子発現の制御が行われることから、がんの転移や炎症反応など種々の生体内イベントにおいて、エクソソームを

介した細胞間の情報伝達が果たす役割に注目されている。また唾液腺から分泌されたエクソソームは分解酵素から保護され安定した状態で存在する(Molecules, 2019)と報告された。この特性から、骨芽細胞が分化の過程で放出するエクソソームに注目した。これらのエクソソームは経口投与に適しており、胃での消化を免れて消化管に到達する可能性が高いと考えられる。したがって、骨再生が必要な場所にエクソソームが到達する可能性は非常に魅力的である。本研究課題は、RNA 医薬品の経口投与に関する学術的な知見を提供するものであり、将来的には新たな治療法や医療アプローチの開発に貢献する可能性がある。

3．研究の方法

- (1) 3D スキャフォールドの作製とマウス骨芽細胞を用いて培養系の確立
- (2) 前骨芽細胞を含む3次元スキャフォールドの作成と培養
- (3) 複数層のスキャホールドにおける細胞生存の検討
- (4) 微小重力環境におけるマウス前骨芽細胞株の挙動観察

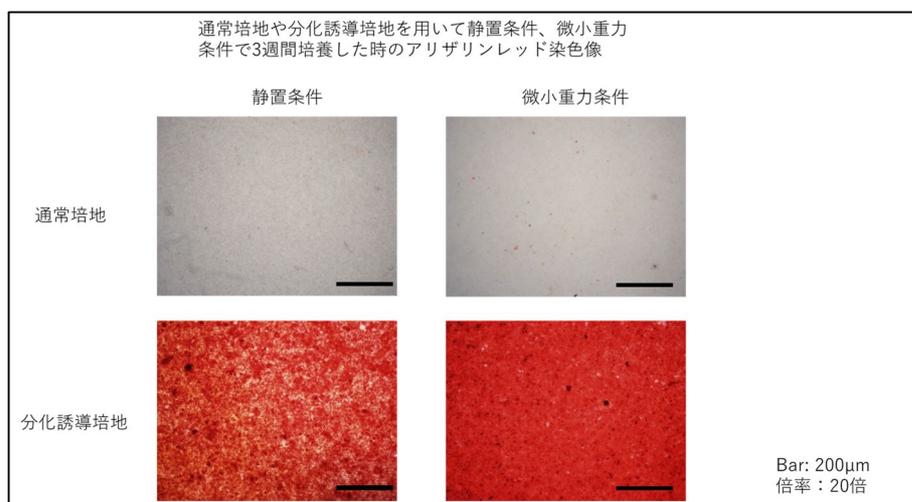
4．研究成果

微小重力環境下における骨芽細胞の分化をマウス骨芽細胞様細胞 KUSA にて遺伝子発現を調べた。その結果、微小荷重を3週間負荷させたところ、通常の静置した培養に比較して骨関連遺伝子群(オステオカルシン、Runx2)の発現減少が観察された。このことから微小重力環境下においては骨芽細胞が未分化を維持することが示唆された。しかしながら NEBL などの分化程度の指標となる遺伝子発現に関しては検討が必要である。また3次元スキャホールド作成のため、コラーゲンをベースとした細胞培養用基質を用いて試作を行った。試作したコラーゲンスキャホールド上に骨芽細胞を播種し細胞増殖を確認したところ細胞生存が観察された。

3D プリンターを用いて前骨芽細胞を含んだ3次元スキャフォールドの試作では、適切濃度のコラーゲンを用いて試作スキャフォールドの作成と並行して、微小重力環境におけるマウス前骨芽細胞株とラット頭蓋冠由来前骨芽細胞の挙動の比較を行った。いずれの細胞においても通常培地で培養し微小重力環境下にて3週間の長期培養を行ない、total RNA を回収した。その後通常法に従い real time PCR を実施し骨関連遺伝子群の発現を検討した。その結果、オステリックスおよび Runx2 の遺伝子発現が抑制された。また骨芽細胞の後期分化マーカーであるオステオカルシンの遺伝子発現が約6倍減少することが確認された。

通常培地またはアスコルビン酸、グリセロリン酸、デキサメサゾンを含む石灰化誘導培地にて培養し、微小重力環境下にて前骨芽細胞の3週間の長期培養を行ない、アリザリンレッドにて石灰化結節の有無によって評価した。結果通常培地で培養し微小重力環境下においた際、前骨芽細胞の石灰化結節の形成は通常重力(静置条件)に比較して結節形成が促進されることが観察され

た(図2)。このことは微小重力においては細胞分化が亢進したと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki S, Venkataiah VS, Yahata Y, Kitagawa A, Inagaki M, Njuguna MM, Nozawa R, Kakiuchi Y, Nakano M, Handa K, Yamada M, Egusa H, Saito M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Correction of large jawbone defect in the mouse using immature osteoblast-like cells and a 3D polylactic acid scaffold.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgac151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagahashi Taiji, Yahata Yoshio, Handa Keisuke, Nakano Masato, Suzuki Shigeto, Kakiuchi Yusuke, Tanaka Toshinori, Kanehira Masafumi, Suresh Venkataiah Venkata, Saito Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Er:YAG laser-induced cavitation can activate irrigation for the removal of intraradicular biofilm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08963-x	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 Tanaka T, Yahata Y, Handa K, Venkataiah SV, Njuguna MM, Kanehira M, Hasegawa T, Noiri Y, Saito M.	4. 巻 7
2. 論文標題 An experimental intraradicular biofilm model in the pig for evaluating irrigation techniques.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Oral Health.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-021-01536-w.	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 Katayama T, Sato T, Hamada N, Goda S, Yamaguchi T, Tsukinoki K, Handa K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of Jixueteng on Experimental Periodontitis During Orthodontic Tooth Movement in Rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1934578X211002419	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 Tsukinoki K, Yamamoto T, Handa K, Iwamiya M, Saruta J, Ino S, Sakurai T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Detection of cross-reactive immunoglobulin A against the severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 spike 1 subunit in saliva.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0249979.	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 脂肪酸塩の口腔内細菌に対する殺菌効果とStreptococcus mutansバイオフィルムに対する影響.	4. 巻 56
2. 論文標題 倉橋 絢子, 渡辺清子, 佐藤武則, 稲葉啓太郎, 藤岡 隼, 半田慶介, 浜田信城,	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 神奈川歯学	6. 最初と最後の頁 26-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato T, Fujimaki R, Suzuki J, Hamada N, Tani-Ishii N, Handa K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Bactericidal effect of a novel alkaline EDTA root canal cleaning solution.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Dentistry,	6. 最初と最後の頁 546-550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0041-1723067.	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 Venkataiah VS, Yahata Y, Kitagawa A, Inagaki M, Kakiuchi Y, Nakano M, Suzuki S, Handa K, Saito M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Clinical Applications of Cell-Scaffold Constructs for Bone Regeneration Therapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10102687.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤武則, 浜田信城, 半田慶介
2. 発表標題 酸化チタン光触媒機能を応用した歯ブラシの効果と最適化
3. 学会等名 第156回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤武則, 浜田信城, 半田慶介
2. 発表標題 抗IL-17抗体による歯槽骨吸収抑制効果
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

1. 発表者名 佐藤武則, 浜田信城, 半田慶介
2. 発表標題 抗IL-17抗体を用いた歯槽骨吸収抑制効果の基礎的検討
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会第55回総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤武則, 半田慶介
2. 発表標題 実験的歯周炎における抗 IL-17 抗体の効果
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会第170回例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤武則, 半田 慶介.
2. 発表標題 アルカリ性EDTA溶液の抗菌効果と細胞傷害性.
3. 学会等名 第19回日本再生歯科医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斉田牧子, 佐藤武則, 浜田信城, 半田慶介, 木本克彦.
2. 発表標題 口腔内炎症に対する抗酸化治療の開発.
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会第56回総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉橋絢子, 渡辺清子, 佐藤武則, 稲葉啓太郎, 藤岡 隼, 半田慶介, 浜田信城.
2. 発表標題 脂肪酸塩の口腔内細菌に対する有効性とヒトへの安全性に関する研究.
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会第166回例会,
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤武則, 浜田信城, 半田慶介.
2. 発表標題 太陽電池を接続した酸化チタン半導体の殺菌効果と細胞傷害性.
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 倉橋 絢子, 渡辺 清子, 佐藤 武則, 稲葉 啓太郎, 半田 慶介, 浜田 信城.
2. 発表標題 脂肪酸塩の Streptococcus mutans バイオフィルムに対する影響.
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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 荒川 俊哉, 池尾 隆, 加藤 靖正, 古株 彰一郎, 近藤 信夫, 自見 英治郎, 鈴木 直人, 半田 慶介, 坂東 健二郎, 平塚 浩一 編著	4. 発行年 2023年
2. 出版社 学建書院	5. 総ページ数 392
3. 書名 スタンダード生化学・口腔生化学. 第4版	

〔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	齋藤 正寛 (Saito Masahiro) (40215562)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	二瓶 智太郎 (Nihei Tomotaro) (50237781)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授 (32703)	

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