

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592201

研究課題名（和文） 糖尿病骨粗鬆症合併症に対する新規骨再生療法の開発

研究課題名（英文） The development of the new bone regeneration therapy for the diabetic osteoporosis

研究代表者

八上 公利（YAGAMI KIMITOSHI）

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：00210211

研究成果の概要（和文）：

糖尿病・骨粗鬆症合併症モデル動物を用いて、骨再生部位局所における骨再生に必要な因子を解析し、ドラッグデリバリーシステムによる骨再生療法を開発することを目的として本研究を行った。何れの担体の孔内においても、カルセインおよびアリザリンによる骨組織形成が確認された。C o 137Hでは2週後において、骨膜側および既存骨膜側骨表面からの太くて豊富な血管の形成が見られた。そして、ハニカム孔内における骨形成は、37Hに比べC o 137Hに多く見られた。歯周病歯槽部歯槽骨における BMP-2 や VEGF の発現の上昇が観察された。

研究成果の概要（英文）：

Using diabetes mellitus / an osteoporosis complication model animal, we analyzed the factor which was necessary for a bone regeneration in the bone regeneration part limited part and performed this study for the purpose of developing bone regeneration medical treatment with the drug delivery system. An ostosis by Cal Sane and the alizarin was confirmed even if we employed it in the aperture of either carrier. And the bony formation in the honeycomb aperture was seen a lot in Col37H in comparison with 37H. Col37H compared the bone density with 37H in 1 week later, and density was slightly high. Elevation of the manifestation of BMP-2 in the periodontal disease alveolar part of mandible alveolar bone and VEGF was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

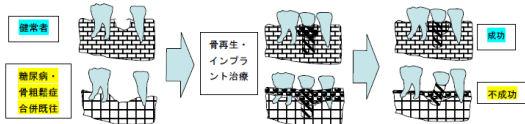
研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は、世界で約 25,000 万人、国内では 247 万人にのぼり、予備軍を含めると国内では実に 2,200 万人に達するといわれている。そして糖尿病は、歯周病の悪化を加速させ歯牙を早期に喪失させる。失った歯牙を補填するためには通常義歯による治療が必要となるが、入れ歯やインプラント義歯などを維持するための顎骨を失った場合には治療が困難となる。また、治療により血糖値がコントロールされても高齢になり骨粗鬆症を合併すると骨の吸収は進行する。そのため、骨の造成を行っても十分な骨量が得られず予後不良となるなど有効な骨再生療法が無い。そこで、申請者は糖尿病・骨粗鬆症合併症モデル動物を用いて、骨再生部位局所における骨再生に必要な因子を解析し、ドラッグデリバリーシステムによる骨再生療法を開発することを目的として本研究を企画した。



2. 研究の目的

これまでに我々は、幾何構造による血管形成と骨形成による効率的な骨再生材料の開発を行い、ハニカム型 β -TCP が効率的に骨形成することを実証してきた。そこで、今回はハニカム型 β -TCP にコラーゲンをコートして、in vivo における骨形成能の評価を行った。ラット頭頂骨骨膜下へ全身麻酔下にて、直系 3mm、高さ 1mm の未コート β -TCP (37H)、コラーゲンコート β -TCP (Co1H) を埋入した。埋入当日にカルセインを、1 週毎にアリザリンを静脈内投与し、石灰化部位を蛍光ラベルした。埋入後 1、2、3、4、6 週後にサンプル組織と共に摘出し、qCT 測定および非脱灰硬組織切片にて組織解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 骨髄細胞の採取と移植幹細胞の培養
①骨髄細胞を還流法にて採取した(図1)すなわち、全身麻酔下で大腿骨骨髄に磷酸緩衝生理食塩水を還流させて、骨髄細胞を採取する。この骨髄細胞より比重遠心法により得られた細胞を培養液(D-MEM/10%代用血漿)にて培養し、初期付着細胞を間葉系幹細胞(BMSC)として使用する。それぞれの細胞は、動物の個体の番号と一致するように個別に培養した。

②採取した BMSC (図2) は多分化能を検証するために骨芽細胞分化培地、脂肪細胞分化培

地、軟骨細胞分化培地により培養した。

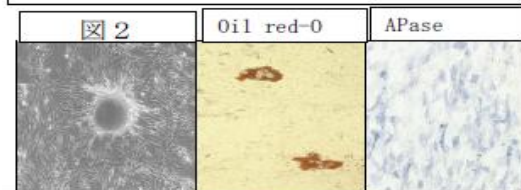
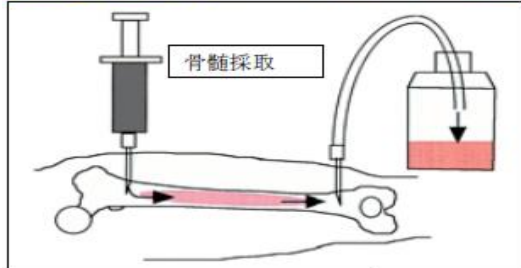
③分化能の評価は、骨芽細胞は ALP 染色、脂肪細胞は Oil red 染色、軟骨細胞は Alcian blue 染色にてそれぞれ同定を行う。また、遺伝子学的に骨芽細胞に関しては Osteocalcin、脂肪細胞は PPAR α 、軟骨細胞は Type II collagen の発現について検証した。

④ドラッグデリバリーシステム(DDS)に必要な因子の決定のため骨芽細胞分化度と iNOS や BMP-2、VEGF、IGF-1、TNF α 、IL-1、IL-6、RANKL の mRNA 発現とタンパクの産生について解析をした。

(2) 糖尿病・骨粗鬆症合併症動物への HB37H による骨再生

①全身麻酔無痛下に下顎両側小白歯を 3 本抜去して骨欠損を形成した。

②欠損部を満たすように HB37H により顎骨を形成し閉創した。



③カルセインおよびアリザリンコンプレキソンにより骨形成状態をラベルした。

④それぞれの動物の飼育記録を作成し、一月毎に血糖値、HbA1c、骨代謝マーカー(尿中 DPD、血中オステオカルシン量、血中 I 型コラーゲン量)を記録する。同時に、全骨塩量を骨密度測定装置にて測定した。

(3) DDS-HB37H による骨造成の評価

①術後 1、3、6 か月に全身麻酔下安楽死下に、下顎骨を 10%ホルマリン・リン酸緩衝液にて固定した。

②3 次元 CT にて骨形態計測を行い、骨梁構

造の変化を比較する。試料をポリエステル樹脂に包埋し、非脱灰切片を作成して免疫組織化学分析、in situ ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析をした。

③得られた結果を基に、減少もしくは亢進している因子を特定し、22年度の細胞培養結果と合わせてDDS作成のためのデータを解析する。解析は統計的仮説検定法を用いて算定した。

(4) DDS-HB37Hの調整とBMSCによる因子の添加量の決定



DDSの作成はコラーゲンを用いた除放システムは久保木らにより、添加する因子の条件設定をした。①得られた抗体もしくはタンパクを、GFPで標識しコラーゲンゲルと合わせてHB37Hに添加した。②得られたデータを基に、DDSに添加する標的因子の必要量を決定した。

(5) DDS-HB37Hの調整と糖尿病・骨粗鬆症合併動物への埋入実験

①全身麻酔無痛下に下顎両側小白歯を3本抜去して骨欠損を形成した。

②欠損部を満たすように標的因子を装備したDDS-HB37Hにより顎骨を形成し閉創する。

③テトラサイクリンにより骨形成状態をラベルした。

④それぞれの動物の飼育記録を作成し、一月毎に血糖値、HbA1c、骨代謝マーカー(尿中DPD、血中オステオカルシン量、血中I型コラーゲン量)を記録する。同時に、全骨塩量を骨密度測定装置にて測定した。

2. DDS-HB37Hによる骨造成の効果の検証

①術後1, 3, 6か月に全身麻酔下安楽死下に、下顎骨を10%ホルマリン・リン酸緩衝液にて固定した。

②3次元CTにて骨形態計測を行い、骨梁構造の変化を比較する。試料をポリエステル樹脂に包埋し、非脱灰切片を作成して免疫組織化学分析、in situ ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析をした。

③得られた結果を基に、減少もしくは亢進している因子を特定し、22年度の細胞培養結果と合わせてDDS作成のためのデータを解析する。解析は統計的仮説検定法を用いて算定した。

(6) 人権および動物の保護及び法令等の遵守への対応

動物を用いた実験に関しては、「研究機関等における動物実験等に関する基本指針」(平成18年告示)に基づいて、「松本歯科大学動物実験委員会」による実験計画の審議と

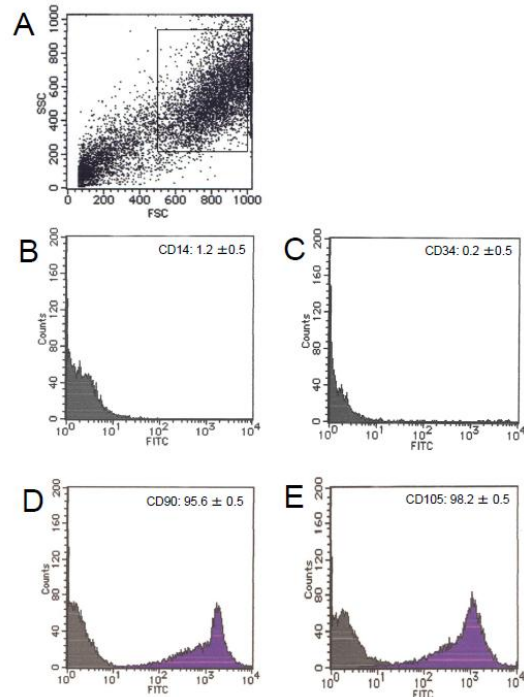
学長承認を持って実施した。その際、研究担当者、連携研究者および研究協力者とともに生命倫理、研究倫理および安全対策に関する価値観を共有し、法的、道徳的、社会的規範を維持するようにすることに動めた。

実験内容については、3R思想(Russel & Burch)を規範として計画を行い、可能な限り動物個体の使用を控え、動物の使用に際しては適切な個体数、適切な手技、麻酔法を用いて苦痛やストレスを与えないように行った。

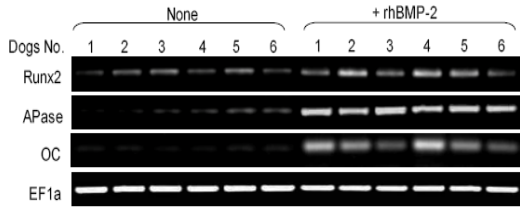
遺伝子組換え動物(マウス)の飼育は、封じ込めレベルPIAにて行い、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成16年施行)に基づいて万全な拡散防止措置を行った。また、「松本歯科大学遺伝子組換え生物等安全管理委員会」への申請と承認を得て実施した。

4. 研究成果

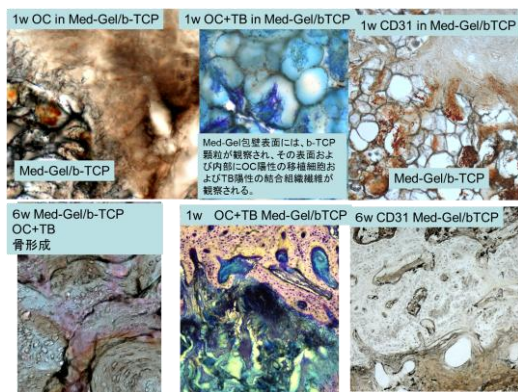
骨髄由来間葉系幹細胞の多分化能を評価するために、CD14, CD34, CD90およびCD105表面抗原について評価した。移植に使用した細胞は、CD14およびCD34には陰性でCD90およびCD105が陽性であり、未分化間葉系幹細胞の表現型を示していた。



そして、骨分化、軟骨分化および脂肪分化と多能性を示した。骨芽細胞分化を行った細胞よりmRNAを抽出し、RT-PCR法によりmRNAの発現を調べた。その結果、いずれの細胞においてもRunx2およびosteocalcinのmRNAの発現が検出され、骨芽細胞への分化能が保持されていることが確認できた。



骨再生部位における主要上昇因子の発現を組織学的に検討した結果、b-TCPによる骨補填部位周囲および内部骨形成開始部位では、CD31 陽性細胞が集積していた。そして、ほぼ同一部位において OC に強陽性を示した。骨関連遺伝子解析の結果、rhBMP-2 の添加により、すべての実験動物において OC の発現が促進されていた。



H37 は、6 wにおいて既存骨膜側骨表面からの太くて豊富な血管の形成が見られた。骨表面かならのみならず、孔壁内面にも直接成熟した骨が形成されていた。b-TCP に融合するように骨が形成されていた。bTCP 壁表面に多核の破骨細胞様細胞が密着付着していた。

Table 1. Percentage of Bone/Implant Contact

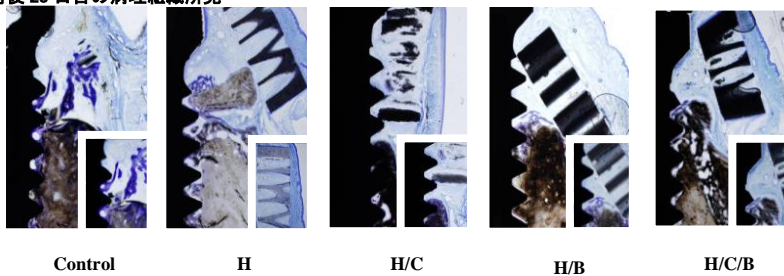
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
28 days	27.3±5.8	29.3±4.3	37.0±4.5	36.8±7.0
84 days	41.2±8.5	54.3±5.9	62.0±9.6 ^a	72.9±11.4 ^{bc}

^aP<0.5 versus group 1 and group3 ^bP<0.1 versus group 1 and group3, ^cP< versus group 2

対照のインプラントは術後 84 日目においてもその表面の大部分は結合組織によって覆われていた。37H のみを移植したインプラントでは、骨断端から 37H の表面に沿って新生骨の形成を認めたが、術後 84 日目においても骨とインプラントの直接接触は一部に見られたのみで、その表面の広い範囲が結合組織によって覆われていた。BMSC を混合した 37H を移植したインプラントも骨との接触は少なく、37H 単独の場合とほぼ同様の所見を呈していた。一方、rhBMP-2 を添加した 37H を移植したインプラントでは、術後 28 日目より 37H の表面や孔内にも骨形成を認め、84 日目では 37H 表面に沿って形成された新生骨がインプラント表面の広い範囲で直接接していた。rhBMP-2 を添加した BMSC を混合した 37H を移植したインプラントにおいても、術後 28 日目より 37H 表面に沿って新生骨を認め、術後 84 日目では広い範囲で新生骨とインプラント表面との直接接触が見られた。

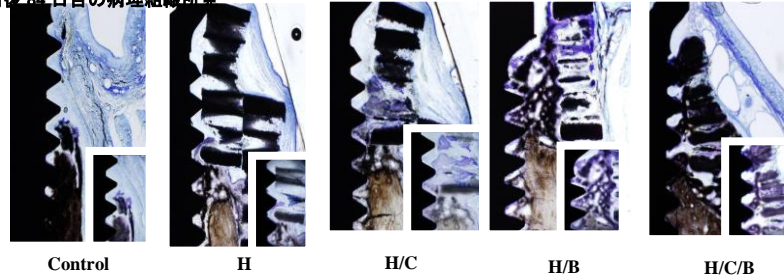
今回の結果は、コラーゲンを付加した 37H という特殊な形体をしたスキャフォールドが骨造成に有効であること、また、骨髄由来の間葉系幹細胞および rhBMP-2 徐放がより効果的に骨造成を促進することを再確認する裏付ける結果であった。そして、VEGF の上昇と組織学的にも血管形成が先行して新生骨が誘導されていることがみられたことよ

術後 28 日目の病理組織所見



Control H H/C H/B H/C/B

術後 84 日目の病理組織所見



Control H H/C H/B H/C/B

- Control: 対象
- H: 37H単独
- H/C: 37H+BMSC
- H/B: 37H+rhBMP-2
- H/C/B: 37H+BMSC+rhBMP-2

り、Col37HはBMP-2およびVEGFにより効率的な骨形成法が行えると思われ、骨形成能の低い疾患を持った症例に対しても骨再生療法へ貢献できると考えられる。

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 Honeycomb form β -tricalcium phosphate induces osteogenesis by geometrical property with BMSC. Yagami K, Yanagisawa S, Kuboki Y (他 4 名). Biomed Mater Eng. 21: 291-306, 2012. doi: 10.3233/BME-2012-0677. (査読有)
- ② Geometry of Extracellular Matrix: Optimal Tunnel Size for Bone Formation in Disk-form Honeycomb β -TCP. Kuboki Y, Yagami K, Iku S, Kaku T, Terada M, Kitagawa Y, Takita H, Li D, Kimura M and Sammons R. Nano Biomedicine, 19: 460-7, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 幾何構造による骨組織誘導能を持つアテロコラーゲンコート β -TCP担体による骨形成能の評価, 八上公利, 定岡直、久保木芳徳, 小野寺純, 松永未知男, 木村満利子. 第12回日本再生医療学会総会, 2013年3月、神奈川.
- ② 骨髄間質細胞培養系担体および培養骨膜を用いた骨再生法の開発に関する基礎的研究. 和田圭之進, 八上公利, 畠賢一郎, 松井義郎, 第65回日本口腔科学会学術集会, 2012年6月、広島.
- ③ ヒト歯根膜線維芽細胞とChromograninAとの関連性について, 定岡直, 八上公利, 川原一郎, 笠原香, 中根卓, 小口久雄, 牧茂, 第22回甲信越北陸口腔保健研究会総会, 2011年7月、新潟.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八上 公利 (YAGAMI KIMITOSHI)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 00210211

(2) 研究分担者

牧 茂 (MAKI SHIGERU)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20134942
笠原 香 (KASAHARA KAORU)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 20064694
川原 一郎 (KAWAHARA ICHIRO)

松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 20319114

(3) 連携研究者

久保木 芳徳 (KUBOKI YOSINORI)
北海道大学・名誉教授
研究者番号: 00014001
代田 達夫 (SHIROTA TATSUO)
昭和大学・歯学部・准教授
研究者番号: 60235760