

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17105

研究課題名（和文）機械的刺激に対してレドックス制御を応用した新規骨再生技術の探索

研究課題名（英文）Investigation of a new method for bone regeneration by combining cellular redox regulation with mechanical stress

研究代表者

渡辺 隼（Watanabe, Jun）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30822241

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：咀嚼機能を改善する治療法として、歯科インプラントを用いた補綴歯科治療が行われている。インプラント治療には、十分な顎骨量が必要なため、適応を拡大する前処置として、歯槽骨欠損を再建する骨造成術が臨床的に求められている。しかしながら、既存の骨造成術の効果は未だ十分ではなく、新規骨再生技術の開発に期待が寄せられている。本研究成果により、抗酸化アミノ酸による細胞内レドックス制御が骨再生条件の最適化に有効な可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、動的小および静的メカニカルストレスがレドックスシグナルに影響を及ぼす可能性、およびレドックスバランス制御がミトコンドリアの脂質過酸化の抑制を介して、骨芽細胞分化に影響を及ぼしている可能性を示唆する点である。これらの成果は、新たな骨再生医療技術の開発およびレドックス生物学と幹細胞生物学を関連付ける基礎的知見に繋がる可能性を秘めており、社会的・学術的に大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Prosthetic dentistry utilizing dental implants is a valuable treatment option for improving masticatory function. However, the success of implant treatment is reliant on sufficient bone volume, necessitating bone augmentation surgery to address alveolar bone defects. It's worth noting that the efficacy of existing bone augmentation surgery is not yet optimal, emphasizing the pressing need for the development of new bone regeneration techniques. The findings of this study suggest that regulating intracellular redox using antioxidants could be a promising approach to enhancing bone regeneration conditions.

研究分野：歯学

キーワード：酸化ストレス 骨再生 レドックス ミトコンドリア iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯牙を喪失した患者の咀嚼機能を改善する有効な再建治療として歯科インプラント治療が行われており、そのインプラント治療の適応を拡大する前処置として、歯槽骨欠損を再建する骨増生術が臨床的に求められている。しかしながら、既存の骨増生術の効果は十分とは言えず、細胞を用いた新規骨再生技術の開発に期待が寄せられている。顎骨を始めとする口腔組織は、咀嚼を中心とする機械的刺激が常にかかる組織であり、骨再生技術開発の観点からメカニカルストレスを考慮することは必要不可欠である。一方、骨組織において、メカニカルストレスにより発生した酸化ストレス(レドックスバランスの変化)を起点としてイオンの細胞内流入が惹起されることが示唆されている。レドックスバランスとは生体内の酸化還元状態を意味し、生体内で合成される酸化性物質あるいは還元性物質により、細胞増殖、抗アポトーシスに関与することが明らかにされており、生体機能を制御する新たな視点として注目されている。さらに、レドックスバランスの変化は骨組織の再生・恒常性の維持や骨粗鬆症にも深く関与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

上記を背景に本研究の目的は、メカニカルストレスとレドックス状態の関連を明らかにし、細胞内レドックス制御を応用した効果的な骨再生技術の開発することである。これを達成するために、メカニカルストレスがレドックスシグナルに及ぼす影響、レドックス状態の変化が骨芽細胞分化に及ぼす影響、局所の酸化ストレスの抑制が脂質酸化損傷に及ぼす影響を評価する。

3. 研究の方法

(1)メカニカルストレスがレドックスシグナルに及ぼす影響の検討

動的メカニカルストレスの評価として、マウス骨細胞様細胞株(ML0-Y4)に流体圧縮刺激培養装置を使用し50kPa、0.5Hzで1時間の圧縮刺激を負荷した。静的メカニカルストレスの評価として、マウス線維芽細胞(L929)を硬さが調節可能なジメチルポリシロキサン上で培養した。硬さは、4.4kPaと26.2kPaの2群を設定し、レドックスシグナル関連遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCRにより評価した。

(2)レドックス状態の変化が骨芽細胞分化に及ぼす影響の検証

レドックス状態の変化が骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討するため、研究代表者の研究室で樹立したマウスiPS細胞由来骨芽細胞様細胞を用いた。抗酸化剤としてNアセチルシステインを使用し、細胞内レドックス状態の評価として、細胞内活性酸素種(ROS)量、総グルタチオン量、硫化水素量を測定した。

次に、ミトコンドリアの評価として、蛍光試薬にて、ミトコンドリアスーパーオキシド、ミトコンドリア膜電位、ミトコンドリア内鉄()イオンおよびミトコンドリア脂溶性過酸化物を染色し、画像解析を行った。

骨芽細胞分化は、骨芽細胞分化誘導培地にNアセチルシステインを添加し、リアルタイムRT-PCRにより骨芽細胞関連遺伝子の発現を、Alizarin Red染色により基質の石灰化を評価した。

さらに、骨芽細胞分化における、レドックス状態の変化が遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析するため、レドックス制御群(Nアセチルシステイン添加群)と対照群で、次世代シーケンサーを使用したTotal RNAによるRNAシーケンス解析およびエンリッチメント解析を行った。

(3)酸化ストレスの抑制が細胞移植局所に与える影響の検討

骨増生術のひとつである局所細胞移植術における酸化ストレスの抑制が、細胞移植に与える影響を検討するため、ラット大腿骨に臨界サイズ骨欠損を作製し、骨髄間質細胞の自家局所移植し、移植細胞に対する抗酸化アミノ酸による前処置の効果を評価した。初期の移植局所の酸化ストレス状態として、移植3日後に組織切片を作製し、活性酸素によるDNA酸化損傷マーカーとして8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)の生成を抗8-OHdGモノクローナル抗体にて、酸化ストレスによる脂質酸化損傷マーカーとして4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)の生成を抗4-HNEモノクローナル抗体にて検出した。

4. 研究成果

(1)メカニカルストレスがレドックスシグナルに及ぼす影響の検討

マウス骨細胞様細胞株を圧縮培養器で培養したところ、メカニカルストレスを負荷していないコントロール群と比較し、メカニカルストレス負荷群では、レドックス関連遺伝子である、グルタチオンジスルフィドレダクターゼ (Gsr)、Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)、スーパーオキシドディスムターゼ 2 (Sod2) の遺伝子発現が上昇した。

次に、硬さが調節可能なジメチルポリシロキサン上でマウス線維芽細胞を培養したところ、剛性が低い群と比較して、剛性が高い群において Gsr、Sod2 の遺伝子発現が増加した。本結果より、圧縮応力および培養基質の硬さという動的および静的メカニカルストレスが、レドックスシグナルに影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2)レドックス状態の変化が骨芽細胞分化に及ぼす影響の検証

N アセチルシステイン添加群で濃度依存的に総グルタチオン量および硫化水素量が増加した。一方で、N アセチルシステイン添加群は骨芽細胞の分化誘導の初期・中期・後期のいずれにおいても ROS 量が有意に減少した。また、対照群では分化誘導の各ステージによって単位細胞当たりの ROS 量が変化することが判明した。

次に、N アセチルシステイン添加群では、対照群と比較し、蛍光試薬の画像解析により、ミトコンドリアスーパーオキシド発生の抑制、ミトコンドリア膜電位の低下の抑制、ミトコンドリア内鉄 () イオンの貯留の抑制、およびミトコンドリア脂溶性過酸化物の抑制がみとめられた。

骨芽細胞分化は骨芽細胞分化マーカーであるオステオポンチン (Spp1)、型コラーゲン a2 (Col1a2)、オステオカルシン (Bglap)、オステリックス (Osx)、Runx2 の遺伝子発現が N アセチルシステイン添加群で有意に上昇した。N アセチルシステイン添加群では、Alizarin Red 陽性領域の増加が観察され、定量評価により基質石灰化は、有意に増加した。

骨芽細胞分化におけるレドックス制御群では、RNA シーケンス解析により、有意に発現が上昇した 1,390 の遺伝子および、有意に発現が減少した 2,482 の遺伝子を同定した。データベースを使用して遺伝子オントロジー解析 (GO 解析) を行ったところ、生物学的プロセスオントロジーでは JAK-STAT シグナルに関連する GO term が、細胞成分オントロジーでは細胞外膜で囲まれた細胞小器官に関する GO term がエンリッチされた。また、分子機能オントロジーでは、Prolactin receptor binding, oxidoreductase activity, oxidizing metal ions, oxygen as acceptor, ferroxidase activity, ferric iron binding 等の GO term がエンリッチされた。

本研究成果により、N アセチルシステインは iPS 細胞由来骨芽細胞様細胞のレドックス状態を変化させ、ミトコンドリアへのダメージを減少させた結果、骨芽細胞分化を促進した可能性が示唆された。

(3)酸化ストレスの抑制が細胞移植局所に与える影響の検討

ラット大腿骨大規模欠損モデルによる自家細胞局所移植術において、抗酸化アミノ酸による前処置群は未処置群と比較し、組織学的評価により 8-OHdG および 4-HNE の生成が減少した。これは、単に移植細胞の酸化ストレス抵抗性が増加し、脂質酸化が抑制されただけでなく、移植した間質細胞が周囲環境の酸化ストレスを抑制した結果、炎症や細胞死を抑制した可能性を示唆する結果である。

本研究成果は、メカニカルストレスが細胞のレドックスシグナルに影響を及ぼすことを示唆するものであり、最適なレドックスバランスが幹細胞の骨芽細胞分化誘導に効果的である可能性が示唆される。さらに、移植細胞および移植部位のレドックスバランスの制御が、細胞移植治療の治療効果を向上させる可能性を秘めており、インプラント治療における骨増生術に多大な貢献をすることが期待される。また、骨再生医療にレドックス生物学を応用した本研究は、歯科医学、幹細胞生物学の観点から、社会的・学術的に大きな意義があると考えられる。

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

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