

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592979

研究課題名(和文)メカノセンサーとしての顎骨由来培養骨膜シート移植による新規骨増生法の開発

研究課題名(英文)Development of the new bone regeneration method by transplanting jawbone periosteum sheets as a mechanosensor.

研究代表者

木村 博人(Kimura, Hiroto)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90142851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：メカニカルストレスと骨代謝の関連は広く研究されているが、メカニカルストレスにより誘導される骨リモデリングにおける骨膜の機能はほとんどわかっていない。我々は骨膜にメカノセンサー(力学的刺激感知)機能があり、骨リモデリングに関与していると仮説を立て、骨膜由来細胞に力学的伸展刺激を負荷し、その遺伝子発現の変化を解析した。

骨膜由来細胞は伸展刺激にตอบสนองしてWntおよびBMP pathwayが活性化され、骨芽細胞分化と骨形成促進に関与していると考えられた。この結果は生体の骨リモデリングにおいて、骨膜がメカノセンサーとしての機能を持つことを示唆すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The relationship between mechanical stress and osteogenesis has been widely studied. However, little is known about the functions of the periosteum in bone remodeling under mechanical stress. We hypothesized that the periosteum senses a mechanical stress to induce bone remodeling, therefore, we subjected periosteum cells to load mechanical stretching and characterized their gene expression profiles.

Periosteum cells appear to induce, in response to the stretch stimulus, gene expression changes in WNT pathway and BMP pathway, which cooperate to promote osteoblast differentiation and osteogenesis. Our results also suggest that during mechanical stress-induced bone remodeling in the body, the periosteum senses the mechanical stress to control signals for promoting osteoblast differentiation and osteogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学

キーワード：骨膜 メカノセンサー 骨代謝 Wnt pathway BMP pathway メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

メカニカルストレスによる歯槽骨や顎骨の病的吸収は、咬合性外傷性歯周疾患、矯正力による歯の移動、骨移植やインプラントでの予後不良例など広く認められる病態である。しかし、顎骨リモデリング担当細胞としての骨膜の機能発現とメカニカルストレスとの接点は依然として不明であり、吸収された顎骨の再生を必要とする医療上の要望はきわめて高いにも関わらず、現実的に臨床上有効な治療法が見いだされないまま今日に至っている。

筆者らはこれまで培養骨芽細胞に細胞伸展刺激装置を用いてメカニカルストレスを負荷しシグナル活性化を解析した結果、適度なメカニカルストレスは骨形成を促進するという知見を得た(J Bone Miner Metab, 23:373-381, 2005)。

この知見を元に筆者らはメカニカルストレス発生源として超音波と性質が近い振動刺激装置を開発し、培養骨芽細胞の増殖・活性化に与える振動刺激の影響を解析したところ、その結果は振動刺激装置の骨芽細胞の骨原性機能発現に及ぼす影響は極めて小さかった。生体に加わる機械的刺激を感知するのは骨芽細胞・破骨細胞などの骨構成細胞のみではないという可能性が示唆された。

その後、他の研究グループによりメカニカルストレスを感知しシグナルを発するメカノセンサー細胞は骨細胞であり、骨細管を介して伝達が行われるという報告がなされた。しかしながら生体に加わる多様なメカニカルストレスの強度・種類を弁別しシグナルに変換するには骨細胞による機構だけでは不十分であろうと筆者らは考えた。すなわち重力など静的な力からスポーツなど動的な力までを受容・弁別・シグナル変換するには複数のメカノセンサー機構が存在、共調していると考えた方が合理的である。

そこで、筆者らは骨膜組織(骨周囲組織)にもメカノセンサー機能が存在し、そこから骨構成細胞へ情報が伝達されるという仮説を立てた(図1)。さらにこの仮説が正しければ顎骨骨膜という採取・培養が比較的容易な細胞を再生材料としてシート状に培養し、「メカノセンサーとしての骨原性機能を持った顎骨骨膜由来培養シート移植治療」という全く新しい概念の骨再生療法へと繋がると思った。

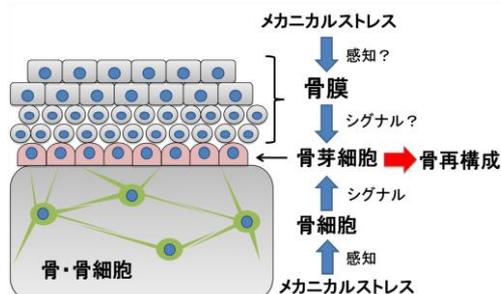


図1. 骨膜のメカノセンサー仮説

2. 研究の目的

骨膜は骨の外側で骨を包むように存在している線維性の膜状組織である。組織学的には骨側の骨形成層(cambium layer)と外側の線維層(fibrous layer)の2層からなり、前者は骨芽細胞様細胞、前骨芽細胞が高い密度で配列した構造を特徴としているのに対して、後者は線維質の組織で線維芽細胞を含むが細胞密度は低い。

骨の成長期には骨形成層に存在する細胞が骨芽細胞に分化し、骨膜による膜性骨化が行われる。また骨折治癒過程においては修復期に骨膜の肥厚と骨膜からの栄養供給、骨形成層からの骨芽細胞の分化がおこり、仮骨を形成し治癒を進める。骨膜は骨代謝において骨芽細胞と栄養の供給源として働き、骨芽細胞分化能、骨形成促進能を持っている。

しかしながら、メカニカルストレス下での骨リモデリングにおける骨膜の機能についてはほとんど不明である。

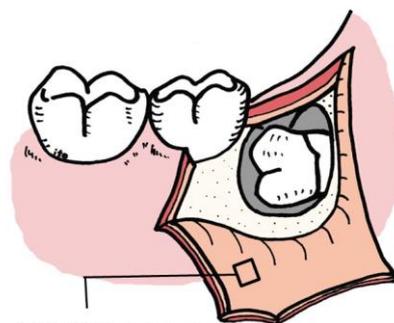
メカニカルストレスと骨形成の関係については以前から多くの研究がなされているが、メカニカルストレスにより誘導される骨リモデリングにおける骨膜の関与はあまり研究されておらず、ほとんど不明である。筆者らは骨の構造、機能を維持する骨リモデリングにメカニカルストレスが必須のものであるならば、骨芽細胞分化能、骨形成促進能をもつ骨膜もメカニカルストレスを感知し骨リモデリングに関与する機構があると考えた。

そこで本研究はヒト顎骨から骨膜組織を採取し分離・培養しヒト顎骨骨膜由来細胞(Human Jaw Bone Periosteum Cells, 以下HJBPCs)の初代培養株を樹立し、メカニカルストレスを負荷したHJBPCsの応答とその機能を理解することを目的に遺伝子発現解析を行い、骨膜がメカノセンサー機能を持つこと、さらにそのメカノセンサー機能におけるシグナル伝達機序の詳細解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒト顎骨骨膜由来細胞(HJBPCs)の培養

①口腔外科小手術の際、下顎粘膜骨膜弁から2×2mmの骨膜組織片を採取(図2)。



骨接触部位をメスで厚さ0.5mm以下の範囲で採取

図2. 骨膜組織の採取

②シャーレ上で培養し細胞の増殖を確認した段階で骨膜組織片を除去、継代し HJBPCs とした。

③比較対照としてヒト正常歯肉線維芽細胞 (Human Gingival Fibroblasts, 以下 HGFs) を用いた。

(2) HJBPCs の特性検討

HJBPCs の特性を検討するため通常培地と骨芽細胞分化培地で培養した HJBPCs を Alkaline Phosphatase(ALP)染色およびアリザリンレッド S 染色を施行した。

(3) HJBPCs へのメカニカルストレスの負荷

HJBPCs をフィブロネクチンコーティングを施したシリコンチャンバー上に播種し、STB-140 system (STREX 社, 大阪) を用いて持続的一軸方向伸展刺激を伸展率 10%、24 時間負荷した (図 3)。

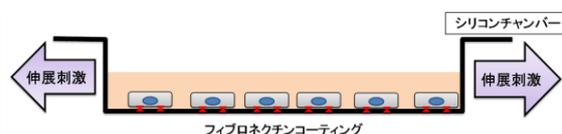


図 3 HJBPCs への伸展刺激負荷

(4) マイクロアレイ解析

伸展刺激による HJBPCs の遺伝子変動をマイクロアレイで網羅的に解析した (47,400 genes)。パスウェイ解析および遺伝子発現変動率から骨代謝において key 遺伝子となると考えられる 20 遺伝子を抽出した。

(5) リアルタイム PCR 分析

マイクロアレイで抽出した 20 遺伝子について、HJBPCs への伸展刺激した場合の変動をリアルタイム PCR で分析した。HGFs を比較対照として同様に分析した

4. 研究成果

(1) HJBPCs の特性検討

通常培地で培養した HJBPCs の形態は線維芽細胞様を示し、盛んな増殖を示す細胞であった。しかし線維芽細胞とは性質は異なり、ALP 染色で陽性であり、陽性率は 55.5% だった (図 4)。

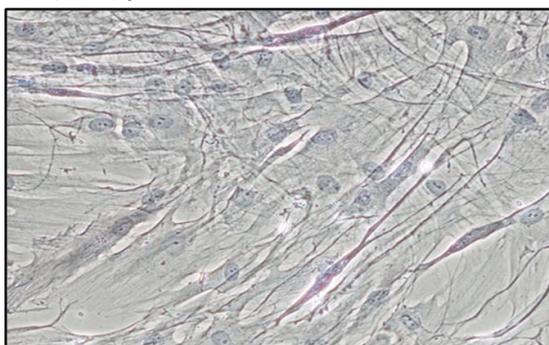
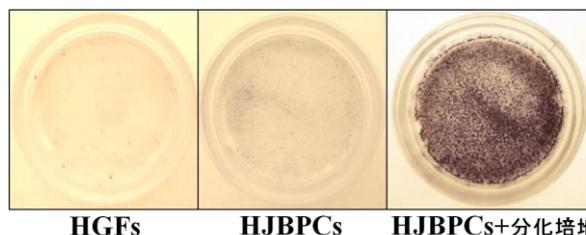


図 4 ALP 染色した HJBPCs

また、骨芽細胞分化培地で HJBPCs を培養したところ、ALP 染色の陽性率は 80% を超えた。カルシウムを染色するアリザリンレッド S 染色では明らかなカルシウム結晶の形成が確認できた。これらの変化は比較対照の HGFs では認めなかったことから、HJBPCs は骨芽細胞様細胞あるいは骨系未分化間葉系細胞 (骨系幹細胞) を含んでおり、骨形成能を有すると考えられた (図 5)。

<ALP 染色>



<アリザリンレッド S 染色>

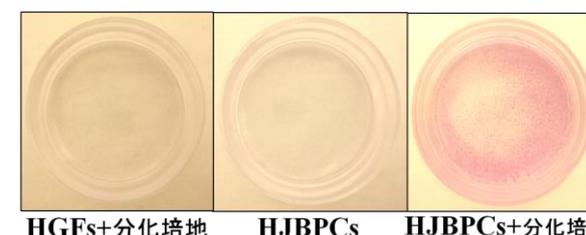


図 5 HJBPCs の特性検討

(2) マイクロアレイ解析

HJBPCs に伸展刺激を負荷することで発現が変動した遺伝子をパスウェイ解析したところ最も多くの遺伝子が発動したのは Wnt signaling pathway だった。次に多かったのは細胞接着に関与する遺伝子群であり BMP signaling pathway が次に続いた (図 6)。

KEGG pathway	Gene number
Wnt signaling pathway	18
Focal adhesion/Adherens junction	17
BMP (TGF- β) signaling pathway	15
MAPK signaling pathway	15
PI3K-Akt signaling pathway	11
JAK-STAT signaling pathway	9
Regulation of actin cytoskeleton	8
HIF-1 signaling pathway	7

図 6 パスウェイ解析

マイクロアレイで解析で大きな変動を示した遺伝子のうち、骨代謝に関連する遺伝子を選び、パスウェイ解析の結果を考慮し、メカニカルストレスにより誘導される骨リモデリングに関与すると考えられる 20 遺伝子を抽出した (図 7)。これらの遺伝子についてリアルタイム PCR でさらに詳細な遺伝子変動の解析を行うこととした。

Wnt pathway	BMP pathway	Interleukin	Insulin-like growth factor
Wnt-5a	BMP-2	IL-1 β	IGF-1
LRP-5	BMP-4	IL-6	IGF-2
ROR-2	BMP-6	IL-11	
SFRP-1	DLX-5	IL-16	
SFRP-2	CHDRL-1	IL-34	
DKK-1	SHH	LIF	

図7 抽出した20遺伝子

(3) リアルタイム PCR の結果

伸展刺激した HJBPCs の遺伝子変動をリアルタイム PCR で解析した。比較対象として HGFs を用いた。Wnt signaling pathway、BMP signaling pathway、Interleukin および Insulin-like growth factor に属する遺伝子の分析結果を以下に示す (図8-①,②,③)。

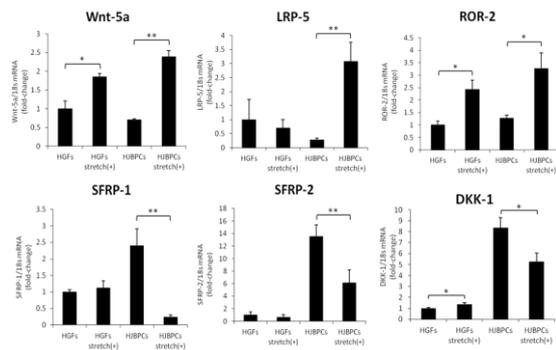


図8-① Wnt signaling pathway

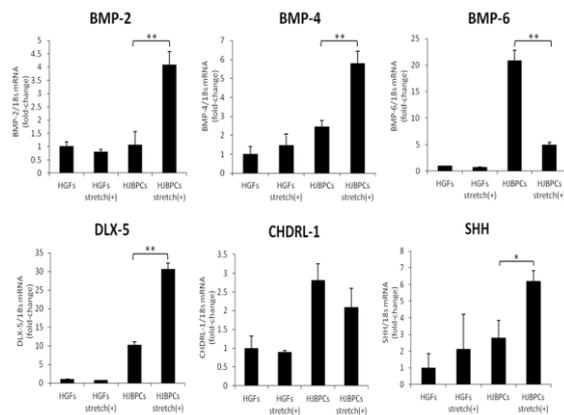


図8-② BMP signaling pathway

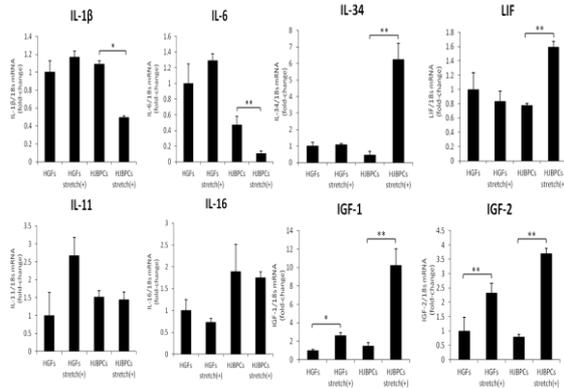


図8-③ Interleukin, Insulin-like growth factor

本研究では HJBPCs への伸展刺激が骨代謝関連因子の遺伝子発現量の変動につながる事が明らかになった。Wnt signaling pathway は様々な生体機能調節に関与する分泌性糖タンパクであり SHH による制御をうける。Wnt 受容体として7回膜貫通型の Frizzled 受容体が知られている。Wnt signaling pathway には β -catenin を介して遺伝子発現を制御する β -catenin 経路 (canonical pathway) と β -catenin 非依存性経路 (non canonical pathway) があり、骨代謝も Wnt signaling pathway の制御を受けることが分かっている。Wnt/ β -catenin 経路では、 β -catenin を介して転写因子 TCF/LEF を活性化することで間葉系細胞の骨芽細胞分化が誘導され骨形成を促進する。一方で、 β -catenin 非依存性経路では c-jun N-terminal kinase (JNK) を介して破骨細胞分化を誘導し、骨吸収を促進するという相反する作用を持っている。Wnt signaling pathway は複数の経路を持ち、シグナルネットワークを構成することで骨代謝調節に関与している。

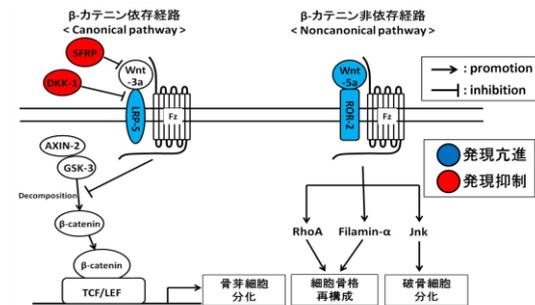


図9 HJBPCs の伸展刺激で変動した Wnt pathway 構成遺伝子

本実験では HJBPCs への伸展刺激は Wnt5a と共受容体である LRP-5、ROR-2 の発現亢進と、阻害因子である DKK-1、SFRP-1、-2 の発現抑制を誘導し、 β -catenin 経路と β -catenin 非依存性経路の両方を活性化したと考えられる (図9)。一方で HGFs への伸展刺激ではこれらの遺伝子の有意な発現変動は起こらなかった。このことはメカニカルストレスで誘導される骨リモデリングにおいて、骨膜組織がメカニカルストレスを感知し Wnt signaling pathway を介してその制御に関与する可能性を示唆している。

BMP signaling pathway に関しては、骨膜由来細胞の伸展刺激により BMP-2、-4 の発現が亢進し、下流の DLX-5 も亢進した。一方、BMP-6 だけが発現抑制された (図10)。BMP-6 は IL-1 β と IL-6 の発現も誘導し、破骨細胞分化にも関与するという報告があり、本研究では BMP-6 と連動して IL-1 β 、-6 も有意に減少しており、これと一致した結果であった。また、IL-6 ファミリーに属する LIF は生理的骨代謝では BMP-2、-4 と協調して骨芽細胞分化に働くという報告があり、LIF の発現

亢進は BMP-2、-4 と協調して変動していると考えられた。IL-34 は M-CSF とレセプターを共有し、破骨細胞分化を誘導するが、その機能の詳細は未解明であり、生理的骨吸収に強く関与するのではないかと報告がある。以上の一連の変化はメカニカルストレスで誘導される骨リモデリングにおいて特有の現象であり、相互に連動しているのではないかと考えられた。

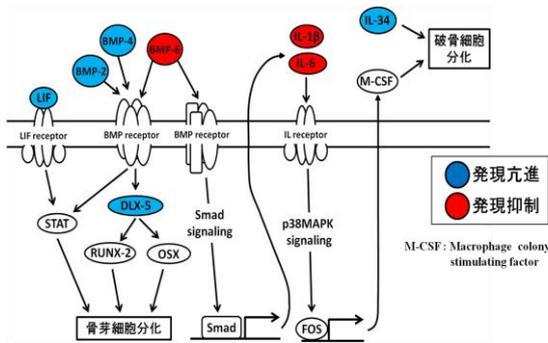


図 10 HJBPCs の伸展刺激で変動した BMP signaling pathway 構成遺伝子

また、HJBPCs を伸展刺激することで IGF-1、-2 の発現が亢進した。IGF は骨芽細胞の機能を強調する一方、最終的には局所濃度が一定まで高まることにより破骨細胞分化へと誘導することが知られている。しかし骨代謝における IGF の局在は不明な点が多く、骨芽細胞が骨形成と伴に分泌し、骨基質に蓄えられ、骨吸収期に破骨細胞が分解した骨基質から放出されるのではないかと考えられている。しかし本研究の結果から骨膜がメカニカルストレスを感知し IGF の供給源となりうるという新たな概念が示唆された (図 11)。

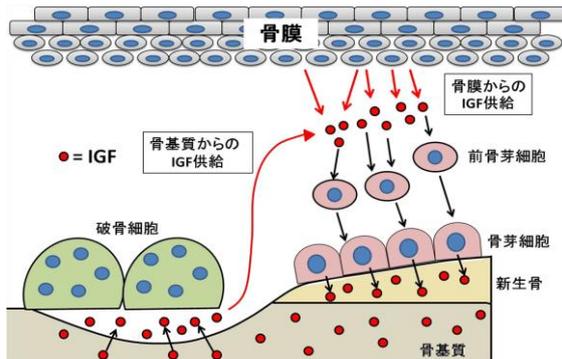


図 11 本研究で示唆された IGF 供給源としての骨膜の可能性

本研究によって HJBPCs は伸展刺激を感知し Wnt/BMP signaling pathways が活性化された。そしてこれらのシグナルは間葉系細胞から前骨芽細胞、骨芽細胞を経て破骨細胞へと分化する、骨リモデリングの各段階において必要とされるシグナルに一致していた (図 12)。これは骨膜がメカニカルストレスを感知して骨代謝の制御に関与できることを示しており「骨膜がメカノセンサーとし

ての機能を持つ」という我々の仮説を支持するものと考えられた。また、LIF の発現亢進や IL-1 β 、-6 の抑制、IL-34 および IGF-1、-2 の発現亢進といった遺伝子群変動の結果から、骨周囲組織である骨膜は、メカニカルストレスに応じた強度の骨を形成するために「骨にとって最適な代謝環境を維持する役割」を担っているのではないかと考察された。

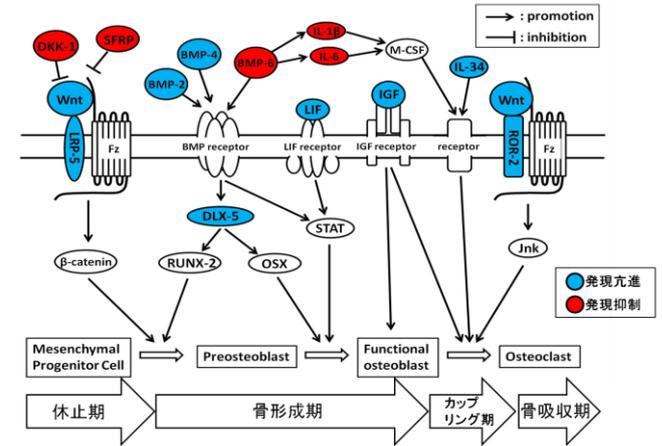


図 12 本研究で示されたメカノセンサーとしての骨膜の骨代謝制御機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Ito R, Matsumiya T, Kon T, Narita N, Kubota K, Sakaki H, Ozaki T, Imaizumi T, Kobayashi W, Kimura H.: Periosteum-derived cells respond to mechanical stretch and activate Wnt and BMP signaling pathways. Biomed Res. 2014;35:69-79. (査読あり) DOI:10.2220/biomedres.35.69

〔学会発表〕 (計 2 件)

伊藤 良平、中川 祥、小林 恒、木村 博人、他. 骨膜由来細胞はメカニカルストレスに応答し Wnt signaling pathway と BMP signaling pathway が活性化される. 日本口腔科学会学術集会 2014.5.9. 東京

Hiroto KIMURA. Usefulness of two-stage surgery for benign odontogenic tumors showing large cystic, intraosseous lesions in the mandible. 中华民国口腔外科学会 (招待講演) 2012.3.10. 台中市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 博人 (Kimura Hiroto)
弘前大学 医学研究科 教授
研究者番号: 90142851

(2) 研究分担者

① 小林 恒 (Wataru Kobayashi)
弘前大学 医学研究科 准教授
研究者番号 : 50234860

② 中川 祥 (Nakagawa Hiroshi)
弘前大学 医学研究科 助教
研究者番号 : 00529688

(3) 研究協力者

① 松宮 朋穂 (Matsumiya, Tomoh)
弘前大学 医学研究科 助教
研究者番号 : 30344592

② 久保田 耕世 (Kubota Kousei)
弘前大学 医学部附属病院 助教
研究者番号 : 10529689

③ 榊 宏剛 (Sakaki Hirotaka)
弘前大学 医学部附属病院 講師
研究者番号 : 90374850

④ 伊藤 良平 (Ito Ryohei)
弘前大学 医学部附属病院 医員
研究者番号 : 20638902