

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659892

研究課題名(和文) 中高年外科的矯正治療術後患者における新たな顎骨治癒評価系の確立

研究課題名(英文) Establishment of new jawbone healing evaluation in the old and middle age patient of jaw deformity after surgery

研究代表者

志茂 剛 (Tsuyoshi, Shimo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40362991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：これまで顎変形症術後の顎骨治癒経過におけるプロセスは曖昧な点が多く、施設間で異なる顎間固定期間を設定しているのが現状である。これまで我々は、ソニックヘッジホッグ(SHH)は骨の形成ならびに吸収に関与することを明らかにしてきた。一方骨折の治癒過程には、細胞遊走、骨のリモデリングが重要となる。そこで本研究では、骨折治癒過程におけるSHHの発現およびその役割を明らかにする。さらに、外科的矯正術後におけるヘッジホッグ骨代謝マーカーとしての有用性を明らかとし、新たな顎骨治癒評価系の確立を目的とする。(本研究は岡山大学倫理委員会承認を得て実施した)

研究成果の概要(英文)： The process of jawbone healing in the postoperative jaw deformity has many vague points, and it is the present conditions until now that set the fixed term between a different intermaxillary fixation between facilities. Previously, we have reported that the sonic hedgehog (SHH) participated in the bone formation and resorption. In this study, we examined the distribution patterns of SHH and the role during fracture healing. Furthermore, I do the usefulness of the hedgehog as the bone metabolism marker after the surgery of jaw deformity and am aimed for establishment pro-new jawbone healing evaluation. (This study was I carried out with Okayama University Ethical Review Board approval.)

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：骨折 顎変形症

1. 研究開始当初の背景

これまで顎変形症術後の顎骨治癒経過におけるプロセスは曖昧な点が多く、施設間で異なる顎間固定期間を設定しているのが現状である。これまで我々は、ソニックヘッジホッグ (SHH) は骨の形成ならびに吸収に関与することを明らかにしてきた。一方骨折の治癒過程には、細胞遊走、骨のリモデリングが重要となる。

2. 研究の目的

本研究では、骨折治癒過程における SHH の発現およびその役割を明らかにする。さらに、外科的矯正術後におけるヘッジホッグ骨代謝マーカーとしての有用性を明らかとし、新たな顎骨治癒評価系の確立を目的とする。

3. 研究の方法

In vivo における顎変形症骨切りモデルはマウス第 8 肋骨骨折モデルを作製した。治癒の過程を HE 染色, ALP 染色, 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色 (以下 TRAP 染色), ならびに SHH 免疫組織学的検討 (抗マウス SHH ウサギポリクローナル抗体 (Abfrontier, Seoul, Korea)) を行ない評価した。

骨芽細胞分化能の検討は、48 穴細胞培養用プレート上でマウス前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞 (RIKEN, 茨城, 日本) を 1×10^5 cell/well 播種した。37°C にて培養を行ない、コンフルエント状態になった時点から 50mg/ml L (+) Ascorbic Acid (ナカライテスク, 京都, 日本) および 1M β -Glycerophosphate (β -GP, Sigma) を添加した培地を用いて 5 日間培養した。4% パラホルムアルデヒド/PBS で 15 分間固定した後、ALP 染色液 (50mM Tris base (Sigma), Naphthol AS-B1 Phosphate (Sigma), N. N-dimethyl formamide, Fast red tri-sodium salt (Sigma)) にて 37°C で 40 分間インキュベートし、水洗、乾燥後、光学顕微鏡下で観察した。

破骨細胞形成能の検討は、MC3T3-E1 細胞と 8 週齢 C57BL/6J マウス大腿骨骨髓から単離した CD11b 陽性細胞との共存培養系を用いた。96 穴細胞培養用プレート上で MC3T3-E1 細胞をそれぞれ 1×10^4 cell/well で、各穴に骨髓 CD11b 陽性細胞を 1×10^5 cell/well で播種し、37°C で培養を行なった。培養開始 1 日後に PTHrP (10nM), M-CSF (30ng/ml) を添加し、また SHH 添加群には PTHrP, M-CSF 添加と同時に SHH (500ng/ml) 添加し TRAP 染色 (和光) を行なった。

一方、上下顎骨切り術および下顎骨骨切り術を施行した外科的矯正治療患者 35 例 (男性 10 例, 女性 25 例, 平均年齢 23.6 歳) を対象とした。術前, 術後 1, 3, 7 日目の末梢血および、術直後, 1, 2 日目のドレーンから局所血清を得た。血清中 SHH を ELISA 法によ

り検出した。

4. 研究成果

骨折後 3 日目に、マクロファージ, 好中球やリンパ球と思われる炎症性細胞を認め、骨折端周囲のライニングセルおよび骨髓細胞に SHH の強発現を認めた (図 1A and B)。骨折後 5 日目には、骨折端周囲に結合組織の増生が認められ、炎症性細胞の浸潤の他に、

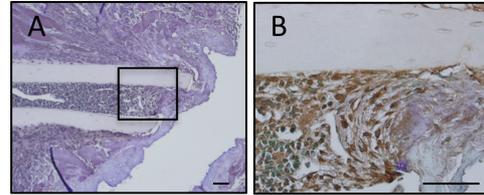


図1 骨折3日後のSHH抗体による免疫組織学的染色像 Aの四角枠の拡大像がBに相当する。PLoS One 2013 e76785改変 Bar: 100 μ m

紡錘形の線維芽細胞の増生が観察された (図 2A)。

骨折端周囲に ALP 陽性骨芽細胞 (図 2B 矢頭) を、その近傍に TRAP 陽性破骨細胞 (図 2B 矢印) を認めた。SHH の発現は骨髓細胞に 3 日目と同様に認められた (data not shown)。

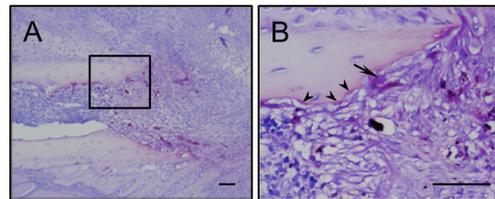
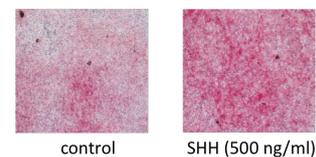


図2 骨折5日後のTRAP/ALP染色像 Aの四角枠の拡大像がBに相当する。矢頭: ALP陽性骨芽細胞, 矢印: TRAP陽性破骨細胞 PLoS One 2013 e76785改変 Bar: 100 μ m

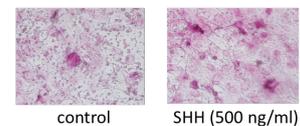
SHH を骨芽細胞に添加すると、ALP 陽性骨芽細胞が有意に増大することが明らかとなった (図 3, $P < 0.05$)。

骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との共存培養系において、PTHrP 存在下で、SHH 添加群は、コントロール細胞において有意な破骨細胞形成促進効果を認めた (図 4, $P < 0.05$)。

SHH を骨芽細胞に添加すると、単独で RANKL mRNA 発現を上昇させ、SHH と PTHrP 同時作用で、



control SHH (500 ng/ml)
図3 SHHが骨芽細胞に与える影響 ALP染色像 PLoS One 2013 e76785改変



control SHH (500 ng/ml)
図4 SHHが破骨細胞形成に与える影響 骨芽細胞とCD11b陽性骨髓細胞の共存培養系 TRAP染色像 PLoS One 2013 e76785改変

RANKLmRNA 発現を相乗的に上昇, さらに PTHrPmRNA 発現を上昇させることが明らかとなった (PLoS One 2013 e76785)。

一方で, 顎変形症術後末梢血における SHH 濃度は, いずれもやや減少傾向ではあるが, ほとんど変動が認められなかった (data not shown)。一方で, 術後ドレーンにおける SHH 濃度は上昇傾向にあることがわかった (図 5)。なお, 出血量, 年齢, 手術時間と SHH 濃度との相関関係はいずれも認められなかった。SHH の末梢および, 局所濃度測定の実用性は, 症例数を増やし, さらなる検討が必要と考える。

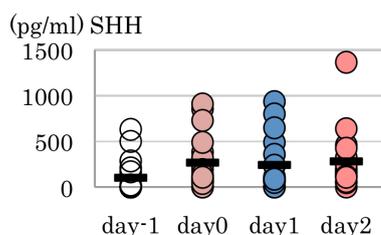


図5 顎変形症術後局所ドレーン中のSHH濃度

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 1 件)

1. Yuu Horikiri, Tsuyoshi Shimo, Naito Kurio, Tatsuo Okui, Kenichi Matsumoto, Masahiro Iwamoto, Akira Sasaki.: Sonic Hedgehog Regulates Osteoblast Function by Focal Adhesion Kinase Signaling in the Process of Fracture Healing, PLoS One, 8(10):e76785, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0076785

[学会発表] (計 3 件)

1. Yuu Horikiri, Tsuyoshi Shimo, Masahiro Iwamoto, Naito Kurio, Tatsuo Okui, Akira Sasaki.: Focal adhesion kinase and sonic hedgehog regulate osteoblast and osteoclast function in the process of fracture healing. The 6th International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society Strategy to Establish the System for the Development of Drug, Okayama, Japan, February 7-8, 2013
2. Yuu Horikiri, Tsuyoshi Shimo, Masahiro Iwamoto, Naito Kurio, Tatsuo Okui, Akira Sasaki.: The role of Focal adhesion kinase and Sonic hedgehog on

the process of fracture repair. The International Bone and Mineral Society (IBMS), Kobe, Japan, May 28-June 1, 2013

3. Kenichi Matsumoto, Yuu Horikiri, Tsuyoshi Shimo, Naito Kurio, Tatsuo Okui, Hiromasa Kuroda, Akira Sasaki.: Sonic hedgehog-focal adhesion kinase signaling regulates the process of fracture repair. The third international symposium of medical-dental-pharmaceutical education and research in okayama, Okayama, Japan, September 22-23, 2013

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
岡山大学プレスリリース
https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id120.html
日刊工業新聞
<http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1020131205eaah.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
志茂 剛 (SHIMO TSUYOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号: 40362991

(2) 研究分担者

西山 明慶 (AKIYOSHI NISHIYAMA)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50189320

吉岡 徳枝 (NORIE YOSHIOKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号：50362984

(3) 連携研究者

()

研究者番号：