

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791959

研究課題名(和文) NF- $\kappa$ B デコイの *in vivo* ターゲティングシステムを用いた骨修復機構の検討研究課題名(英文) Analysis of bone healing process with the *in vivo* targeting system of NF $\kappa$ B decoy

研究代表者

中村 恵 (Nakamura, Megumi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20431512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B)デコイを用いて炎症関連分子の発現を一括して抑制し、ラット頭頂骨規格化骨欠損修復について検討するとにより、炎症が骨修復において果たす役割の一端を解明することを目的とした。これまでに、I型コラーゲンスポンジから成る担体を用いた*in vivo*ターゲティングシステムを確立した。また、骨修復と類似した骨形成過程を持つと考えられる発生期の骨において炎症性サイトカインのmRNA発現があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to investigate bone healing process of the standardized calvarial defect in rats with downregulation of inflammation-related molecules by nuclear factor-kappa B (NF $\kappa$ B) decoy to elucidate the role of inflammation in bone repair. So far, we succeeded to establish the *in vivo* targeting system using type I collagen sponge as a carrier. In addition, we showed the mRNA expression of proinflammatory cytokines in developing bone of which bone formation process is comparable to that of healing bone.

研究分野：組織・発生学

キーワード：骨修復 炎症 NF- $\kappa$ B 規格化骨欠損

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨を含む全ての生体組織では、損傷を受けると炎症反応が起きて治癒が進行する。過度の炎症は生体にとって有害であり、炎症性疾患においては炎症の抑制が必要となる。しかし、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- (TNF-) の欠損マウスでは、創傷治癒が正常に行われず(Saika et al. 2006)、interleukin-6 (IL-6) の欠損マウスでは、創傷治癒の遅れが生じることが報告されている(Lin et al. 2003)。また、炎症が起こると骨芽細胞の分化が直接または間接に促進される可能性も示され(Rifas et al. 2003; Gorts et al. 2004; Shen et al. 2005)、TNF- の実験的局所投与が骨折の治癒に促進的に作用することも報告されている(Glass et al. 2011)。しかし、生体の炎症が骨修復に果たす役割についてはよくわかっていない。

(2) NF- B は、炎症性サイトカイン等の炎症関連分子の発現を調節している転写因子で、NF- B の転写抑制により、これらの炎症関連分子の発現を一括して抑制できるため、炎症治療の標的分子として注目されている。近年、NF- B の抑制を目的として、NF- B デコイが開発された。NF- B デコイは認識配列を含む二本鎖ヌクレオチドで、炎症に際して過剰活性化された NF- B のゲノム DNA への結合を競合的に阻害することで NF- B 転写活性を抑制し、結果的に炎症を抑制する(Higuchi et al. 2008)。

(3) 従来、炎症性シグナルによる骨吸収促進については多くの研究が報告されているが、炎症の骨形成への関与についての知見は乏しい。特に、骨損傷時における骨修復期と比較して、発生期における骨形成過程での炎症関連分子の発現については情報が少ない。

## 2. 研究の目的

(1) 過度の炎症は生体に有害となるが、適度な炎症は骨修復に必須であり、炎症がなければ修復は開始せず、正常な治癒ができなくなる、との仮説を検証するために、ラット頭頂骨規格化骨欠損修復実験系(Honma et al. 2008; Henmi et al. 2011)にデコイ法を適用して NF- B を阻害する in vivo ターゲティングシステムを確立し、NF- B に発現を支配される炎症関連分子の作用を一括して抑制し、炎症抑制群と炎症非抑制群との間で、骨修復における骨芽細胞の骨形成能と形成された修復骨量を比較検討することにより、骨修復メカニズムにおける炎症の重要性を示すことを目的とした。

(2) さらに、骨修復と同じく活発に骨形成が進行する骨発生の場における炎症関連分

子の発現を調べて、骨修復時の発現パターンと比較検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

実験動物の取り扱いについては、東北大学における動物実験に関する指針に則った。Wistar 系雄性ラットを用い、実験期間中はラット用固形飼料および水にて飼育した。

### (2) 頭頂骨規格化骨欠損作製

イソフランの吸入麻酔後、生後 10 週齢のラットの腹腔内にペントバルビタール(50 mg/kg)を注射し全身麻酔を施した。両側側頭線に沿って約 15mm の皮膚切開を加え、皮膚のフラップを翻転した。同様の切開を骨膜に加え、骨膜のフラップを翻転し、頭頂骨を露出させた。右側頭頂骨に直径 5.8mm のトレフィンバーを用いて、生理食塩水注水下に、骨を貫通する規格化骨欠損を作製した。この際、背側矢状静脈洞と硬膜を傷つけないよう注意した。骨膜と皮膚のフラップを復位後縫合した。

### (3) NF- B デコイの投与と担体埋入

厚さ 2.0mm の型コラーゲンを主成分とするコラーゲンシート(新田ゼラチン)を直径 6.0mm のパンチでくり抜き担体として使用した。担体を EOG 滅菌後、NF- B デコイを Tris-EDTA 緩衝液(溶媒)に溶解したもの、あるいは溶媒のみを 100  $\mu$ l 浸潤させて、規格化骨欠損内に埋入する。前者を炎症抑制群(実験群)、後者を炎症非抑制群(対照群)とした。

### (4) 発生期の顎骨採取

胎生 14 日齢・16 日齢・18 日齢・20 日齢のラットを子宮から取り出して上下顎骨を摘出し、超音波ホモゲナイザーを用いて破碎後、-80  $^{\circ}$ C にて保存した。

### (5) RNA 抽出および逆転写反応

凍結保存しておいた胎生期の顎骨を解凍後、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit(QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA から、random primer (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)、逆転写酵素 (Super Script, Invitrogen, 200 U/ $\mu$ g RNA) を用いて cDNA を合成した。

### (6) Real-time PCR

合成した cDNA は 100 倍希釈して real-time PCR に用いた。LightCycler 1.5 (Roche, Mannheim, Germany) を用い、LightCycler software version 3.5 にて TNF- と IL-6 について定量的に解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) in vivo ターゲティングシステム  
NF- $\kappa$ B デコイを浸潤させる担体としてコラーゲンシートを用いた。ラット頭頂骨規格化骨欠損のサイズに合わせて、コラーゲンシートの形態・厚み・分解速度などの調整を行った。厚さ 2.0mmのコラーゲンシートを骨欠損の直径より 0.2mm大きいサイズのパンチでくり抜き、ラット頭頂骨の規格化骨欠損に埋入し、翌日・3 日後・1 週間後でその分解状態を調べた。



図 1: コラーゲン担体の埋入  
その結果、担体は埋入後一日でほとんど溶解しており、3 日後では完全に認められなかった。

(2) 炎症性サイトカインの mRNA 発現  
修復期の骨形成時の炎症関連分子の検討に先駆けて、発生期における骨形成時の炎症性サイトカインの mRNA 発現を Real-time PCR 法を用いて検討した。胎生 14 日齢・16 日齢・18 日齢・20 日齢の顎骨において TNF- $\alpha$  と IL-6 の mRNA 発現が認められた。発生期における炎症関連分子の発現が確認できたことから骨修復時と同様に炎症性サイトカイン等の炎症関連分子がトリガーとなり骨芽細胞機能が活性化し骨形成が惹起され、骨の発生が進行する可能性が示唆された。

(3) 考察  
NF- $\kappa$ B デコイの in vivo ターゲティングシステムについては、システムの確立は達成できたものの、デコイの投与濃度等を決定できるまでに至らなかった。

また、本研究において、骨発生過程での炎症性サイトカインの発現が確認された。修復・治癒過程と発生過程は、組織形成という観点から共通したメカニズムを持つ可能性があることから、本研究結果は、発生過程においても修復・治癒過程と同様に炎症関連分子が骨形成のトリガーとなっている可能性を示唆している。今後、TNF- $\alpha$  と IL-6 の mRNA 量を統計学的に検討し、修復骨における発現パターンとの比較検討が必要であると考える。

#### <引用文献>

Glass GE et al. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the

recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. Proc Natl Acad Sci USA 108:1585-1590, 2011

Gortz B et al. Arthritis induce lymphocytic bone marrow inflammation and endosteal bone formation. J Bone Miner Res 19:990-998, 2004

Henmi A, Nakamura M et al. Involvement of sensory neuron in bone defect repair in rats. J Electron Microsc (Tokyo) 60(6): 393-400, 2011

Higuchi Y et al. Development of cell-selective targeting systems of NF $\kappa$ B decoy for inflammation therapy. Yakugaku Zasshi 128:209-218, 2008

Honma T, Itagaki T, Nakamura M et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. Oral Dis. 14:457-464, 2008

Lin ZQ et al. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. J Leukoc Biol 73:713-721, 2003

Rifas L et al. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. J Cell Biochem 88:650-659, 2003

Saika S et al. Loss of tumor necrosis factor  $\alpha$  potentiates transforming growth factor  $\beta$ -mediated pathogenic tissue response during wound healing. Am J Pathol 168:1848-1860, 2006

Shen F et al. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17 and TNF- $\alpha$ -induced genes in bone cells. J Leukoc Biol 77:388-399, 2005

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Okata H, Nakamura M, Henmi A, Yamaguchi S, Mikami Y, Shimauchi H, Sasano Y. Calcification during bone healing in a standardized rat calvarial defect assessed by micro-CT and SEM-EDX. Oral Diseases 21(1):74-82, 2015 (査読有り)

[学会発表](計5件)

Okata H, Nakamura M, Henmi A, Yamaguchi

S, Mikami Y, Sasano Y. Calcification in healing calvarial bone assessed by micro-CT and SEM-EDX. The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, January 20 and 21, 2014, Sendai, Japan

Okata H, Nakamura M, Henmi A, Yamaguchi S, Mikami Y, Shimauchi H, Sasano Y. Analysis of calcification in bone healing with a standardized rat calvarial defect model. International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy (ASahct) 2013, August 27 and 28, 2013, Sendai, Japan

笹野泰之、逸見晶子、大方広志、三上靖人、中村恵、硬組織の発生・修復における細胞外基質リモデリングと石灰化。第118回日本解剖学会総会・全国学術集会「歯の発生の会」、平成25年3月27日、高松市

大方広志、中村恵、逸見晶子、島内英俊、笹野泰之、骨密度と構成元素の解析を利用した修復骨基質の石灰化の検討。日本解剖学会第58回東北・北海道連合支部学術集会、平成24年9月22・23日、山形市

大方広志、中村恵、逸見晶子、島内英俊、笹野泰之、骨欠損修復における骨基質の石灰化に関する検討。第54回歯科基礎医学会学術大会・総会、平成24年9月14日～16日、郡山市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 恵 (NAKAMURA MEGUMI)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：20431512