

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2016

課題番号：24792170

研究課題名(和文)炎症性刺激を活用した新規の骨修復・再生治療法の研究と開発

研究課題名(英文)Development of new therapy for bone healing and regeneration using inflammatory stimuli.

研究代表者

逸見 晶子(Henmi, Akiko)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40613055

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)：NF- β デコイを浸潤させるためのコラーゲン担体を作製し、ラット頭蓋骨の規格化骨欠損に埋入した。担体は埋入後3日で完全に分解され消失した。さらに、埋入後4週で、骨欠損にコラーゲン担体を埋入したラットと埋入していないコントロール・ラットの骨修復を組織学的に比較検討した。コントロールでは、骨欠損部の大部分に修復骨を認めたのに対し、担体を埋入した欠損には修復骨がほとんど見られなかった。コラーゲン担体の適用条件のさらなる検討が必要である。本研究で当初目的とした完全には修復されず残存した骨欠損の周囲に二次欠損を作製する実験系とNF- β を標的とするデコイ核酸を用いる実験系の確立には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The study was designed to test the hypothesis that bone healing is advanced by inflammation and decreased when the inflammation is down-regulated. We attempted to develop the rat experimental model. The collagen carriers were implanted in a rat parietal bone defect and the process of degradation of the carrier was examined in 1 day, 3 days and 1 week. The most of the carrier was degraded within 1 day and completely disappeared within three days. Bone formation in the defect was compared in 4 weeks with histology between the experimental rat and the control, a rat with no carrier in the defect. The most of the bone defect healed in the control whereas little bone formation was observed in the defect with the collagen carrier. How to apply the collagen carrier to the bone defect remains to be considered. The rat experimental model of the secondary bone defect and that of the decoy for NF- β have not been made and are still under consideration.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：骨欠損修復 炎症 NF- β 頭蓋骨 ラット コラーゲン担体

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔外科領域では、骨欠損症例が多く見られる。例えば、抜歯後の骨欠損(抜歯窩)、顎骨の嚢胞摘出や腫瘍摘出により生じた骨欠損、口蓋裂に代表される先天的な骨欠損などが挙げられる。骨が自己修復して治癒できる欠損の大きさには限界があり、臨床の間では治癒しない大きな骨欠損の治癒が重要な課題となる。

(2) 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- α (TNF- α) 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- α 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。

(3) 申請者等の研究グループは、ラット頭蓋骨に、自己修復される小さな骨欠損と、自己修復が不完全で欠損が残存してしまう大きな骨欠損を作製し、修復骨量や骨の構造タンパクの産生について比較検討を行った結果、欠損の大きさに関わらず骨修復は一定期間内で停止すると報告している(Honma et al. 2008)。つまり、一定期間内に修復できなかった部分が骨欠損として残存すると考えられる。以上から申請者は、骨欠損修復のメカニズムに関して「骨芽細胞は損傷に伴う炎症反応により活性化され欠損部を修復するが、炎症反応が消退すると低下し、骨修復は停止する。」との仮説を着想した。

2. 研究の目的

(1) 骨芽細胞は損傷に伴う炎症反応により活性化され欠損部を修復するが、炎症反応が消退すると細胞活性が低下し、骨修復は停止する、との仮説を検証するために、ラット頭蓋骨規格化骨欠損モデル(Honma et al. 2008; Henmi et al. 2011)を利用して、完全には修復されない大きな欠損(一次欠損)を作製し、一次欠損の修復停止後に、残存欠損より大きい欠損(二次欠損)を作製して実験的に新たな炎症を起こし、骨修復が再開して欠損が完全に治癒するか否かを検討する。

(2) 骨欠損修復過程における炎症性サイト

カインの役割を調べるため、前述の規格化骨欠損モデルに、nuclear factor -kappa B (NF- κ B) を標的とするデコイ核酸を浸潤させたコラーゲン担体を埋入して、NF- κ B に発現を支配される炎症性サイトカイン(IL-1 や TNF- α 等) の作用を一括して抑制し(Higuchi et al. 2008)、骨芽細胞活性と骨修復量への影響を検討する。

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) 頭蓋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(3.8mm または 5.8mm) 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- κ B デコイ投与に用いる担体埋入

厚さ 1.0mm または 2.0 mm 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 3.0 mm または 6.0 mm のパンチでくり抜き担体として使用した。

予備実験として、直径 3.0 mm と直径 6.0 mm の担体を、それぞれ直径 3.8 mm と 5.8 mm の規格化骨欠損部に埋入した。

4. 研究成果

(1) 炎症抑制実験系の確立

一次欠損修復後に二次欠損を作製し実験的に炎症を起こす実験系の確立の前に、炎症抑制実験系の確立に着手した。

NF- κ B デコイを浸潤させる担体を検討するために、コラーゲンシートを利用して担体を作製した。ラット頭頂骨規格化骨欠損のサイズに合わせて、コラーゲン担体の形態と厚みの調整を行った(図 1)。厚さ 1.0 mm または 2.0 mm のコラーゲンシートを 3.0 mm または 6.0 mm 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 2)。

その結果、担体は埋入後 1 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。

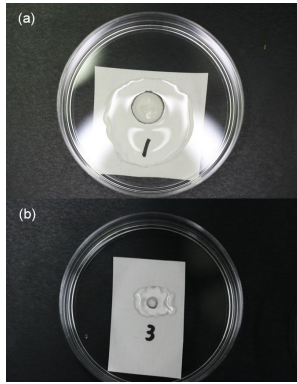


図 1 : コラーゲン担体の形態と厚みの調整
(a)直径 6.0 mm (b)直径 3.0 mm



図 2 : 直径 3.0 mm コラーゲン担体の埋入

次に、担体埋入後の骨修復を確認するために、コラーゲン担体を埋入したラットと埋入していないラットをそれぞれ術後 4 週で灌流固定し、脱灰後、パラフィン包埋し、前頭断の方向に 5 μ m の切片を作製後、H-E 染色を施し、組織学的検討を行った。

コラーゲン担体を埋入していないラットでは、骨欠損部の大部分に修復骨を認めた (図 3 -b) のに対し、担体を埋入したラットでは、ほとんど修復骨が認められず、欠損部にはコラーゲン担体と思われるものが残存している像が認められた (図 3 -a)。

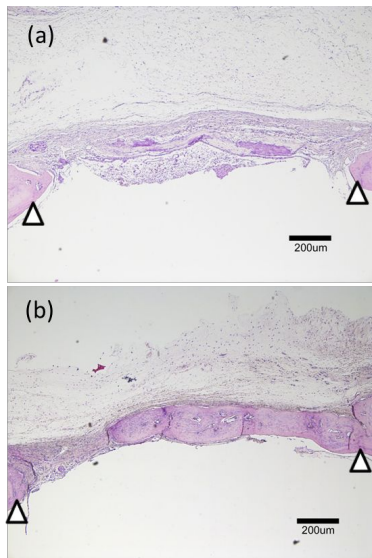


図 3 : 術後 4 週の組織像
(a) 直径 3.0 mm コラーゲン担体埋入
(b) コラーゲン担体非埋入
△ 既存骨と修復骨の境界

(2) 一次欠損モデルの確立

申請者などの研究グループは、8.8mm の骨欠損が完全には修復しないことを既に報告している (Honma et al. 2008)。

骨欠損作製後の経時的な修復骨量や骨芽細胞の活性を調べるため、また、完全に修復するか否かを確認するため、現在、予備実験的に 8.8 mm よりも小さい 5.8 mm の一次骨欠損を作製し、飼育している途中段階である。

(3) 考察

炎症抑制実験系を確立するため、骨欠損の大きさやコラーゲン担体の形態、厚み、分解速度などについて検討した。コラーゲン担体は埋入後 3 日後に肉眼的には完全に溶解しているように見えたが、コラーゲン担体埋入後 4 週の組織像では、通常の修復骨の形成が見られず、コラーゲン担体が残存しているような像が認められた。コラーゲン担体が完全には吸収されず、骨修復を阻害した可能性が考えられた。今後、コラーゲン担体の分解速度などの調整が必要である。コラーゲン担体の適用条件を確立した段階で、NF- κ B デコイ核酸の適用を検討する予定である。

また、一次欠損モデルについては、現在予備実験の段階で実験系の確立には至らなかった。今後、骨欠損の大きさなどを決定し、本実験に移行する予定である。

<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 NFkappaB 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 α potentiates transforming growth factor β -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- α -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3件)

Maruyama K, Henmi A, Okata H, Sasano Y. Analysis of calcium, phosphorus, and carbon concentrations during developmental calcification of dentin and enamel in rat incisors using scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). *Journal of Oral Biosciences* 58:173-179, 2016, (査読有り)
[DOI] 10.1016/j.job.2016.08.003

Henmi A, Okata H, Anada T, Yoshinari M, Mikami Y, Suzuki O, Sasano Y. Bone matrix calcification during embryonic and postembryonic rat calvarial development assessed by SEM-EDX spectroscopy, XRD and FTIR spectroscopy. *Journal of Bone Mineral Metabolism* 34:41-50, 2016 (査読有り)
[DOI] 10.1007/s00774-014-0647-x

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)
[DOI] 10.1111/odi.12212

〔学会発表〕(計13件)

逸見晶子、丸山顕太郎、大方広志、笹野泰之、ラット切歯象牙質とエナメル質の形成過程におけるカルシウム、リンおよび炭素のSEM-EDXを用いた元素分析。日本解剖学会第62回東北・北海道連合支部学術集会、2016年9月3日-4日 帯広市

笹野泰之、逸見晶子、大方広志、中村恵、鈴木治、骨発生、修復に伴う石灰化成熟。第121回日本解剖学会総会・全国学術大会、シンポジウム「石灰化研究の新展開」(招待講演)、2016年03月28日~30日、福島県郡山市

Maruyama K, Henmi A, Okata H, Sasano Y. SEM-EDX analysis of Ca, P and C during calcification in rat incisor dentin and enamel. The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, January 18 and 19, 2016, Sendai, Japan

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

Henmi A, Okata H, Anada T, Yoshinari M, Mikami Y, Suzuki O, Sasano Y. Calcification in the bone matrix during rat calvarial development. The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, January 20 and 21, 2014 Sendai, Japan

Hayashi R, Kozuka M, Shishido S, Kakiuchi Y, Henmi A, Okata H, Sasano Y. Calcification in rat developing mandibular bone. International Symposium for Interface Oral Health Science, January 20 and 21, 2014 Sendai, Japan

逸見晶子、大方広志、三上靖人、鈴木治、笹野泰之、ラット頭蓋骨発生、成長過程における骨基質石灰化の成熟に関する検討。第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013年9月20日-22日、岡山市

林利香、狐塚雅弘、穴戸駿一、柿内裕輔、逸見晶子、大方広志、笹野泰之、ラット下顎骨における石灰化。第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013年9月20日-22日、岡山市

逸見晶子、大方広志、穴田貴久、三上靖人、鈴木治、笹野泰之：骨発生、成長における石灰化過程の解析。日本解剖学会第59回東北・北海道連合支部学術集会 2013年9月14日-15日 札幌市

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 Synposium 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」、2013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、2012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、2012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

逸見 晶子 (HENMI AKIKO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40613055