

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792198

研究課題名(和文) 培養細胞由来の細胞外基質を用いた放射線性骨髄炎の治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment method of osteoradionecrosis with extracellular matrix derived from cultured cell.

研究代表者

土屋 周平 (TSUCHIYA, Shuhei)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20569785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、放射線性骨髄壊死のラット実験動物モデルを作製することができ、また、その組織学的解析、タンパク質の抽出などの実験方法が確立できた。培養細胞から細胞外基質を採取することは困難であったため、ラット骨髄間質細胞の培養細胞が分泌した培養上清を応用することとなった。しかしながら、培養上清の投与は困難を極め、放射線性骨髄壊死の治療法の開発にはいたらなかった。その一方で、放射線骨髄壊死の骨の細胞外基質の変化を示唆するため、細胞外基質分解酵素であるグランザイム B の免疫染色を行ったところ、放射線照射一日目に骨髄内と骨に発現が認められた。今後の放射線性骨髄壊死の病態解明の礎となる結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：I could make a rat laboratory animal model of osteoradionecrosis, and experiment methods such as the histological analysis and extraction of the protein were able to be established. However, it was difficult to gather an extracellular matrix from the cultured rat bone marrow stromal cell. I also injected the culture supernatant which the cultured cell of the rat marrow stroma cell secreted. However, the dosage of the culture supernatant was full of difficulty. These results did not lead to the development of the cure for osteoradionecrosis.

On the other hand, to suggest the change of the extracellular matrix of the bone after radiation, granzyme B (GrB) which was a quality of extracellular matrix degrading enzyme. The expression of GrB was re-detected in the marrow and a bone tissue after one day of irradiation. These results will become the basic pathological analysis of osteoradionecrosis in the future.

研究分野：歯歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：放射線性骨髄壊死 細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域における難治性疾患のひとつに放射線による骨髄炎があげられる。この疾患は、頭頸部領域の悪性腫瘍治療の放射線療法、化学療法後の合併症として引き起こされる。(Almazrooa S .et. al, *J Am Dent Assoc*, 2009)。特に耳鼻科領域において上咽頭癌、中咽頭癌は、放射線の感受性が高いことから、下顎骨を含めた腫瘍病変への放射線照射が行われる頻度が高い。また近年、口腔外科領域の悪性腫瘍に対して機能や審美の保存を重視した「超選択的動注化学放射線療法」が用いられ、その副作用のひとつとして骨髄炎が注目され始めている。放射線性骨髄炎の発症率は報告により様々であるが、5～15%程度であり (Zhuang Q. et. al, *Med Hypotheses*, 2011)、下顎骨に好発する (Schwartz HC et. al, *Am J Clin Oncol*, 2002)。ひとたび骨髄炎が発症すると、激しい疼痛や、顎骨壊死に至ったり、病的骨折を引き起こす危険性が高くなる。しかしながら、既存の治療方法は、病変部の外科的切除、高気圧酸素療法、ドレナージ、抗菌薬の投与などであるが、完治は困難である。

本研究に関連する国内、国外の動向は、骨に対して放射線照射後の病態を解析した報告がある。その機序は、放射線照射による造血幹細胞の減少や、骨組織内の細胞にアポトーシスが引き起こされ、その結果として骨組織内が虚血状態となり (Knospe WH. et. al, *Blood*, 1966)、骨髄内の間葉系幹細胞周囲の細胞外基質が変性することにより、骨前駆細胞の分化 (Ikeda .S et. al, *Int J Radiat Biol*, 2000)、増殖が抑制されることによって引き起こされることが報告されている (Han B. et. al, *J Orthop Res*, 2008)(図1)。また、放射線照射後、治療過程における間葉系幹細胞は、細胞外基質の遺伝子発現を上昇することが明らかにされており、骨髄壊死の治療には細胞外基質が重要であることが示唆されている (Pritchard MR. et. al, *Cells Tissues Organs*, 2010)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線照射により破壊された骨組織内の細胞外基質を外部から補うことにより、骨前駆細胞の分化や増殖を可能にすることを試みる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

体重約 200g の雄ラットを用いる。鉛版 (厚さ 5 cm) を用いて照射野以外を防御した。当初、下顎骨への照射を試みたが、脳への照射を完全にブロックすることができず、やむを得ず大腿骨への 30 Gy の照射となった。

(2) BMSCs の培養

ラット大腿骨骨髄より骨髄間質細胞を採取し、培養を行った。培養方法は通法に従い、DMEM に 10% 牛胎児血清を含めたものとした。

(3) 放射線照射したラット大腿骨の標本作製

全身麻酔 (ソムノペンチル) をラットに全身投与し、屠殺したのちに 4% パラホルムアルデヒドにて還流固定を行い、通法に従いパラフィン包埋を行った。標本を回収した時間は放射線照射後、1日と8週とした。

(4) 放射線照射したラット大腿骨からのタンパク質の抽出

全身麻酔 (ソムノペンチル) をラットに全身投与し、屠殺したのちに、4 M グアニジン、0.6 M HCl にてタンパク質の抽出を行った。抽出したサンプルは透析チューブにて脱塩、凍結乾燥を行った。

(5) 電気泳動

12% SDS - PAGE ゲルにて電気泳動を行い、クマシーブリリアンドブルー染色にてタンパク質の発現を確認した。

(6) 免疫組織化学染色

放射線照射したラット大腿骨におけるグランザイム B の発現を調べるために、ABC法を用いた免疫組織化学染色を行った。

(7) 培養細胞からのタンパク質の抽出

培養したラット骨髄間質細胞の培養上清から、タンパク質を回収した。当初、細胞接着した細胞からの細胞外基質のみを抽出する予定であったが、収量が非常に少なく、細胞外基質のみを回収することは断念した。

(8) 培養上清中に含まれているタンパク質の同定

培養上清中から回収したタンパク質を質量分析計 (LC / MS / MS) によって同定した。

(9) ラット単径部からの培養上清投与
ラット単径部に 24G シリンジを用いて培養上清の大腿骨への局所投与を試みたが、単径動脈の径が著しく小さく、失敗と終わった。そこで、総頸動脈からの全身投与となった。

4. 研究成果

(1) 放射線照射したラット大腿骨の組織学的評価

放射線照射 1 日目では、ラット大腿骨にはリンパ球などの炎症性細胞浸潤認められ、また、血管腔には血球が大量に認められており、既存の報告と同じようになりかなり強い炎症反応が引き起こされていることが明らかになった。また、放射線照射後 1 日目では骨細胞は消失せず、骨芽細胞も骨髄内の表面に付着していることが明らかになった (図 1)。

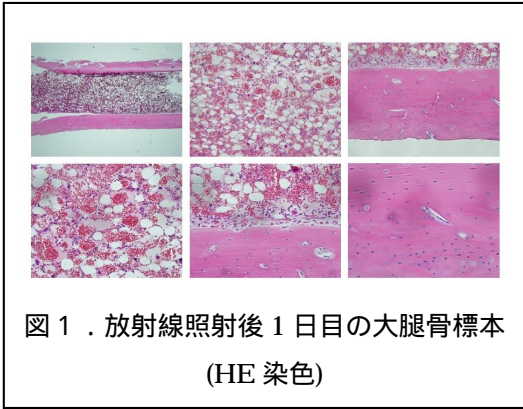


図 1 . 放射線照射後 1 日目の大腿骨標本
(HE 染色)

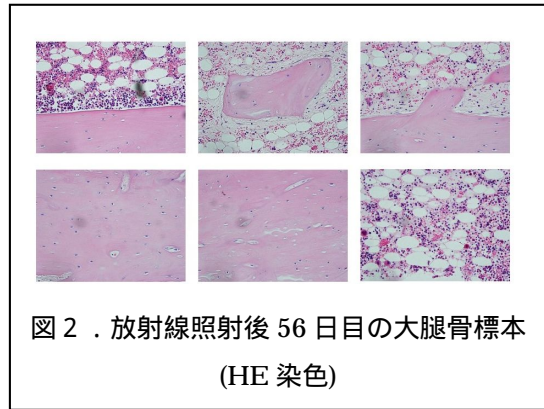


図 2 . 放射線照射後 56 日目の大腿骨標本
(HE 染色)

放射線照射後 56 日目では、炎症性細胞はほとんど認められず、脂肪髄と思われる空洞が認められ、血管腔がほとんど認められなくなっていることが明らかになった。また、骨組織内の骨細胞はほとんど消失しており、さらには、骨組織の骨髄側に並んでいる骨芽細胞は認められなくなった。一方で、既存の報告に見られるように、骨髄内の組織に線維芽細胞様組織は認められなかった(図 2)。

(2) . 放射線照射した骨のタンパク質の発現

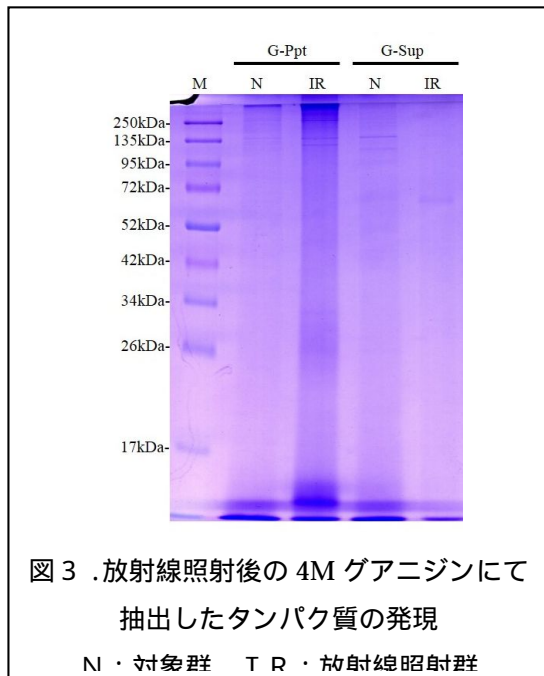


図 3 . 放射線照射後の 4M グアニジンにて抽出したタンパク質の発現
N : 対象群 T R : 放射線照射群

放射線照射したタンパク質の発現を SDS - PAGE にて解析を行ったところ、明らかにタンパク質の発現に違いが認められた。そして、4M グアニジンで抽出したタンパク質の非可溶性成分 (Ppt) は、明らかに分解されたと想定されるタンパク質が低分子量に認められた。しかしながら、発現が異なるタンパク質の種類を同定することは、今回の実験では行うことができなかった(図 3)。

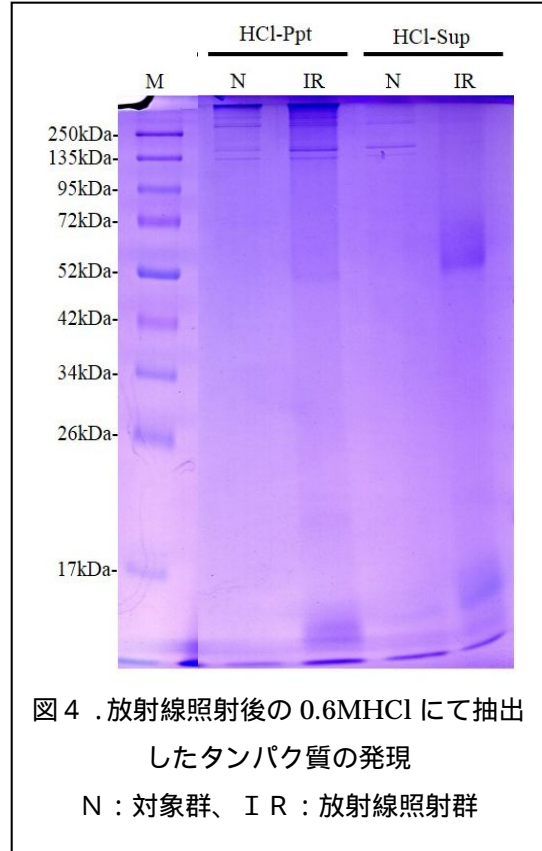


図 4 . 放射線照射後の 0.6MHCl にて抽出したタンパク質の発現
N : 対象群、 I R : 放射線照射群

HCl にて抽出したタンパク質は、カルシウム結合タンパク質が含まれているが、可溶性成分(Sup)の抽出物を比較したところ、明らかに分解産物と思われるタンパク質が低分子量に認められることが明らかになった。その一方で、非可溶性成分(Ppt)の領域には発現の違いは明確には認められなかった(図 4)。これらタンパク質発現の結果から、当初予想された、細胞外基質の変化が放射線照射によって引き起こされている可能性があることが示唆された。

(3) 培養ラット骨髄間質細胞の培養上清に含まれるタンパク質の同定

培養ラット骨髄間質細胞の培養上清を回収し、質量分析法(LC/MS/MS)によって解析したところ、I型コラーゲン、フィブロネクチン、デコリンなどの細胞外マトリックスが主に含まれていることが明らかになった。一方で、かなり多くの種類のタンパク質が含まれていることが明らかになり、ペプチドの一部のみのタンパク質を含めると約 3000 のタンパク質が同定された。しかしながら、培養上清のタンパク質を網羅的に解析することは収量の問題から不可能であった。今

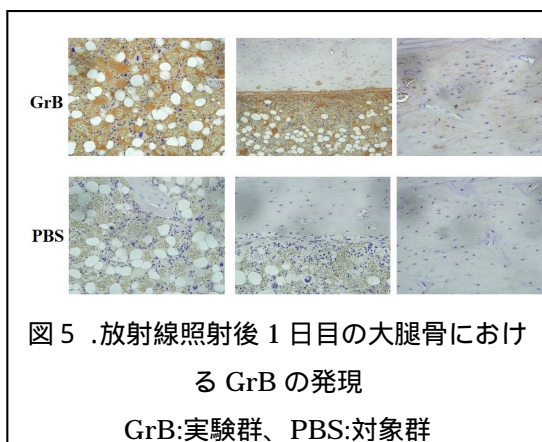
後、細胞外マトリックスを中心としたタンパク質を放射線照射したラットの大腿骨に投与することを検討することとなる。

(4) ラット大腿骨への培養上清の投与

ラット単径動脈からの投与を試みたが、血管径が小さく、局所投与は不可能であった。そこで、総頸動脈からの全身投与を行った。投与量は培養上清の原液 1ml とした。培養上清を投与後、4 週、8 週にて屠殺、評価を計画したが、実験動物の予期せぬ死亡により、今回の実験期間では評価不可能であった。今後、培養上清の投与方法を含めて、検討の余地が残ることとなった。

(5) 放射線照射したラット大腿骨の GrB タンパク質の発現

電気泳動のタンパク質発現解析結果から、放射線照射した骨の細胞外基質が変化していると仮説が立てられたため、紫外線照射後の皮膚に発現している GrB タンパク質の局在を同定した。GrB は、アポトーシスを誘導する因子として知られているが、近年、デコリン、パイグリンなどの細胞外基質を分解する酵素としての機能を有していると考えられている。そこで、放射線照射後 1 日目の GrB の発現を大腿骨にて確認した。



放射線照射後 1 日目の GrB の発現は骨髓内、骨髓血清内、一部の骨組織内に認められた。また、骨に沿って認められる骨芽細胞にも発現は認められた。一方で、放射線照射後 8 週の組織標本では GrB の発現は認められなかった。

この免疫染色の結果から、放射線照射を行うことによって GrB が骨髓内の細胞、骨細胞に発現し、細胞外マトリックスを破壊することによって、骨組織の再生が阻害されているのではないかとこの仮説が導かれると考える。

本研究期間内では、細胞外基質を骨組織内に移植することによって骨髓壊死を回復させることは困難であったが、今後、骨髓壊死の病態に関して研究を行い、治療方法の探索の礎になったと思われる。

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 3 件)

1. Rat bone marrow stromal cell-conditioned medium promotes early osseointegration of titanium implants. , Shuhei Tsuchiya, Kenji Hara, Ikeno M, Okamoto Y, Hideharu Hibi, Ueda M , Journal of Oral and Maxillofacial implants , 28 巻 5 号 (頁:1360-1369), 2013 年, 査読有り
2. Effect of vitronectin bound to insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 on porcine enamel organ-derived epithelial cells. , Shinohara Y, Tsuchiya S, Hatae K, Honda MJ. , International journal of dentistry (頁:1-10), 2012 年, 査読有り
3. In vivo transplantation and tooth repair. , Tsuchiya S, Honda MJ. , Methods in molecular biology , 887 巻 (頁:123-134), 2012 年, 査読有り

[学会発表](計 2 件)

1. 大気圧プラズマ処理したインプラントへのヒト脱落乳歯幹細胞培養上清の応用, 大森 正裕, 土屋 周平, 黒田 健介, 日比 英晴, 上田 実, 第 34 回日本口腔インプラント学会 中部支部総会・学術大会, 2013 年 11 月 17 日, じゅうろくプラザ, 岐阜
2. オッセオインテグレーション早期獲得のためのインプラントへの細胞培養上清の応用, 土屋周平, 日比英晴, 上田実, 日本補綴歯科医学会第 122 回学術大会, 2013 年, 5 月 18 日, 福岡国際会議場, 福岡

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 周平 (Tsuchiya Shuhei)
名古屋大学医学部付属病院・助教
研究者番号: 20569785

(2) 研究分担者

該当無し