

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670874

研究課題名(和文) 骨芽細胞および造血幹細胞の活性化による放射線性骨壊死の治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapy for osteoradionecrosis using the activation of osteoblast and hematopoietic stem cell

研究代表者

佐藤 毅 (Tsuyoshi, Sato)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60406494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨特異的にプラスミドを遺伝子導入させるためのキャリアーとしてFITC-(Asp-Ser-Ser)6がマウスにおいて有用かどうか検討したところ、FITC-(Asp-Ser-Ser)6は骨に移行する事が示された。また、放射線照射を行った骨髄細胞での骨芽細胞分化遺伝子の発現上昇を認め、破骨細胞・脂肪細胞分化遺伝子の発現は変化がなかった。一方で、放射線照射を行った骨髄細胞と脂肪組織由来間葉系細胞を共存培養させると、骨芽細胞のみならず脂肪細胞分化遺伝子の発現上昇を認め、破骨細胞分化遺伝子発現の低下を認めた。

研究成果の概要(英文)：We examined whether FITC-(Asp-Ser-Ser)6 is a useful carrier for transfection into bone specifically and showed that it was incorporated to bone tissue. We found that osteoblastic gene was upregulated in irradiated bone marrow cells. On the other hand, not only co-culture osteoblastic gene but also adipogenic gene was upregulated and osteoclastic gene was downregulated in irradiated bone marrow cells co-cultured with adipose-derived mesenchymal stem cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：放射線 骨髄細胞 脂肪組織由来間葉系幹細胞 骨芽細胞 脂肪細胞 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

頭頸部の悪性腫瘍(癌)に対する放射線治療は機能および形態の温存には欠かせない治療法であるが、顎骨骨髓に放射線が照射されることで、まれに皮膚や口腔粘膜に潰瘍形成が起こり骨露出をきたす放射線性骨壊死という病気が引き起こされることがある。また、放射線が照射した顎骨において、歯周病の急性発作などをきたす場合や抜歯処置を行った場合には骨髓炎を発症する確率が高く、顎骨に腐った骨ができるいわゆる顎骨壊死に至ることがある。放射線性骨壊死に対する治療として、抗菌薬投与・洗浄、腐骨分離を待ち腐骨除去を行う方法あるいは、高気圧酸素療法が行われる。しかしながら、放射線骨壊死に対する有効な治療法はいまだ確立されていない。

神経系は骨髓の中まで及ぶが、骨髓においては神経系以外にも骨代謝調節を制御する機構が存在すると考えている。そこで、骨髓に存在する造血幹細胞に着目した。造血幹細胞は骨芽細胞と niche を形成しており(Calviら Nature 2003)、骨芽細胞との相互作用が重要であると考えられている。最近、Seslerらは骨芽細胞における NFAT シグナルの低下により造血幹細胞の増殖が引き起こされること、in vivo にて骨芽細胞特異的 NFAT シグナル遮断により骨量が増加することを示した(Seslerら Clin Dev Immunol 2013)。つまり骨芽細胞において NFAT シグナルの低下を起こすことが重要と考えられる。また、Hanらにより脂肪組織にも造血幹細胞が存在することが示された(Hanら Blood 2010)ことから、骨髓の機能が喪失されても脂肪組織からの供給が可能ではないか、と考えた。造血機能の回復と骨量の増大が同時に可能であれば、放射線性骨壊死に対する治療に有効ではないかと考えた。そこで、遺伝子治療は効率性やウイルスの安全性などが問題となっているため、われわれは骨表面の細胞特異的に遺伝子導入を可能とする手法に着目した(Zhangら Nat Med 2012)。

2. 研究の目的

本研究は、造血幹細胞を活性化することで骨髓の機能を回復し、放射線性骨壊死を治療する方法を開発するための基礎的研究である。本研究の目的は、骨特異的にプラスミドを遺伝子導入させるためのキャリアーとして FITC-(Asp-Ser-Ser)₆ がマウスにおいて有用かどうか検討することと、放射線照射を行った骨髓細胞での骨芽細胞・破骨細胞・脂肪細胞系の遺伝子発現の変動と放射線照射を行った骨髓細胞に脂肪組織由来間葉系細胞との共存培養における骨芽細胞・破骨細胞・脂肪細胞系の遺伝子発現の変動について検討することである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物として C57BL/6J(メス、10週齢)を使用した。

(2) 細胞培地

培地の組成は、血清として 10% ウシ血清(FBS)、抗菌薬として 1%ペニシリン・ストレプトマイシン(P/S)を含有した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を使用した。

(3) 骨髓細胞及び脂肪幹細胞の採取

骨髓細胞の採取法は以下の通りである。ツベルクリン針をつけた 1mL シリンジに DMEM 培地を 1mL 入れた。マウスの脛骨および大腿骨を採取し、各骨の両骨端部を剪刀で切断し、片方の断端から DMEM 培地を勢いよく流し、骨髓内腔をフラッシュして内部の細胞を 50mL チューブに集めた。1つの骨に対してこの操作を 3 回繰り返して細胞を回収した。細胞を遠心して 24-well plate に $6 \times 10^4/cm^2$ で播種した。

脂肪組織由来間葉系細胞は以下のように採取した。皮下脂肪組織を摘出して剪刀にて細かく切断した。これを Hank 緩衝液で洗浄後、細胞外基質をコラゲナーゼにて 37 で処理した。1,200 回転で遠心後、40 μ m フィルターに通して細胞を回収し凍結保存した。

(4) 放射線照射

骨髓細胞を 24 時間培養後、放射線照射群には放射線照射を行った。条件は 40Gy・150kV・20mA・17 秒間、フィルターは 0.5Al・0.1Cu で行った。

(5) 共存培養

保存した脂肪組織由来間葉系細胞を解凍し、24-well plate に用意した骨髓細胞に $3 \times 10^4/cm^2$ で播種し共存培養を行った。

(6) 定量 RT-PCR

回収した細胞から ISOGEN (ニッポンジーン)を用いて RNA 抽出を行った。定量 RT-PCR には Applied Biosystems Prism 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies 社)を用い、プロトコールは添付文書に従って行った。Total RNA は ISOGEN を用いて抽出し、逆転写酵素反応は High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies 社)を用いた。ウラシル-DNA グリコシラーゼ(UNG)用いて 50 で 2 分間処理し、AmpliAq Gold DNA ポリメラーゼ用いて、95 で 15 秒間の変性と 60 で 60 秒間のアニーリングと伸長で 40 サイクル行い、増幅した。得られた結果は、GAPDH をコントロールとし、相対的な値を Applied Biosystems Prism Sequence Detection Software version 2.1 (Life Technologies 社)にて分析した。使用したプライマーは次の配列である。osterix, forward; GAGGAAGAAGCCCATTCACA, reverse; GCAGGCAGGTGAACCTTCTTC: runx2, forward; GCGTATTT CAGATGATGACA, reverse; TACCATTGGGAAGCTGATAGG, PPAR γ 2, forward; AAGAGCTGACCAATGGTTG, reverse; ACCCTTGATCCTTCACAAG, NFATc1, forward;

ATGCCAAATACAGCTTTCCAGTC, reverse;
 CGTCTTCCACCTCCACGTCG, b-actin, forward;
 AGAAGGACTCCTATGTGGGTGA, reverse;
 CATGATCTGGGTATCTTTTCA.

(7) 生体蛍光検出法

生体に投与した物質が取り込まれているかどうかを調べるため、物質に蛍光標識を行い、Clairvivo OPT を用いて検出した。投与する物質は(Asp-Ser-Ser)₆(DSS)₆であり、蛍光標識である FITC を組み込んだ FITC-(DSS)₆ を作製し、27 μ mol/kg (100 μ L) で投与した。対照群にはリン酸緩衝液 (PBS) を同量投与した。投与方法は腹腔内投与とした。

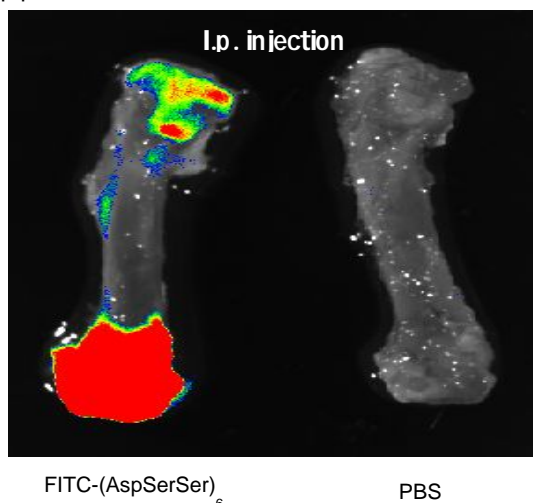
4. 研究成果

<マウスにおける骨デリバリーシステムの構築>

骨髄の内部で、骨を作る細胞において NFAT 遺伝子が活性化できなくなることにより血液を作る細胞の増殖が引き起こされ、骨を作る細胞が活性化され、骨の量が増加することが報告されている (Sesler ら Clin Dev Immunol 2013)。マウスの生体に対して、NFAT 遺伝子の活性化を低下させるような合成ペプチドを骨組織の細胞に導入し、血液を作る細胞の増殖を引き起こし、骨を作る細胞を活性化させることができるか、検討を行うことが必要である。そのため、まず骨組織に吸着するペプチドをマウスに投与して、骨組織に取り込まれるのかどうかを調べた。

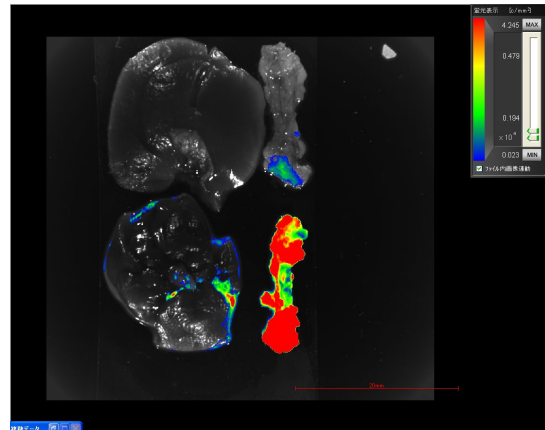
Zhang らは、ラットにおいて石灰化面に吸着するペプチドである (DSS)₆ を組み込んだリポソームを血中に入れると、ペプチドが骨面に吸着することを発見し、デリバリーシステムを構築している。われわれはマウスにおいてこのデリバリーシステムが有効かどうかを調べた。まず FITC という蛍光タンパク質を標識した (DSS)₆ のペプチドである FITC-(DSS)₆ を作製した。この FITC-(DSS)₆ をマウスの腹腔内に投与し、48 時間後に大腿骨を摘出して Clairvivo OPT という蛍光タンパク質を検出できる機器を用いて、大腿骨における蛍光の検出を行った。その結果、蛍光タンパク質は大腿骨頭付近に強く集積していることが明らかとなった (図 1)。

図 1



さらに、投与した物質が肝臓に取り込まれているか (代謝されるか) どうかを確認したところ、肝臓にも取り込まれていた (図 2)。

図 2



<放射線照射を行った骨髄細胞と脂肪組織由来間葉系細胞との共存培養による遺伝子発現の変動>

骨髄細胞について以下の群を設定した。

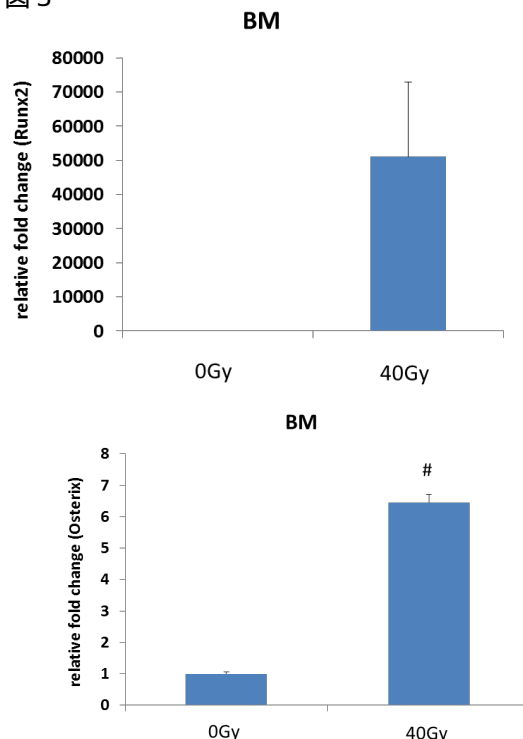
BM(0Gy)群：骨髄細胞を培養する群

BM(40Gy)群：放射線照射した骨髄細胞を培養する群

上記の群において、骨芽細胞分化、脂肪細胞分化、破骨細胞分化に関わる遺伝子の発現を検討した。

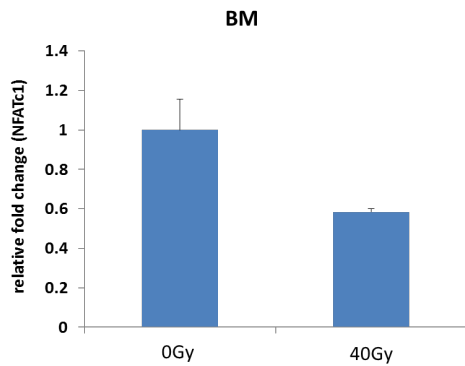
骨芽細胞分化マーカーである Runx2 および osterix について定量 RT-PCR を行ったところ、40Gy の放射線照射により、Runx2 発現が上昇し (有意差なし) osterix 発現が有意に上昇した (図 3)。

図 3



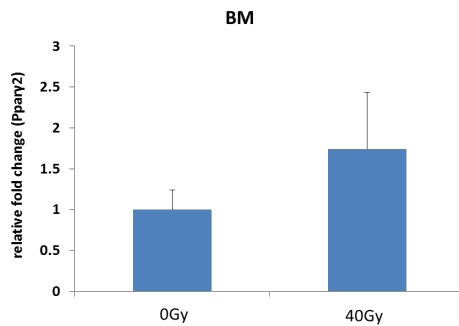
破骨細胞分化マーカーである NFATc1 について定量 RT-PCR を行ったところ、40Gy の放射線照射により、NFATc1 発現に変化はなかった (図 4)。

図 4



脂肪細胞分化マーカーである PPAR γ 2 について定量 RT-PCR を行ったところ、40Gy の放射線照射により、PPAR γ 2 発現に変化はなかった (図 5)。

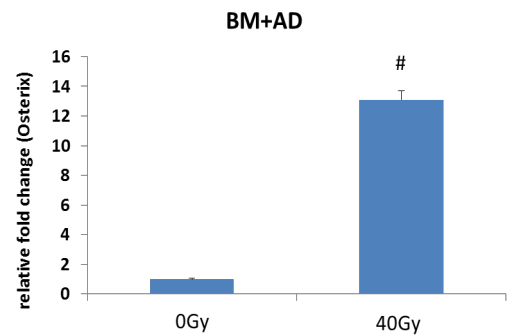
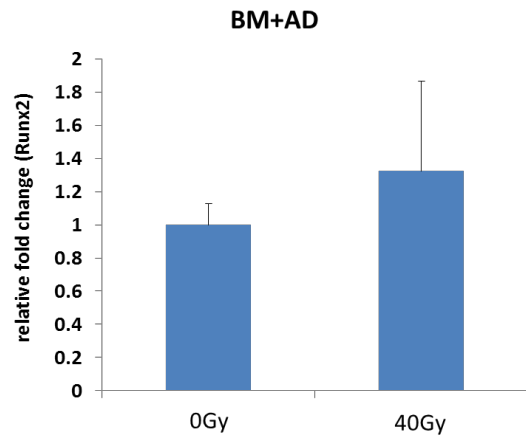
図 5



次に、骨髄細胞と脂肪組織由来間葉系細胞の共存培養について以下の群を設定した。
 ADBM(0Gy)群：骨髄細胞と脂肪組織由来間葉系細胞とで共存培養する群
 ADBM(40Gy)群：放射線照射した骨髄細胞と脂肪組織由来間葉系細胞とで共存培養する群
 上記の群において、骨芽細胞分化、脂肪細胞分化、破骨細胞分化に関わる遺伝子の発現を検討した。

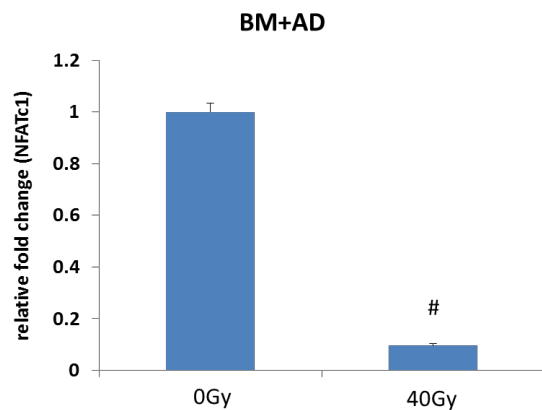
骨芽細胞分化マーカーである Runx2 および osterix について定量 RT-PCR を行ったところ、40Gy の放射線照射により、Runx2 発現に変化はなかったが、osterix 発現が有意に上昇した (図 6)。

図 6



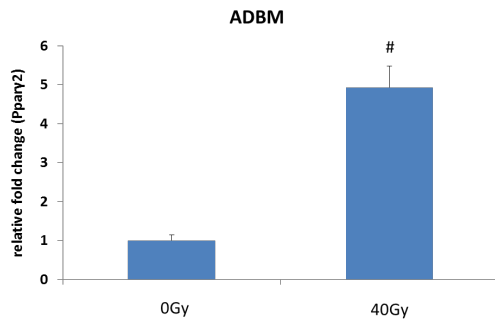
破骨細胞分化マーカーである NFATc1 について定量 RT-PCR を行ったところ、40Gy の放射線照射により、NFATc1 発現が有意に低下した (図 7)。

図 7



脂肪細胞分化マーカーである PPAR γ 2 について定量 RT-PCR を行ったところ、40Gy の放射線照射により、PPAR γ 2 発現が有意に上昇した (図 8)。

図 8



以上の結果より、放射線照射を行った骨髄細胞に脂肪組織由来間葉系細胞が存在すると骨や脂肪への分化は起こる可能性があるが、破骨細胞への分化は起こりにくいことが示唆された。

5．主な発表論文等
該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 毅 (Sato Tsuyoshi)
 埼玉医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：60406494

(2)研究分担者

臼井 通彦 (Usui Michihiko)
 九州歯科大学・歯学部・准教授
 研究者番号：10453630

水野 洋介 (Mizuno Yosuke)
 埼玉医科大学・医学部・講師
 研究者番号：30406532