

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893248

研究課題名(和文)骨再生効果を増強した組換え成長因子による低侵襲性骨再生法の開発

研究課題名(英文)The development of minimally invasive bone regeneration with recombinant growth factor enhanced the bone regeneration effect

研究代表者

横田 潤 (Jun, Yokota)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：60733730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では複数の成長因子の効果を効率よく作用させるためにMSCへ遺伝子導入し、骨芽細胞分化能を評価した。またTGF- β ならびにVEGFにも着目し、MSCの骨芽細胞分化能に及ぼす影響について検証した。その結果、ベクター濃度依存的に骨芽細胞へと有意に分化促進させた。またTGF- β ならびにVEGFをMSCへ同時刺激すると、細胞増殖能は低下し、骨芽細胞分化マーカー(ALP、BSP、OCN)の発現が有意に促進した。またERKのリン酸化が増強されることも明らかとなった。これらの結果より遺伝子導入ならびに複数成長因子によりMSCは有意に骨芽細胞へと分化し、骨再生治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to affect growth factors to the mesenchymal stem cells (MSC), we transfected plasmid vector, and evaluate the osteogenic differentiation. And we also investigated the effects of TGF- β and VEGF on the osteogenic differentiation of MSC. As a result, BMP-2 plasmid vector induced matrix mineralization in the MSC in a dose-dependent manner. TGF- β and VEGF stimulated to the MSC, cell proliferation was downregulated, but osteo differentiation markers (ALP, BSP, OCN) expression was significantly upregulated. Furthermore TGF- β and VEGF induced extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation. These findings indicated that gene transfection and the combination of TGF- β and VEGF were significantly differentiated MSC into osteoblasts, and our findings provide insight into the establishment of novel therapeutic methods for bone formation.

研究分野：再生医療

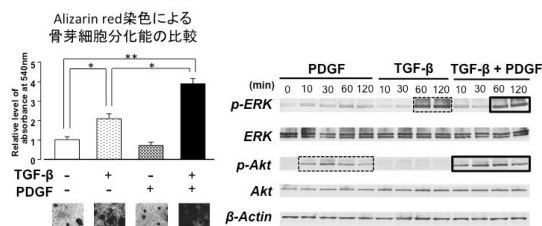
キーワード：遺伝子導入 骨再生

1. 研究開始当初の背景

歯を喪失した場合の機能回復の方法として、近年は治療効果と予後の観点からデンタルインプラントが適用となる症例が激増している。一方、骨量の有無が重要なポイントとなるため、抜歯後の顎骨・歯槽骨の維持または回復が重要視されている。しかしながら、抜歯後または、抜歯に至る過程ですでに骨吸収が亢進し、歯槽骨が失われている症例も多々見受けられる。失われた歯槽骨の回復手段として自家骨移植がゴールド・スタンダードとされているが、患者への侵襲や負担は決して小さくはない。

このような背景から、現在まで骨芽細胞を活性化する新規生体材料の開発や各種成長因子の利用等、様々な試みがなされている。近年、多血小板血漿 (platelet-rich plasma、PRP) や次世代 PRP として知られる CGF (Concentrated growth factors) は硬組織再生のみならず軟組織再生も促進するとされ、注目されている。PRP や CGF といった血小板濃縮血漿にはとりわけ主要成長因子として vascular endothelial growth factor (VEGF)、platelet derived growth factor (PDGF)、insuline-like growth factor-I (IGF-I)、transforming growth factor- β (TGF- β) が豊富に存在しており、これら成長因子の働きによって骨再生促進作用を発揮することが示唆されている。

申請者は複数の成長因子の相乗効果について着目し、これまでに間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells、MSC) の骨芽細胞分化におよぼす影響を評価した。その結果、MSC における TGF- β 誘導性の骨芽細胞分化は MEK/ERK 経路に依存すること、さらにこの骨芽細胞分化は PDGF 刺激による PI3K/Akt 経路の活性化に伴って相乗的に促進されることを明らかにした (Yokota et al., 2014、図 1)。



(図1) PDGF、TGF- β による相乗効果

しかしながら成長因子を利用した骨再生療法は、個々の成長因子における作用強度の差異や、異なる半減期を補完するための反復投与の必要性が問題視され、効果的な臨床応用には至っていないのが実情である。そこで本研究では、これらの問題点を解決するために、in vivo 遺伝子導入法に着目する。近年、遺伝子導入を用いた遺伝子治療が臨床でも応用されつつあり、前述の問題等が解消される可能性が高い。遺伝子導入法としては効率の良いウイルスベクターを用いることが多

いが、ウイルスの毒性が問題視される。そのため本研究では安全性に配慮し、プラスミドベクターを用いた in vivo 遺伝子導入法に注目した。さらには複数の成長因子の中で、TGF- β ならびに骨軟骨移行を促進させる VEGF が MSC の骨組織形成能獲得に及ぼす影響についても着目した。

2. 研究の目的

本研究では遺伝子導入法に着目し、組換え融合タンパクの発現ベクターを遺伝子導入することにより、効果的に MSC へ発現・作用させる、骨芽細胞へと分化させることを検証する。併せてその他の成長因子の組み合わせによる、さらなる骨芽細胞分化促進効果を検証する。

3. 研究の方法

- (1) 細胞：ヒト骨髄由来不死化間葉系幹細胞
- (2) 骨芽細胞分化誘導：デキサメタゾン、アスコルビン酸、グリセロリン酸、10% FBS を含む MEM を骨分化誘導基礎培地として MSC を培養した。骨分化誘導基礎培地の添加と同時に VEGF、TGF- β それぞれの単独、及び 2 種類の成長因子の組み合わせで添加した。
- (3) 遺伝子導入：BMP-2 プラスミドベクターをリポフェクタミンにて本細胞へ遺伝子導入した。また遺伝子導入していない、BMP-2 成長因子を添加し、実験群と骨芽細胞分化能を比較、検証した。
- (4) 評価項目

WST-1 Assay：細胞増殖能
 ALP 染色：骨芽細胞への分化状態や骨組織における分布
 Alizarin Red 染色：細胞間気質に沈着したカルシウム結晶
 リアルタイム RT-PCR：骨芽細胞分化マーカー遺伝子であるアルカリフォスファターゼ (ALPL)、骨シアロプロテイン (BSP)、オステオカルシン (BGLAP) の mRNA 発現量の変動
 ウェスタンブロット：TGF- β 単独及び VEGF との同時刺激によるシグナル伝達系の解析

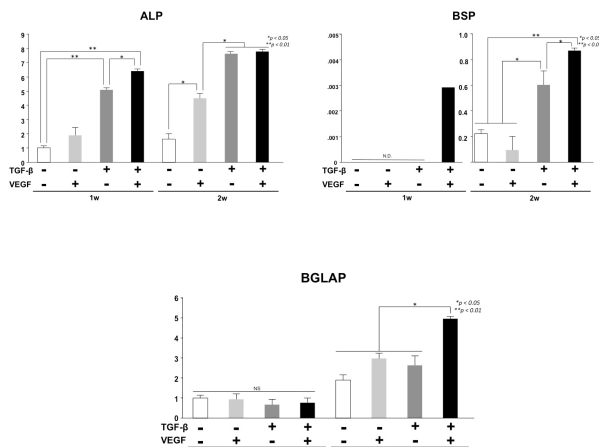
(5) 動物実験

10 週齢雄性 S.D. ラット頭蓋骨へ直径 6mm の骨欠損を形成した。実験群には術後 8 週に渡り、BMP-2 プラスミドベクターを in vivo 導入試薬と共に注射で局所投与し、対照群には生理食塩水を注射した。術後 4 週、8 週それぞれの時点でイソフルラン吸入麻酔下にてマイクロ CT の撮影を施行し、骨再生の程度をエックス線学的に評価した。

4. 研究成果

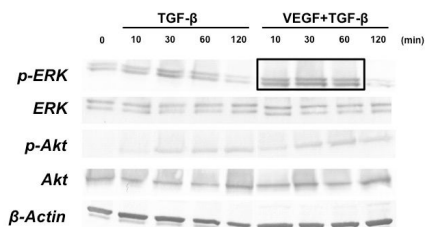
- (1) BMP-2 プラスミドベクターならびに遺伝子導入試薬の濃度依存的に骨芽細胞へと有意に分化促進させ、BMP-2

- 単独添加と比較してもその差は顕著であった。
- (2) VEGF、TGF-beta 単独添加ではコントロールと比較して細胞増殖能が促進されたが、同時添加したところ抑制された。
 - (3) VEGF、TGF- β を同時添加したところ、TGF- β 単独よりも顕著に骨芽細胞へと分化した。また染色面積を測定したところ、より多くの MSC が骨芽細胞へと分化していることが確認された。
 - (4) VEGF を単独添加したところ顕著な石灰化は確認されなかったが VEGF、TGF- β を同時添加したところ、TGF- β 単独よりも顕著に石灰化が増強された。
 - (5) 培養1週では TGF- β 単独刺激により ALPL の mRNA 発現量が有意に増加し、この効果は TGF- β と VEGF の同時添加によりさらに増強された。さらに単独添加では認められなかった BSP の発現も同時添加では認められた。培養2週では TGF- β と VEGF の同時添加により BGLAP の発現も有意に増加した(図2)。



(図2)

- (6) TGF- β による刺激により ERK のリン酸化が増強され、その作用は VEGF を同時刺激にすることでリン酸化がさらに増強された(図3)。



(図3)

- (7) マイクロCTによる観察では、遺伝子導入によって骨形成が促進される傾向が認められたが、使用したプラスミド濃度が高かったためか、対照側の骨再生にも影響が出た

可能性があり、個体間の差が大きかった。以上の結果より in vitro において遺伝子導入し、MSC を骨芽細胞へと有意に分化促進させ、さらにその他の成長因子を用いることでより効率的な骨組織再生促進が可能となることが示唆された。

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2件)

1. Taira M., Hatakeyama W., Yokota J., Chosa N., Ishisaki A., Takafuji K., Kihara H., Kondo H., Hattori M. Tracking GFP-labeled transplanted mouse MSC in nude mice using in vivo fluorescence imaging Nano Biomedicine. 2014 6:73-77.
2. Chosa N., Kikuchi-Aomatsu E., Nishihira S., Yokota J., Takahashi N., Kondo H., Sugiyama Y., Miura H., Ishisaki A. Signaling pathways for maintaining the stemness of mesenchymal stem cells. Dent. J. Iwate Med. Univ. 2014 39:56-65.

〔学会発表〕(計6件)

1. 横田 潤、武部 純、西郷 慶悦、石崎 明、近藤 尚知:陽極酸化・水熱処理チタン上でのマウス間葉系幹細胞への影響 第45回日本口腔インプラント学会学術大会 2015年9月21日 岡山
2. 五十嵐靖之、横田 潤、井上 学、鬼原英道、近藤 尚知:GFP マウス骨髄由来間葉系幹細胞株の骨分化における成長因子の影響 日本補綴歯科学会第124回学術大会 2015年5月29日 埼玉
3. 三浦 真悟、畠山 航、横田 潤、折祖研太、近藤 尚知:下顎骨辺縁切除術を行った患者に対して口腔前庭拡張術、インプラントオーバーデンチャーを適用した1症例 公益社団法人日本口腔インプラント学会第35回東北・北海道支部学術大会 2015年11月21日 仙台
4. 横田 潤、五十嵐 靖之、帖佐 直幸、鬼原 英道、近藤 尚知、石崎 明: TGF- β と VEGF の同時刺激による間葉系幹細胞への骨分化促進効果 第87回日本生化学会大会 2014年10月 京都
5. 横田 潤、西郷 慶悦、佐々木 健、澤田 愛、近藤 尚知:間葉系幹細胞ならびに TGF- β 、VEGF を併用した歯槽骨造成法に関する研究 第44回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 2014年9月 東京
6. 五十嵐 靖之、横田 潤、佐藤 友秀、原 淳、近藤 尚知:GFP マウス骨髄由来間葉系幹細胞株の骨分化における BMP-2 の影響 第44回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会

2014年9月 東京

7. Kihara H, Takafuji K, Miura S, Hatakeyama W, Yokota J, Matumoto C, Kondo H : Bone Augmentation at Maxillary Sinus Using Plate Shape of Beta-Tricalcium Phosphate The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration 2014年7月 北海道

〔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

<http://prosthodontics.iwate-med.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 潤 (JUN YOKOTA)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：60733730

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし