

平成 31 年 5 月 2 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15832

研究課題名(和文)薬物性顎骨壊死の予防療法としての破骨細胞デリバリー療法についての研究

研究課題名(英文)A study on osteoclast-delivery therapy to anti-resorptive agent-related osteonecrosis of the jaw.

研究代表者

池邊 哲郎(Ikebe, Tetsuro)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：20202913

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文): 薬物関連顎骨壊死の原因の1つは薬物による破骨細胞の死滅とそれによる骨代謝の停止であることから、病変部に破骨細胞や骨芽細胞を移植することによって顎骨壊死が改善できるか否かを調べた。破骨細胞・骨芽細胞の輸送体としてDNA/プロタミン複合体および近赤外線照射で発熱するDNA/高分子被覆型カーボンナノチューブ複合体を利用した。両素材とも破骨細胞の分化培養および骨芽細胞培養が可能であった。両素材をゾレドロン酸投与したマウスの頭蓋骨欠損部に移植すると対照群に比べて骨形成の促進が見られた。マウス顎骨壊死モデルでの良好な結果は得られていないが、今後の顎骨壊死の新規治療法への期待が持てる結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症は高齢者の転倒に伴う骨折を増加させ、その結果寝たきりとなって生命予後を低下させる。ビスホスホネートやデノスマブなどの骨吸収抑制薬は、骨粗鬆症の治療に極めて有効であるが、一方、抜歯などを契機として難治性の顎骨壊死を引き起こし患者QOLの低下を招く。従って骨粗鬆症の治療を促進するためには顎骨壊死を制御することが重要である。本研究は顎骨壊死治療法の1つのアイデアとして、顎骨病巣に骨代謝関連細胞を移植して新生骨を誘導させるものであったが、その結果として細胞移植のための有効な担体を作製できた。本研究のこれからの展開は、顎骨壊死の治療を通して健康寿命の延伸に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文): The occurrence of anti-resorptive agent-related osteonecrosis of the jaw (ARONJ) is supposed to be due to the elimination of osteoclasts and suppression of bone turnover. Thus, the graft of exogenous osteoclasts or osteoblasts into the lesion may improve the symptom of ARONJ. I investigated two new materials, DNA/Protamine complex and DNA/polymer-coated carbon nanotubes complex as a carrier of delivering osteoclasts to the lesion. I confirmed that the mouse bone marrow cells derived osteoclasts and osteoblast cell lines could express their marker molecules in the cultures on both carrier materials. When both carrier materials containing osteoclasts or osteoblasts, which were grafted into the bone defect of calvaria as well as tooth extraction socket of mandible in the mice with or without the treatment of zoledronic acid, the new bone formation was promoted in the calvaria defect, but not extraction socket. The results of this project are promising for a new therapy of ARONJ.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎骨壊死 破骨細胞 骨吸収抑制薬 ARONJ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート (BP) をはじめとする骨吸収抑制薬が契機となって発症する顎骨壊死 (薬物関連顎骨壊死、骨吸収抑制薬関連顎骨壊死) は、骨粗鬆症患者の増加に伴い高齢者を中心として症例数が年々増加している。いったん発症した顎骨壊死は難治性であり、在宅や老健施設の要介護高齢者に発症する例が増え、口腔医療を担当する歯科医師にとって大きな脅威となっている。顎骨壊死の治療法として、米国のガイドラインでは、顎骨を温存する保存的治療が推奨されているが、健常骨を含めて外科的に切除する方法 (下顎区域切除など) が治療期間も短く根治性が高いとする報告や副甲状腺ホルモンの注射薬 (テリパラチド) が有効であるとの報告もあり、いまだ有効な治療法はないと言える。近年、破骨細胞を抑制する抗 RANKL 抗体デノスマブやがんの分子標的治療薬も顎骨壊死を招くことが報告され、原因薬物の種類が増加している。従って、高齢者社会、特に在宅高齢者の口腔医療を考えた場合、患者の QOL を著しく低下させる顎骨壊死の克服は極めて重要である。本研究の目的は BP によって破骨細胞が枯渇した顎骨に外部から破骨細胞を移植することによる顎骨壊死の改善法を検証することにある。

2. 研究の目的

骨のホメオスタシスには骨吸収と骨新生とのカップリングが必要であると云われているが、薄い歯肉粘膜を通して外的刺激を受けやすく新陳代謝の激しい顎骨では、骨吸収と骨新生のバランスが他部位よりも重要であり、骨吸収を担う破骨細胞は顎骨のホメオスタシスに中心的な役割を担っているであろう。顎骨壊死では破骨細胞が抑制されて骨吸収と骨新生のバランスが崩れていることが原因と考えられるため、その治療には破骨細胞を正常化することが必要であろう。そこで抜歯窩周囲の歯槽骨に、健全な破骨細胞を供給 (移植) することができれば骨リモデリングが回復して顎骨壊死が改善するのではないかと考えて本研究を着想した。顎骨へ破骨細胞を供給するためには、破骨細胞を局所に動員するための細胞デリバリーシステムを開発することが必要である。そこで、申請者施設の福島博士が開発した生体内吸収性 DNA/プロタミン複合体を細胞デリバリーのための担体として利用し、同素材の上に前破骨細胞を播種・培養し、それを BP 投与マウスの抜歯窩に充填することによって顎骨壊死の発現および進行を解析することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) 細胞デリバリー担体としての DNA/プロタミン複合体と DNA/高分子被覆型カーボンナノチューブ複合体の作製

水産加工の際に大量に廃棄されるサケの白子 DNA の有効利用を研究する過程で、DNA とプロタミンとの複合体が福岡歯科大学再生医学研究センターで開発されている。DNA/プロタミン複合体は、水に不溶性だが、生体内の酵素で分解され、抗菌作用を有し、DNA/プロタミン複合体上での線維芽細胞生存率はほぼ 100% で、生体親和性に優れている。ペースト状にできるため抜歯窩填入も可能である。また、福岡歯科大学材料工学分野の川口稔講師の協力で、単層カーボンナノチューブに分散安定性を与えるためにポリエチレングルコールを共重合させた高分子被覆型カーボンナノチューブを DNA と混合した新規素材を作製し、細胞輸送担体としての適性を解析する。

2) 破骨細胞 / DNA/プロタミン複合体の作製

マウス長管骨から骨髓を採取し、骨髓細胞を培養する。培地に M-CSF と RANKL を添加し、骨髓細胞に含まれる骨髓幹細胞から単核の前破骨細胞へ分化誘導させ、円板状にした DNA/プロタミン複合体上に播種する。ここで、7日間培養し、RANKL 添加による多核破骨細胞への分化能および細胞の生存率を調べ、DNA/プロタミン複合体と破骨細胞との親和性を検証する。同様には骨芽細胞 MC3T3-E1 を培養して、Runx2 や Osterix などの骨形成関連分子の発現を調べる。DNA/カーボンナノチューブ複合体においても同様の実験を行う。

3) マウス頭蓋骨欠損部への移植実験

マウス頭蓋骨に直径 5mm の骨欠損を作り、DNA/プロタミン複合体または DNA/カーボンナノチューブ複合体を填入し、3か月まで飼育し、骨新生をマイクロ CT および病理組織像で解析する。次に素材に破骨細胞または骨芽細胞を培養したものを同様にマウス頭蓋骨欠損部に填入し、新生骨形成を解析する。

4) ビスフォスフォネート投与マウスへの移植実験マウスの腹腔内にゾレドロン酸 (250 μ g/kg) を 1 週間に 2 回、計 2 週間注射し、頭蓋骨の骨欠損を作製して 3) と同様の実験を行う。

5) マウス抜歯窩への応用ゾレドロン酸を注射されたマウスの上顎第 1 大臼歯を抜歯した後、(1) 抜歯直後に素材を抜歯窩に填入 (移植) して、顎骨壊死発症を予防できるかどうかと、(2) 抜歯後に発症した壊死骨周囲に素材を移植した後の顎骨壊死の変化を、それぞれ調べる。

4. 研究成果

1) DNA/プロタミン複合体上にマウス骨髓細胞を播種し、M-CSF (50ng/ml)+RANKL (80ng/ml) で処理することによって破骨細胞へ分化誘導 (TRAP 陽性、NF- κ B 活性化、pit formation)

することができた。

2) DNA/プロタミン複合体上で骨芽細胞 MC3T3-E1 を培養することができた。骨芽細胞の in vitro 実験で、DNA/プロタミン複合体中の DNA が骨芽細胞の ALP、Runx2 と Osterix の発現を促すことがわかった。また、DNA によってリン酸輸送体 SLC20A1 の発現が増加し、リン酸輸送体のインヒビターによって骨芽細胞マーカー (ALP、Runx2、Osterix) の発現が低下することから、DNA 中のリン酸に骨芽細胞活性化作用 (骨形成作用) があることがわかった。

3) マウス頭蓋骨の骨欠損部分に DNA/プロタミン/破骨細胞複合体および DNA/プロタミン/骨芽細胞複合体を移植すると 3 か月で新生骨形成が促進された。両細胞間に有意な差は認められなかった。

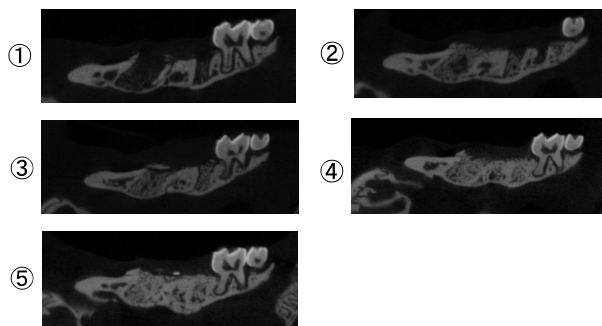
4) 破骨細胞および骨芽細胞を移植するための新規担体素材として高分子被覆型カーボンナノチューブの細胞親和性等を調べた。高分子被覆型カーボンナノチューブの分散安定性、マウス生体内動態 (肝臓集積) を確認した。

5) DNA/高分子被覆型カーボンナノチューブ複合体に近赤外線を照射すると 40 以上の発熱効果を示したが、本素材中の破骨細胞および骨芽細胞の生存率 (viability) には差がなかった。また近赤外線照射によって破骨細胞の TRAP 発現と pit formation および骨芽細胞の ALP と Runx2 発現に効果は認められなかった。

6) 破骨細胞および骨芽細胞を培養した DNA/高分子被覆型カーボンナノチューブ複合体をマウス頭蓋骨の骨欠損部に移植したところ、3 か月で新生骨形成が見られたが、DNA/プロタミン/破骨細胞複合体と有意な差は認められなかった。

7) マウス腹腔にゾレドロン酸 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を 1 週間に 2 回、計 2 週間注射した上で、頭蓋骨に骨欠損を作製し、DNA/プロタミン/細胞複合体および DNA/高分子被覆型カーボンナノチューブ/細胞複合体を移植し、3 か月に屠殺し、新生骨形成を分析した。その結果、ゾレドロン酸投与群でも複合体の新生骨促進作用が見られたが、ゾレドロン酸投与群と非投与群の間に新生骨形成量に有意な差は認められなかった。

8) マウス腹腔にゾレドロン酸を注射した後、下顎臼歯を抜去し、そこに、コントロール (素材填入なし)、DNA/プロタミン複合体、DNA/プロタミン/細胞複合体、DNA/高分子被覆型カーボンナノチューブ複合体、DNA/高分子被覆型カーボンナノチューブ/細胞複合体、をそれぞれ填入し、抜歯窩は歯肉を寄せて閉鎖した。3 か月後に屠殺し抜歯窩新生骨の形成程度を比較した。コントロールと比較すると、②~⑤群ともにマイクロ CT にて有意に新生骨形成が見られたが、し



かしながら ②~⑤間に有意な差はなかった。細胞が移植されてもされなくても、移植された細胞が破骨細胞であろうと骨芽細胞であろうと、新生骨量に差がなかった。

9) 8) の実験で予想された結果が出なかったため、マウス抜歯部に顎骨壊死を誘導し、そこに破骨細胞を移植する実験までには至らなかった。8) に実験結果の解析のため 7) の実験に立ち返って改善策を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mori K, Kawaguchi M, Fujigaya T, Ohno J, Ikebe T. Polymer-coated carbon nanotubes as a molecular heater platform for hyperthermic therapy. *Journal of Hard Tissue Biology* 27 : 139-146, 2018 <https://doi.org/10.2485/jhtb.27.139>

〔学会発表〕(計 2 件)

勝俣 由里, 鍛冶屋 浩, 首藤 俊一, 池崎 晶二郎, 田中 文恵, 永嶌 勝之, 永沼 香織, 見立 英史, 米津 博文, 泉 喜和子, 平木 昭光, 池邊 哲郎 サケ DNA スカフォールドはリン酸輸送体の活性を介して骨形成を促進する 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2017 年 4 月 28 日 松山市

森 紘一郎, 川口 稔, 勝俣 由里, 永嶌 勝之, 池邊 哲郎 カーボンナノチューブを応用した温熱療法用ナノデバイス 第 72 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2018 年 5 月 13 日 名古屋市

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。