

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11825

研究課題名(和文) 亜鉛徐放性チタンスキャフォールドと歯髄幹細胞による薬剤関連顎骨壊死治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic method for medication-related osteonecrosis of the jaw using dental pulp stem cells and zinc modified titanium scaffold

研究代表者

遊佐 和之 (Yusa, Kazuyuki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80636960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では薬剤関連顎骨壊死(MRONJ)の病態生理の解明および申請者がこれまで報告してきた骨再生に関する技術をMRONJモデルに応用することで治療効果を判定することを目的とする。ゾレドロン酸(Zol)およびメカニカルストレスを付与した骨芽細胞をin vitro MRONJモデルとして、細胞生存率、リアルタイムPCR、アリザリンレッドS染色を行った所、細胞生存および骨芽細胞分化が著しく減弱する事が確認された。一方、これらの細胞は歯髄幹細胞および亜鉛徐放性チタンスキャフォールドにより骨芽細胞分化が回復される事が確認され、MRONJ治療への応用の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRONJ罹患骨においては、投与薬剤による骨芽細胞分化、RANKL/OPGを介した破骨細胞分化および骨リモデリングの抑制が病態形成に大きく影響している事が報告されており、本研究より得られた、骨の再生医学的アプローチによる骨芽細胞分化促進および骨リモデリングの回復という結果がMRONJの根治的治療に繋がる事が想定された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to investigate pathophysiological characters of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) and therapeutic effects of bone regeneration therapy for MRONJ. To evaluate the influences of zoledronic acid (Zol) and mechanical stress, we performed cell viability assay, real time PCR and Alizarin Red S staining. Cell viability and osteoblast differentiation were remarkably inhibited by Zol and mechanical stress. However, dental pulp stem cells and zinc modified titanium scaffold induced osteoblast differentiation which influenced Zol and mechanical stress. Our results indicated the future possibility of clinical application of dental pulp stem cells and zinc modified titanium scaffold for MRONJ patients.

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨再生 薬剤関連顎骨壊死 骨芽細胞 破骨細胞 分子生物学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤関連顎骨壊死(medication-related osteonecrosis of the jaw; MRONJ)は2003年に Marx がビスフォスフォネート(bisphosphonate; BP)製剤投与患者における顎骨壊死を報告して以来、BPとは作用機序が異なる抗 RANKL 抗体(デノスマブ; Dmab)や血管新生阻害薬(ベバシズマブ; BEV)に関連する顎骨壊死も報告され、本邦を含め世界的に症例数は増加の一途を辿っていると同時に発症すると難治性であり臨床上大きな問題となっている。

申請者はこれまで生体内微量元素の1つである亜鉛の骨芽細胞分化促進作用に着目し、骨再生に関する研究を行ってきた。亜鉛はヒト体内に約2g存在し、そのうち20-30%にあたる約400-600mgが骨に含まれる。亜鉛は骨芽細胞を活性化し分化亢進を促すことで骨量の増大をもたらす事が報告されている。骨再生においては成体幹細胞の1つである骨髄間葉系幹細胞が広く用いられているが、骨髄穿刺にともなう侵襲や細胞増殖能の低さおよび継代培養による分化能の低下等の問題を抱えている。近年、乳歯や智歯などの歯髄中にも成体幹細胞が存在する事が報告され骨、軟骨、脂肪および神経組織への分化誘導が可能であることが示されている。また、申請者らは乳歯歯髄より分離した歯髄幹細胞の表面抗原の検索により間葉系幹細胞マーカーである CD44、CD73 陽性で造血幹細胞マーカーである CD14、CD45 陰性であることを確認している。申請者らはこれまで亜鉛が歯髄幹細胞の骨芽細胞分化を亢進させる事を種々の実験系において明らかにしてきた。

様々な疾患の根治的治療を考慮する際、病態へのアプローチは必須となると考えられるが、MRONJにおいては、投与薬剤による骨芽細胞分化の抑制と RANKL/OPG を介した破骨細胞の分化抑制および骨リモデリングの抑制が病態形成に大きく影響している事が報告されており、骨再生医学的アプローチによる骨芽細胞分化の促進および骨リモデリングの改善が MRONJ の根治的治療に繋がる事が想定される。

2. 研究の目的

現在までの MRONJ に関する基礎的、臨床的研究結果および未だ不明な点を考慮し、本研究では以下の3項目を検索することを目的とした。

(1) MRONJ *in vitro* モデルの作製と分子生物学的特徴

(2) MRONJ *in vitro* モデルと歯髄幹細胞/亜鉛徐放性チタンスキャフォールドの共培養による MRONJ *in vitro* モデルの細胞生存、増殖、分化

(3) *in vivo* での治療効果判定

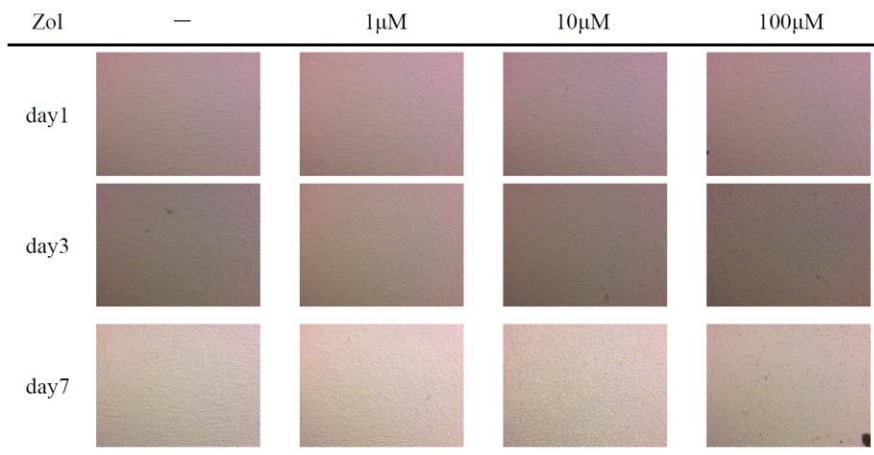
3. 研究の方法

マウス骨芽細胞にゾレドロン酸(Zol)を添加し、濃度依存性の細胞増殖、生存率の変化を検索した。さらにガラスシャーレおよび鉛玉を用いて 4.0 g/cm² の圧縮ストレスを負荷して培養を行い、*in vitro* MRONJ モデルを作製した。*in vitro* MRONJ モデルにおける分子生物学的特徴の検索のため、細胞形態の観察、細胞生存率、骨芽細胞分化関連マーカーの mRNA 発現、基質石灰化などの点から検索した。

さらに作製した *in vitro* MRONJ モデルと歯髄幹細胞/亜鉛徐放性チタンスキャフォールドの共培養を行い、同様に分子生物学的特徴に関して検索を行った。

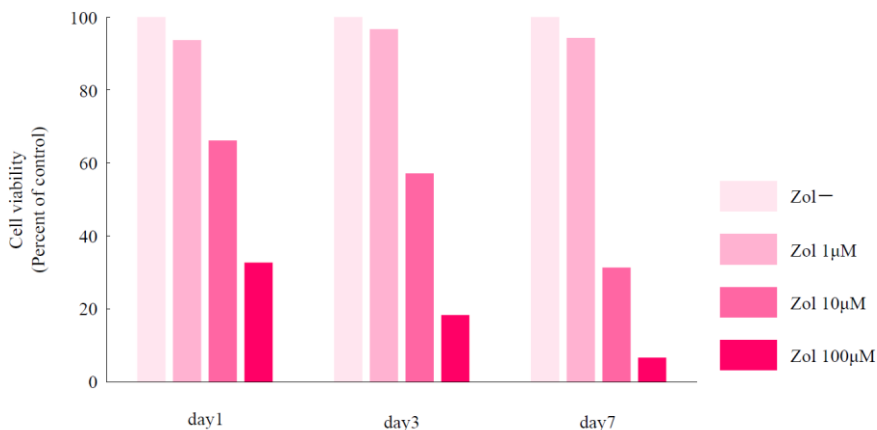
4. 研究成果

Zol 添加濃度による細胞形態



1μM Zol 添加群と control 群(Zol-)において細胞形態に著明な変化は確認されなかったが、100μM Zol 添加群では培養 3 日目、10μM Zol 添加群では培養 5 日目より死細胞が増加し培養 7 日目ではそれらが著明となった。

Zol 添加濃度による細胞生存率(MTS アッセイ)



MTS アッセイにより細胞生存率を検索した結果、1μM Zol 添加群と control 群(Zol-)の細胞生存率に著明な差は認めなかったが、10μM および 100μM Zol 添加群では細胞生存率が著しく減少することが確認された。

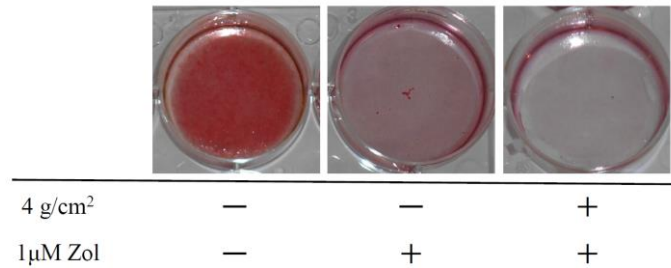
in vitro MRONJ モデルの作製

以上の結果をもとに、1μM Zol 添加群および control 群(Zol-)に 4.0 g/cm² の圧縮ストレスをかけて in vitro MRONJ モデルを作製した。

in vitro MRONJ モデルの mRNA 発現

in vitro MRONJ モデルの骨芽細胞分化関連マーカーの mRNA 発現をリアルタイム PCR で検索した。Type I collagen、BMP2、ALP、Runx2 のいずれのマーカーも圧縮ストレスおよび 1μM Zol 添加により発現が減弱する事が確認された。

基質石灰化



培養 21 日目の基質石灰化に関して検索するため、アリザリンレッド S 染色を行った所、圧縮ストレスおよび 1μM Zol 添加群において著明な基質石灰化の減弱が確認された。

以上の結果より骨芽細胞の培養系において、Zol は 10μM 以上の高濃度では著明な細胞毒性を示すとともに、細胞増殖に影響のない濃度(1μM)においても mRNA 発現および基質石灰化を減弱させるとともに、圧縮ストレスがさらにそれらを助長することが示された。歯槽骨および顎骨には歯あるいは義歯床を介して持続的な圧縮ストレスが負荷されており、ブラキシズムや不適合義歯を介した著明な圧縮ストレスが MRONJ の増悪に寄与しうる事が想定された。

in vitro MRONJ モデルと歯髄幹細胞/亜鉛徐放性チタンスキャフォールドの共培養

上記の通り作製した in vitro MRONJ モデルと歯髄幹細胞/亜鉛徐放性チタンスキャフォールドを共培養し、培養 7 日目の mRNA 発現をリアルタイム PCR で検索した所、共培養を行っていない群と比較して骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現が若干上昇する事が確認された。以上の結果から Zol および圧縮ストレスにより抑制された骨芽細胞分化が歯髄幹細胞により回復される事が示され、MRONJ 治療への応用の可能性が示唆された。

以上の結果を踏まえ、in vivo への移行を検討していたが、手術手技の安定性および条件設定に問題があり十分な結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yusa Kazuyuki, Hemmi Tomoharu, Ishikawa Shigeo, Yamanouchi Hideyuki, Kasuya Satoshi, Sakurai Hiromasa, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 129
2. 論文標題 Rehabilitation after maxillectomy in patients with implant-retained obturator: A preliminary report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 8~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oooo.2019.08.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Shigeo, Matsumura Hiroyoshi, Tomitsuka Sachiko, Yusa Kazuyuki, Sato Yoko, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Comparison of Complications With Semisolid Versus Liquid Diet Via Nasogastric Feeding Tube After Orthognathic Surgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 410.e1~410.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joms.2018.10.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saitoh Hisako, Moriya Toru, Takeyama Mirei, Yusa Kazuyuki, Sakuma Ayaka, Chiba Fumiko, Torimitsu Suguru, Ishii Namiko, Sakurada Koichi, Iino Mitsuyoshi, Iwase Hirotaro, Tokanai Fuyuki	4. 巻 62
2. 論文標題 Estimation of birth year by radiocarbon dating of tooth enamel: Approach to obtaining enamel powder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Forensic and Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 97~102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jflm.2019.01.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hemmi Tomoharu, Yusa Kazuyuki, Kasuya Satoshi, Yamanouchi Hideyuki, Ishikawa Shigeo, Kobayashi Takehito, Iino Mitsuyoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Influence of interval between biopsy and surgery on prognosis of patients with early-stage oral squamous cell carcinoma: A preliminary study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 159~162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideyuki Yamanouchi, Kazuyuki Yusa, Shigeo Ishikawa, Tomoharu Hemmi, Kaoru Edamatsu, Mitsunori Yamakawa, Mitsuyoshi Iino	4. 巻 30
2. 論文標題 Pathologic evaluation of tumor budding as a prognostic factor for Stage I-II tongue squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 225-228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橘寛彦、尾崎尚、遊佐和之、川口太郎、飯野光喜	4. 巻 31
2. 論文標題 広範囲顎骨支持型装置を適用した1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本口腔インプラント学会誌	6. 最初と最後の頁 346-353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11237/jsoi.31.346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橘寛彦、北畠健一朗、遊佐和之、逸見朋陽、川口太郎、飯野光喜	4. 巻 17
2. 論文標題 インプラント治療と片側上顎臼歯部歯槽骨骨切り術により咬合の回復を行った顔面多発骨折変形治療の1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Maxillo Facial Implants	6. 最初と最後の頁 107-114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuyuki Yusa, Hideyuki Yamanouchi, Yukie Yoshida, Shigeo Ishikawa, Hiromasa Sakurai, Mitsuyoshi Iino	4. 巻 9
2. 論文標題 Evaluation of quality of life and masticatory function in patients treated with mandibular reconstruction followed by occlusal rehabilitation with dental implants: A preliminary report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology.	6. 最初と最後の頁 499-503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2017.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuyuki Yusa, Hideyuki Yamanouchi, Akira Takagi, Mitsuyoshi Iino.	4. 巻 8
2. 論文標題 Three-dimensional printing model as a tool to assist in surgery for large mandibular tumour: a case report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral & Maxillofacial Research.	6. 最初と最後の頁 e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5037/jomr.2017.8204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuyuki Yusa, Hideyuki Yamanouchi, Ayako Sugano, Mitsuyoshi Iino.	4. 巻 -
2. 論文標題 Successful outcome of low-dose S-1 used to treat buccal squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Case Reports in Oncological Medicine	6. 最初と最後の頁 4537631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/4537631	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 上田翔平、遊佐和之、石川恵生、飯野光喜
2. 発表標題 当科における薬剤関連顎骨壊死(MRONJ)の臨床的検討
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福田 雅幸 (Fukuda Masayuki) (20272049)	秋田大学・医学部附属病院・准教授 (11401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	飯野 光喜 (Iino Mitsuyoshi) (50212717)	山形大学・医学部・教授 (11501)	