

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17314

研究課題名(和文) RANKL結合ペプチドによる骨造成法の口蓋裂治療応用における基礎的研究基盤の構築

研究課題名(英文) The basic research to apply bone augmentation by RANKL-binding peptide to the treatment for cleft palate cases.

研究代表者

上原 智己 (Uehara, Tomoki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50783130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂患児における顎裂部の骨欠損を骨で補填する治療に、我々が開発した注射による顎骨造成法を応用することを見据え、研究開始当初は、新生骨を機能させ長期的に維持する方法についての実験計画を立案した。様々な実験モデルでの検討を行った結果、担体の粒子直径を小さくすると、注射時の薬剤の操作性が向上し、新生骨の形態をコントロールできることが判明した。また、新生骨の長期的経過を観察したところ、新生骨および接する母骨の骨密度は薬剤投与後8週までの間、増加傾向にあることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂治療において一般的に行われている顎裂部骨移植術は、患児腸骨からの自家骨移植を主体としており、身体的侵襲が大きい。我々が開発した手術をせずに薬剤の注射投与で骨形成を促す顎骨造成法の発展は、口蓋裂治療へ大きな貢献をもたらす。また、本研究課題により、新生骨の形態を自在にコントロール可能になったことと、新生骨および接する母骨が経時的に密度を増すことが明らかになったことで、本骨形成法が口蓋裂治療以外の歯科臨床において広く応用される可能性が高まり、新たな治療法が考案される等の波及効果が期待された。

研究成果の概要(英文)：We aim to apply our method by injection of bone-augmenting agent to the treatment for cleft palate cases. For the purpose, we made an experimental plan to investigate whether or not newly formed bone could be preserved for a long time by given a function. As a result of various studies using some experimental models, we found that the operability was improved and that the morphology of newly formed bone could be controlled by selecting the carrier of small particle diameter. Moreover, the long-term observation revealed that the bone densities of newly formed bone and connected basal bone were tended to increase until 8 weeks after drug administration.

研究分野：小児歯科学

キーワード：RANKL ペプチド 顎骨造成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は日本人の 500 人に 1 人の頻度の割合で発生する高頻度の先天異常の一つである。口蓋裂では、先天的な顎骨の欠損により、機能面、審美面での障害が生じる (Vargervik, *The Cleft Palate J*, 1981)。現在、口唇口蓋裂の標準的治療は複数回にわたって行われる外科的治療が主であり、特に犬歯萌出期に犬歯誘導のため行われる顎裂部骨移植術(Secondary bone graft: SBG)は患児腸骨からの自家骨移植を主体としており、身体的侵襲が大きい。よって、SBG を行わずに低侵襲に顎裂部の骨欠損を補填し、患者への負担を軽減する治療法が確立できれば、口唇口蓋裂治療へ大きな貢献をもたらす。

骨形成作用を持つことで知られている bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) は、骨形成に必要な量を用いると、術後の炎症や発がん等の副作用が生じることが指摘されている (Woo et al, *Clin Orthop Relat Res*, 2013; Feeley et al, *Bone*, 2006)。そこで我々は BMP-2 の骨形成作用を強め、骨形成に必要な BMP-2 の使用量を減らす薬剤候補として、RANKL (receptor activator of NF- κ B-ligand) に結合するペプチドに着眼した。RANKL に結合することが明らかとなっている W9 ペプチドや RANKL のデコイ受容体であるオステオプロテゲリン (OPG) 上の RANKL 結合部位に似た構造を持つ OP3-4 ペプチドは、破骨細胞形成抑制作用をもつ (Aoki et al, *Adv Drug Deliv Rev*, 2012)。これまでに、W9 ペプチドを併用することで BMP-2 による骨誘導が大きく促進され、高い骨形成促進作用があることが示されており、BMP-2 単独よりも OP3-4 ペプチドを併用する方が骨密度の高い緻密な骨が形成されることが明らかになっている。我々が行った実験では、RANKL 欠損マウスの骨芽細胞では W9 ペプチドの分化促進作用が発揮されなかったことから W9 ペプチドは RANKL 依存的に骨芽細胞の分化を促進させる可能性が示された (Furuya et al, *J Biol Chem*, 2013)。

ペプチド製剤は、製作費用の安さ、抗原抗体反応の可能性の低さ、ターゲットに適合させるための構造改変の容易さなどの利点を持つため、臨床応用への可能性が高い。そこでこれまでの成果、研究結果を踏まえ、BMP-2 と RANKL 結合ペプチドを併用し、顎裂部骨移植術を行わずに、低侵襲、低コストに顎裂部の骨欠損を補填することを考えた。しかし、申請者らが考案した、BMP-2 と RANKL 結合ペプチドをゼラチンハイドロゲル担体に含ませ注射する方法では、新生骨の形態にばらつきが生じていたため、注射法を改良し、新生骨の形や大きさのある程度コントロールできる手技を開発する必要がある。さらに、新生された骨が長期間維持されるか否かについては検証されておらず、機能していない骨は吸収されることが考えられる。そして、顎裂部骨移植術の目的は、同部に歯を誘導することにあるため、骨新生を行った部位に歯を誘導できるか否かの検証が必要となる。

2. 研究の目的

本研究では BMP-2 と RANKL 結合ペプチドの併用による新規骨造成法の実際的な臨床応用を鑑み、骨を新生させた後、新生骨を機能させることで、新生骨が長期的に維持されるか否かを明らかにする。それらの結果を踏まえ、従来行われている顎裂部骨移植に比較し低侵襲に、顎裂部の骨欠損を補填する新規治療法の基礎的研究基盤を構築することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 申請者が過去に報告した骨造成法の他部位への応用と再現性の検討

申請者が過去に報告した新規骨形成法 (Uehara et al, *JDR*, 2016) では上顎切歯と第一臼歯の間の歯隙に適用した。本研究課題では同部位に適用し再現性を確認しつつ、顎骨における他の部位でも自在に骨を形成することが可能か否かを検討するために、下顎第一臼歯頰側粘

膜下に薬剤を注射した。具体的には、生後 8 週のオスの野生型マウス (C57BL/6) を用い、ゼラチンハイドロゲルを担体として BMP-2 と RANKL 結合ペプチドである OP3-4 を混和した薬剤を粘膜下注射し、4 週後にマイクロ CT を用いて新生骨の形状や大きさの確認を行った。

(2) 歯槽骨吸収モデルの立ち上げ

すでに報告されている結紮誘発性マウス歯周炎モデル (Abe et al, J Immunol Methods, 2013) を参考に、生後 8 週のオスの野生型マウス (C57BL/6) の上顎右側第二臼歯の歯頸部に絹糸を結紮することで歯周炎を引き起こした。結紮から 2 週後、歯槽骨吸収窩相当部の粘膜下に同薬剤を注射し、注射から 4 週後にマイクロ CT を用いて新生骨の確認を行った。

(3) 新生骨の形態をコントロールすることが可能な注射法の確立

新生骨の位置や形状、大きさをコントロールするには、薬剤を投与するための注射法に改良が必要であると考えた。そこで適切な注射法の模索 (注射針の挿入方向・深度等) を行い、新生骨の形態の比較を行った。さらに、担体として用いているゼラチンハイドロゲル (京都大学生体材料学分野 田畑研究室 田畑泰彦教授より提供) の粒子直径を従来用いていた約 30-70 μm から、20 μm 以下に変更した。

(4) 新生骨部の長期的維持の検討

新生骨の長期的維持について検討するため、注射投与後 8 週までの長期的な経時変化を観察した。マウス上顎切歯と第一臼歯の間の歯隙に同薬剤を粘膜下注射し、In vivo マイクロ CT 撮影による 3 次元骨形態計測と、蛍光色素の投与を行った。8 週経過後にすべてのマウスを安楽死させ、非脱灰凍結切片を作製して組織学的解析を行った。

4. 研究成果

申請者が過去に報告した上顎の骨形成法の再現性と他部位でも自在に骨を形成することが可能かを確認するために、マウスの上顎骨及び下顎骨近傍の粘膜下に薬剤を注射し新生骨を誘導した。注射を行ったすべてのマウスにおいてマイクロ CT 画像上で骨形成が認められたが、上下顎ともに新生骨の位置や大きさ、形状にばらつきが認められた。当初の予定では「矯正モデル」として新生骨部に矯正的に歯牙を移動させることで、新生骨の長期的経過に差が生じるか否かを検討する予定であったが、先行研究によると、マウス第一臼歯に矯正力を加えた際に得られる歯の移動量は 150 μm 程度であるため (Yoshimatsu et al, J Bone Miner Metab, 2006; Silvana Rodrigues et al, Journal of Biomechanics, 2012)、新生骨の位置や大きさ、形状にばらつきがある状態では新生骨部へ正確に歯を誘導することが困難であると考えられた。したがって、本研究課題の解明には他モデルによる検証が適当であると考えた。

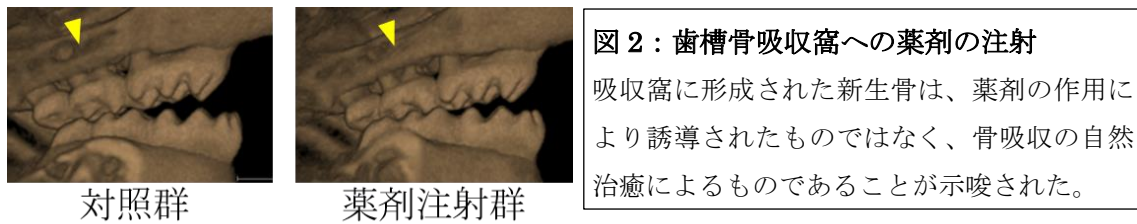
他のモデルとして、「結紮誘発性マウス歯周炎モデル」に着目した。マウス上顎右側第二臼歯の歯頸部に、二週間絹糸を結紮することで歯周炎が誘発され、十分な骨吸収窩を得ることができた (図 1)。



図 1：結紮誘発性歯周炎モデル

マウス上顎第二臼歯の歯頸部に絹糸を 2 週間結紮することで、歯周炎による歯槽骨吸収窩が得られた。

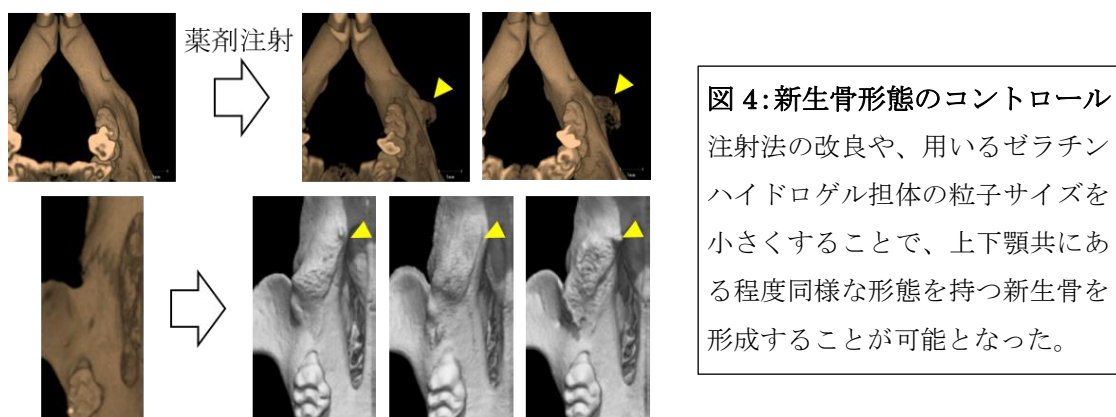
結紮除去後、齒槽骨吸収窩相当部の粘膜下に薬剤を注射し、4週後にマイクロCTを用いて新生骨の確認を行った。注射4週後のマイクロCT画像では、歯周炎による齒槽骨吸収窩は、薬剤注射群だけでなく、担体のみを注射した対照群においても同様の新生骨が認められた(図2)。



注射による新生骨が形成されるまでは約28日間を要するため、自然治癒によって生じた骨と、薬剤注射によって誘導された新生骨かどうかの判断は困難だった。一方で、歯周炎を引き起こさずに同部位に注射を行うと、新生骨を認めた(図3)ことから、自然治癒による骨形成や炎症の存在が注射による骨形成に不向きな条件となってしまったと考えられる。



その後、研究の幅を広げ、当研究課題の遂行のためには、薬剤を投与するための注射法を改良し、新生骨の位置や形状、大きさをコントロールすることが必要であると考えた。本研究における注射では、薬剤の投与量を正確に計測するためにハミルトンシリンジを用いていた。しかし、ハミルトンシリンジでは本実験で用いる担体と混ぜ合わせたゲル状の薬剤を吸引することができなかつたため、粘調度の高い物質でも吸引することができるピペットを新たに使用し、ハミルトンシリンジ後部より薬剤を注入した後に注射することとした。さらに、担体として用いるゼラチンハイドロゲルの粒子直径を20 μm以下に変更することで操作性が向上し、ある程度同様な形態の新生骨を誘導させることが可能となった(図4)。



次に、新生骨の形態がコントロールすることが可能となったことを踏まえ、新生骨部に歯を誘導し、機械的刺激を与えることで機能を持たせ、長期的予後に差が生じるか否かを検討する計画を立てた。まずは、新生骨の長期的な経時変化を観察した。薬剤の注射2週間後から骨様不透過像がCT画像上に生じ、新生骨部の平均骨密度は265 mg/cm³であった。新生骨部の骨密度は経時的に増加し、2週経過時点と比較すると4週経過時点で約2倍、8週

経過時点で約3倍に達した(図5)。本研究で観察した期間において、新生骨は機械的刺激を与えられなくても維持された。

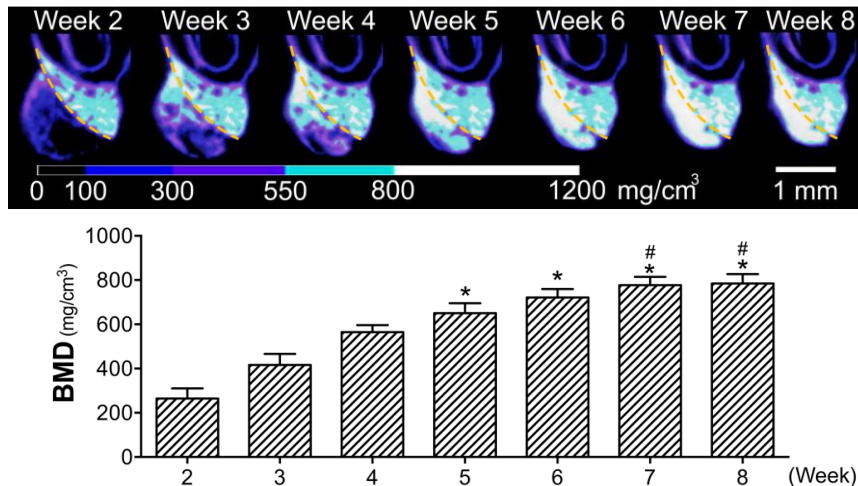


図5：新生骨部の骨密度は経時的に増加する

上段図の黄色の点線は、母骨と新生骨の境界を示す。下段グラフ横軸は注射後の経過週を示す。

* $p < 0.05$ vs week 2, # $p < 0.05$ vs week 4

Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction

また、新生骨部だけでなく、新生骨に接する母骨の骨密度も経時的に増加することが明らかになり、研究前には予想していなかった特筆すべき結果と言える(図6)。

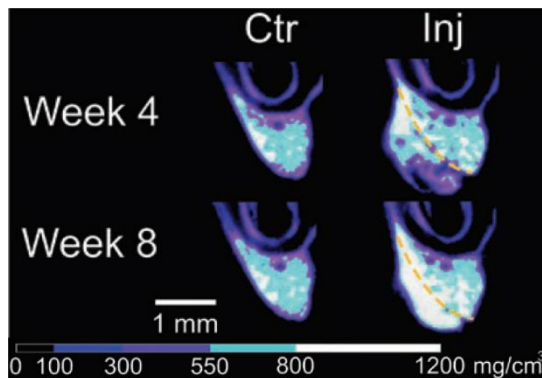


図6：新生骨に接する母骨の骨密度の変化

Ctr：対照群

Inj：注射による骨形成

黄色の点線は、母骨と新生骨の境界を示す。

本研究課題では BMP-2 と RANKL 結合ペプチドの併用により誘導した新生骨に機能すなわち機械的刺激を与えることで、新生骨が長期的に維持されるか否かを明らかにすることを目的とし、これまでに「矯正モデル」「歯槽骨吸収モデル」などの様々な実験系を用い検討を行ってきた。薬剤の注射に用いる担体の粒子直径を小さくすることで操作性が向上し、新生骨の形態のコントロールが可能になった点や、新生骨および接する母骨の骨密度の経時的増加を明らかにした点は特筆すべき成果である。今後の展開としては、新生骨を有効に利用し、利用した際の新生骨と母骨の経時的変化を確認することなどが考えられる。本研究課題では、今後の実験を行うにあたり、有用なデータと実験手技を獲得できたことが成果として挙げられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----