

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17175

研究課題名（和文）ラマン分光法を用いた破骨細胞の分化・生理機能解析と顎骨壊死の病態解明への応用

研究課題名（英文）Differentiation and physiological function analysis of osteoclasts using Raman spectroscopy and its application to elucidation of the pathogenesis of osteonecrosis of the jaw

研究代表者

Marin Elia (Marin, Elia)

京都工芸繊維大学・材料化学系・准教授

研究者番号：10814014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ラマン分光法を用いて、骨サンプルの構造および微細構造の変化について、骨壊死の影響による変化、特に鉱化の喪失と骨コラーゲンの組成変化を理解することができました。これらの情報は患者から得られたサンプルによって得られ、アルコールによる骨壊死とステロイドの服用による骨壊死との違いを認めることができました。全体として、ラマン分光法は、人間の骨の研究において、鉱物および有機成分の品質を評価することができる強力なツールであることが証明されました。さらに、ラマン分光法はイメージングツールとしても使用でき、骨の広範な領域の構造と組成の正確な化学的マップを提供します。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究の科学的な重要性は、骨吸収細胞の分化と骨リモデリングのプロセスに対する理解に貢献する点にあります。RANKLとビスホスホネートがデンチン基質に及ぼす影響に関する洞察を提供し、骨の生物学に関する知識を進め、骨関連疾患の治療戦略につながる可能性があります。

社会的な観点から見ると、この研究は医療の向上と、人口の大部分に影響を及ぼす骨の疾患の対処に重要です。より良い治療法の開発につながり、生活の質を向上させ、医療費を削減することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：By using Raman spectroscopy, we were able to understand the changes in structure and microstructure of bone samples due to the effects of osteonecrosis, and in particular the loss of mineralization and the changes in the composition of the bone collagen. These information were obtained by samples acquired from patients, and we were able to notice differences in osteonecrosis caused by alcohol and osteonecrosis caused by the assumption of steroids. Overall, Raman spectroscopy proved to be a powerful tool in the study of human bone, able to assess the quality of both the mineral and the organic fraction. Moreover, Raman spectroscopy could be used as an imaging tool, giving accurate chemical maps of the structure and composition of large areas of bone.

研究分野：生体材料

キーワード：ラマン 骨 骨壊死

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨壊死(または無血行性壊死)は、骨組織の血液供給不良による組織死を特徴とする病理的状态です。これは全身のさまざまな骨に起こる可能性があります。特に顎骨に影響を与える顎骨壊死(ONJ)があります。ONJは、顎骨の骨組織の喪失と口腔健康の損ないをもたらす深刻な状態です。

ビスホスホネートは、骨粗鬆症、骨転移、多発性骨髄腫など、骨吸収の過剰な状態を伴う疾患の治療に一般的に使用される薬剤です。ビスホスホネートは、骨吸収細胞の活性を抑制することによって作用します。骨吸収細胞は、骨の分解と再構築を担当する特殊な細胞です。骨吸収細胞の活動を抑制することで、ビスホスホネートは骨密度を維持し、骨喪失を防ぐのに役立ちます。

しかし、ビスホスホネートの長期使用は、特に顎において骨壊死のリスクをもたらす可能性があります。ビスホスホネート関連のONJの病態形成の正確なメカニズムはまだ完全に解明されていませんが、ビスホスホネートによる骨吸収細胞の活性の抑制が、顎骨での骨形成と骨吸収の微妙なバランスを妨げ、骨の健康を損ない、骨壊死のリスクを高める可能性があると考えられています。

核内因子 B 活性化因子リガンド(RANKL)は、骨吸収細胞活性の重要な調節因子です。RANKLは、骨吸収細胞の分化、活性化、生存を促進するためのタンパク質分子です。RANKLは、骨吸収細胞の前駆細胞表面に存在するその受容体であるRANKに結合することによって作用します。RANKL-RANKシグナル伝達経路は、正常な骨リモデリングプロセスにおいて骨形成と骨吸収のバランスを維持する上で重要な役割を果たしています。

ビスホスホネート関連のONJにおいては、ビスホスホネート、RANKL、および骨吸収細胞活性の相互作用が特に興味深いです。ビスホスホネートがRANKL-RANKシグナル伝達経路に干渉し、骨吸収細胞の分化と機能に変化をもたらす可能性があります。この変化は、骨形成と骨吸収の微妙なバランスを妨げ、血液供給の低下や骨壊死の発症へとつながる可能性があります。

ビスホスホネート、RANKL、骨吸収細胞活性の相互関係を理解することは、特に顎骨壊死の病態形成を解明する上で重要です。この領域でのさらなる研究は、関与する具体的な分子および細胞の相互作用を明らかにし、ビスホスホネート使用に関連するONJのリスクを軽減するための予防および治療戦略の開発につながる可能性があります。

### 2. 研究の目的

この研究の目的は、Raman分光法を強力な解析ツールとして用いて、骨壊死、骨吸収細胞活性、およびビスホスホネート(BP)の影響について包括的な理解を得ることです。骨壊死組織の特性を調査し、BP治療を含む様々な条件下で骨吸収細胞活性を評価することにより、特に口腔関連の薬物関連骨壊死(MRONJ)の病態生理を明らかにし、骨の病態についての理解を深めることを目指しています。

さらに、この研究では、BPが骨吸収細胞の代謝や骨吸収に及ぼす影響を解明することを目指しています。BPは骨吸収抑制剤として、骨粗鬆症や骨転移を持つ患者の骨折予防に広く使用されています。しかし、骨のターンオーバーの過度な抑制は、MRONJなどの合併症と関連しています。生体に近い環境で培養された骨吸収細胞による骨吸収の状態を非侵襲的に調べるために、Raman分光法を利用することで、BP、骨吸収細胞活性、および骨代謝の複雑な相互作用を理解することを目指しています。

この調査を通じて、MRONJの診断法を確立し、骨吸収細胞活性や骨吸収に直接関連する骨病態に関する知識を向上させることを目指しています。BPの役割を研究に組み込むことで、骨壊死とその治療法に関するより包括的な理解が得られ、骨壊死関連疾患の予防策、早期診断、および対象的な医療治療法の開発に貢献することが期待されます。

### 3. 研究の方法

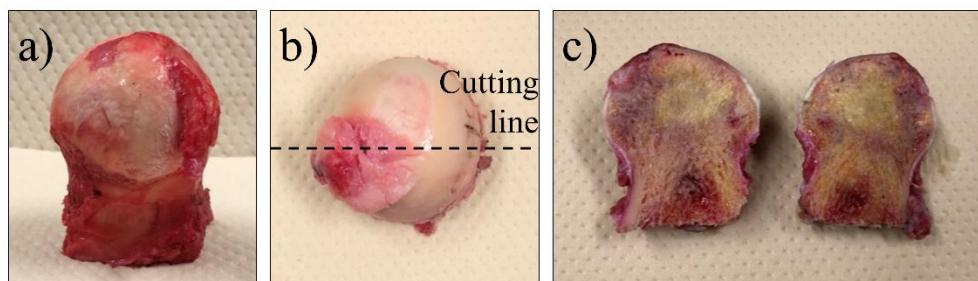


図 1: 研究の第一部におけるサンプル準備の例

この研究は2つのパートに分けて行われました。最初のパートでは(図 1)、骨壊死の有無を含むさまざまな人間の骨サンプルを調査しました。組織のラマンスペクトルとその状態との相関関係を見つけることを目指しました。骨サンプルに対してラマンスペクトロスコピーを行い、ラマンスペクトルと骨の状態との間の有意な関係を統計的に分析しました。

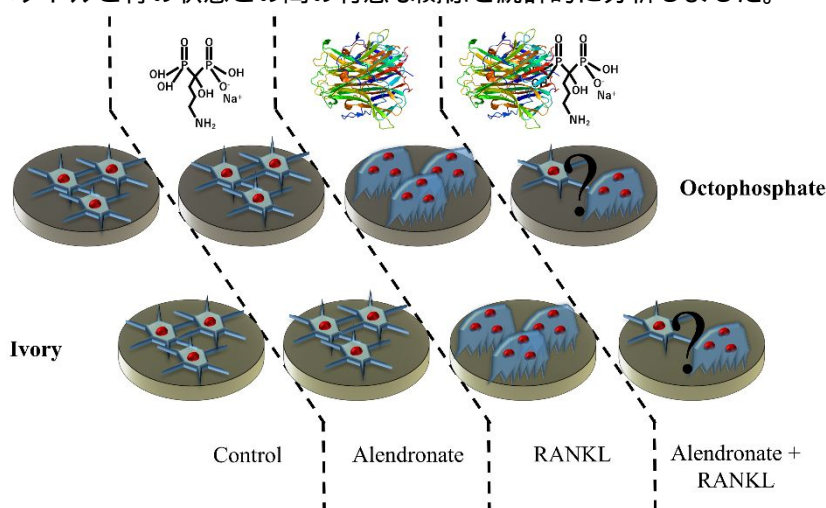


図 2: 研究手法の第二部の概略図

第2のパートでは、象牙と正カルシウムリン酸塩の標準サンプルを使用しました。これらのサンプル上で骨吸収細胞を培養し、ビスホスホネートおよび/または RANKL の影響を調べるために添加しました。ラマンスペクトロスコピーを用いて、骨吸収細胞活性中のサンプルのラマンスペクトルの変化をモニターし、分析しました。

両パートのデータは、主成分分析を含む適切な統計的手法を用いて分析され、潜在的な傾向や相関関係を特定することを目指しました。ビスホスホネート治療や RANKL の追加などの実験条件とラマンスペクトルの変化との間の有意な関連性を明らかにすることを目指しました。

研究デザインでは、結果の妥当性と信頼性を確保するために適切なコントロールが導入されました。データの分析と解釈は、観察された相関関係と影響の包括的な理解を得るために行われました。

### 4. 研究成果

この研究では、ラマンスペクトロスコピーを用いて骨成分を測定し、骨壊死の分子レベルでの効果を調査しました。その結果、股関節頭の壊死部位と周囲の健康な組織との間に骨組成と結晶性に違いがあることがわかりました。さらに、壊死の原因と関連するスペクトルの違いも同定されました。ただし、ステロイド使用のコホートが女性であるため、骨粗鬆症がスペクトルの違いに寄与している可能性は完全に排除することは困難です。ただし、図 6 には健康な組織の2つのタイプの間には統計的に有意なスペクトルの違いは見られず、骨粗鬆症の存在は考えにくいことを示しています。さらに、アルコールの健康な組織の散布図の重心はステロイドに関連するものよりもわずかに高い PC1 の値にあります。

ヒドロキシアパタイト (HAp) の結晶性と鉱物対マトリックス強度比 (HAp のラマンバンドの強度/各有機物の強度) の関係を、股関節頭の壊死領域、限界領域、および健康な領域で Raman スペクトロスコピーを使用して分析しました。その結果、アルコール性およびステロイド性の骨壊

死の骨成分の変化プロセスが異なる可能性が示唆されました。

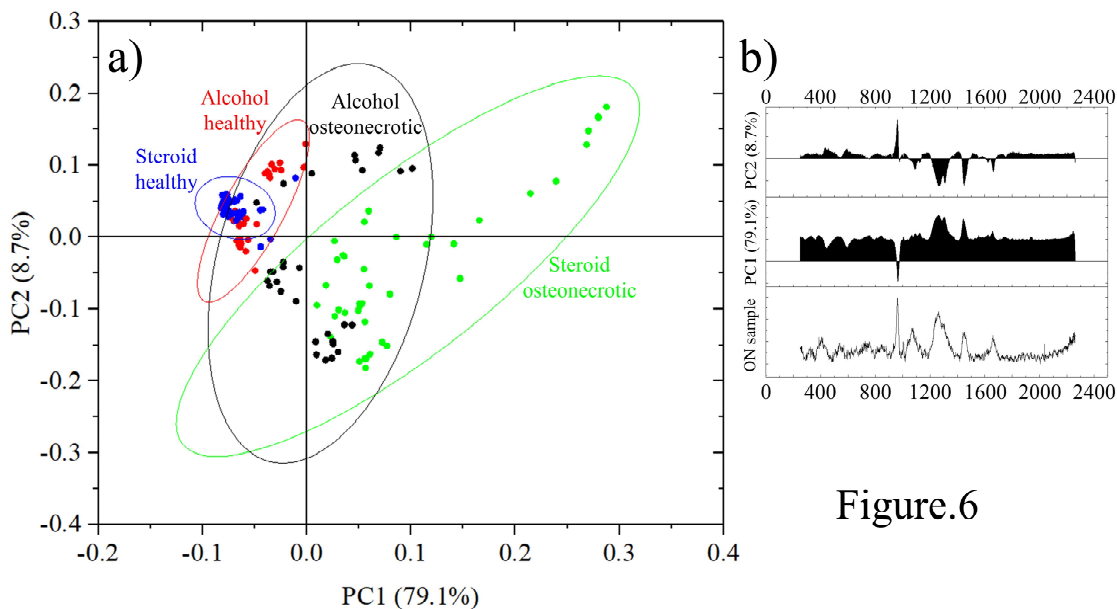


Figure.6

図 3 : 主成分分析の結果、健康な骨と壊死骨の間に統計的に有意な差が示されています。

この研究の結果は、ONFH を治療する整形外科医にとって重要な示唆を持つ可能性があります。ラマン分光法は ONFH に関連する骨成分の変化を調査するために使用されましたが、本研究ではアルコール性およびステロイド性 ONFH の壊死領域における Hap の結晶性の違いと強度比の違い (Hap のラマンバンドの強度/各有機物の強度) に焦点を当てました。これまでの研究では、発生メカニズムの違いについては言及されていませんでした。今後の研究では、測定サンプル数を増やし、統計的な信頼性と妥当性を向上させる必要があります。また、アルコール性およびステロイド性 ONFH の骨組成の違いのリスク要因を明確にする必要があります。さらに、これらのラマンスペクトルから得られる各変数の解釈と関係に関するさらなる調査は、臨床実践における骨の強度評価やリアルタイムでの実施のために不可欠です。

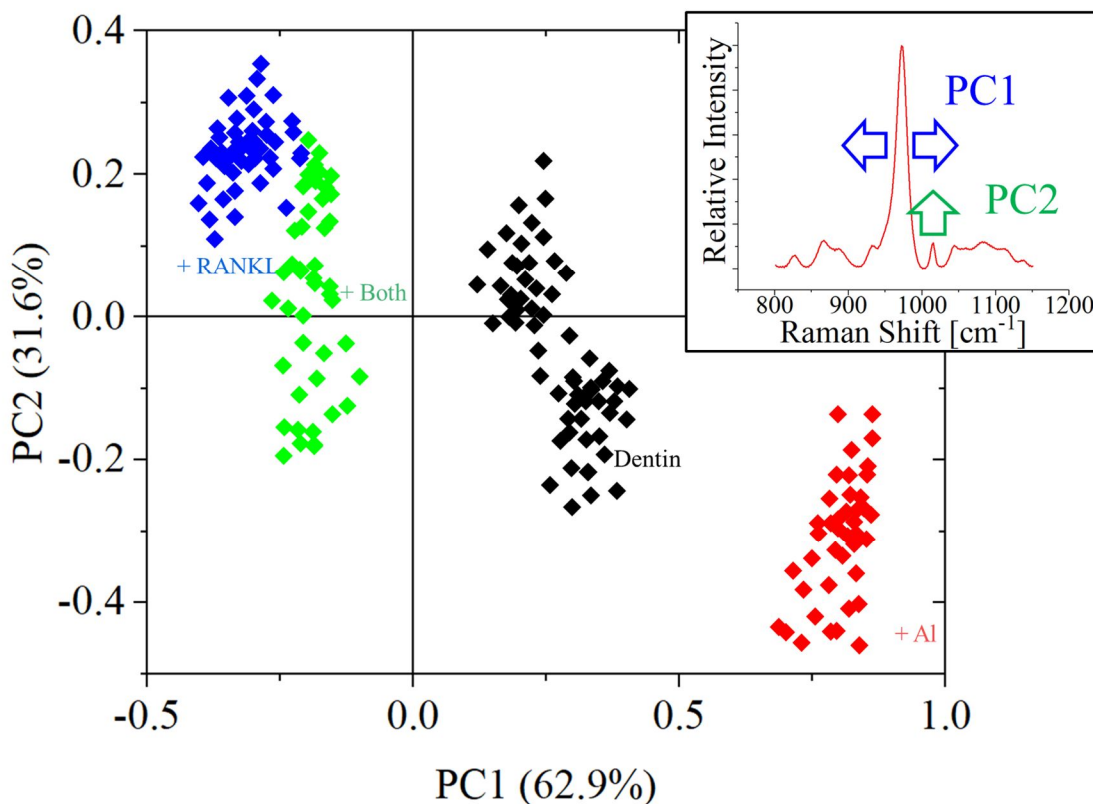


図 4 : デンチン基質における主成分分析 (PCA) の結果 : ビスホスホネートと RANKL 処理を受けたデンチン基質との比較

研究の第2部では、RANKL およびビスホスホネートの存在下での骨吸収細胞の分化と活性に焦点を当てた調査が行われました。顕微鏡的な観察から、8つの異なる基質のうち5つでリモデリングが起こり、4つの試料ではTRAP染色による骨吸収細胞の分化の兆候と、約  $1375\text{ cm}^{-1}$  付近の特定のラマンフィンガープリントバンドの存在が示されました。

デンチンおよび八カルシウムリン酸塩のコントロールでは限定的なリモデリングが観察され、おそらくマクロファージ RAW-264.7 細胞の作用と関連しています。この特異なリモデリング作用は通常、骨組織の炎症および有機骨基質の分解と関連しています。ラマンスペクトルは、八カルシウムリン酸塩基質がRANKLに曝された場合に、基質間で明確な違いを示し、特に約  $1375\text{ cm}^{-1}$  での強いバンドが現れました。

$1375\text{ cm}^{-1}$  での強いバンドは、骨吸収細胞への細胞分化のための分光的なフィンガープリントとして同定されました。このバンドはチミン、チミジン、およびそれらの複合体に対応し、特に  $\text{CH}_3$  振動モードに関連しています。骨吸収細胞の生成を誘導するとされるチミジンホスホリラーゼは、骨基質の吸収中に骨吸収細胞の放出に役立ちます。

結論として、デンチンおよび八カルシウムリン酸塩基質上の骨リモデリングは、RAW-264.7 細胞からの骨吸収細胞の分化と関連していることが明らかになりました。研究では、アレンドロネートの添加によって RANKL による分化は阻害されましたが、完全に抑制されませんでした。さらに、骨吸収細胞の分化に対する分光的なフィンガープリントとして、 $1375\text{ cm}^{-1}$  での強いバンドが同定され、RANKL による分化した骨吸収細胞の中に存在し、両方のビスホスホネートで抑制された RAW-264.7 細胞とコントロールの RAW-264.7 細胞には存在しませんでした。主成分分析では、骨吸収細胞の分化に関連する3つの主要な分光学的マーカーが明らかにされました。それは、 $960\text{ cm}^{-1}$  のリン酸塩バンドの幅の変化、デンチン基質のアミドバンドの相対的な強度の変化、および両基質上で分化後に現れるチミジンホスホリラーゼに関連したバンドの出現です。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishimura Eiji, Zhu Wenliang, Marin Elia, Honma Taigi, Sugano Nobuhiko, Ando Wataru, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 5
2. 論文標題 PCA-Assisted Raman Analysis of Osteonecrotic Human Femoral Heads	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods and Protocols	6. 最初と最後の頁 10 ~ 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mps5010010	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Marin Elia, Yoshikawa Orion, Boschetto Francesco, Honma Taigi, Adachi Tetsuya, Zhu Wenliang, Xu Huaizhong, Kanamura Narisato, Yamamoto Toshiro, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 17
2. 論文標題 Innovative electrospun PCL/fibroin/l-dopa scaffolds scaffolds supporting bone tissue regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 045010 ~ 045010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1748-605X/ac6c68	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Marin Elia, Adachi Tetsuya, Boschetto Francesco, Zhu Wenliang, Adachi Keiji, Kanamura Narisato, Yamamoto Toshiro, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 12
2. 論文標題 Raman Spectroscopic Investigation of Osteoclastic Activity under the Influence of Bisphosphonate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 3757 ~ 3757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app12083757	査読の有無 有
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 該当する

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------