

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10264

研究課題名(和文) エクソソームによる放射線性顎骨壊死の治療法開発と機序解明

研究課題名(英文) Treatment development and elucidation of mechanism for radiation-induced osteonecrosis of the jaw with exosomes

研究代表者

岡部 一登 (Okabe, Kazuto)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50801453

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)：本研究は、ヒト歯髄幹細胞から単離したエクソソーム(DPSCs-EVs)を用いて難治性疾患である放射線性顎骨壊死(ORNJ)の新たな治療法を開発し、ORNJの発症機序を解明することを目的とした。細胞実験では、DPSCs-EVsとの共培養により放射線照射した細胞の増殖能が促進され、細胞老化が抑制されたことを確認した。この結果を基に動物実験へ移行した。放射線照射したラットは抜歯すると治癒せず、ORNJを発症する。一方、抜歯する前にDPSCs-EVsを投与することで正常な治癒を促した。DPSCs-EVsはORNJに対する治療法となり、細胞老化が発症の一因となっている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

放射線治療は頭頸部がんに対して高い治療効果を有し、機能や形態の温存の観点から選択されることは日常臨床において少なくない。その反面、様々な有害事象を患者にもたらす。中でも、放射線性顎骨壊死は治療法が確立しておらず、対応に苦慮し、顎骨切除を余儀なくされることが少なくない。その場合、摂食障害や発音障害、審美障害をもたらす、著しくQOLを低下させる。本研究では、DPSCsから単離したエクソソームの投与によりORNJの発症を抑制することを明らかにした。更なるエクソソームの解析により発症機序の解明や創薬へと引き継ぐことが可能となり、本研究は学術的ならびに社会的意義を有するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a new treatment for radiation-induced osteonecrosis of the jaw (ORNJ), an intractable disease, using exosomes isolated from human dental pulp stem cells (DPSCs-EVs), and to clarify the pathogenesis of ORNJ. In cell experiments, we confirmed that co-culture with DPSCs-EVs promoted the proliferative ability of irradiated cells and inhibited cellular senescence. Based on these results, we moved on to animal experiments. Irradiated rats do not heal after tooth extraction and develop ORNJ. On the other hand, administration of DPSCs-EVs before tooth extraction promoted normal healing, suggesting that DPSCs-EVs may be a treatment for ORNJ and that cellular senescence may be a factor in its development.

研究分野：口腔外科

キーワード：放射線性顎骨壊死 エクソソーム 歯髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

頭頸部がんの組織型は放射線療法の効果が高いとされる扁平上皮癌が 90%を占める。また放射線療法は、治療後も臓器の機能や形態が温存されやすく、治療後の容貌変化や発声咀嚼、嚥下機能等の低下が少ないため、手術療法とともに頭頸部がんに対する治療法の中心的役割を担っている。しかしながら、口腔領域の正常組織が照射野に含まれることにより、口腔粘膜炎や口腔乾燥症等の様々な有害事象が生じる。特に晩発性に生じる放射線性顎骨壊死 (ORNJ) の対応に苦慮する。非手術療法は確立されておらず、温存したはずの顎骨を切除することを余儀なくされることが少なくない。ORNJ の最大の誘発因子は抜歯等の侵襲的歯科治療である。臨床医は放射線治療を受けた患者の抜歯を敬遠する傾向にあり、感染源でしかない歯が放置された、いわゆる抜歯難民を生み出してきた。医療従事者は、その有害事象である放射線性顎骨壊死の確固たる治療法が全く進歩していない現状を顧みなければならない。

幹細胞治療は難治性疾患に対して有効となる治療法として期待されている。近年、その治療効果は移植した幹細胞の分泌因子によるものであることが分かってきた。分泌因子の中でもエクソソームと呼ばれる細胞外小胞が細胞間情報伝達において重要であることが明らかとなり、急速に関心を集めている。小胞体中の情報伝達物質は、細胞の起源によって異なるが、数種類のタンパク質や mRNA、microRNA、がん特異的代謝産物など多岐にわたる。特に骨髄由来間葉系幹細胞(以下、MSCs)のエクソソームを介した細胞間情報伝達は、免疫応答、中枢神経系、心血管系などの生理機能に関与し、さまざまな疾患に対する効果の重要な役割を担っているとされる。

本研究では幹細胞として MSCs ではなく、医療廃棄物となる乳歯や永久歯の内部組織である歯髄に局在する歯髄幹細胞(以下、DPSCs)に注目した。DPSCs は MSCs を由来とする因子より細胞保護因子、血管再生因子、線維化抑制因子、幹細胞集積因子などの治療効果因子を多く含有しており、脊髄損傷などの難治性疾患の病態を改善させる等の組織再生能が高いことが明らかになっている。そのため、DPSCs から単離したエクソソーム (DPSCs-EVs) は ORNJ に有用であるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DPSCs-EVs の ORNJ に対する効果を検証し、その機序を解明することである。DPSCs-EVs を解析することで、非手術療法のない ORNJ に対する創薬への足掛かりとなる。

3. 研究の方法

(1) DPSCs-EVs の単離

DPSCs-EVs は商用ベースのヒト DPSCs の培養上清から超遠心法により単離した。単離後はフローサイトメトリーやウエスタンブロット法を用いて、特異的表面抗原である CD9、CD63、CD81 を確認し、蛍光免疫染色により細胞によるエクソソームの取り込みを確認した。また透過型電子顕微鏡で観察後、粒径分布を測定した。

(2) 細胞実験

ラット大腿骨から採取、培養した骨髄細胞を本実験に用いた。放射線照射 (6Gy) 後に DPSCs-EVs との共培養の有無について分化能、遊走能、増殖能、細胞老化、関連遺伝子について検討した。放射線照射していない骨髄細胞を対照群とした。骨芽細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞への分化能を評価するため、分化誘導後に各々アリザリンレッド S 染色、オイルレッド O 染色、抗 CD31 抗体による蛍光免疫染色法を行い、観察した。遊走能は Gap Closure アッセイ、増殖能をコロニーアッセイおよび WST-8、細胞老化を β -Gal について免疫染色、qRT-PCR を実施した。骨および血管関連遺伝子である Runx2、OCN、VEGF- α 、RANKL、OPG の発現量は qRT-PCR で解析した。

(3) 動物実験

近年報告されているラット ORNJ モデルを基にした。すなわち、左側下顎に放射線照射 (15 ~ 20Gy) することで作製した。照射野以外は純鉛板で保護した。同時に尾静脈から PBS もしくは DPSCs-EVs を投与した。放射線照射 10 日後に下顎臼歯を抜歯した。抜歯後の経過として、創の治癒を観察し、体重変化を測定した。体重変化は経口摂取の可否を評価することを目的とした。放射線照射 21 日後に屠殺した。抜歯部位を含めて下顎骨を摘出し、標本を放射線学的および組織学的に評価した。放射線学的評価として、 μ CT を撮影し皮質骨密度、海綿骨密度、骨梁比率を測定した。組織学的評価として、薄切した標本を HE 染色し観察した。

4. 研究成果

(1) 細胞実験

放射線照射によりラット骨髄細胞の増殖能は抑制され(図1)細胞老化を促進した(図2)。一方、DPSCs-EVs との共培養により、増殖が促進され(図1)細胞老化が抑制された(図2)。本実験では分化能や遊走能、関連遺伝子の発現に明らかな差は見られなかった。

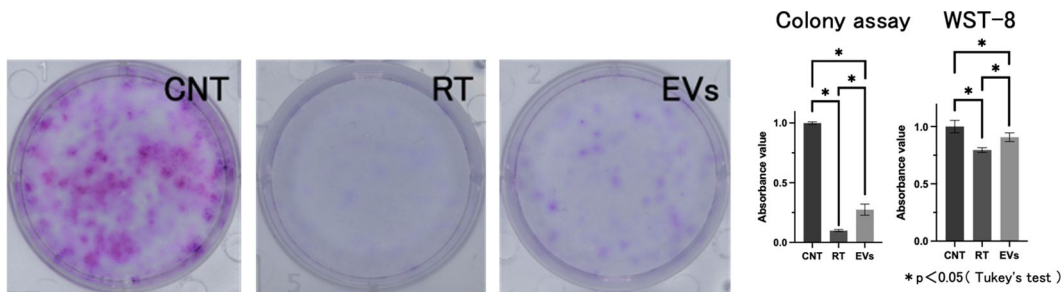


図1 増殖能の評価

CNT：対照群、RT：放射線照射した骨髄細胞、EVs：放射線照射後に DPSCs-EVs と共培養した骨髄細胞

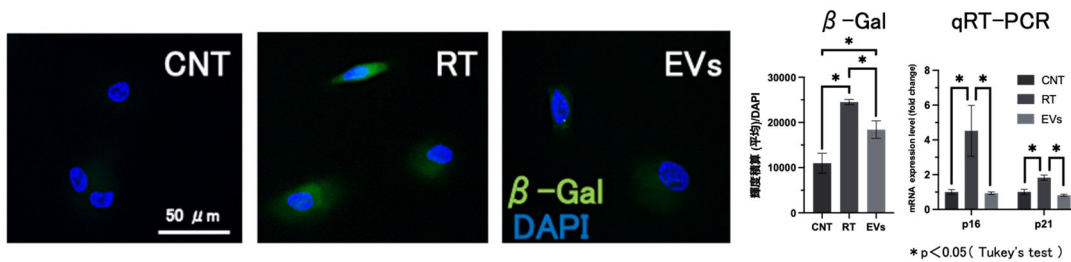


図2 細胞老化の評価

CNT：対照群、RT：放射線照射した骨髄細胞、EVs：放射線照射後に DPSCs-EVs と共培養した骨髄細胞

(2) 動物実験

DPSCs-EVs 投与により放射線照射した抜歯窩は上皮によって閉鎖された。放射線学的所見として、海綿骨が形成され、骨梁比率が増加した。これは対照群と同等であった。組織学的所見では、骨髄の線維化や炎症性細胞の浸潤が減少し、抜歯部位の歯槽骨の治癒の促進が確認された。

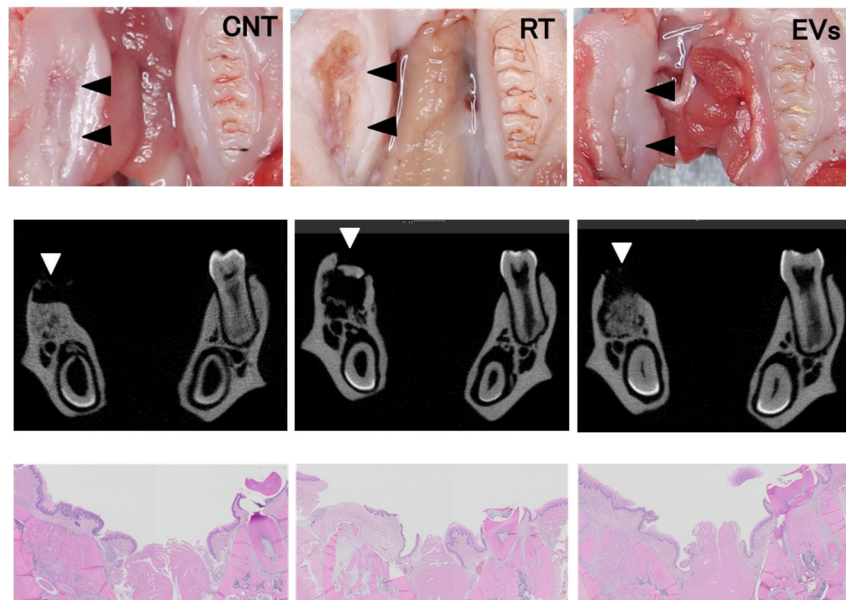


図3 放射線照射 21 日後の抜歯部位

(上段) 肉眼所見 (中段) 放射線学的所見 (下段) 組織学的所見 CNT：対照群、RT：放射線照射した骨髄細胞、EVs：放射線照射後に DPSCs-EVs と共培養した骨髄細胞

DPSCs-EVs の投与により、ラット ORNJ モデルにおいて抜歯窩の治癒を促進した。この機序として、骨髄細胞の細胞老化が抑制されたことが一因となったことが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 SAWAKI Tadashi, OKABE Kazuto, SAKAGUCHI Kohei, SAKAKURA Hiroki, KANEKO Ryuji, HIBI Hideharu	4. 巻 67
2. 論文標題 A case involving tooth extraction in a patient with acquired von Willebrand syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 459 ~ 463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5794/jjoms.67.459	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 Toyama N, Tsuchiya S, Kamio H, Okabe K, Kuroda K, Okido M, Hibi H.	4. 巻 31
2. 論文標題 The effect of macrophages on an atmospheric pressure plasma-treated titanium membrane with bone marrow stem cells in a model of guided bone regeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of materials science. Materials in medicine	6. 最初と最後の頁 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10856-020-06412-7	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 -
1. 著者名 Kamio H, Tsuchiya S, Kuroda K, Okido M, Okabe K, Ohta Y, Toyama N, Hibi H.	4. 巻 114
2. 論文標題 Chondroitin-4-sulfate transferase-1 depletion inhibits formation of a proteoglycan-rich layer and alters immunotolerance of bone marrow mesenchymal stem cells on titanium oxide surfaces.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta biomaterialia	6. 最初と最後の頁 460 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2020.07.034	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 -
1. 著者名 Okabe Kazuto, Kaneko Ryuji, Kawai Takamasa, Kano Fumiya, Ohta Yuya, Hibi Hideharu	4. 巻 32
2. 論文標題 Oral self-injury associated with septicaemia in a case of Cornelia de Lange syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 136 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2019.10.003	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 OKABE Kazuto, TSUCHIYA Shuhei, SAKAI Kiyoshi, MATSUSHITA Yoshiyasu, SUGIMOTO Keisuke, HIBI Hideharu	4. 巻 65
2. 論文標題 Perioperative management of tooth extraction in a patient with congenital afibrinogenemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 507 ~ 512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5794/jjoms.65.507	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 WAKAYAMA Hiroataka, FU Saisei, FUJIO Masahito, ANDO Yuji, OKABE Kazuto, HIBI Hideharu	4. 巻 65
2. 論文標題 Experience of multiple tooth extraction under intravenous sedation in a patient with variegate porphyria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 519 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5794/jjoms.65.519	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 Shimizu Shinobu, Tsuchiya Shuhei, Hirakawa Akihiro, Kato Katsuyoshi, Ando Masahiko, Mizuno Masaaki, Osugi Masashi, Okabe Kazuto, Katagiri Wataru, Hibi Hideharu	4. 巻 19
2. 論文標題 Design of a Randomized Controlled Clinical Study of tissue-engineered osteogenic materials using bone marrow-derived mesenchymal cells for Maxillomandibular bone defects in Japan: the TEOM study protocol	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-019-0753-1	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小原 豪, 岡部一登, 宋昕蔓, 渡邊純奈, 外山直人, 太田優也, 小間義朗, 日比英晴
2. 発表標題 ヒト歯髄幹細胞由来細胞外小胞が放射線性顎骨壊死に与える効果
3. 学会等名 第76回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小原 豪, 岡部一登, 太田優也, 山本憲幸, 外山直人, 浦田悠輔, 日比英晴
2. 発表標題 p53変異頭頸部扁平上皮癌に対するTRAILと温熱療法を併用した治療法
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Song Xinman, Kazuto Okabe, Hisanobu Kamio, Yuya Ohta, Go Ohara, Naoto Toyama, Hideharu Hibi
2. 発表標題 Fam20B depletion inhibits formation of proteoglycan-rich layer and alters calcification ability of bone marrow mesenchymal stem cells on titanium oxide surfaces
3. 学会等名 第75回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小原 豪, 岡部一登, 太田優也, 山本憲幸, 日比英晴
2. 発表標題 温熱療法を併用したTRAILの頭頸部扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果
3. 学会等名 第39回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡部一登, 藤尾正人, 酒井陽, 梶村有紀子, 坂口晃平, 渡邊純奈, 日比英晴
2. 発表標題 骨再生についてのわれわれの取り組みの変遷
3. 学会等名 第50回日本口腔インプラント学会記念学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外山直人, 土屋周平, 黒田健介, 藤尾正人, 岡部一登, 荻須宏太, 神尾尚伸, 日比英晴
2. 発表標題 大気圧プラズマ処理したチタンがマクロファージの極性変化と骨形成に与える影響
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原豪, 土屋周平, 太田優也, 神尾尚伸, 岡部一登, 日比英晴
2. 発表標題 TNF- 刺激歯根膜由来間葉系幹細胞の頭頸部扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神尾尚伸, 土屋周平, 黒田健介, 藤尾正人, 岡部一登, 荻須宏太, 外山直人, 太田優也, 日比英晴
2. 発表標題 オッセオインテグレーションを構成するコンドロイチン4硫酸の機能解析
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田優也, 土屋周平, 神尾尚伸, 岡部一登, 日比英晴
2. 発表標題 TNF- 刺激歯髄由来間葉系幹細胞はTRAILを介して口腔扁平上皮癌を抑制する
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻須宏太, 藤尾正人, 土屋周平, 岡部一登, 外山直人, 日比英晴
2. 発表標題 伸展刺激下で得た細胞培養上清における骨形成・血管新生能の検討
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1件

1. 著者名 Kazuto Okabe, Akira Sayo, Yuya Ohta, Go Ohara, Noriyuki Yamamoto, Hideharu Hibi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Japanese stmatological society	5. 総ページ数 54
3. 書名 Oral Science in Japan 2020	

〔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	酒井 陽 (SAKAI KIYOSHI) (80772425)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	

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
---------	---------