

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21791757

研究課題名（和文） ビスフォスフォネート誘発顎骨壊死に対する幹細胞治療の開発

研究課題名（英文） Development of the treatment for Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with stem cell therapy

研究代表者

江浦 重義 (EURA SHIGEYOSHI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00366361

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、ビスフォスフォネート系薬剤（以下 BP）服用患者において、口腔内手術後等に発症する顎骨壊死に対する治療法を確立することである。具体的方法としては、BP 薬剤投与による上顎骨壊死実験モデルを作製し、上顎骨壊死部の骨再生を目的とした脂肪組織由来間葉系幹細胞と多血小板血漿の混合物移植実験の効果を検証することである。

本研究の前半では動物実験モデルを作製するため、上顎臼歯の抜歯時期の前後に BP 薬剤を投与し、その抜歯窩における骨再生遅延（上顎骨壊死）の誘発を試みた。Fischer rat に Alendronate (Ald) を 1.0mg/kg/回もしくは 2.0mg/kg/回投与した。抜歯後 1 及び 2 週間後に組織学的観察を行った結果、Ald 投与群と対照群との間に、抜歯窩内の骨再生に有意差は確認されなかった。

また骨再生治療法の検証として、ラット頭蓋骨欠損モデルを用い、脂肪組織幹細胞と多血小板血漿の混合物を移植した結果、移植 8 週間において対照群と比較し有意な骨再生が認められた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to develop the novel therapy for the Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw (BPONJ) with mesenchymal stem cells implantation. To establish the animal model for BPONJ, 1.0mg/kg/each or 2.0mg/kg/each Alendronate (Ald) was injected into the Fischer rat by intraperitoneal injection. After 1 and 2 weeks the upper molar tooth extracted, histological observation was performed with the hematoxylin and eosin staining. The results showed that no significant difference was seen between Ald injection groups and control groups although the bone regeneration in the teeth sockets was slightly delayed in the Ald injection groups.

To examine the bone regeneration ability with adipose-derived stem cells (ASCs), the combination of ASCs and platelet-rich plasma (PRP) was implanted into rat calvarial bone defect model. After 4 and 8 weeks ASCs/PRP implantation, new-formed bone was significantly higher than the other groups in the micro-CT analysis.

This study suggested that the combination of ASCs and PRP was effective method for bone regeneration although the BRONJ animal model was not established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学、幹細胞、歯学、骨

1. 研究開始当初の背景

近年、ビスフォスフォネート系薬剤（以下BP）服用患者において、歯科治療等の外科的侵襲が契機となった顎骨壊死が報告されている。現在のところその原因及び治療法は明確に解明・確立されていない。日本国内ではBP製剤の服用患者数は100万人以上おり、歯科治療等により上顎骨壊死が生じる患者数の増加が今後予想される。そのためBP誘発型上顎骨壊死に対する硬組織再生療法を確立する必要がある。

2. 研究の目的

BP誘発型顎骨壊死動物実験モデルを開発し、さらに顎骨壊死部位に対する硬組織再生療法を確立すること。

3. 研究の方法

(1) 動物実験モデルの開発

Fischer rat（雄性、10週齢）にAlendronate(Ald) 1.0mg/kgを2日毎に5回腹腔内投与した。またAld投与3回目後、上顎第2大臼歯を抜歯し、抜歯部位がBPによる影響を受け、骨再生遅延等が生じるかどうかを検証する。評価時期は抜歯後1週及び2週間後に行なうこととし、実験群として①

Ald 1.0mg/mlを5回投与し抜歯後1週後に評価、②Ald 1.0mg/mlを5回投与し抜歯後2週後に評価、③生理食塩水 1.0mg/mlを5回投与し抜歯後1週後に評価、④生理食塩水 1.0mg/mlを5回投与し抜歯後2週後に評価の4群を準備する。

(2) 幹細胞移植による硬組織再生の検証

脂肪組織由来の間葉系幹細胞と同種由来の多血小板血漿との混合物による骨再生能を動物実験にて検証する。実験動物鼠径部から採取した脂肪組織をコラゲナーゼ処理し間質細胞集団を回収する。間葉系幹細胞を含む間質細胞集団は基本培地で第3継代まで培養し、同種由来の多血小板血漿とともに、作製した頭蓋骨欠損モデルに移植する。

(3) 顎骨壊死モデルへの幹細胞移植

作製した顎骨壊死動物モデルの抜歯部位に、脂肪組織幹細胞を多血小板血漿とともに移植し、硬組織再生の動向を検証する。

4. 研究成果

(1) 作製した実験モデルの検証

BP誘発型上顎骨壊死モデルの作製において、Fischer ratにAldを2日毎に1.0mg/kg

を5回腹腔内投与した結果、投与1及び2週間後に当該部位の組織学的観察において、実験群における抜歯窩には壊死組織及び骨再生遅延等は組織切片上で認めず、対照群との差異はみられなかった。

引き続き BP 投与による抜歯窩の骨壊死を誘発するために、Ald 投与方法を再検討した。Ald 投与量を前回の 1.0mg/kg から 2.0mg/kg に増量し、抜歯前の投与回数を5回に増加した。前回の評価方法と同様に、抜歯窩を周囲組織とともに採取した後、抜歯部位の組織学的観察及び画像解析による抜歯窩内の再生骨量の計測を行った。結果、今回の投与プロトコルを用いた場合、若干の Ald 投与群と対照群との間に、抜歯窩内の骨再生に差異が認められたが、本投与方法においても有意な差は確認されなかった。

(2) 脂肪組織幹細胞移植による硬組織再生

顎骨壊死動物モデルの作製を目指し、Ald 投与方法の再検討を継続するとともに、骨再生の治療方法の検証も平行して行った。骨再生治療法として間葉系幹細胞移植を検討した。具体的には、脂肪組織幹細胞と多血小板血漿の混合物移植による骨再生能の検証を、すでに報告されているラット頭蓋骨欠損モデルを用いて実施した。第3継代後の脂肪組織幹細胞 (1.0×10^7 細胞個/ml) を同種由来の多血小板血漿とともに骨欠損部に移植した。移植8週後、骨欠損部周囲と連続する新生骨が骨欠損全体にみられ、ほぼ欠損領域全体を覆う硬組織再生所見が組織切片上及びマイクロ CT 画像解析で確認された。

(3) 顎骨壊死モデルへの幹細胞移植実験

本研究課題の期間内では、有用な骨再生方法が示唆されたが、BP 誘発型上顎骨壊死モデルの作製は困難であった。今後は引き続き実

験モデルの作製を検討していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC, Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells, 査読有り, 30, 2012, pp 804-810. doi: 10.1002/stem.1076.
2. Tobita M, Orbay H, Mizuno H, Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. Discov Med, 査読有り, 11, 2011, pp 160-170. PMID:21356171
3. Orbay H, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H, Effect of adipose-derived stem cells on improving the viability of diced cartilage graft. Plast Reconstr Surg, 査読有り, 129, 2011, pp 369-377. PMID:21987040 doi:10.1097/PRS.0b013e31822b65fd
4. Tobita M, Mizuno H, Periodontal Disease and Periodontal Tissue Regeneration. Curr Stem Cell Res Ther, 査読有り, 5, 2010, pp 168-174.

PMID:19941449

[学会発表] (計2件)

1. 飛田護邦、水野博司
脂肪組織幹細胞におけるセメント質再生能の検証.
第56回防衛衛生学会
2012年2月2日、東京・日本

2. Morikuni Tobita, John K. Fraser, Marc H. Hedrick, and Hiroshi Mizuno.
The Effect of Human Adipose-Derived Stem Cells for Periodontal Regeneration.
88th General Session & Exhibition of the International Academy of Dental Research,
2010年7月15日, Barcelona・Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江浦 重義 (EURA SHIGEYOSHI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00366361

(2) 研究分担者：

(3) 連携研究者：

(4) 研究協力者：

飛田 護邦 (TOBITA MORIKUNI)

日本医科大学・大学院医学研究科・特別研究生

研究者番号：10599038