

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03126

研究課題名（和文）UVA照射による光生物学的反応を利用した局所的骨形成促進の作用機序解明

研究課題名（英文）Mechanistic analysis of bone formation via photobiologic reaction triggered by UVA irradiation

研究代表者

佐々木 啓一（Sasaki, Keiichi）

東北大学・歯学研究科・非常勤講師

研究者番号：30178644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、ラット大腿骨から採取した骨髄由来細胞に紫外線A波（UVA）を照射した場合、致命的なダメージは引き起こさないが、軽度の脂質過酸化状態が引き起こされることが示唆された。また、同等のUVA照射条件で、ラットの大腿骨を処理したところ、照射部位の皮質骨直下の骨髄中に骨梁形成が認められた。したがって、UVA照射による軽度酸化ストレスが刺激となり、大腿骨内部で骨梁形成が促進されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紫外線A波（UVA）をラットの大腿骨に照射することで、皮質骨を透過したUVAが骨髄中に存在する細胞に軽度酸化ストレスを及ぼすことが示唆された。この酸化ストレスがトリガーとなり、UVA照射部位の局所において新生骨が形成されることを動物実験を通して実証した。UVA照射によって局所的に骨密度を高めることができる本方法は、歯科治療において安全かつ簡便に応用できる骨形成促進法となり得る。特に、骨密度が低下している骨減少症、骨粗鬆症患者におけるインプラント治療や歯周組織再生療法においても、局所的なUVA照射による骨形成促進法は、臨床的価値の高い画期的な治療法となりえると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that ultraviolet-A (UVA) irradiation at a wavelength of 365 nm did not cause lethal damage to cells harvested from rat femur, although it increased the level of cellular lipid peroxidation. In an animal study, we found that UVA irradiation of the rat femur resulted in trabecular bone formation beneath the irradiated cortical bone.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：紫外線 新生骨 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科治療の予後は歯を支持する歯槽骨の状態の影響を大きく受ける。特に歯科インプラント治療や歯周治療においてはその影響が大きい。例えば骨密度が低下する骨粗鬆症は、そのリスクファクターと考えられている¹⁾。予後良好な歯科治療を提供するために、骨造成や骨再生療法の研究および臨床応用が進められている。しかしながら、現時点で骨造成を期待する薬剤は一般に全身投与によるものであり、いかに局所的に効果を発揮させるかが課題である。また BMP などの局所投与に際してもドラッグデリバリーの担体が必要となるため、簡便な方法とは言い難い。

これまでに研究代表者らは、ラットの大臼歯に 90 秒間 UVA 照射 (波長 365 nm) を行うことで炎症性細胞の浸潤を伴うことなく、第三象牙質の形成が促進されることを報告してきた²⁾。象牙芽細胞のマーカーである HSP (heat shock protein)-25 を用いた免疫組織化学染色分析の結果、この第三象牙質形成は、UVA 照射によって軽度の酸化ストレスを受けた象牙芽細胞が、新たに歯髄幹細胞から分化した象牙芽細胞によって置換されることに伴う反応であることが示唆された。軽度の酸化ストレスが組織修復や再生を促すことは、他の研究グループによっても示唆されている³⁾。

さらに、上記の知見に基づき波長 365 nm の紫外線 A 波 (UVA) をラット大腿骨に 3 分間照射することで、照射野に局限して局所的に骨梁形成が促進され、骨密度が増加することを発見した。UVA は皮膚科光線療法でも使用されており、短時間照射であれば生体に対する有害作用は限定的である。従って、UVA 照射によって局所的に骨密度を高めることができる本方法は、歯科治療において安全かつ簡便に応用できる骨形成促進法となり得る。特に、骨密度が低下している骨減少症、骨粗鬆症患者におけるインプラント治療や歯周組織再生療法においても、局所的な UVA 照射による骨形成促進法は、臨床的価値の高い画期的な治療法となると考えられる。

2. 研究の目的

上記の先行研究を基に、「UVA 照射による軽度な一時的酸化ストレスが、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促して骨形成が促進される」との仮説を立て、この仮説の検証を本研究の目的とした。特に、本研究では、UVA 照射による骨形成促進効果のメカニズム解明、骨粗鬆症モデルおよび部分骨欠損モデルにおける *in vivo* 骨形成促進効果の評価、歯科臨床応用の検討を目的とした。

3. 研究の方法

一連の動物実験の計画書は、東北大学動物実験専門員会での審査を受け、実験の承認が得られてから実施した (動物実験承認番号: 2020DnA-042)。

(1) ラット大腿骨から採取した骨髄由来細胞を用いた試験

ラットの大腿骨から骨髄を採取し、 α -MEM 培地を入れた 6 ウェルプレート中で培養を行った。細胞培養には CO₂ インキュベーターを用いた。1~2 週間の培養後、ウェル底部に付着した細胞をトリプシン/EDTA で剥がして回収し、フラスコで継代培養を行い、3~5 代目の細胞を 96 ウェルプレートに播種し、90%コンフルエントになった段階で実験に用いた。後述の UVA 照射の影響が他のウェルの細胞に及ばないようにするために黒色プレートを用いた。

UVA 照射には、市販の LED 装置 (LX505, OmniCure) を用いた。照射野が直径 6 mm となるように集光レンズを用い、放射照度が 100 mW/cm² となるように出力 30 mW で 90 秒間照射を行った (積算照度: 9 J/cm²)。照射後、ウェルに α -MEM と WST-1 試薬 (Roche) を入れて CO₂ インキュベーターで 2 時間培養し、培養液の 450 nm の吸光度を、プレートリーダー (FilterMax F5, Molecular Devices) を用いて測定した。得られた吸光度の結果より、コントロール群 (UVA 照射なし) に対するテスト群 (UVA 照射あり) の細胞生存率を算出した。また、細胞の脂質過酸化の状態を、TBARS アッセイキット (ZeptoMetrix) を用いて評価した。UVA 照射後にトリプシン/EDTA で細胞をはがして回収し、超音波ホモジナイザーで処理を行った。キットの説明書に従って TBARS アッセイを行い、蛍光分光光度計 (FP-8200, JASCO) を用いて励起光 530 nm に対する蛍光 550 nm を測定し、検量線法によってマロンジアルデヒド量 (MDA equivalent) として算出した。

(2) ラット大腿骨への UVA 照射による骨梁形成の評価

雄性的 Wistar ラットを用いた動物実験を行った。全身麻酔下で大腿部外側に小切開を入れ、外側広筋と大腿二頭筋の境目を剥離して大腿骨を露出させた。露出させた大腿骨側面に UVA 照射 (LX505, 集光レンズ 3 mm) を行った (テスト群)。細胞試験と同等の UVA 照射を行うために、事前に波長 365 nm の UVA の大腿骨透過率の測定を行った。大腿骨を長軸に平行に切断して板状に加工し、この試料を透過する UVA の出力を、パワーメーター (FieldMate, Coherent) を用いて測定した。その結果、透過率は 0.7% であった。そこで、大腿骨内部 (骨髄) の細胞に対して積算照度が 9 J/cm² となるように放射照度 7.4 W/cm² で 3 分間照射を行った。したがって、大腿骨

表面でのUVAの積算照度は624 J/cm²であり、大腿骨を透過したUVAの積算照度は9.3 J/cm²であった。反対側の大腿骨に対しては偽手術(大腿骨の露出までを実施)を行った(コントロール群)。手術後は縫合を行い、3週間後にサクリファイスを行って大腿骨を採取した。

採取した大腿骨を、マイクロCT(CT Lab HX100, Rigaku)を用いて分析した。膝関節部位(大腿骨遠位部)からUVA照射部までの高解像度画像データ(voxel size: 9 μm)を得るために2回に分けて撮像を行い、ステッチングにより1つの画像データとした。マイクロCTデータの解析には3次元画像解析ソフトAmira3D Pro(ThermoFisher Scientific)を用い、マイクロCTを用いた骨の解析のガイドライン⁴⁾に沿った分析を実施した。UVA照射で形成される大腿骨内部の骨梁形成の定量分析は、関心領域(ROI)やセグメンテーション方法の影響を大きく受けるため、Amira3D Proを用いた規格分析法を確立した。同一個体のテストとコントロールで同じ部位にROIを設定するために、Resample Transform Imageモジュールを用いて大腿骨の3次元画像の重ね合わせを行った。その後、大腿骨遠位端部とUVA照射部位のROIを設定し、テストとコントロールの同一個所における骨梁の分析を実施した。各ROIにおける骨梁のセグメンテーションにはAmbient Occlusionモジュールを一定の閾値で用いた。さらに、Interactive Top-Hatモジュールによって、細い骨梁部や狭い骨梁間の空隙分のセグメンテーションを行った。

4. 研究成果

(1) ラット大腿骨から採取した骨髄由来細胞を用いた試験

図1にWST-1試験による細胞生存率の結果を示す。UVA照射(積算照度: 9 J/cm²)を行ったテスト群では、UVA非照射のコントロール群と同程度の細胞生存率が認められた。一方、TBARSアッセイにより脂質過酸化を分析したところ、統計学的な有意差は認められなかったものの、UVA照射によりMDAが増加する傾向が認められた。したがって、本試験のUVA照射条件は骨髄由来細胞に対して致命的なダメージを引き起こさないが、軽度の酸化ストレス状態をもたらすことが示唆された。

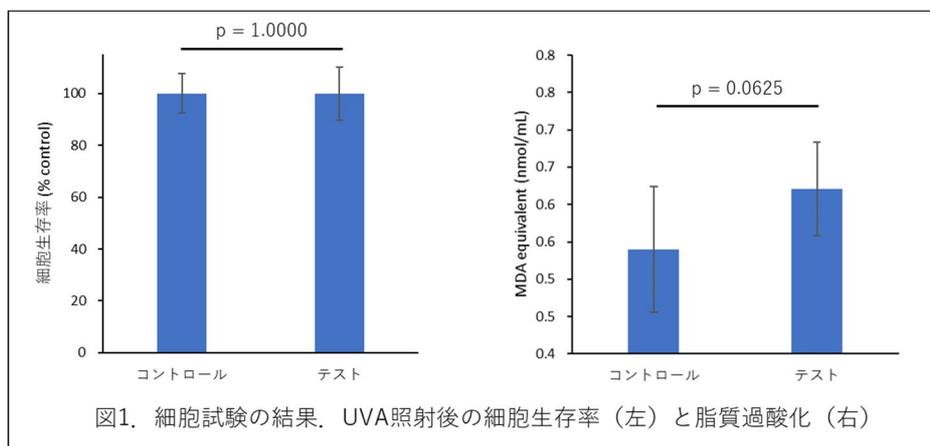


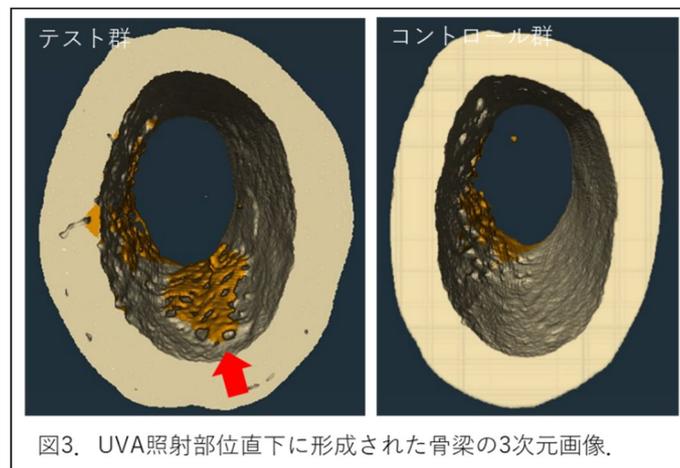
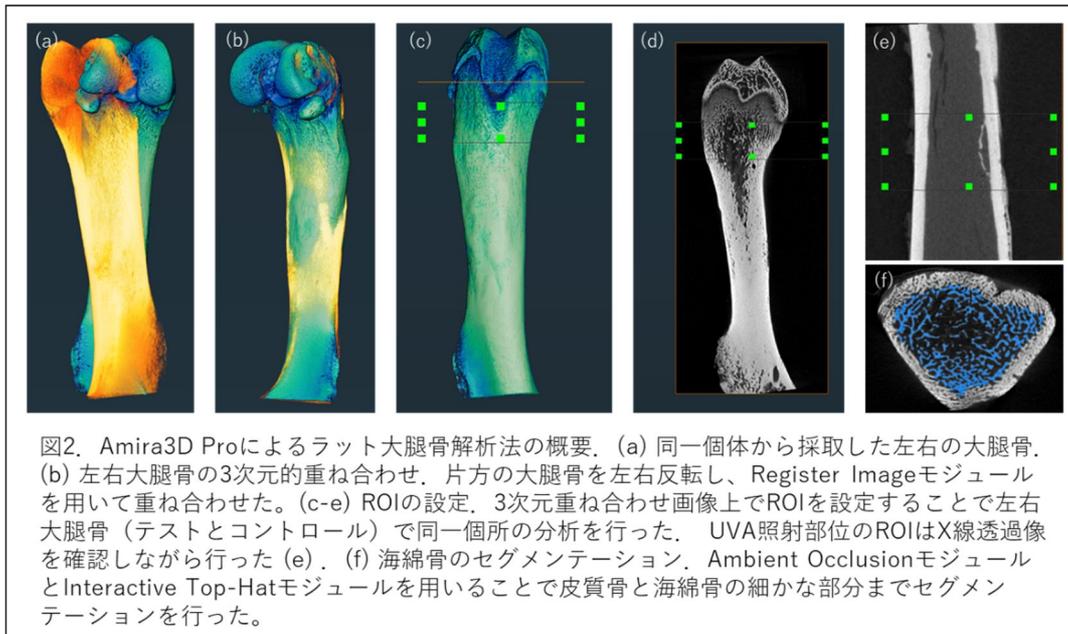
図1. 細胞試験の結果. UVA照射後の細胞生存率(左)と脂質過酸化(右)

(2) ラット大腿骨へのUVA照射による骨梁形成の評価

3次元画像解析ソフトAmira3D Proを用いたラット大腿骨の解析方法を図2に示す。同一個体から採取した左右の大腿骨を、片方の大腿骨を左右反転し、Register Imageモジュールを用いて重ね合わせることで適合の良い3次元画像重ね合わせを行うことができた。この3次元重ね合わせ画像上でROIを設定し、左右大腿骨(テストとコントロール)で同一個所の分析を行った。大腿骨遠位部の海綿骨の状態を左右で比較し、UVA照射部位から離れた場所に及ぼす影響を評価した。また、UVA照射部位のROIはX線透過像を確認しながら設定し、反対側のコントロール(偽手術のみ)との比較を行った。ROIを切り出し、Ambient OcclusionモジュールとInteractive Top-Hatモジュールを用いることで皮質骨と海綿骨(骨梁)の細かな部分までセグメンテーションを行ってそれぞれ体積等の分析を行った。

大腿骨遠位部海綿骨のBV/TV、Tb.Th、Tb.Sp、Tb.Nについては、左右側で差は認められなかった。UVA照射を行った骨幹部では、照射部位直下においてすべての個体で骨梁形成が認められた(図3)。しかしながら、図2(e)に示すようなROIの領域においては、新生骨梁の割合が既存の骨梁の割合より低いため、定量値に統計学的有意差は認められなかった。

本研究を通して、UVA照射による軽度酸化ストレスが刺激となり、大腿骨内部で骨梁形成が促進されることがわかった。また、3次元画像解析ソフトを用いた精密な骨梁分析法を確立することができたので、今後は、UVA照射による新生骨梁のみの体積分析を行い、定量値に関してテスト群とコントロール群の差を示すための分析を行う。薬剤ではなく光を用いた非侵襲的な骨梁形成促進法は、歯科分野において需要が高いと考えられるので、今後さらに研究を進展させて歯科医療への貢献を果たす。



<引用文献>

- 1) Chambrone L. Current status of the influence of osteoporosis on periodontology and implant dentistry. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 23:435-439, 2016
- 2) Nakamura K et al. Reactions of dental pulp to hydrogen peroxide photolysis-based antimicrobial chemotherapy under ultraviolet-A irradiation in rats. *J Photochem Photobiol B*, 212:112042, 2020
- 3) Serras F. The benefits of oxidative stress for tissue repair and regeneration. *Fly (Austin)*, 10:128-133, 2016
- 4) Bouxsein et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*, 25, 1468-1486, 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakamura K
2. 発表標題 Dental application of ultraviolet-A induced photochemical and photobiological reactions
3. 学会等名 2022 TU-HKU-FJMU International Symposium on Oral Health Sciences. Online symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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	金森 義明 (Kanamori Yoshiaki) (10333858)	東北大学・工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	菅野 太郎 (Kanno Taro) (30302160)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	中村 圭祐 (Nakamura Keisuke) (30431589)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	松浦 寛 (Matsuura Hiroshi) (30612767)	東北学院大学・工学部・教授 (31302)	

6. 研究組織（つづき）

	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	天雲 太一 (Tenkumo Taichi) (80451425)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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