

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593069

研究課題名(和文)組織内微小環境因子を標的とした骨治癒促進効果

研究課題名(英文)Effect of bone microenvironment factors on bone healing

研究代表者

高岡 一樹 (KAZUKI, TAKAOKA)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60373122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨微小環境因子の解析のため自然発症2型糖尿病(SDT)ラットにビスフォスフォネート(BP)投与を行い、ラットモデルの樹立を行い、病態の解析を行った。ラットモデルの検討により、BP関連顎骨壊死は炎症細胞反応が乏しく、骨代謝障害のため腐骨分離できずに骨髄炎が長期化した状態と考えられた。また、骨微小環境における破骨前駆細胞のTGF- β 1の影響を検討した。運動性の高い破骨前駆細胞はTGF- β 1の上昇した骨微小環境内で運動性を消失し、骨リモデリング開始部に定着する。破骨前駆細胞は安定、静止した破骨前駆細胞となり骨芽細胞とともに微小環境を形成し、破骨細胞へと分化していくと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the side effects of bisphosphonates on extraction socket healing in spontaneously diabetic Torii (SDT) rats, which is an established model of non-obese type 2 diabetes mellitus in study of bone microenvironment. We demonstrated the development of BRONJ-like lesions and suggested that low bone turnover with less inflammatory cell infiltration plays an important role in the development of BRONJ. The aim of this study was to determine the effects of TGF- β 1 on migration of OC precursors (OPs) in the bone microenvironment. The round shape of RAW cells changed into a spindle shape by treatment with TGF- β 1. The cell migration of RAW cells was decreased by treatment with TGF- β 1. We showed that TGF- β 1 is released from the bone matrix induces motile OPs to quiescent OPs in bone microenvironment.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨代謝 顎骨壊死 TGF-

1. 研究開始当初の背景

近年、ビスフォスフォネート(BP)製剤を投与されているがん患者や骨粗鬆症患者が抜歯などの侵襲的歯科治療を受けた後に、顎骨壊死 (Bisphosphonates-Related Osteonecrosis of the Jaw, BRONJ)が発生することがあり、多数の症例報告がされている。現時点ではBRONJ発症のメカニズムは不明であり、難治性で治療法も確立されていない。顎骨壊死はBRONJ報告から一躍注目されるようになったが、以前よりわれわれ口腔外科医は、放射線性顎骨壊死、糖尿病、コルチコステロイド治療患者の抜歯窩治癒不全などの骨治癒遅延に悩まされてきた。顎骨壊死の治療において骨リモデリングを促進させる微小組織内環境の実態やその機能の解明が必要であることが強く認識されている。

2. 研究の目的

骨修復における骨リモデリングに関わる破骨細胞は単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞である。破骨細胞分化前の単球系破骨前駆細胞はどのような機構で血中から位置決めして骨へ遊走してくるのか明らかでない。組織幹細胞の維持や分化の調節は、ニッチ(niche)と呼ばれる特別な微小環境が担っていると考えられているが、その実体や機能はよくわかっていない。組織内微小環境は、細胞膜表面や細胞間に局在する細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)とそれに結合する生理活性物質(増殖因子, サイトカイン, ケモカインなど)などが含まれており、破骨前駆細胞が遊走・定着, 分化する場と考えられており、その解明が必要である。本研究では、骨微小環境因子の解析のため自然発症2型糖尿病(SDT)ラットにBP投与を行い、ラットモデルの樹立を行い病態の解析をした。また、糖尿病と骨との関連において、終末糖化産物はTGF- β の発現と分泌を増加させマウス骨髄間質系ST2細胞とヒト間葉幹細胞の石灰化を抑制するという報告がある。骨微小環境における破骨前駆細胞のTGF- β 1の影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 7週齢雄 Sprague-Dawley(SD)ラットおよび自然発症2型糖尿病(SDT)ラットを用いた。BP投与群はゾレドロン酸 35 μ g/kgを(SD/ZOL, SDT/ZOL), コントロール群(SD/control, SDT/control)は生食を尾静脈より投与した(Figure 1)。

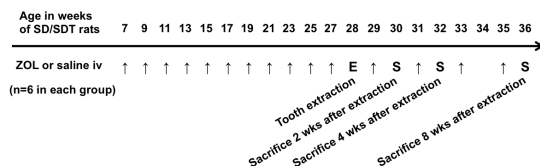


Fig. 1.

22週間11回投与後、上顎臼歯を抜歯し、術後2、4、8週目に上顎骨を摘出、HE染色を施し鏡検した。

術後4週目屠殺群のみ屠殺2、7日前にカルセインを投与し、蛍光顕微鏡による骨形成速度の検討を行った。また、TRAP染色を行い鏡検分析した。

μ CTを用いて脛骨の撮影を行い、骨形態計測を行った。

血清から骨代謝マーカー(BAP、CTX、TRACP-5b)の測定をした。

(2) マクロファージ系破骨前駆細胞RAW264.7細胞にTGF- β 1(5ng/ml)の投与を行った。

細胞増殖および細胞形態の変化を観察した。

chemotaxis assayを行い、細胞運動能へのTGF- β 1の影響を検討した。

TGF- β 1, Rho, Rac1, Cdc42のタンパク発現をウエスタンブロット法にて検討した。

4. 研究成果

(1) 体重および血糖値の変化: SDラットは観察終了まで体重が増加し続けたが、SDTラットは12週齢を超えた頃より、徐々に体重減少が認め、観察終了まで体重は減少し続けた。SDラットの血糖値は100~150mg/dlで安定していたが、SDTラットは24週齢までに600mg/dl以上の高血糖を生じ、以後も600~800mg/dlの血糖値を示した。

(2) 骨形態計測: SDTラットの脛骨における骨形態計測の結果、骨量(BV/TV)、骨梁数(Tb.N)はZOL投与により有意に増加し、骨梁間距離(Tb.Sp)は減少していた。

(3) 各群のラット抜歯窩の肉眼的観察およびH&E所見: SD/control群の抜歯窩は正常な治癒経過を示したのに対して、SD/ZOL群の抜歯窩においては新生骨形成の減少がみられ、術後8週目でも上皮化していないものが見られた(16.7%, 1/6)。SDT/control群はSD/control群に比べて新生骨形成が減少し治癒遅延状態であったが、術後8週目には完全な上皮化が見られた。一方、SDT/ZOL群は術後8週間経過しても上皮化せず著しい骨露出状態が続いていた(100%, 6/6)。同部のHE所見の特徴としては、SDT/control群は抜歯後4週間経過しても、抜歯窩には上皮による被覆はみられず、バクテリアコロニーを伴う腐骨形成を認め、腐骨形成部周囲間質には炎症細胞浸潤を伴う骨髄炎像がみられた。しかし、抜歯8週間後では、これら骨髄炎像は見られず、抜歯窩は上皮によって完全に被覆され、明らかな治癒期への移行が認められた。SDT/ZOL群では骨髄腔相当空間は細菌塊で満たされており、骨梁中の骨小腔は空虚で腐骨を認め、炎症性細胞の反応はわずかであった(Table 1, Figure 2)。

Table 1
Incidence of bone exposure at 8 weeks after tooth extraction by ZOL treatment

	Bone exposure		Empty osteocyte lacunae of alveolar bone per unit tissue area
	Macroscopic	Microscopic	
SD/control	0/6	0/6	6.8±1.8
SD/ZOL	0/6	1/6	17.8±4.9*
SDT/control	0/6	0/6	8.5±3.2
SDT/ZOL	6/6	6/6	36.6±7.8*

*p<0.05 versus SD/control

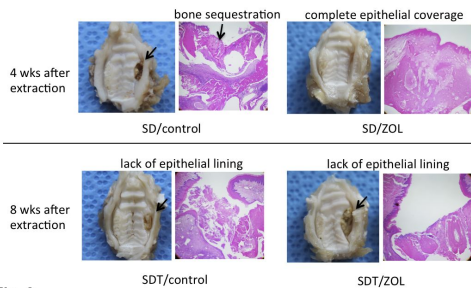


Fig. 2.

Table 2
Changes in bone metabolizing markers in serum at 4 weeks after tooth extraction by ZOL treatment

	CTX(ng/mL)	TRACP-5b(U/L)
SD/control	33.2±7.8	4.8±0.9
SD/ZOL	30.7±8.9	4.2±0.3
SDT/control	30.7±11.2	1.3±0.4*
SDT/ZOL	28.7±9.9	0.9±0.3*

*p<0.05 versus SD/control

(4)カルセイン二重標識および TRAP 染色：カルセイン二重標識による骨形成速度の差は明らかでなかったが、SDT/BP 投与群の TRAP 陽性細胞数は有意に減少していた。

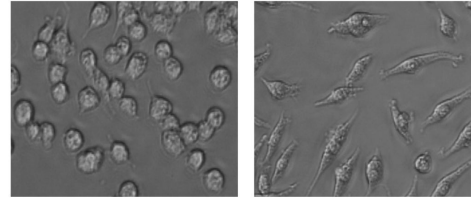
(5)骨代謝マーカー：BAP、CTX の各群間の差はみられなかったが、SDT ラットの TRCP-5b 値が SD ラットより明らかに低値で、SDT/ZOL の TRCP-5b 値が最も低値であった(Table 2)。

(6)TGF- 1 投与による RAW264.7 細胞の増殖への影響：今回行った TGF- 1 濃度(5ng/ml) では細胞増殖への影響はみられなかった。

(7)TGF- 1 投与による細胞形態の変化：TGF- 1 投与により細胞形態は円型から紡錘形に変化した(Figure 3)。

(8)TGF- 1 投与による運動能への影響：TGF- 1 投与により運動能は減少した。

(9) ウエスタンブロット法による検討において、TGF- 1 添加により Rho、Rac1、Cdc42 発現は減少した(Figure 4)。



RAW264.7 TGF-β(-) RAW264.7 TGF-β(+) 3日目
細胞形態：円型→紡錘形

Fig. 3.

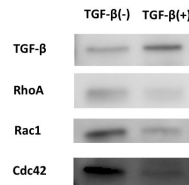


Fig. 4.

(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 1 件)

岡岡一樹、岸本裕充、医局紹介 兵庫医科大学歯科口腔外科学講座 口腔癌治療からオーラルマネジメントまで、査読無、ザ・クインテッセンス、34(1)、138、2014

[学会発表] (計 6 件)

岡岡一樹、西岡稔浩、阿部徹也、山村倫世、瀬川英美、野口一馬、浦出雅裕、岸本裕充、自然発症 2 型糖尿病ラットにおけるビスフォスフォネート関連顎骨壊死、第 59 回日本口腔外科学会学術集会、2014 年 10 月 17-19 日、幕張メッセ(千葉)

Takaoka K., Yamamura M., Nishioka T., Abe T., Segawa E., Noguchi K., Urade M., Kishimoto H., Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws using Spontaneously Diabetic Torii rats, The 2014 Annual Meeting of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, Sep.8-13, 2014, Honolulu, (USA)

岡岡一樹、西岡稔浩、阿部徹也、山村倫

世、奥井 森、瀬川英美、大津奈央、野口一馬、岸本裕充、浦出雅裕、2 型糖尿病ラットにおけるビスフォスフォネート (BP) 関連顎骨壊死モデルの樹立、第 57 回日本口腔外科学会学術集会、2012 年 10 月 19-21 日、パシフィコ横浜 (横浜)
Takaoka K., Nishioka T., Abe T., Yamamura M., Ohtsu N., Segawa E., Zushi Y., Okui S., Noguchi K., Kishimoto H., Urade M., Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws using Spontaneously Diabetic Torii rats. 21st Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery (EACMFS), Sep.12-15, 2012, Dubrovnik, (Croatia)
西岡稔浩、高岡一樹、阿部徹也、山村倫世、奥井 森、大津奈央、野口一馬、岸本裕充、浦出雅裕、2 型糖尿病ラットにおける BP 製剤関連顎骨壊死の発症、第 66 回日本口腔科学会学術集会 2012 年 5 月 17-18 日、広島国際会議場 (広島)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高岡 一樹 (TAKAOKA, Kazuki)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：60373122

(2)研究分担者

浦出 雅裕 (URADE, Masahiro)
兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授
研究者番号：70104883