

令和 元年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20408

研究課題名（和文）顎口腔領域疾患において喪失された骨の再生メカニズムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of the mechanism for a bone generation which was lost by oral disease

研究代表者

山田 珠希（YAMADA, TAMAKI）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：80580943

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は骨という器官の環境を理解し、いかに新生させるかを臨床的な観点だけでなく基礎的な観点からも考慮することである。骨環境には主に3種の役者があり、これらが複雑なネットワークを形成し、骨代謝が行われている。骨細胞は骨環境では一番多く存在し、その機能はあまり知られていないので現状である。本研究では骨細胞に着目し、骨代謝への関わりを探求し、実際の臨床に応用することが目的であった。顎口腔領域の疾患により損失した骨は数回の外科的処置を繰り返すことにより骨形態の回復に有効であることがわかった。今後は基礎的な観点から検索する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨は臓器のなかで体の軸をなしており、その形態や機能は非常に重要である。そのため顎口腔領域の疾患により骨が喪失された場合はその回復が形態、機能（咀嚼、嚥下、発音等）の回復につながる。骨が最大で軸をなす臓器であることを考えると本研究の成果は歯科領域にとどまらず、他科的疾患の解明や治療に役立つことが考えられ、学術的意義は大きいと考える。また、ヒトが生きる上で重要な機能（咀嚼、嚥下、発音、審美等）を担う口腔領域における骨に関する研究成果の社会意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study understands the bone environment and considers how to

generate the bone from not only a clinical point but also the basic research. There are three kinds of actors in a bone environment, and these form a complicated network, and perform bone metabolism. The osteocyte exists most in the bone environment, but its functions are unknown not much. We paid my attention to the osteocyte and searched a relation to bone metabolism, and hoped to apply to a clinical point. The bone which was lost by oral disease understood the thing that was effective for the bone generation by repeating several times of surgical care. It will be necessary to search it from a basic point of view in future.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、骨は臓器として知られている。また、骨は臓器の表面積の大部分を占めているためその機能を無視することはできず、注目が集まっている。骨をミクロ単位で見ると複雑なネットワークがある。すなわち、骨を作る骨芽細胞、骨を破壊する破骨細胞、そして未だ不明な点が多くある骨細胞の3種の細胞である。これらの連携により骨代謝が行われている。骨細胞は骨芽細胞の一種で骨内に埋め込まれた細胞である。未だ不明な点が多くあるが、骨細胞同士は突起を伸ばし、まるで神経のネットワークのような連携をみることができる。このような構造から何らかの重要な機能を保持していることは容易に推定できる。

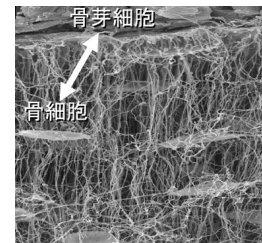
顎口腔領域では様々な疾患により形態や機能を維持ならびに支持する骨が喪失される。骨による支持が喪失した場合、顎口腔による形態ならびに機能が喪失されることとなり、咀嚼・嚥下・発語等の低下ならびに審美面での低下を招き、患者のQOLに多大なる影響を与える。口腔領域の疾患に罹患するものでは若年者も多く、大きな問題である。そうした背景から骨という臓器に着目し、骨再生や骨新生への探索研究が非常に重要であると考えた。前述通り、骨のなかでも特に骨細胞に着目し、骨再生や新生に貢献しているかどうかを研究目的としたことが本研究開始の背景である。また、骨を喪失した患者の形態や機能を回復させ、QOLの向上を目指すことが本研究の背景でもある。

### 2. 研究の目的

申請者はこれまでに基礎研究さらには臨床研究と多方面に渡る研究に従事してきた。その中でも骨という臓器に着目し、探索を続けてきた。顎口腔領域は咀嚼・嚥下・発音さらには審美面などの多くの機能を持ち、また、生きる上で欠かすことの出来ない領域である。しばしば顎口腔領域に発生した疾患により、周囲の組織、特に骨を大きく喪失することがある。骨の喪失により生きる上での重要な機能が損なわれ、患者のQOLに多大なる影響を及ぼす。また、これまでも骨再生や新生に対する研究は多くあるが、未だ満足のいく成果が得られていないのが現状である。骨に対する基礎研究の基盤と臨床医としての知識を合わせ、患者のQOLを向上するために骨の再生や新生に注目した研究を行うことが目的である。本研究では骨代謝を取り巻く環境(骨芽細胞、破骨細胞、特に骨細胞)に目を向け、いかにして質の良い骨を十分な量再生ならびに新生させるかを探索することが目的である。本研究のテーマは骨が全身を占める臓器であることから歯科学を越えて医学領域へも貢献できると信じ、解析を行う。

### 3. 研究の方法

骨環境下では様々な因子により骨代謝が活発に行われている。これまでの研究結果から癌が骨に転移した場合、骨折した場合、さらには骨内の骨髄が脱髄された場合などでは骨破壊や骨新生などが認められる。これらの研究成果は実験動物モデルを用いた系の組織化学的解析で解析済みである。これらの研究成果から骨環境では代謝が迅速に行われ、従来の形態に修復する機能が十分に備わっていることが推察される。臨床の現場で実際に骨欠損した場合に骨にどのような刺激を与えることで骨代謝が行われ、形態が回復するかについては画像を参考に経時的に観察する。骨代謝には骨を作る骨芽細胞、骨を破壊する破骨細胞が知られ、これまでも十分な知見が得られている。しかしながら、骨環境下にはその大部分を骨細胞が占めており、相互に突起を伸ばし、ネットワークを形成している(右図)。形態学的な知見は解明されつつあるが分子生物学的知見には未だ解明されていないことが多くある。骨細胞の突起間でどのような因子が作用し、骨代謝に関わるかは免疫組織学手法を用いて検索する。骨細胞はFGF23、Sclerostin、DMP-1を産生していることが知られている。元々骨細胞は骨芽細胞が骨に埋め込まれた細胞のことであり、骨表面では骨芽細胞と連携している(右図)。骨細胞が骨芽細胞に何らかの刺激を送信し、骨代謝に関与していると考えられる。骨芽細胞は骨を作る細胞であり、それらの司令塔であると考えられる骨細胞に着目し、いかに質の良い十分な骨を作らせるかを培養の手法を用いて細胞レベルで探索する。実際には骨細胞を分離培養し、ネットワークを形成させ、骨細胞産生因子の発現が生じる最適条件とまた、骨芽細胞を活性化させるための産生因子をタンパクならびに遺伝子レベルで解析する。培養レベルで解明した事象を実際の生体モデルで解析する。そもそも骨環境下では3種の細胞群が複雑に相互作用し、骨代謝が成り立っている。それゆえ3種の細胞群が揃った骨環境下で実験を行う。モデルとしては骨に欠損を作



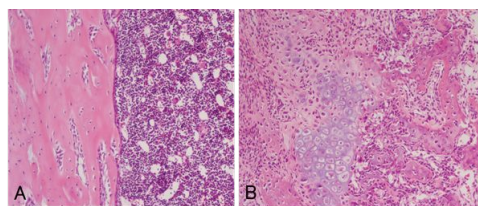
り、その周囲での骨細胞の挙動に関して、微細構造学的に形態を解析する。また、その時点の分子生物学的側面に関しても検索する。骨欠損部に骨新生を促す液性因子や環境刺激因子を探索するため種々の条件を設定し、最適な条件を検索する。2年間の研究計画で得た成果を総合的に解析する。骨新生に最適な条件を確かなものにするために生体を模倣した系である実験動物モデルを使用する。最適な条件下で作られた骨の量や質を種々の方法を用いて解析する。具体的には3D-CTを用いた骨密度や骨量の検索を行う。質の良い骨とは適度な強さとしなやかさが必要であるが物理学的物性等は力学的試験を用いて検索する。

#### 4. 研究成果

本研究計画ならびに方法を用いて以下の成果を得た。これまでの研究成果から骨に対して何らかの刺激（癌細胞の骨転移、骨折などの外傷等）が加わると骨代謝に関連した細胞群、特に骨細胞のシグナルに変化が生じることを明らかにし（図1参照）、また、それら刺激により骨新生が活発に行われることを明らかにした（図2参照）。すなわち、骨にある種の刺激を加えることで骨が新生し、それらには骨細胞が関連している可能性が示唆された。実際の生体では図3に示す通り、数回の外科的刺激を加えると十分な骨量の回復と形態が回復することが明らかになった。つまり実験動物で生じている現象は実際の臨床の現場でも



【図1】腫瘍骨転移環境下における骨細胞産生因子の免疫染色化学。各左パネル(A,C)は正常な皮質骨における骨細胞産生因子の局在を示す。腫瘍に隣接した皮質骨の骨細胞産生因子は負に制御されている(B,D)。

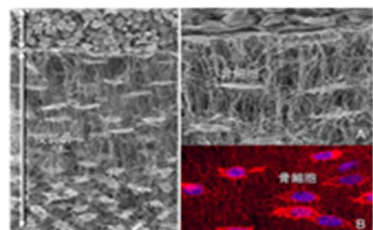


【図2】ラット頭骨内を脱髄すると骨新生が活発に起こる。脱髄前(A)と脱髄後(B)のHE染色組織像。

生じており、in vitroの実験結果はin vivoに応用できると考えられた。臨床の現場では図3



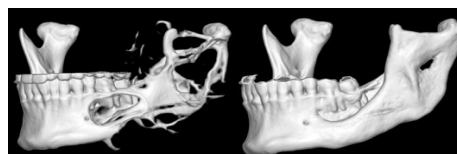
【図3】骨欠損部に数回の外科的刺激を加えると骨新生と骨形態の回復が認められる。手術前(A)と数回の手術後(B)のパノラマX線写真。



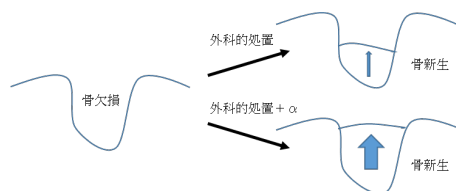
【図4】皮質骨内における骨細胞の走査型電子顕微鏡(A)と免疫染色化学(B)。

のような骨新生を促進するためには数回の手術が必要となり（1度の外科的処置においては3ヶ月で約2から3mm程度の骨量が増生される程度）。度重なる全身麻酔下での手術になるため、患者側への負担が大きい。それらを改善するためには骨代謝に係る3種の役者（骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞）のうち、どの役者が骨増生ならびに新生に関与するかを明らかにしたく、これまでの実験動物モデルでの結果を参考にし、研究を進めた。図4は皮質骨内の骨細胞の様子を示したものであるが、骨細胞は骨内で最も多く存在し、神経系に類似したネットワークを形成しているような形態をしている。形態学的観点から予測すると骨に何らかの刺激が加わった場合にこの複雑で密な連携ネットワークを介して迅速に骨代謝を促進することが可能であることが示唆された。そのため、本研究では骨細胞を活性化する因子を探索し、外科的処置だけでなく、それら因子と合わせることでいかに迅速に骨の新生を促すかを探索する計画を立てた。実際の生体側（実験動物）での検討では設定する条件が多いことから使用する固体数が多くなることや系が複雑になり、均一な結果が得られない可能性がある。そのためまずは実験動物から骨細胞を抽出し、培養することを試みた。系としては細骨からの細胞抽出方法（PLoS ONE; Michigam T., et al, 2014）は既に確立されたものがあり、本方法を参考に培養を試みたが、骨細胞が抽出されたかどうか不明であることや培養されたとしても数が少なく、遺伝子レベルでの解析までには至らなかった。今後は骨細胞の抽出と培養を安定化させ、骨細胞を活性化させ、骨新生を促すのに最適な条件をin vitroの段階で抽出することが目標である。前述通り、in vitroの状

ヶ月で約2から3mm程度の骨量が増生される程度。度重なる全身麻酔下での手術になるため、患者側への負担が大きい。それらを改善するためには骨代謝に係る3種の役者（骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞）のうち、どの役者が骨増生ならびに新生に関与するかを明らかにしたく、これまでの実験動物モデルでの結果を参考にし、研究を進めた。図4は皮質骨内の骨細胞の様子を示したものであるが、骨細胞は骨内で最も多く存在し、神経系に類似したネットワークを形成しているような形態をしている。形態学的観点から予測すると骨に何らかの刺激が加わった場合にこの複雑で密な連携ネットワークを介して迅速に骨代謝を促進することが可能であることが示唆された。そのため、本研究では骨細胞を活性化する因子を探索し、外科的処置だけでなく、それら因子と合わせることでいかに迅速に骨の新生を促すかを探索する計画を立てた。実際の生



【図5】骨欠損部への骨新生による形態の回復



況は *in vivo* の状況を反映していると考えられるため、まずは *in vitro* の研究成果を安定させ、実際の臨床に応用したい。図 5 のように口腔領域疾患によりこれだけの骨が吸収され、形態的にも機能的にも不安定な状況でも数回の外科的な処置を繰り返すだけで骨量や形態を回復することは可能である。ただし、骨欠損の程度によっては数十回にも及ぶ侵襲が必要になる。本研究成果はまだ十分に得られていないが、*in vitro* 下で骨新生を促進させるための最適な条件が得られるように研究を継続することは重要である。最適な条件が設定された場合、つまりは外科的処置に何らかの因子を加えた条件を設定し、将来的には実際の生体側（人体）に応用し、質的にも量的にも十分な骨を早急に新生し、手術回数を減らすことを目指したい。そのことは患者側の負担を減らすだけでなく、QOL の改善にも貢献できる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Ohiro Y., Yamada T., Kakuguchi W., Kobayashi I., Kitamura T., Tei K. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 31:121:125, 2019. 査読有り

山田 珠希、大廣 洋一、足利 雄一、栗林 和代、松沢 祐介、長峯 杏介、田中 宗一、北村 哲也、鄭 漢忠：下顎エナメル上皮腫に対する反復処置法における歯の保存に関する研究．日本口腔外科学会雑誌 64:347-34, 2018. 査読有り

Yamada T., Matsuzawa Y., Sogabe I., Donen M., Tei K., Mikoya T.: A rare case of glial choristoma of the tongue associated with cleft palate. Oral Science International. 15:22-26, 2018. 査読有り

山田 珠希、栗林 和代、大廣 洋一、篠原 早紀、松田 光平、鈴木 豊典、北村 哲也、進藤 正信、鄭 漢忠：下顎骨髄から発生したと考えられた巨大な悪性リンパ腫の 1 例．北海道歯学会雑誌 36:92-99, 2016. 査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

山田 珠希：口蓋悪性黒色腫に対するニボルマブの使用経験、第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2018/1/25-1/26、新潟グランドホテル、新潟、2018 .

足利 雄一、山田 珠希、栗林 和代、大廣 洋一、鄭 漢忠：上顎歯肉癌術後放射線治療後に 4 年で発症した放射線肉腫の 1 例、第 62 回日本口腔外科学会、2017/10/20-22、国立京都国際会館、京都、2017 .

Tamaki Yamada : The application of “Dredging Method” for the treatment of Ameloblastoma、第 62 回日本口腔外科学会、2017/10/20-22、国立京都国際会館、京都、2017 .

山田 珠希：当科における過去 28 年間の腺様嚢胞癌症例の臨床的検討、第 41 回日本頭頸部癌学会、2017/6/8-6/9、ウエスティン都ホテル京都、京都、2017 .

Tamaki Yamada : A case of huge KCOT treated by “Dredging Method” , 2017 Annual Conference of TAMOS , 2017/3/3-3/7 , Taipei , Taiwan , 2017 .

Tamaki Yamada : Henoch-Scholein Purpura after preoperative chemoradiotherapy developed in a patient with tongue cancer , The 57<sup>th</sup> Congress of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons , 2016/4/22-4/24 , Gunsan-si , Korea , 2016 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。