

令和元年5月8日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07017

研究課題名(和文) ラマン分光法を用いた顎骨壊死の病態解明と診断技術への応用

研究課題名(英文) Establishment of Diagnostic technology of medication-related osteonecrosis of the jaws using Raman spectroscopy.

研究代表者

足立 圭司 (Adachi, Keiji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70457951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラマン分光法を用いビスホスホネート系薬剤関連顎骨壊死(以下、BRONJ)の病態解明を行う。BRONJの病態は十分に解明されておらず、その診断方法を確立することは急務となっている。我々は、高感度に分子レベルの解析を行うことができるラマン分光法に着目した。ラマンスペクトルは分子の指紋と呼ばれており、細胞や組織を生きのまま標識や固定を行わず、非侵襲的に分子レベルの解析が可能である。そのため、医療分野や創薬分野での応用が期待されている。ラマン分光解析を行うことで、BRONJのバイオマーカーを同定し、その発症メカニズムを解析出来ると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ラマン分光法を用いビスホスホネート系薬剤関連顎骨壊死(以下、BRONJ)の病態解明を行う。BRONJの病態は十分に解明されておらず、その診断方法を確立することは急務となっている。我々は、高感度に分子レベルの解析を行うことができるラマン分光法によりBRONJの病態解明を行う。

研究成果の概要(英文)：In this study, we use Raman spectroscopy to elucidate the pathophysiology of bisphosphonate drug-related jaw bone necrosis (hereinafter referred to as BRONJ). The pathogenesis of BRONJ has not been fully elucidated, and establishing a diagnostic method is urgently needed. We focused on Raman spectroscopy, which can perform molecular level analysis with high sensitivity. Raman spectra are called molecular fingerprints, and non-invasive molecular level analysis is possible without labeling and fixing cells and tissues alive. Therefore, the application in the medical field and the drug discovery field is expected. By performing Raman spectroscopy, it is considered that biomarkers of BRONJ can be identified and the onset mechanism can be analyzed.

研究分野：口腔外科学

キーワード：ビスフォスフォネート関連顎骨壊死 ラマン分光法 BRONJ 薬剤関連顎骨壊死 MRONJ ビスフォス
フォネート 破骨細胞

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、ビスホスホネート系薬剤関連顎骨壊死(Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw, BRONJ) (または薬剤関連顎骨壊死 MRONJ: Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw) と呼ばれる医原性の顎骨疾患が問題となっている。BRONJは骨粗鬆症や癌の骨転移の治療薬としてビスホスホネート系薬剤(BP剤)を内服している患者に、顎骨露出や骨壊死が発症するのが特徴的である。

現在でも、BRONJの発症メカニズムはBP剤が破骨細胞のアポトーシスを誘導し、骨代謝回転が過度に抑制されているが、発症メカニズムは明らかにされていない。これまでの破骨細胞の研究は、プラスチックプレート上で破骨細胞を培養し、TRAP染色やPCR等の固定や染色、プローブを用いた破壊的・侵襲的な解析がほとんどであった。しかしながら、これらは本来の破骨細胞のダイナミズムを解析することはできなかった。

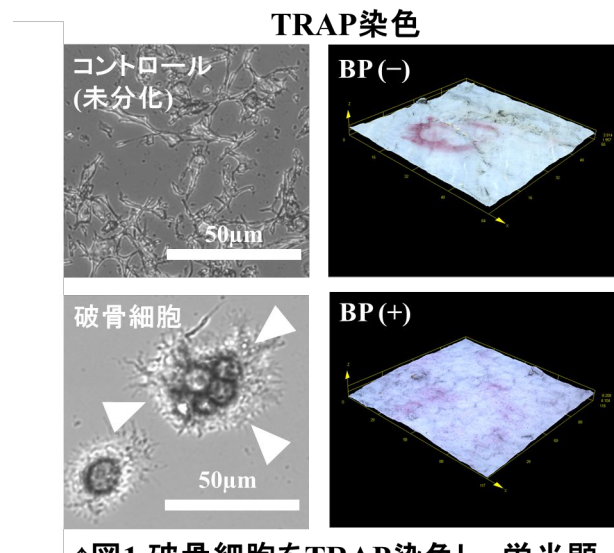
BRONJは超高齢化社会を迎える我が国において今後増加することが予想され、その病態を理解し、究明することが喫緊の課題となっている。本研究では、ラマン分光法を用いBRONJの病態解明を行う。

2. 研究の目的

BRONJの病態は十分に解明されておらず、その診断方法を確立することは急務となっている。我々は、高感度に分子レベルの解析を行うことができるラマン分光法に着目した。ラマンスペクトルは分子の指紋と呼ばれており、細胞や組織を生きたまま標識や固定を行わず、非侵襲的に分子レベルの解析が可能である。そのため、医療分野や創薬分野での応用が期待されている。ラマン分光解析を行うことで、BRONJのバイオマーカーを同定し、その発症メカニズムを解析出来ると考えられる。本法は、レーザーラマン顕微鏡を用い、BRONJの発症に関与する破骨細胞より特有のラマンスペクトルを取得することで、BRONJの病態解明と診断法の確立を目指す。

3. 研究の方法

マウス由来マクロファージ様細胞株 RAW264.7 をガラスまたは象牙基板上で播種し、破骨細胞へ分化誘導(sRANKL)し、BP剤の存在下または非存在下で7日間培養した。象牙質表面の象牙質切片上で培養した破骨細胞が形成するピットと呼ばれる骨吸収窩をヘマトキシリン染色し、レーザー顕微鏡で観察しピットの数、形状、面積などの情報を基に破骨細胞の分化を評価する。また、破骨細胞をファロイジンで染色し、蛍光顕微鏡で細胞辺縁にアクチンリングを形成するか確認する。BP剤の存在下または非存在下で培養した破骨細胞をレーザーラマン顕微鏡で分析し、破骨細胞特有のラマンスペクトルの探索やビスホスホネート系薬剤が破骨細胞の骨吸収に及ぼす影響をモニタリングした。



↑図1.破骨細胞をTRAP染色し、蛍光顕微鏡またはレーザー顕微鏡で観察。

4. 研究成果

マウス由来マクロファージ様細胞株 RAW264.7 を象牙基板上で破骨細胞へ分化させ、BP剤の存在下または非存在下で7日間培養した。培養後、TRAP染色・F-アクチン染色・ラマン分光解析を行った。TRAP染色において、BP剤の非存在下では、破骨細胞の内部は濃染されていた。一方、BP剤の非存在下では、破骨細胞は淡く染色されていた(図1)。ラマン分光分析において、破骨細胞は水(H₂O)に帰属する 3500cm⁻¹のピークを有するラマンバンドが強く発現することを見出した。水のラマンスペクトルは3200 cm⁻¹~3500 cm⁻¹にブロードなピークが認められ、結合水は3200 cm⁻¹付近に、自由水は3500 cm⁻¹付近にピークを持つ。これらのスペクトルの変化は、破骨細胞の有する酸(H⁺)によるものと考え、今後は初代培養より分化させた破骨細胞や骨組織においても同様の起こるかを検証する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
京都府立医科大学歯科口腔科学
<http://www.kpu-m.ac.jp/doc/classes/igaku/kinou/65.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：金村 成智
ローマ字氏名：Narisato Kanamura

研究協力者氏名：山本 俊郎
ローマ字氏名：Toshiro Yamamoto

研究協力者氏名：ペッツォッティ ジュセッペ
ローマ字氏名：Giuseppe Pezzotti

研究協力者氏名：足立 哲也
ローマ字氏名：Tetsuya Adachi

研究協力者氏名：堀口 智史
ローマ字氏名：Satoshi Horiguchi

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。