

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09785

研究課題名(和文) ビタミンC不足に伴う骨質低下が進行性下顎頭骨吸収の発症に及ぼす影響と予防法の開発

研究課題名(英文) Effect of deteriorated bone quality associated with vitamin C deficiency on the development of progressive condylar resorption and development of preventive methods

研究代表者

小林 正治 (Kobayashi, Tadaharu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80195792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：進行性下顎頭骨吸収の発症メカニズムにおける骨質の影響と予防法の開発について検討した。ラットにコラーゲン線維の収束化を阻害する α -Aminopropionitrile (BAPN) を0.2%の濃度で飲み水へ溶解し投与したところ、大腿骨と下顎頭のマイクロCTデータにおいてBAPN投与群は骨密度が対照群より低い値となった。しかし、BAPN投与群の下顎骨は脆くなり、下顎骨延長を行うことができなかった。一方、下顎骨延長モデルラットを用いて骨髄由来間葉系幹細胞培養上清(MSC-CM)が下顎頭骨吸収に及ぼす影響を検討したところ、マイクロCTデータにおいてMSC-CM投与群では下顎頭骨吸収が有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性下顎頭骨吸収とは下顎頭の著明な吸収像を特徴とする病態で、比較的新しい疾患概念であり、下顎後退症の発症や下顎骨前方移動術後の後戻りの主たる原因として注目されているが、その発症メカニズムについては未知な点が多く、臨床の場ではその対応に苦慮している。

本研究では、ラットにコラーゲン線維の収束化を阻害するBAPNを投与し、骨質の低下を確認した。今後、BAPNの投与量を調節して、骨質が下顎頭骨吸収に及ぼす影響を検討する。一方、下顎骨延長モデルラットにMSC-CMを投与することによって下顎頭骨吸収が有意に抑制されたことから、下顎頭骨吸収の予防法を開発する上で有用な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of bone quality on the pathogenic mechanism of progressive condylar resorption and the development of preventive measures. When α -Aminopropionitrile (BAPN), which inhibits the convergence of collagen fibers, was dissolved in drinking water at a concentration of 0.2% and administered to rats, the bone mineral density of the BAPN-administered group was lower than that of the control group in the micro CT data of the femur and mandible. However, the mandible of the BAPN-administered group became brittle, and effective mandibular distraction could not be performed. On the other hand, when the effect of serum-free conditioned medium from human MSCs (MSC-CM) on condylar resorption was examined using rat mandibular distraction model, condyle resorption was significantly suppressed in the MSC-CM-administered group based on micro CT data.

研究分野：外科系歯学

キーワード：進行性下顎頭骨吸収 骨強度 骨質 骨延長 α -Aminopropionitrile 骨髄由来間葉系幹細胞培養上清

1. 研究開始当初の背景

進行性下顎頭骨吸収 (PCR) とは下顎頭の著明な吸収像を特徴とする病態で、比較的新しい疾患概念であり、下顎後退症の発症や下顎骨前方移動術後の後戻りの主たる原因として注目されている。申請者らも PCR を発症した 7 例について分析し、発症リスク因子として下顎後退の重症度と手術時前方移動量の関与を報告した。下顎骨前方移動術後の PCR に関するレビュー論文では、PCR の発症には下顎頭部にかかる力学的負荷の量と負荷に対する骨の許容力 (骨強度) が関与していると結論づけているが、発症メカニズムについては未知な点が多く、臨床の間ではその対応に苦慮している。

PCR の発症メカニズムを解明し、その予防法を開発するためには、PCR 発症動物モデルが有用と考えられる。われわれはラット下顎骨延長モデルを用いて下顎頭部を形態学的ならびに組織学的に検討したところ、マイクロ CT 画像で下顎骨延長後に下顎頭部の骨吸収像が認められた。組織学的観察では、下顎頭前方部で軟骨細胞層が完全に消失し、多数の TRAP 陽性破骨細胞の局在が認められ、骨吸収領域は線維性組織で置換されていた (引用文献)。さらに、力学的負荷に対する骨の許容力 (骨強度) を低下させるために、転写因子 NFAT を活性化させるカルシニューリンを阻害し、骨形成を抑制する免疫抑制剤 FK506 (1mg/kg) を生後 5 週より連日筋肉注射して作製した骨粗鬆症ラットに下顎骨延長を行ったところ、著明な下顎頭骨吸収を認めた (引用文献)。

2010 年に NIH コンセンサス会議において、骨強度は骨量 (骨密度) と骨質 (コラーゲン架橋の質や骨梁構造など) によって規定されると定義された。骨は鉄筋コンクリートに例えられ、鉄筋に相当する構造物がコラーゲンで、コラーゲン線維の強度を規定しているのが隣り合う分子同士をつなぎ止めるコラーゲン架橋であり、成熟架橋 (ピリジノリン架橋) は骨を粘り強くして骨強度を高める。骨組織は様々なメカニカルストレスに適応できるように硬く、かつ弾性に富んでいる必要があるが、近年コラーゲン架橋の質と生体アパタイト (Biological Apatite, BAp) 結晶の配向性によって規定される骨質が骨強度の約 30% を担っているとして注目されている。PCR の発症においても骨量とともに骨質が影響していると考えられるが、PCR と骨質との関係については明らかにされていない。

一方、間葉系幹細胞 (rMSCs) の培養上清には多様な成長因子が含まれ、これらの成長因子群のもつ血管新生、細胞遊走および骨形成促進作用による骨再生医療への応用が期待されている。われわれも、間葉系幹細胞培養上清 (MSC-CM) の骨形成促進効果を、動物実験モデルを用いて確認し報告した (引用文献)。そこで、PCR の発症予防には、骨形成促進効果を有する MSC-CM が有用ではないかと考えた。

PCR 発症メカニズムにおける骨質の影響が解明され、さらにその予防法が開発されれば、外科的矯正治療の成績向上に寄与すると考える。

2. 研究の目的

PCR の発症メカニズムを解明するためには、下顎頭に負荷をかける動物モデルが有用と考え、本研究ではわれわれが確立した下顎骨延長による PCR 発症モデルラットを応用し、骨質を低下させたラットの下顎頭に負荷をかけた時の下顎頭への影響を解明するとともに、新たな PCR 発症予防法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) ビタミン C の充足状態が下顎頭部の骨密度や骨梁の微細構造に及ぼす影響

Osteogenic Disorder Shionogi (ODS) ラット (日本クレア) の生存には飲水によってビタミン C (適正量: 1.0 mg/ml) の投与が必要である。本実験では、ODS 雄ラットを用いて生後 5 週齢よりビタミン C を含まない食餌 (C-free Diet) を与え、異なるビタミン C 濃度の水を与える抵投与群 (0.5 mg/ml ビタミン C 含有水)、適正投与群 (1.0 mg/ml ビタミン C 含有水)、高投与群 (2.0 mg/ml ビタミン C 含有水) の 3 群に分類した。10 週齢でと殺を行い、それぞれの個体より下顎頭形態や骨梁の微細構造をマイクロ CT を用いてビタミン C の充足状態が下顎頭部の骨量・骨質に及ぼす影響を検討した。

(2) β -Aminopropionitrile が骨密度や骨梁の微細構造に及ぼす影響

生後 4 週より Wistar ラットにコラーゲン線維の収束化を阻害する β -Aminopropionitrile (BAPN) を 0.2% (500ml の水に BAPN 1.0g 溶解) の濃度で飲み水へ溶解し投与した。飲水は自由飲水とした。BAPN 投与して 4 週、8 週でと殺を行い、それぞれの個体より大腿骨と下顎骨を採取し、 μ CT を用いて骨密度や骨梁の微細構造を観察した。

(3) 骨髄由来間葉系幹細胞培養上清 (MSC-CM) が下顎頭骨吸収に及ぼす影響の検討

Wistar ラットより骨髄由来間葉系幹細胞 (rMSCs) を採取し、無血清培地で 48 時間培養して得られた培養上清を MSC-CM とした。rMSCs を MSC-CM 存在下に培養し rMSC における骨および軟骨形成、血管新生関連遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR にて確認した。さらに、ラット下顎骨延長により生ずる下顎頭吸収モデルを用い、10 日間の下顎骨延長期間において尾静脈

より延長開始時、延長開始 5 日目、延長開始終了時（延長開始 10 日目）MSC-CM を注入した（図 1）。延長開始時、延長終了時、延長終了後 1 週、2 週、3 週、に動物用マイクロ CT にて下顎頭の 3 次元的形態変化および骨質・骨密度の計測を実施した。また延長終了後 3 週の下顎頭およびその周囲組織について組織学的検討を行なった。

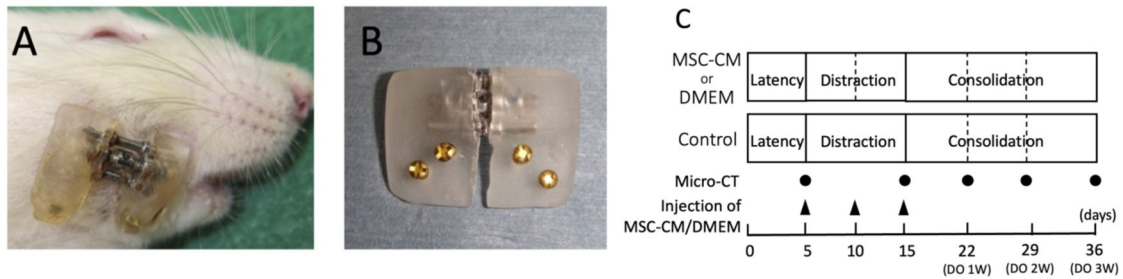


図 1 . A: ラット下顎骨延長モデル、 B: 自家製骨延長装置、 C: 骨延長プロトコール 10 日間の下顎骨延長期間において尾静脈より延長開始時、延長開始 5 日目、延長開始 10 日目に MSC-CM を注入

4. 研究成果

(1) ビタミン C の充足状態が下顎頭部の骨密度や骨梁の微細構造に及ぼす影響

0.5 mg/ml、1.0mg/ml、1.5mg/ml の異なる濃度のビタミン C 含有水で 10 週齢まで飼育したのちに飼育期間中の体重は 3 群間で明らかな差を認めなかった。10 週齢時に μ CT で下顎頭の骨を撮影・分析したところ、下顎頭形態や骨梁の微細構造にビタミン C 摂取量の違いによる明らかな差は認められなかった。

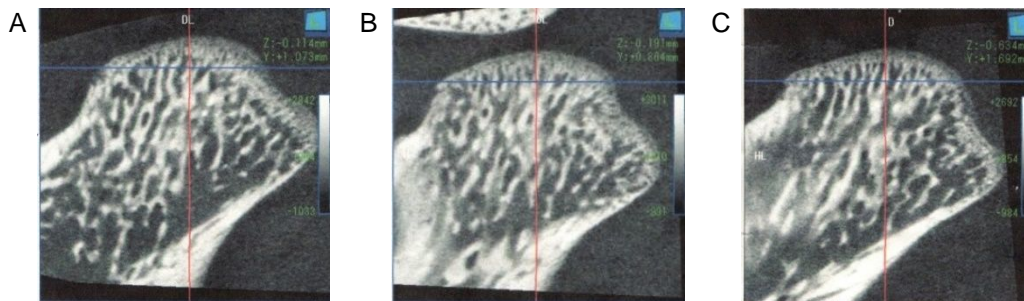


図 2 . 下顎頭のマイクロ CT 画像

- A: 0.5 mg/ml ビタミン C ラット
- B: 1.0 mg/ml ビタミン C ラット
- C: 1.5 mg/ml ビタミン C ラット

(2) β -Aminopropionitrile が骨密度や骨梁の微細構造に及ぼす影響

大腿骨の骨密度計測結果（図 3）

BAPN 投与群は骨密度(BMD), bone volume, BV/TV の全てにおいて対照群より低値を示した。

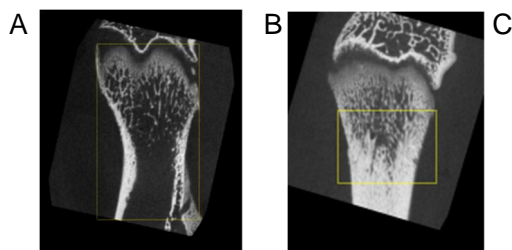


図 3 . 大腿骨のマイクロ CT 画像と骨密度計測結果

- A: BAPN 投与ラットの大腿骨
- B: 対照群の大腿骨
- C: BAPN 投与群の骨密度は低値を示した

	BAPN 投与群	対照群
BMD (mg/cc)	263.0	493.1
Bone volume (mm ³)	26.3	34.2
BV/TV (%)	41.1	0.5

下顎頭の骨密度計測結果（図4）
 BAPN 投与ラットはTMJとTrabecular boneの骨密度は対照群と比較すると低い値となった。

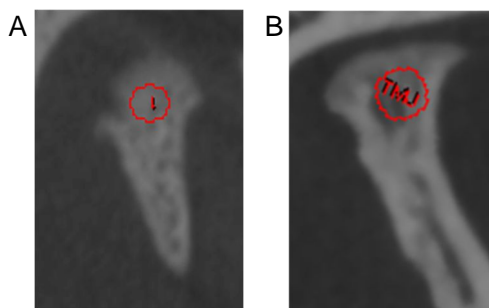


図4. 下顎頭のマイクロCT画像と骨密度計測結果
 A: BAPN 投与ラットの下顎頭
 B: 対照群の下顎頭
 C: BAPN 投与群の下顎頭の骨密度は低値を示した

	BAPN 投与群	対照群
TMJ BMD (mg/cc)	212.2	522.2

今回の研究結果より BAPN 投与ラットは骨密度が低下するとともに脆い下顎骨となっており、下顎骨骨切りと骨延長装置の装着術を施行したところ、その脆さから有効な骨延長を行うことができなかった。下顎骨延長を行うためには、BAPNの投与量を減らしたモデルラットの作製が必要である。

(3) 骨髄由来間葉系幹細胞培養上清 (MSC-CM) が下顎頭骨吸収に及ぼす影響の検討

MSC-CM は rMSCs におけるアルカリホスファターゼ、Runx2、I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、SOX9、アグリカン、アンジオポエチン 1 など、骨・軟骨形成、血管新生に関する遺伝子発現を亢進した（図5）。

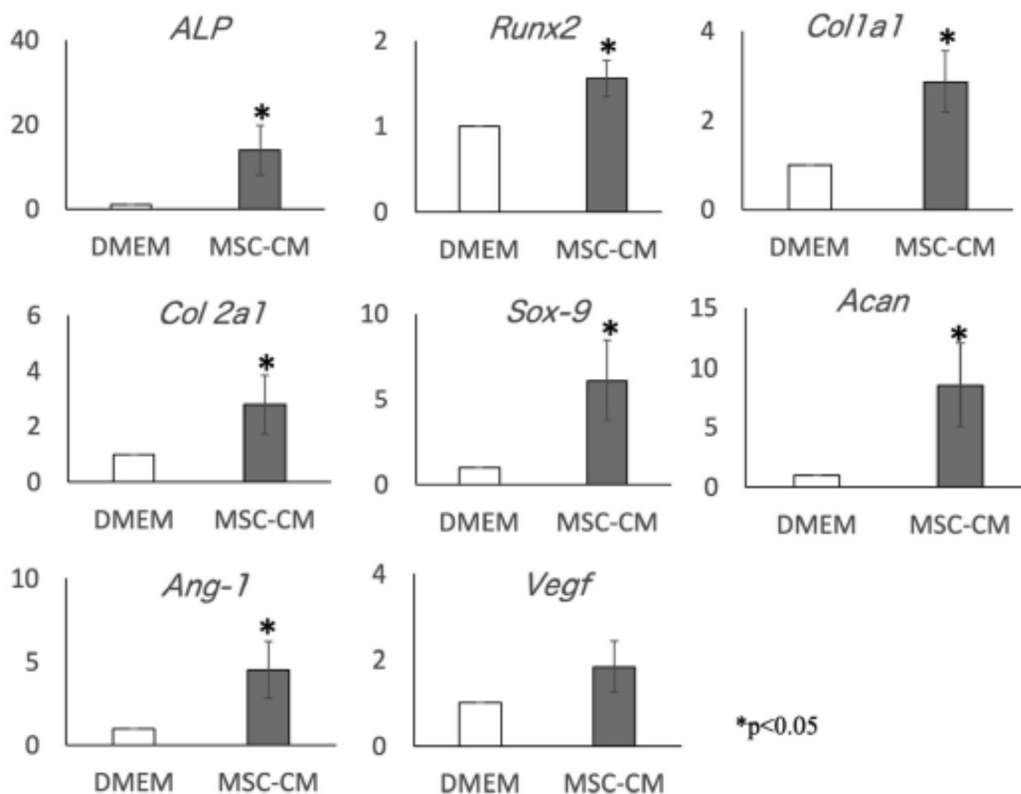


図5. rMSC 遺伝子発現に対する MSC-CM の影響

またマイクロCTによる検討の結果、MSC-CM 投与群では下顎頭吸収が有意に抑制され、下顎頭における骨密度の低下も有意に抑制された。組織学的には、下顎頭吸収が抑制されたばかりか、下顎頭吸収でみられる軟骨層の菲薄化が MSC-CM 投与群では見られず、肥大軟骨層が保護されていた。これらの結果より MSC-CM が下顎頭吸収に対する抑制効果を持つことが示唆された。

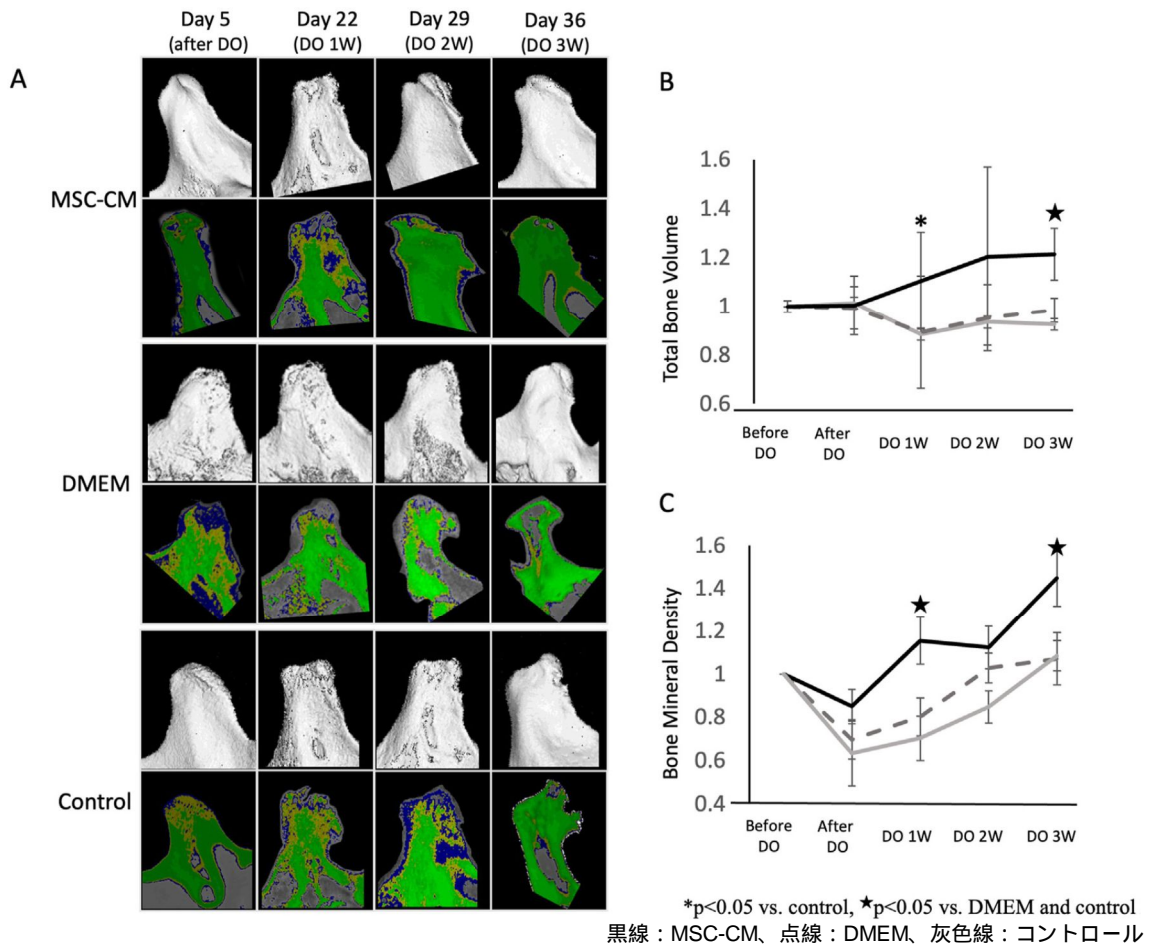


図6. マイクロCTによる検討結果

A: マイクロCT画像と顎骨のスライス領域のCT値カラーマップを表す。画像は、各グループとも同一ラットから生成した。CRは、ラット下顎骨の仮骨延長術(DO)後に観察され、MSC-CM治療群で時間とともに改善した。

B: 経時的なBVの変化。MSC-CMグループでは、BVは時間の経過とともに改善し、DO後1週間および3週間後に統計的に有意な改善を示した。

C: 経時的なBMDの変化。MSC-CM群で経時的に改善され、DMEM群と対照群の両方よりも1週間後と3週間後に統計的に有意な差が認められた。

<引用文献>

Sakagami N, Kobayashi T, Nozawa-Inoue K, Oda K, Kojima T, Maeda T, Saito C: A histologic study of deformation of the mandibular condyle caused by distraction in a rat model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2014 Sep;118(3):284-94.

Daisuke Suda, Atsushi Ohazama, Takeyasu Maeda, Tadaharu Kobayashi: The effect of bone mass and architecture on mandibular condyle after mandibular distraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017 Oct;124(4):339-347.

Wataru Katagiri, Takamasa Kawai, Masashi Osugi, Yukiko Sugimura-Wakayama, Kohei Sakaguchi, Taku Kojima and Tadaharu Kobayashi: Angiogenesis in newly regenerated bone by secretomes of human mesenchymal stem cells. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2017 Mar 25;39(1):8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katagiri Wataru, Endo Satoshi, Takeuchi Ryoko, Suda Daisuke, Saito Naoaki, Kobayashi Tadaharu	4. 巻 7
2. 論文標題 Conditioned medium from mesenchymal stem cells improves condylar resorption induced by mandibular distraction osteogenesis in a rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e06530 ~ e06530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2021.e06530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤諭、片桐渉、竹内涼子、須田大亮、小林正治
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞培養上清は進行性下顎頭吸収の進行を抑制する
3. 学会等名 第74回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片桐渉、遠藤諭、竹内涼子、須田大亮、齋藤直朗、小林正治
2. 発表標題 進行性下顎頭吸収に対する骨髄間葉系幹細胞培養上清を用いた再生医学的予防・治療法の開発研究
3. 学会等名 第30回 NPO法人日本顎変形症学会学術集会
4. 発表年 2020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	片桐 渉 (Katagiri Wataru) (10437030)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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	長谷部 大地 (Hasebe Daichi) (30571905)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101)	

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