

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19189

研究課題名（和文）薬剤関連顎骨壊死のメカニズムを大局的に解明する－骨細胞ネットワークに着目して－

研究課題名（英文）Comprehensive elucidation of Medication-related Osteonecrosis of the Jaw - focusing on osteocyte network -

研究代表者

齋藤 直朗（SAITO, Naoaki）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10826259

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は薬剤関連顎骨壊死の発症過程における骨細胞動態に着目して、顎骨壊死モデルラットでの骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、マクロファージ群の細胞動態を組織学的、分子生物学的に解明することであったが、コロナ禍における他業務のエフォート増加など、薬剤関連顎骨壊死の病態を呈するモデルラットの再現、作成が十分に行えず、当初予定していた解析に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤関連顎骨壊死の発症メカニズムを解明する目的で行った本研究であったが、薬剤関連顎骨壊死モデルラットの再現、作成に苦慮し、十分な成果を得ることができない結果に終わった。骨代謝における骨細胞を司令塔とした細胞ネットワークという着眼点は維持しつつ、より実現可能なアプローチでの研究を進め、薬剤関連顎骨壊死で苦しむ患者の発症防止、治療に寄与したい。

研究成果の概要（英文）：This study focused on bone cell dynamics during the development of drug-related osteonecrosis of the jaw, and aimed to histologically and molecular biologically elucidate the cellular dynamics of bone cells, osteoblasts, osteoclasts, and macrophages in a rat model of osteonecrosis of the jaw. However, due to increased efforts on other tasks during the COVID-19 pandemic, it was not possible to fully reproduce and create model rats exhibiting the pathology of drug-related osteonecrosis of the jaw, and the analysis originally planned could not be completed.

研究分野：口腔外科学

キーワード：薬剤関連顎骨壊死 骨細胞 破骨細胞 骨代謝ネットワーク マクロファージ機能的亜群

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2003年にビスホスホネート(BP)製剤の投与を受けているがん患者あるいは骨粗鬆症患者において難治性の顎骨壊死(BP-Related ONJ:BRONJ)が発生することが初めて報告され、その後、RANKL(Receptor Activator of NF- κ B Ligand)に対するヒト型IgG2モノクローナル抗体製剤(denosumab)の投与患者でもBRONJと同様のONJ(denosumab-related ONJ:DRONJ)がほぼ同じ頻度で発生することが判明した。いずれも破骨細胞による骨吸収を治療ターゲットとする治療薬がONJ発生に関与することから、現在では両者ならびに関連薬剤を包括してMRONJと称されている。がんの骨転移や骨粗鬆症に伴う骨折は患者のQOLに直結する要因となるため、骨吸収抑制薬が患者にもたら恩恵は大きいものである。しかしながら、口腔機能も日常生活に密接に関わることから、MRONJによるQOL低下も重大な事象としてとらえる必要がある。そのため、早急な予防法や治療法の確立、病態解明が求められている。最初のBRONJの報告から15年が経過し、2016年に発行されたMRONJに対するポジションペーパー改訂版を踏まえて、近年では抜歯前やMRONJ発症後の治療に際して休薬は不要であることや、積極的な外科的療法により良好な治療成績を得られているとする報告が増えてきたが、全体として予防策や治療法についての統一した見解が得られていないのが現状である。また、海外におけるMRONJ発症率は0.001~1.8%と比較的稀であるとされてきたが、近年本邦で行われた抜歯後のMRONJ発生に関する他施設共同研究では、骨粗鬆症患者で1~2%、さらに悪性腫瘍患者では10~20%と報告されており、決して稀な副作用として看過できる状況ではなくなってきている。治療法や病態メカニズムに関する基礎的研究では、幹細胞由来の培養上清を用いた研究や薬剤による上皮細胞への為害作用、マクロファージによる炎症・抗炎症作用に着目した報告がされているが、十分な発症メカニズムの解明には至っていない。一方で、本邦でも今年度承認予定の新規骨粗鬆症治療薬である抗スクレロスチン抗体(romosozumab)は、骨細胞から分泌されるスクレロスチンを阻害することで、骨形成促進と骨吸収抑制作用の両方の作用を有する薬剤とされているが、同薬剤でも顎骨壊死が早期に生じるとされている。いまだにBP製剤や抗RANKL抗体がどのようなメカニズムで顎骨壊死を引き起こしているのかが解明されていない中で、新規骨粗鬆症治療薬の登場により、今後の対応に大きく影響を及ぼすことが推察される。これまで、薬剤関連顎骨壊死の主因は骨吸収抑制薬による破骨細胞機能ならびに分化阻害であると考えられていたが、直接的に破骨細胞に作用しない抗スクレロスチン抗体でも顎骨壊死がみられるということは、破骨細胞のみへの影響だけでは十分に顎骨壊死のメカニズムを説明できないことを示唆している。すなわち骨代謝関連細胞や破骨細胞の起源となる単球・マクロファージの関連性を解明する必要があると考えた。骨芽細胞・前骨芽細胞と破骨細胞は互いにRANK-RANKL、セマフォリン3A・4Dによって骨形成と骨吸収を行う上でのカップリング機構を要しており、これらをスクレロスチンといった分泌因子を介して骨細胞が調節している。そのため、BP製剤による破骨細胞のアポトーシス、抗RANKL抗体による破骨細胞分化阻害により、骨代謝全体としてのバランス異常が顎骨壊死のメカニズムにつながっているのと考えられる。また、破骨細胞の異常はマクロファージ機能的亜群の分布にも影響を与えられ、炎症・抗炎症バランスが病態進行に関与していることが推察される。このような病変全体としての骨代謝関連細胞ならびにマクロファージの動態変化やその関連性については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、骨代謝の司令塔である骨細胞を中心に、MRONJにおける骨代謝関連細胞ならびにマクロファージの動態変化を大局的に解明することを目的としている。これまでの研究は骨吸収抑制薬が与える影響を上皮細胞や破骨細胞やマクロファージといった比較的ピンポイントの対象として検証している報告が多いが、いずれもクリティカルな要因とはいえ、様々な要因が連鎖もしくは重複してMRONJを引き起こしていると考えられる。「木を見て森を見ず」ではないが、いまいちど「森を見渡すように」全体像を把握するようなアプローチが必要であると考え。骨細胞を起点とした骨芽細胞、前骨芽細胞、破骨細胞、マクロファージなどの骨代謝関連細胞ネットワークとして全体像に注目した解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

MRONJモデルラットとして5週齢雄性Wistar/STラットにゾレドロン酸(ZOMETA®)を35 μ g/kg/week、デキサメタゾン(DECADORON®)を1mg/kg/dayで2週間連続皮下注射。投与終了後に片側の上下顎臼歯を抜去したものをMRONJ群として使用する。概ね7~8割の個体でMRONJ様の骨露出ないし、腐骨分離像を呈するが、肉眼的に明らかなMRONJ様の病変を呈していないものも、徴候的な所見が得られる可能性があり、MRONJ群として解析する。抜歯前2週間に生食のみを投与した群をコントロールとして用いる。いずれの群も観察ポイントは抜歯後1、3、5週間の時点とし、各種解析を行う。

【解析項目】

- ・in vivo 3DマイクロX線CTを用いた、経時的な病態変化の解析

生体で撮影可能なマイクロ X 線 CT 装置 (CosmoScan GX, Rigaku 社製) を用いて、抜歯後 1、3、5 週の各時点での病変を経時的に画像評価する。主な観察ポイントとしては、腐骨分離の有無、骨溶解像の範囲、周囲骨硬化像の範囲とし、それぞれの体積を画像処理ソフトにて算出する。

・組織学的解析

【1】骨細胞の解析：骨細胞マーカーとして Dentin matrix protein 1 (Dmp1) 免疫組織化学を用いて、観察領域における生活骨細胞の割合を算出する。また、骨溶解ならびに腐骨形成過程における骨細胞死の様式を確認する目的で TUNEL 染色を行うとともに、酸性ホスファターゼ酵素組織化学を併用し、骨細胞死に伴う、骨小腔や骨細管系の脱灰様相を探る。

【2】骨芽細胞・破骨細胞の解析：骨芽細胞ならびに前骨芽細胞マーカーとしてはアルカリホスファターゼ (ALP) 免疫組織化学を用いる。破骨細胞マーカーとしては酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 酵素組織化学、Cathepsin K 免疫組織化学を用いて、病変における破骨細胞分化の評価を行うとともに、形態学的に骨吸収活性を有する破骨細胞の動態を解析する。

【3】マクロファージの解析：CCR7 (M1 マクロファージマーカー)、CD163 (M2 マクロファージマーカー) につき免疫組織化学による二重染色を行い、病変組織におけるマクロファージサブタイプの集簇動態を解析し、破骨細胞との関連性を探る。

・定量的 PCR、ELISA 法による骨代謝関連因子、炎症関連メディエーターの発現解析
MRONJ 病変領域から組織サンプルを回収し、定量的 PCR ならびに ELISA 法を用いて、骨芽細胞分化マーカー (ALP、Runx2)、破骨細胞分化マーカー (NFATc1)、骨代謝関連サイトカイン (スクレロスチン、セマフォリン 3A・4D)、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1、IL-6)、抗炎症性サイトカイン (IL-4、IL-10、TGF- β)、単球・マクロファージ遊走因子 (MCP-1) について遺伝子発現もしくはタンパク発現解析をすることで、組織学的所見に対する分子生物学的裏付けを行う。

4. 研究成果

本研究では報告されている手法に基づいて顎骨壊死モデルラットにおける解析を試みたが、想定していた顎骨壊死の発現が確認できず、薬剤量などの調整も行ったが、十分な結果を得ることができず、当初予定していた解析に至らなかった。一方、予備研究として行った骨形成過程におけるマクロファージ機能的亜群のスイッチングが骨代謝において重要である可能性が示唆され、顎骨壊死における炎症反応に起因する骨代謝関連細胞への関連が今後の顎骨壊死メカニズム解明の一助になることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wataru Katagiri, Satoshi Endo, Ryoko Takeuchi, Daisuke Suda, Naoaki Saito, Tadaharu Kobayashi	4. 巻 7(3)
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 1-8
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 -

1. 著者名 Hiroko Kato, Masahiro Sugimoto, Ayame Enomoto, Miku Kaneko, Yuko Hara, Naoaki Saito, Aki Shiomi, Hisashi Ohnuki, Kenji Izumi	4. 巻 10(6)
2. 論文標題 Metabolomic Alteration of Oral Keratinocytes and Fibroblasts in Hypoxia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10061156	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 1件）

1. 発表者名 Satoshi ENDO, Wataru KATAGIRI, Ryoko TAKEUCHI, Naoaki SAITO, Tadaharu KOBAYASHI
2. 発表標題 Development of novel bone regenerative medicine by the contents from stem cell conditioned media
3. 学会等名 The 58th Congress of the Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片桐渉、竹内涼子、遠藤諭、齋藤直朗、長谷部大地、船山昭典、小林正治
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞培養上清のマクロファージスイッチング作用は早期の骨形成を誘導する
3. 学会等名 第23回日本顎顔面インプラント学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------