

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K18604
研究課題名(和文) 過剰な咬合力による薬剤関連顎骨壊死発症機序の解明

研究課題名(英文) Hyperocclusive state and MRONJ

研究代表者

峯 裕一 (Mine, Yuichi)

広島大学・医系科学研究科(歯)・講師

研究者番号：60605989

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)：薬剤関連顎骨壊死は、発症頻度は稀であるものの、一度発症すれば重篤な症状をきたす。リスクファクターとして、骨吸収抑制薬の種類、局所的要因、全身的要因、先天的要因、生活習慣、併用薬等が考えられている。本研究では、実験的過剰咬合とビスフォスフォネート投与が、マウス顎骨に与える影響を検討した。また、骨オルガノイドによる *in vitro* 試験においても検討を加えた。実験的過剰咬合とビスフォスフォネートを投与したマウスの顎骨では、骨壊死の兆候である空の骨細胞窩が多数認められた。また骨オルガノイドにおいて、静水圧刺激とビスフォスフォネート刺激を組み合わせることで、壊死のマーカーであるLDHの放出が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

補綴歯科治療において顎堤は、義歯やインプラントを支持する上で重要な役割を果たしており、その状態不良は補綴歯科治療の成功を妨げる大きな要因となる。薬剤関連顎骨壊死は、本邦を含め複数のポジションペーパーが関連学会から示されている。しかしながら、その発症メカニズムは未だ明確にはなっていない。本研究では、過剰な咬合力や義歯の使用による口腔内の刺激と薬剤関連顎骨壊死の関連について、その一端を明らかにすることを目指し研究を推進した。

研究成果の概要(英文)：Osteonecrosis of the jaw (ONJ) is a serious adverse event that is associated with antiresorptive agents, and it manifests as bone exposure in the maxillofacial region. This *in vivo* model exhibited ONJ in alveolar bone, particularly in the mandible. Moreover, the experimental hyperocclusion induced remarkable alveolar bone resorption in both mouse mandible and maxilla, whereas N-BP treatment completely prevented alveolar bone resorption. In this study, we also modeled trauma by exposing clumps of mesenchymal stem cells (MSCs)/extracellular matrix complex to hydrostatic pressure in combination with N-BP. Hydrostatic pressure loading induced lactate dehydrogenase (LDH) release by calcified cell clumps that were differentiated from MSCs; this LDH release was enhanced by N-BP priming. These *in vivo* and *in vitro* models may contribute further insights into the effect of excessive mechanical loading on ONJ onset in patients with occlusal trauma.

研究分野：骨生物学

キーワード：MRONJ 咬合性外傷 実験的過剰咬合 顎骨壊死 ONJ 薬剤関連顎骨壊死 過剰咬合

1. 研究開始当初の背景

補綴歯科治療において顎堤は、義歯やインプラントを支持する上で重要な役割を果たしており、その状態不良は補綴歯科治療の成功を妨げる大きな要因となる。一方、高齢化社会を背景として、ビスフォスフォネート (BP) 製剤をはじめとした骨吸収抑制薬の使用が増加している。BP はハイドロキシアパタイトに高い親和性を示し、破骨細胞のアポトーシスを誘導することで、骨吸収を阻害する。現在、骨転移を有する癌患者および骨粗鬆症患者の治療に広く用いられており、臨床的なエビデンスが示された治療効果の高い薬剤である。しかしながら、2003年にBP製剤治療を受けている癌または骨粗鬆症患者に、侵襲的歯科治療をきっかけに難治性の顎骨壊死 (BP-Related Osteonecrosis of the Jaw, BRONJ) が発生することが初めて報告された。さらに、BP製剤だけではなく、その他の骨吸収抑制剤や血管新生阻害剤においても顎骨壊死が惹起されることが明らかとなった。現在では、薬剤に関連した顎骨壊死として薬剤関連顎骨壊死 (Medication-related ONJ, MRONJ) という言葉が用いられている。

2016年に顎骨壊死検討委員会が発表したポジションペーパーでは、MRONJの発症リスクとして抜歯のみならず、過大な咬合力、不適合義歯およびインプラント治療など補綴学的に重要な症状・治療法についても重大な局所因子としている (図2)。しかしながら、ポジションペーパーでは、これらのリスク因子は医学的根拠に基づいて確定されたものではないと述べられており、実際、MRONJの発症機序は完全には明らかにされていない。

2. 研究の目的

本課題では、MRONJ発症に関与が疑われている過剰な咬合力等の不適切な荷重に焦点をあてる。これらの病態を再現するために17K17181において確立したモデルマウスを作製、詳細に解析を行うことで、MRONJの発症と重症化の機序を明らかにすることを目的とする。

現在までにMRONJに対する治療法に関する研究は複数報告されており、その一刻も早い応用が期待されている。一方で上述したように、医学的根拠に基づいた発症機序は未だ明らかになっていない。本課題はMRONJモデルマウスおよび*in vitro*骨壊死モデルを詳細に比較・解析する点に独自性を有するとともに、発症および重症化の機序の一端を解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) ビスフォスフォネート投与マウスにおける実験的過剰咬合の誘導

本研究は広島大学動物実験委員会の承認を受け実施した (承認番号 A18-106)。6週齢雌のC57BL/6Jマウスに対し、週2回、ビスフォスフォネートとしてゾレドロン酸 (ZOMETA; ノバルティスファーマ株式会社、東京) を尾静脈から、デキサメタゾン (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) を腹腔から3週間投与した。実験開始1週間後に実験的過剰咬合の誘導を目的として、マウス上顎左第一大臼歯咬合面にメチルメタクリレートレジン (スーパーボンド; サンメディカル株式会社、滋賀) を使用し、矯正用線 (デンツプライシロナ株式会社、東京) を接着した。ゾレドロン酸/デキサメタゾン投与および生理食塩水/デキサメタゾン投与マウスに対し、矯正用線の接着の有無により計4群を設定し、実験条件とした。解析にはTRAP染色を用いた。

(2) 三次元間葉系幹細胞集塊 (Clumps of MSC/ECM complex, C-MSCs)

ビスフォスフォネートの投与と咬合圧を想定した、*in vitro*モデルの構築を試みた。ヒト間葉系幹細胞セルライン UE7T-13細胞を、アスコルビン酸を含むDMEM培地で培養した。UE7T-13細胞をウェルから細胞を剥離し Corning® 超低接着表面プレート上で培養することで、三次元間葉系幹細胞集塊 (Clumps of MSC/ECM complex, C-MSCs) を作製した。C-MSCsは骨誘導分化培地で培養し、ビスフォスフォネート存在下もしくは非存在下で、静水圧刺激を加えた。壊死の指標として、乳酸脱水素酵 (Lactate Dehydrogenase, LDH) の放出を検出した。また、C-MSCsの石灰化については、マイクロCT (Skyscan1176; BRUKER, MA, US) を用いて評価した。

(3) 顎骨壊死、特に BRONJ 発症におけるビスフォスフォネートの役割の解明に向けた基礎的検討

UE7T-13細胞を、DMEM培地もしくは100nMのデキサメタゾン、50µg/mLのアスコルビン酸および10mMのβ-グリセロリン酸を含む骨誘導分化培地で培養した。ビスフォスフォネートとしてリセドロネートおよびリセドロネートアナログを使用した。リセドロネートアナログは、ピリジルを含むR2側鎖のメチレン (-CH₂-) 基が1個増加しており、このわずかな構造変化により骨吸収抑制能が大幅に低下している。UE7T-13細胞をリセドロネートもしくはリセドロネートアナログ存在下で24時間培養し、Alamar Blue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, US) を用いて細胞活性への影響を評価した。また、リセドロネートもしくはリセドロネー

トアナログ存在下で 0、3、7 日間培養後 RNA を抽出し、real-time RT-PCR を用いて PGRN mRNA の発現を評価した。さらに、*Porphyromonas gingivalis* 由来リポ多糖 (Pg-LPS) が PGRN mRNA の発現に与える影響について検討した。

4. 研究成果

(1) ビスフォスフォネート投与マウスにおける実験的過剰咬合の誘導

17K17181 において確立した方法により、ビスフォスフォネート投与マウスにおける実験的過剰咬合の誘導し評価を加えた。TRAP 染色の結果、正常咬合のマウス顎骨と比較して実験的過剰咬合のマウス顎骨では、TRAP 陽性細胞の数が有意に多く認められた。さらにゾレドロン酸を投与した実験的過剰咬合のマウス顎骨においても TRAP 陽性細胞の数が有意に多く認められた(図 1)。

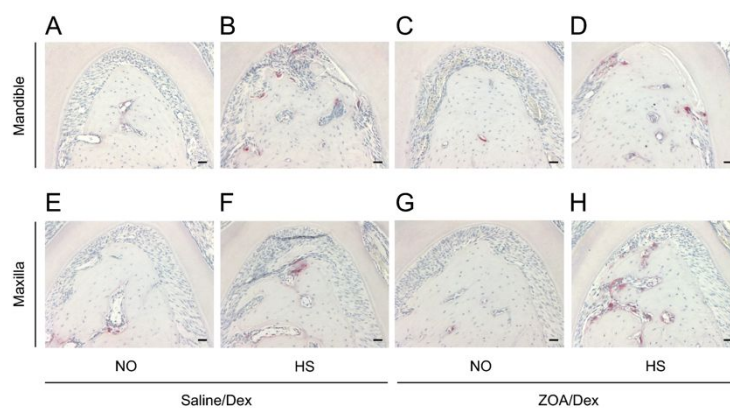


図 1. 上顎および下顎の TRAP 染色像

(2) 三次元間葉系幹細胞集塊 (Clumps of MSC/ECM complex, C-MSCs)

C-MSCs を骨分化誘導培地で分化誘導を行うことで、マイクロ CT 像の取得が可能となり、顕著な石灰化が確認された。

リセドロネートを C-MSCs において LDH の放出を誘導しなかった。一方、静水圧刺激により C-MSCs からの LDH の放出を検出した。さらに、リセドロネート存在下に静水圧刺激を加えることにより、C-MSCs からの LDH の放出は有意に増加した。

(3) 顎骨壊死、特に BRONJ 発症におけるビスフォスフォネートの役割の解明に向けた基礎的検討

100 μ M までのリセドロネートおよびリセドロネートアナログは、UE7T-13 の細胞活性に影響を与えなかった。

UE7T-13 細胞において PGRN mRNA は、骨誘導分化培地で培養することで、DMEM 培地で培養した場合と比較して有意に上昇した。

コントロール群と比較してリセドロネート群では、培養 3 および 7 日目のいずれにおいても PGRN mRNA の発現が有意に上昇していた。一方、リセドロネートアナログ群ではこのような発現の上昇は認められず、コントロール群と同程度の発現量を示した。

Pg-LPS 存在下で UE7T-13 細胞を培養した結果、骨誘導分化培地で培養した場合においても PGRN mRNA の発現は認められなかった。さらに、Pg-LPS 存在下においてはリセドロネートによる PGRN mRNA の発現誘導も認められなかった。

本研究では、マウスにおいて顎骨壊死様の病態を誘導し詳細な解析を行った。また、C-MSCs と静水圧刺激により *in vitro* 解析システムを構築した。この *in vitro* 解析システムを用いることで、BRONJ 発症におけるビスフォスフォネートの役割を詳細に明らかにできる可能性が示唆された。今後は本件成果の結果を基に、MRONJ 発症機構の解明と新規治療法の開発に向けた研究を推進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ito Rei, Mine Yuichi, Yumisashi Yoshie, Yoshioka Reina, Hamaoka Misa, Taji Tsuyoshi, Murayama Takeshi, Nikawa Hiroki	4. 巻 7
2. 論文標題 In Vivo Efficacy of Lacticaseibacillus rhamnosus L8020 in a Mouse Model of Oral Candidiasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 322 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof7050322	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 Yoshioka Reina, Mine Yuichi, Kaku Masato, Nikawa Hiroki, Murayama Takeshi	4. 巻 150
2. 論文標題 Lansoprazole and zoledronate delays hard tissue healing of tooth extraction sockets in dexamethasone-treated mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 112991 ~ 112991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2022.112991	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 Ito Shota, Mine Yuichi, Yoshimi Yuki, Takeda Saori, Tanaka Akari, Onishi Azusa, Peng Tzu-Yu, Nakamoto Takashi, Nagasaki Toshikazu, Kakimoto Naoya, Murayama Takeshi, Tanimoto Kotaro	4. 巻 12
2. 論文標題 Automated segmentation of articular disc of the temporomandibular joint on magnetic resonance images using deep learning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04354-w	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 該当する
1. 著者名 Mine Yuichi, Iwamoto Yuko, Okazaki Shota, Nakamura Kentaro, Takeda Saori, Peng Tzu Yu, Mitsuhashi Chieko, Kakimoto Naoya, Kozai Katsuyuki, Murayama Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Detecting the presence of supernumerary teeth during the early mixed dentition stage using deep learning algorithms: A pilot study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Paediatric Dentistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ipd.12946	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 該当する

1. 著者名 Mine Yuichi, Okuda Karin, Yoshioka Reina, Sasaki Yuuki, Peng Tzu-Yu, Kaku Masato, Yoshiko Yuji, Nikawa Hiroki, Murayama Takeshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Occlusal Trauma and Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 380 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-021-00916-2	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 該当する

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 峯 裕一, 蓑田芽萌理, 吉岡玲奈, 牧平清超, 二川浩樹, 村山 長
2. 発表標題 実験的過剰咬合におけるビスフォスフォネート投与マウスのBRONJ様病態解析
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshioka R, Mine Y, Nikawa H, Murayama T
2. 発表標題 Lansoprazole Delays Extraction Socket Healing in Bisphosphonate-medicated Mice
3. 学会等名 The 34th Annual Scientific Meeting of International Association of Dental Research - South East Asia Division (IADR-SEA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshioka R, Mine Y, Nikawa H, Murayama T
2. 発表標題 Evaluation of Extraction Socket Healing in Zoledronate-medicated Mice Combining Lansoprazole
3. 学会等名 2021 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------