

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17150

研究課題名(和文) バイオマテリアル関連マクロファージによる骨吸収抑制剤投与下骨増生の制御機構

研究課題名(英文) The functions of biomaterial-associated macrophages during bone regeneration in body treated with anti-resorptive agents

研究代表者

小林 真左子 (Fujioka-Kobayashi, Masako)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：90706954

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)：骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート製剤や抗RANKL抗体製剤は、薬剤関連顎骨壊死発症のリスク因子である。本研究は、骨吸収抑制剤を投与した際に誘導されるバイオマテリアル関連マクロファージに注目し、骨形成能との関連性を検討した。ゾレドロン酸と抗RANKL抗体(mAb)を使用し、マウスモデルを作製した。それぞれのマウスからPlatelet-rich fibrinを加工し、キャリアとして骨補填材を頭蓋骨欠損部に埋植し、骨形成能を検討した。解析の結果、mAb投与群で新生骨形成が促進される傾向を認めた。組織学的に骨補填材周囲にマクロファージが誘導されたが、明確な極性変化を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨吸収抑制剤が免疫系とくに骨補填材関連免疫細胞に与える影響、骨形成に及ぼす影響に関する研究は、これまでほとんど報告がなかった。本研究では、骨吸収抑制剤関連顎骨壊死を発症していない骨吸収抑制剤投与中の個体において、人工物である骨補填材を用いる骨造成法が有用かどうかについて、初めてマウスモデルを作製し、多面的に評価した。本研究結果は、Guided bone regeneration法の応用知見として口腔外科、歯科インプラント外科領域に与えるインパクトは大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Anti-resorptive agents such as bisphosphonates and anti-RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) antibody agents are thought as risk factors of medication-related osteonecrosis of the jaw. The present study investigated the relationship between biomaterial-associated macrophages and bone formative potential during the treatment of antiresorptive drugs. The mice models were created using zoledronate and mouse anti-RANKL antibody (mAb). Platelet-rich fibrin from each model mouse was prepared, used as carrier of bone grafting materials, and implanted into the calvarial defects. The greater new bone formation in defects were observed in the mAb group. The macrophages, however, induced around the bone substitutes did not show any specific polarization tendency.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨吸収抑制剤 骨形成 骨補填材

1. 研究開始当初の背景

GBR (Guided bone regeneration)法などの骨造成手術が必要な場合、ドナーサイドの負担を軽減するため、限局的な骨欠損に対しては、骨補填材が用いられる。しかし、骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート製剤や抗 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand)抗体製剤が投与されている場合、口腔外科処置は薬剤関連顎骨壊死 (Medication-related osteonecrosis of the jaw; MRONJ) のリスクがある。そこで、骨吸収抑制剤投与中の患者に骨造成が必要な場合、その有効性のエビデンス不足から骨補填材を用いた方法が積極的に選択されることが少ないのが現状である。

近年 Osteomacs といわれる骨形成に関わるマクロファージの存在が報告され、バイオマテリアル関連マクロファージおよび Multinucleated giant cells (MNGCs)の極性変化と骨形成能の関連性について、近年注目されている。GBR で良好な骨形成が得られた場合であっても、骨補填材の表面にはバイオマテリアル関連マクロファージおよび MNGCs が多く観察されることは分かっているが、それら MNGCs の機能の全容は解明されていない。

そこで本研究では、骨吸収抑制剤関連顎骨壊死を発症していない骨吸収抑制剤投与中の個体において、人工物である骨補填材を用いる骨造成法が有用かどうかについて、マウスモデルを作製し、多面的に評価することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨吸収抑制剤を投与した際に誘導されるバイオマテリアル関連マクロファージに注目し、その機能を明らかにし、骨形成能との関連性を検討することとした。また、骨補填材を効果的に埋植するために Platelet-rich fibrin (PRF)をキャリアとして使用することを考え、骨吸収抑制剤を投与したマウスモデルから加工した PRF の有用性についても骨形成能について比較検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 骨吸収抑制剤マウスモデルの作製

検討する骨吸収抑制剤は、ゾレドロン酸 (ZOL)、抗 RANKL 抗体 (mAb) とした。

In vivo 実験として、C57BL/6J 雌マウスを使用し、Sham (PBS)、ゾレドロン酸 (ZOL)、抗 RANKL 抗体 (mAb) を全身投与した (図 1)。全身投与の効果は大腿骨遠位端の骨量、骨密度をマイクロ CT にて比較検討した。

(2) 骨吸収抑制剤投与マウスから作製した PRF の *in vitro* 評価

1) Sham (PBS)、2) ZOL、3) mAb を投与した個体からそれぞれ 1mL 採血し (n = 3)、遠心分離操作にて PRF を作製した。それぞれの PRF の抽出液を用い、マウス骨芽細胞様 MC3T3E-1 細胞を用いて *in vitro* で細胞生存能、細胞遊走能、細胞増殖能、骨芽細胞分化能について検討した。

(3) 頭蓋骨欠損部への骨補填材の埋植と骨形成能の評価

(1) で作製したモデルマウスの頭蓋骨に生検パンチを用いて径 3mm の骨欠損を作製した。それぞれのモデルマウスより作製した PRF と 1) empty、2) deproteinized bovine bone mineral (DBBM) 顆粒、3) carbonate apatite (CO₃Ap) 顆粒を混和し、骨欠損部に埋入した。治癒期間の後、動物を安楽死させ、試料を採取した (図 1)。採取した試料はマイクロ CT 及び組織学的に評価し、骨形成能、骨補填材周囲のマクロファージの形態と極性について比較検討を行った。

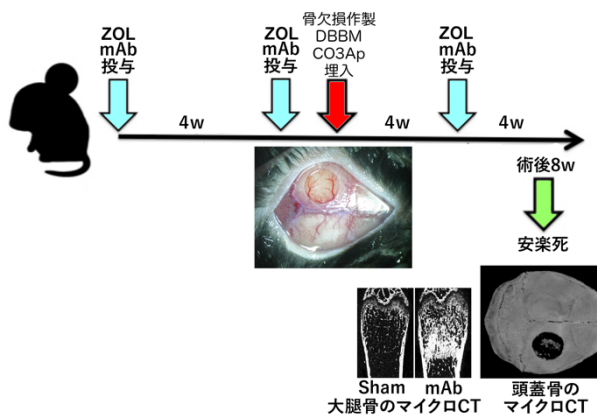


図 1: 骨吸収抑制剤投与マウスモデルにおける頭蓋骨欠損への骨補填材埋入と評価

4. 研究成果

(1) 骨吸収抑制剤投与マウスモデルの確立

Sham 群と mAb 投与群における投与 4 週後の大腿骨遠位端部のマイクロ CT 画像の 3D 構築画像の代表例を図 2 に示す。マイクロ CT 分析では、ZOL 投与群、mAb 投与群で、全身投与 4 週後に大腿骨遠位端部の骨量、骨密度は皮質骨、海綿骨ともに有意な増加を認めた。

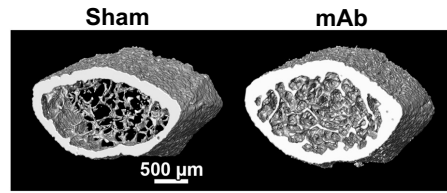


図 2 : Sham 群と mAb 投与群の大腿骨遠位端部のマイクロ CT の 3D 画像

さらに、脱灰薄切標本を作製し、H-E 染色、TRAP 染色で組織学的に評価したところ、Sham 群では骨梁構造および TRAP 活性を認めていたが、ZOL 投与群、mAb 投与群では、ともに海綿骨の骨梁構造を認めず、TRAP 活性は低下した。以上より、ZOL 投与群、mAb 投与群ともに全身的に骨量の有意な増加が確認され、骨吸収抑制剤投与マウスモデルとして有用であることが示された。しかしながら、設定した条件では、ZOL に比較し mAb 投与群の骨量、骨密度の増加量の方が有意に大きく、今後さらなる骨吸収抑制剤の投与のタイミング、投与量の条件検討が必要であると考えられた。また、条件検討を重ね実験を行っていたが、mAb は高額であり、実験計画当初の予定から投与回数制限が必要となったため、投与 4 週後のモデルの有用性が確認されたことを鑑み、頭蓋骨骨欠損部の治癒期間は 4 週とし、評価することとした。

(2) 骨吸収抑制剤投与マウスから作製した PRF の *in vitro* 評価

1) Sham (PBS)、2) ZOL、3) mAb を投与した個体から作製した PRF の表面性状を走査電子顕微鏡 (SEM) で観察した (図 3)。すべての群で規則的なフィブリン網の構造を認め、各群で明らかな差異を認めなかった。また、パ

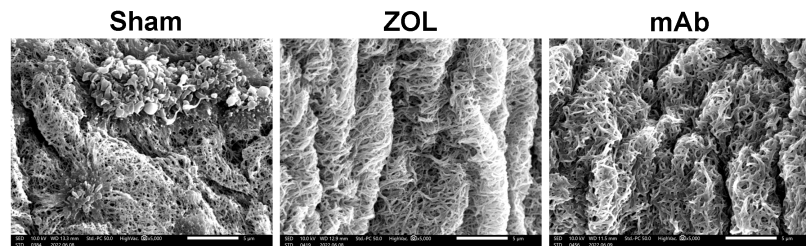


図 3 : 各群の PRF の SEM 像 (×5000 倍)

ッフィーコート層部には多くの白血球や血小板の凝集を認めた。

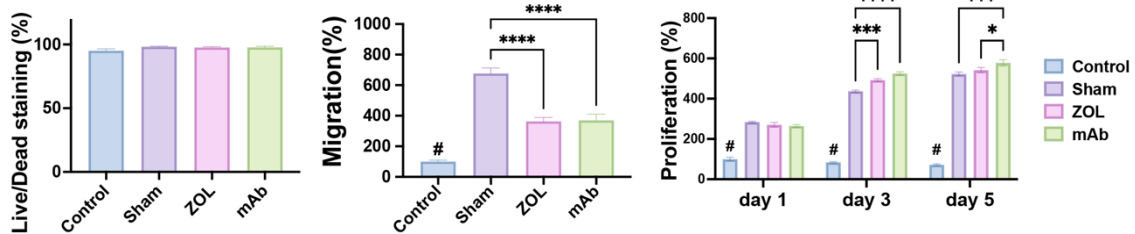


図 4 : 各群の PRF の細胞生存能、遊走能、細胞増殖能

(# ; 他のすべての群に比較して優位に低い、* ; 群間内に統計学的有意差がある、 $p < 0.05$)

1) Sham-PRF、2) ZOL-PRF、3) mAb-PRF の抽出液を用い、マウス骨芽細胞様細胞である MC3T3E-1 細胞を用い、細胞生存能、骨芽細胞分化能について比較検討した。その結果、図 4 に示すように、Live/dead assay ではすべての群で優れた細胞生存能を示した。細胞遊走能は PRF 群で Control に比較し有意に高かったが、Sham 群と比較し、ZOL 群、mAb 群では有意に低かった。細胞増殖能は PRF 群で Control に比較し有意に高かったが、Sham 群と比較し、ZOL 群、mAb 群では細胞増殖率が高い傾向が見られた (図 4)。

骨芽細胞分化能の比較検討では、ALP assay と Alizarin red 染色を行ったところ、PRF 群で Control に比較し、骨芽細胞分化能が有意に促進されていたが、Sham 群と比較し、ZOL 群、mAb 群では骨芽細胞分化能が抑制される傾向が見られた (図 5)。

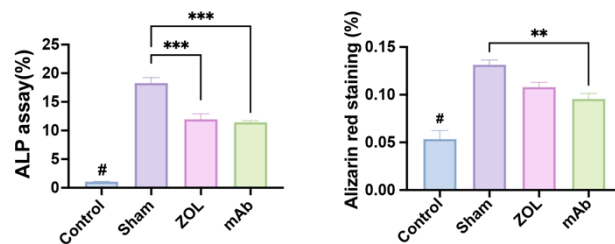


図 5 : 各 PRF における骨芽細胞分化能の比較 (ALP assay, Alizarin red staining)

(# ; 他のすべての群に比較して優位に低い、* ; 群間内に統計学的有意差がある、 $p < 0.05$)

以上より、骨吸収抑制剤投与モデルマウスから作製した PRF は Sham 由来の PRF に比較し、明らかな形態的な変化は認めなかったが、細胞遊走能や骨芽細胞分化能がやや低下する傾向を認めた。

(3) 頭蓋骨欠損部への骨補填材の埋植と骨形成能の評価

頭蓋骨骨欠損部への骨補填材の埋入の術中写真を図 6 に示す。結果 (1) で示したように、ZOL 投与群、mAb 投与群ともに Sham に比較し大腿骨遠位端部の骨量、骨密度の増加が見られたが、設定した条件では、ZOL に比較し mAb 投与群の骨量、骨密度の増加量の方が有意に大きく、ZOL 群と mAb 群での頭蓋骨骨欠損部の骨形成能の比較は困難であった。しかしながら、本研究で設定した条件で頭蓋骨骨欠損部の新生骨量を比較すると、mAb 投与群の方が Sham 群や ZOL 投与群に比較し、新生骨形成が促進する傾向にあった (図 7)。骨密度の比較検討では骨補填材投与群で欠損部の Mineral density が低い傾向にあった (図 7)。これは、残存する骨補填材が新生骨密度よりも CT 値が低いことによると考えられた。

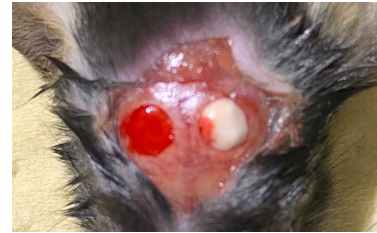


図 6 : 頭蓋骨骨欠損への骨補填材料埋入を行った術中写真

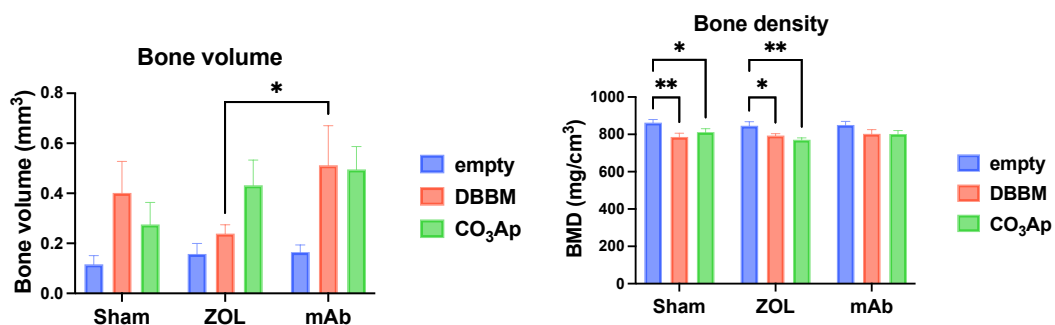


図 7 : 各群における新生骨量と骨密度の比較 (* ; 群間内に統計学的有意差がある、 $p < 0.05$)

組織学的には脱灰パラフィン切片を作製し、骨形態計測と免疫組織学的解析を行った (図 8)。新生骨量の計測は脱灰標本であるため、定量は正確性に欠けるが、マイクロ CT と同様の傾向が観察された。また、骨補填材の周囲にはマクロファージが誘導されていたが、骨形成量とマクロファージ数、MNGC 数との相関関係は認めなかった。M1、M2 マクロファージのマーカータンパクの免疫組織学的な検出によるマクロファージの極性の検討では、どちらのマーカーも発現がみられ、骨吸収抑制剤の違い、骨補填材の違いによる極性変化ははっきりとしなかった。そこで、今後の研究課題として、*in vitro* におけるマクロファージ、MNGCs、破骨細胞の培養実験でもより詳細な解析を行っていきたいと考えている。

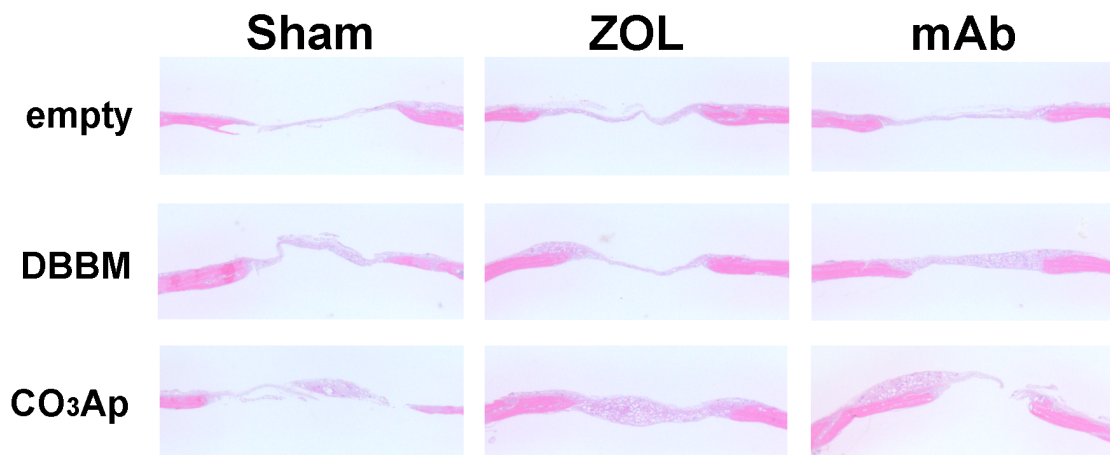


図 8 : 各群における骨欠損部の H-E 染色画像

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 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Koyanagi M, Fujioka-Kobayashi M, Yoneyama Y, Inada R, Satomi T | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Regenerative Potential of Solid Bone Marrow Aspirate Concentrate Compared with Platelet-Rich Fibrin | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Tissue Eng Part A | 6. 最初と最後の頁 749-759 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2021.0225 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Koyanagi M, Fujioka-Kobayashi M, Inada R, Yoneyama Y, Satomi T | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Skin and Bone Regeneration of Solid Bone Marrow Aspirate Concentrate Versus Platelet-Rich Fibrin | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Tissue Eng Part A | 6. 最初と最後の頁 141-149 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2022.0175 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 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 Fujioka-Kobayashi M, Koyanagi M, Yoneyama Y, Inada R, Satomi T |
| 2. 発表標題 Regenerative potential of solid bone marrow aspirate concentrate compared to platelet-rich fibrin |
| 3. 学会等名 26th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小柳昌央, 小林真左子, 稲田 諒, 米山勇哉, 里見貴史 |
| 2. 発表標題 血液および骨髓液濃縮材料の上皮欠損治癒促進効果の検討 |
| 3. 学会等名 第76回NPO法人 日本口腔科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|