

学位論文の要約

A nitrogen-containing bisphosphonate inhibits osteoblast attachment and impairs bone healing in bone-compatible scaffold

(細胞親和性を付与したスキャホールドにおける骨芽細胞の接着と骨組織形成にビスフォスフォネートが与える影響に関する研究)

January, 2021

(2021年1月)

Chika Koyama  
小山 千佳

Oral and Maxillofacial Surgery  
Yokohama City University Graduate School of Medicine  
横浜市立大学大学院医学研究科医科学専攻顎顔面口腔機能制御学

(Doctoral Supervisor : Kenji Mitsudo, Professor)  
(指導教員：光藤 健司 教授)

## 学位論文の要約

# A nitrogen-containing bisphosphonate inhibits osteoblast attachment and impairs bone healing in bone-compatible scaffold

(細胞親和性を付与したスキャホールドにおける骨芽細胞の接着と骨組織形成にビスフォスフォネートが与える影響に関する研究)

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103635>

### 1. 序論

ビスフォスフォネート製剤（以下 BP 製剤）は固形がんの骨転移や多発性骨髄腫、高カルシウム血症や骨粗鬆症の治療薬として広く使用されているが、薬剤関連顎骨壊死（Medication-related osteonecrosis of the jaw ; 以下 MRONJ）を引き起こす代表的な薬剤である。MRONJ は顎骨の露出、腫脹、疼痛、排膿、知覚神経障害、軟組織壊死や口腔内外の瘻孔を主な症状とし、BP 製剤による MRONJ の発生頻度は注射薬で 0.2-6.7%，経口薬で 0.028-0.4%と報告され(Solomon et al., 2013 ; Ruggiero et al., 2014)，発症すると患者の QOL を著しく低下させる。発症機序は未だ明らかでないが、抜歯などの外科侵襲後に発症することが多いことから、骨の治癒に何らかの原因があるのではないかと考えられている。現在使用される BP 製剤はハイドロキシアパタイト（以下 HA）への吸着力が増強された窒素含有剤であり、吸着することで破骨細胞に取り込まれてその活動を抑制する。一方で骨の治癒過程において活動する骨芽細胞は HA に接着することで作用を発現していくが、BP 製剤が骨芽細胞の細胞接着に与える影響は不明な点が多い。HA 薄膜コーティングによって強力な骨芽細胞誘導能・骨治癒促進能を付与したチタンファイバー製スキャホールドが近年考案された(Hirota et al., 2010, 2011, 2016)。本研究ではこの HA 薄膜に BP 製剤を吸着されることによって及ぼされる骨芽細胞の接着、機能発現および骨治癒への影響を検討した。

### 2. 実験材料と方法

直径 50 $\mu$ m のチタンファイバーからなる空隙率 87%のチタンファイバースキャホールドを用いた直径 15mm および 5mm，厚さはいずれも 1.5mm のディスクを実験基材とした。

EDTA-Ca 錯体のアルコール溶液とメタリン酸ジブチルアンモニウム塩を  $\text{Ca/P}=1.67$  の割合で調整した分子プレカーサー溶液に基材を浸漬させ、 $600^{\circ}\text{C}$ に加熱することでスキャホールドを HA でコーティングし、初代室素含有 BP 製剤のパミドロネート溶液に HA コーティングスキャホールドを一晩浸漬させ、パミドロネートを吸着させたスキャホールドを作製し、これを用いた実験群を BP 吸着群とした。パミドロネートを吸着させていない対照群を BP 非吸着群とした。パミドロネートの濃度は  $0.001\text{M}$  と  $0.01\text{M}$  を作製し ( $0.001\text{M}$ -BP 吸着群,  $0.01\text{M}$ -BP 吸着群), X 線を用いた表面分析により室素含有 BP がスキャホールドにコーティングされていることを確認した。in vitro では  $0.001\text{M}$ -BP 吸着群を, in vivo では  $0.001\text{M}$ -BP 吸着群と  $0.01\text{M}$ -BP 吸着群を使用した。

正常ヒト骨芽細胞を直径  $15\text{mm}$  のスキャホールドに播種し、4 時間と 24 時間培養後にチタンファイバーに接着している生細胞数と細胞の大きさを計測し,  $0.001\text{M}$ -BP 吸着群と BP 非吸着群の 2 群で比較した。生細胞数は Cell Counting Kit-8 を用いて, 細胞の大きさは蛍光顕微鏡によって観察して計測した。また同様に 7 日および 14 日間培養し, アリザリンレッドにて石灰化産物を染色し, その程度を比較した。続いて, ラット頭蓋骨に直径  $5.2\text{mm}$  の骨欠損を形成し, 直径  $5\text{mm}$  のスキャホールドを埋入した。スキャホールドは BP 非吸着群,  $0.001\text{M}$ -BP 吸着群,  $0.01\text{M}$ -BP 吸着群を用い, 3 週, 6 週, 9 週後にスキャホールド内の骨組織形成の程度を評価した。BP 吸着群と BP 非吸着群の比較には, マン・ホイットニーの U 検定を用い,  $p<0.05$  で有意差ありとした。

### 3. 結果

正常ヒト骨芽細胞のチタンファイバーへの接着は播種 4 時間後, 24 時間後ともに BP 吸着群は BP 非吸着群に比べ有意に生細胞数が少なく, 細胞の長径も有意に小さかった (図 1)。骨芽細胞の石灰化試験においては 7 日目, 14 日目ともに BP 吸着群では有意に石灰化産物が少なかった。ラット頭蓋骨を用いた骨形成能の評価では埋入 3 週間後, 6 週間後では BP の濃度に関わりなく BP 吸着群は BP 非吸着群に比べ有意に骨形成が少なかった (図 2)。9 週では両群に有意差はなかったが,  $0.001\text{M}$ -BP 吸着群の骨形成率は BP 非吸着群と同程度であった。

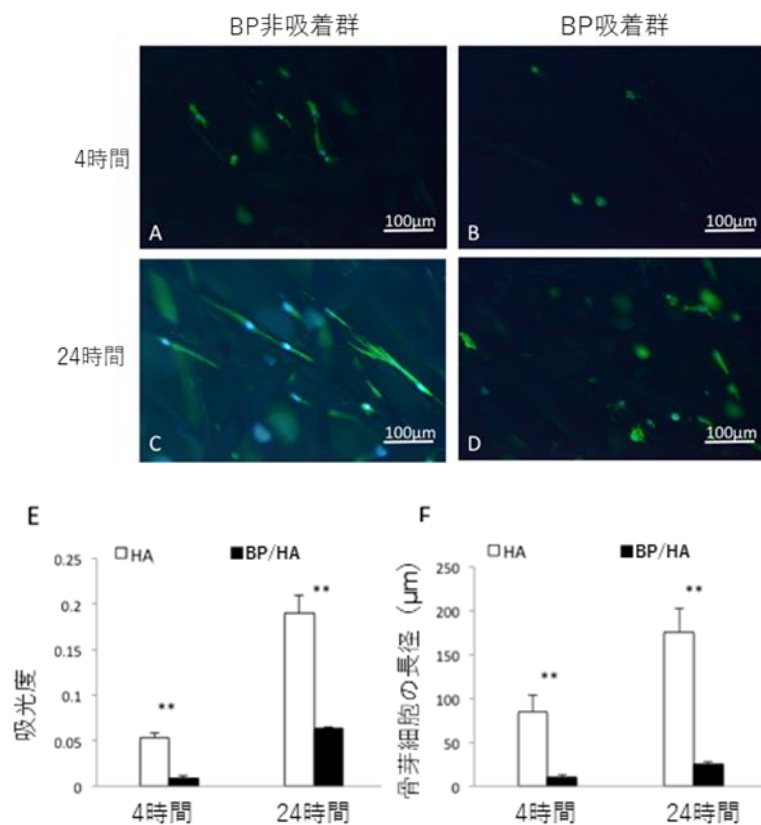


図 1：基材上での骨芽細胞接着試験

A-D. 4 時間後, 24 時間後の BP 非吸着群(HA), BP 吸着群(BP/HA)での骨芽細胞の蛍光顕微鏡像. E. 4 時間後, 24 時間後の吸光度. 吸光度は骨芽細胞数と比例することから骨芽細胞数は BP 吸着群は BP 非吸着群に比べ有意に少なかった (\*\* $p < 0.01$ ). F. 4 時間後, 24 時間後の骨芽細胞の長径. BP 吸着群が BP 非吸着群に比べ有意に小さかった (\*\* $p < 0.01$ ).

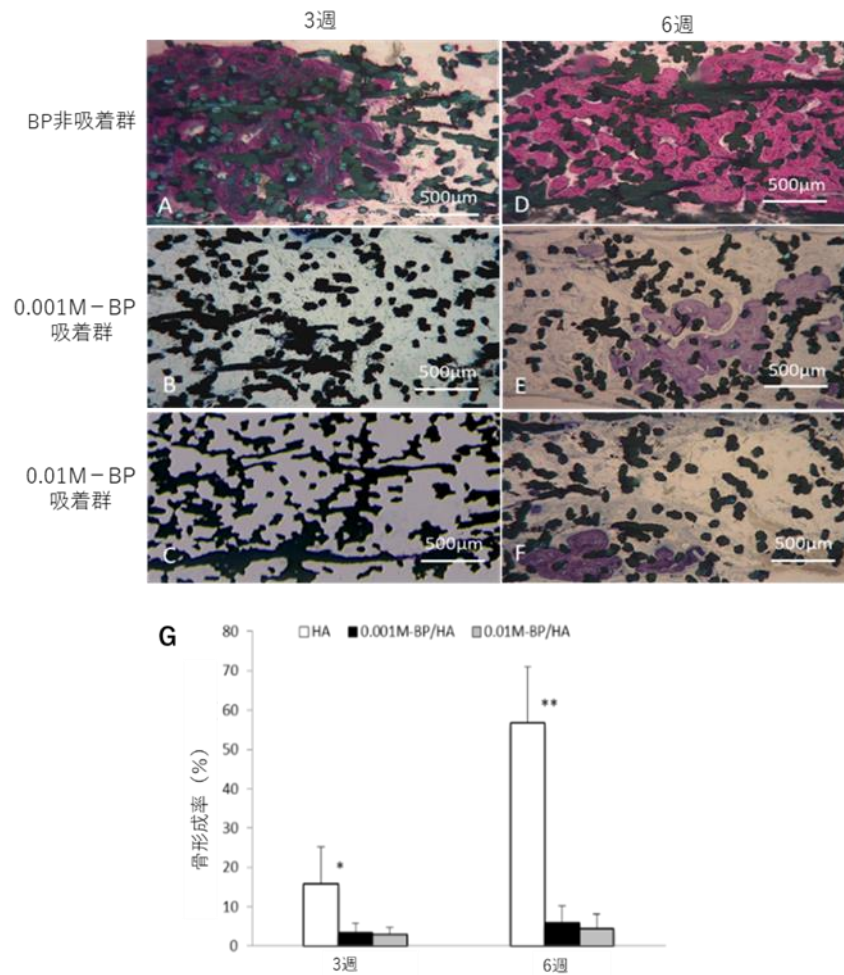


図 2：基材上での骨芽細胞の骨形成

A-F. 3 週と 6 週の、BP 非吸着群(HA)および BP 吸着群 (0.001M, 0.01M-BP/HA) の光学顕微鏡像. G. 3 週と 6 週の、BP 非吸着群および BP 吸着群の骨形成率. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

#### 4. 考察

パミドロネートがチタンファイバー上の HA と接着する事で骨芽細胞と HA の接着を阻害し、その後の細胞の成熟や機能発現まで障害されることでスキャホールド内の骨治癒が阻害されたと考えられた. 外科侵襲を受けた骨組織は通常、骨芽細胞の働きにより骨が形成され治癒する. しかし BP 製剤により骨芽細胞が HA に接着することができず、骨治癒は阻害され、不完全な治癒となり感染または骨壊死を引き起こし、MRONJ を発症すると考えられた. MRONJ の発症は BP 製剤が結合した骨組織において骨のリモデリングが阻害される事に加え、骨硬化による骨髓の減少や感染、粘膜の免疫異常など複数の要因が挙げられて

いるが、本研究ではリモデリングに関わる骨芽細胞の接着不良、それに続く骨形成不全が窒素含有 BP 製剤により起こり得ることが明らかにされた。

## 5. 結語

窒素含有 BP 製剤による骨芽細胞と HA の接着阻害は MRONJ 発症要因の 1 つになり得ると考えられた。

## 引用文献

Hirota, M., Hayakawa, T., Ametani, A., Monden, Y., Noishiki, Y., Tohnai, I.(2010), Use of molecular precursor method to facilitate thin hydroxiapatite coating of titanium fiber web scaffold and enhance bone formation: an experimental study in rat cranial bone defects, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 25, 888-892.

Hirota, M., Hayakawa, T., Ametani, A., Kuboki, Y., Sato, M., Tohani, I.(2011), The effect of hydroxyapatite-coated titanium fiber web on human osteoblast functional activity, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 26, 245-250.

Hirota, M., Shima, T., Sato, I., Ozawa, T., Iwai, T., Ametani, A., Sato, M., Noishiki, Y., Ogawa, T., Hayakawa, T., Tohani, I.(2016), Development of a biointegrated mandibular reconstruction device consisting of bone compatible titanium fiber mesh scaffold, *Biomaterials*, 76, 223-236. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.09.034

Solomon, D.H., Mercer, E., Woo, S.B., Avorn, J., Schneeweiss, S., Treister, N.(2013), Defining the epidemiology of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: prior work and current challenges. *Osteoporosis International*, 24, 237-244. doi: 10.1007/s00198-012-2042-6

Ruggiero, S.L., Dodson, T.B., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B., O’Ryan, F. (2014), American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update, *J Oral Maxillofac Surg*, 10, 1938-1956. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031

## 論文目録

### I 主論文

A nitrogen-containing bisphosphonate inhibits osteoblast attachment and impairs bone healing in bone-compatible scaffold.

Koyama, C., Hirota, M., Okamoto, Y., Iwai, T., Ogawa, T., Hayakawa, T., Mitsudo, K.:  
*J Mech Behav Biomed Mater.* 104, 103635, 2020.

### III 参考論文

1. Hydroxyapatite coating for titanium fibre mesh scaffold enhances osteoblast activity and bone tissue formation.

Hirota, M., Hayakawa, T., Yoshinari, M., Ametani, A., Shima, T., Monden, Y., Ozawa, T., Sato, M., Koyama, C., Tamai, N., Iwai, T., Tohnai, I.:  
*Int J Oral Maxillofac Surg*, 41, 1304-1309, 2012.

2. High-dose zoledronic acid narrows the periodontal space in rats.

Okamoto, Y., Hirota, M., Monden, Y., Murata, S., Koyama, C., Mitsudo, K., Iwai, T., Ishikawa, Y., Tohnai, I.:  
*Int J Oral Maxillofac Surg*, 42, 627-631, 2013.