

論文内容要旨

論文題目

ビスホスホネート製剤および機械的ストレスが
ヒト歯肉線維芽細胞に与える影響

責任講座：歯科口腔・形成外科学 講座
氏名：逸見 朋陽

【内容要旨】(1,200字以内)

【背景】

ゾレドロン酸(ZA)をはじめとするビスホスホネート製剤(BP)の重大な副作用の一つとして薬剤関連顎骨壊死(Medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ)が知られている。MRONJの詳細な発症メカニズムに関しては不明な点が多いものの、骨芽細胞や破骨細胞の分化・機能抑制に伴う骨リモデリングの抑制がMRONJ発症に関与している可能性が指摘され、骨をターゲットとした種々の研究が行われている。

一方、顎骨とともに歯槽部を構成する口腔軟組織へBPが与える影響やMRONJ発症との関連に関しては不明な点が多い。

口腔軟組織は歯槽部の顎骨を被覆し口腔細菌等の外的要因に対してバリアとして働くが、MRONJの典型的な臨床所見として顎骨壊死とともに軟組織欠損が生じる事から、口腔軟組織における恒常性の破綻がMRONJ発症に影響する可能性が想定される。また、口腔軟組織には咀嚼、咬合等により断続的な機械的ストレスが加わり、これらの機械的ストレスが歯周炎等の種々の歯科疾患の増悪に繋がる事が広く知られている。

本研究ではMRONJ発症メカニズムの検証を目的として、ZAおよび機械的ストレスが歯肉線維芽細胞(Human Gingival Fibroblasts: HGFs)の増殖および機能に与える影響を検討した。

【方法】

細胞増殖能は、HGFs播種後ZA(10 μ M、100 μ M)を添加し培養1、2、3、5、7日目にMTSアッセイを用いて評価した。さらにZA(10 μ M)添加群に2g/cm²の圧縮ストレスを加え、real-time PCRおよびSirius Red染色で細胞の表現形質を評価し、対照群と比較検討した。

【結果】

100 μ MのZA添加により、著明な細胞増殖抑制を認めたが、培養7日目まで10 μ M添加群、ストレス負荷群では細胞増殖に有意な変化は認めなかった。一方、線維芽細胞増殖を促進するFGF-2やCTGF、線維芽細胞分化マーカーであるI型コラーゲンのmRNA発現がZA添加とストレス負荷のいずれでも対照群と比較して減少することが明らかとなった。さらにZA添加とストレス負荷を同時に加えると、その効果発現が高まる傾向も明らかにした。Sirius Red染色によるコラーゲン発現評価でも同様の結果を得た。

【考察】

高濃度(100 μ M)のZAはHGFsの細胞増殖を著明に抑制するが、10 μ MのZA添加による細胞増殖への著明な影響は確認されなかった。一方、HGFsの分化マーカーの遺伝子発現およびコラーゲン発現は10 μ MのZA添加および圧縮ストレス負荷により減弱した。以上の知見および歯ぎしり、食いしばり等のブラキシズムを有している場合や不適合義歯を使用している場合など、過剰な機械的ストレスが口腔軟組織にかかるケースでMRONJ発症が多くみられる臨床的知見から、ZAおよび機械的ストレスの複合的な作用がHGFsを始めとした口腔軟組織の恒常性に影響しMRONJ発症のリスク因子の一つとなる可能性が示唆された。

令和 4 年 8 月 1 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：逸見 朋陽

論文題目：ビスホスホネート製剤および機械的ストレスがヒト歯肉線維芽細胞に

与える影響

審査委員：主審査委員

高木 理彰

高木理彰



副審査委員

川前 金幸

川前金幸



副審査委員

二口 充

二口充



審査終了日：令和 4 年 7 月 25 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

ビスホスホネート製剤の重大な副作用の一つに薬剤関連顎骨壊死があり、その発症メカニズムは明らかではない。薬剤関連顎骨壊死の病態形成には歯槽部を構成する口腔粘膜組織へのビスホスホネート製剤と機械的ストレスの双方が関与すると仮説を立てた申請者は、ビスホスホネート製剤の一つであるゾレンドロン酸 (ZA) および圧縮ストレスが歯肉線維芽細胞の増殖、分化に与える影響について *in vitro* で検討した。細胞増殖能は、歯肉線維芽細胞播種後 ZA (10 μ M、100 μ M) を添加し、培養 1、2、3、5、7 日目に MTS アッセイを用いて評価した。さらに ZA (10 μ M) 添加群に 2g/cm² の圧縮ストレスを加え、real-time PCR および Sirius Red 染色で細胞の表現形質を評価し、対照群と比較検討した。その結果、100 μ M の ZA 添加により著明な細胞増殖抑制を認めたが、培養 7 日目まで 10 μ M 添加群、ストレス負荷群では細胞増殖に有意な変化は認めなかった。一方、線維芽細胞増殖を促進する FGF-2 や CTGF、線維芽細胞分化マーカーである I 型コラーゲン mRNA 発現が ZA 添加とストレス負荷のいずれでも対照群と比較して減少することを明らかにした。さらに ZA 添加とストレス負荷を同時に加えると、その減少効果が高まる傾向も明らかにした。Sirius Red 染色によるコラーゲン発現評価でも同様の結果を得た。

本研究では、ビスホスホネート製剤の歯肉線維芽細胞機能抑制とあわせて、機械的ストレスも細胞機能を抑制すること、さらにその両者には相乗効果があることを *in vitro* で示した点で新規性を有する。これらにより、薬剤関連顎骨壊死の病態形成に歯肉線維芽細胞機能低下が関与する可能性を示した点に意義がある。一方、結果で、Sirius Red 染色の形態観察をより説得力のある図で示すこと、考察では、培養条件が実験結果に与える影響や、薬剤やストレスによる細胞周囲と細胞内のシグナル経路の推察をよりわかり易く論述、明示すべきとの意見が出された。これらの点に十分対応、修正が出来れば、本研究論文は博士 (医学) の授与に値すると判定した。