

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20562

研究課題名(和文)BRONJ新規治療法としての間葉系幹細胞移植の検討

研究課題名(英文)A study of mesenchymal stem cells transplantation for new treatment of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw

研究代表者

真下 貴之(MASHIMO, Takayuki)

日本大学・歯学部・非常勤医員

研究者番号：30736450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：今回われわれは、1年目の研究において、マウス骨髄由来間葉系幹細胞を採取し、マウス抜歯窩へ移植する術式を確立した。移植した細胞は抜歯窩において、有意に骨髄組織形成を誘導する結果を示した。続いて、ビスフォスフォネート製剤、抗癌剤、ステロイドの投与により、高頻度でのBRONJマウスの作製に成功した。2年目においてはBRONJマウスの抜歯窩へ間葉系細胞移植実験を行った。現時点で、移植の結果に有意差はまだないが、移植によるBRONJ症状の改善傾向を認める結果を示した。

研究成果の概要(英文)：In the first year, I established methods of bone marrow-derived mesenchymal stem cell harvesting and transplantation into mice extraction sockets. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell accelerated the bone marrow tissue formation in the mice extraction sockets. In addition, we success a preparation of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) model mice with injecting intraperitoneally bisphosphonates, anticancer drugs and steroids into the mice. In the second year, bone marrow-derived mesenchymal stem cells were transplanted into the BRONJ model mice extraction sockets. As this time, Although, the results did not have significant difference, cell transplantation tended to improve BRONJ symptom.

研究分野：口腔外科

キーワード：BRONJ 間葉系幹細胞 移植 抜歯窩

1. 研究開始当初の背景

近年、口腔外科領域において、BP 製剤投与患者に抜歯などの外科的侵襲を加えると顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: BRONJ)が起るといふ報告が年々増加している。しかし、BRONJ への治療方法は確立しておらず、抜歯前に BP 製剤を休薬するなどの予防法、発症後は外科的侵襲を加える処置は行わず、抗生剤投薬と局所洗浄といった消極的な方法でしか治療ができないのが現状であった。一方、間葉系幹細胞は様々な細胞へ分化する能力を持っている細胞であり、骨疾患や心疾患などの再生医療において、すでに多くの臨床応用が開始されていた。そこで BRONJ に対する新しい治療方法として間葉系幹細胞移植に注目していた。

2. 研究の目的

BRONJ マウスを作製し、間葉系幹細胞移植を行うことで BRONJ 発症に対する新たな予防方法および治療方法を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄由来間葉系幹細胞の採取

マウス骨髄由来間葉系幹細胞の採取は、計 5 匹の C57BL/6J マウスの左右大腿骨および脛骨を摘出、70%エタノールにて消毒後、乳鉢内にて骨を粉碎する。粉碎された骨片は 0.2%コラゲナーゼ溶液にて 37℃で 60 分間インキュベートし、骨髄および内骨膜表面に付着している細胞を酵素処理によって単離する。これら処理後に得られた細胞からフローサイトメトリーを用い、CD45-/TER119-/PDGFRα+/Sca-1+細胞を分取する。

(2) BRONJ モデルの作製

C57BL/6J マウス (8~10 週齢) にビスフォスフォネート製剤 (BP 製剤) を 125µg/kg と 1 抗癌剤 (商品名: タキソテール) 25mg/kg、ステロイド製剤 (デキサメタゾン) 5mg/kg を腹腔内より週 1 回投与する。3 製剤投与開始 3 週間後、上顎第一臼歯を抜歯し、その後さらに、週 1 回ずつ 6 週間にわたり 3 製剤の投与を続ける。対照群として同周期に同用量の生理食塩水を投与したマウスの同部位を抜歯し、同じく 6 週間にわたり投与を続ける。

(3) BRONJ マウスへの細胞移植方法

上記方法で BRONJ マウスを作製し、予防を目的として抜歯直後に骨髄由来間葉系幹細胞を局所投与する実験を行い、移植効果の検討を行う。また治療を目的として、同様の 3 製剤を投与後に抜歯を行い、BRONJ 発症を確認後、間葉系幹細胞を局所投与する実験を行う。このように BRONJ モデルマウスの作製と予防法、治療法の確立を目指し検討する。

4. 研究成果

(1) マウス骨髄由来間葉系幹細胞の採取の確立

マウス骨髄由来間葉系幹細胞を採取し、さらにフローサイトメトリーを用いた CD45-/TER119-/PDGFRα+/Sca-1+細胞を幹細胞分画として分取する方法を確立させた (図 1)

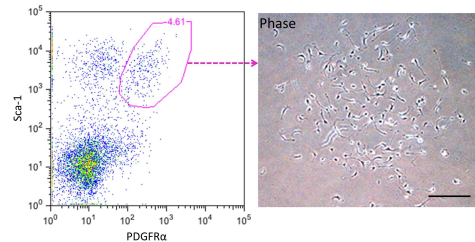


図 1

(2) マウス抜歯窩への細胞移植方法の確立

BRONJ マウスの抜歯窩への細胞移植を行う前実験として、通常マウスの抜歯窩への細胞移植を行った (図 2)。DiI にて移植細胞をラベリングし、上皮、肉芽組織、骨表面に移植細胞が存在することを確認した (図 3)。

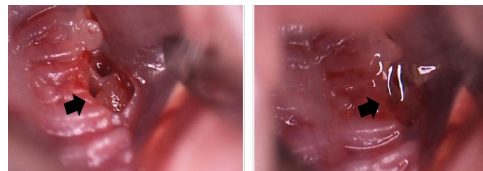


図 2

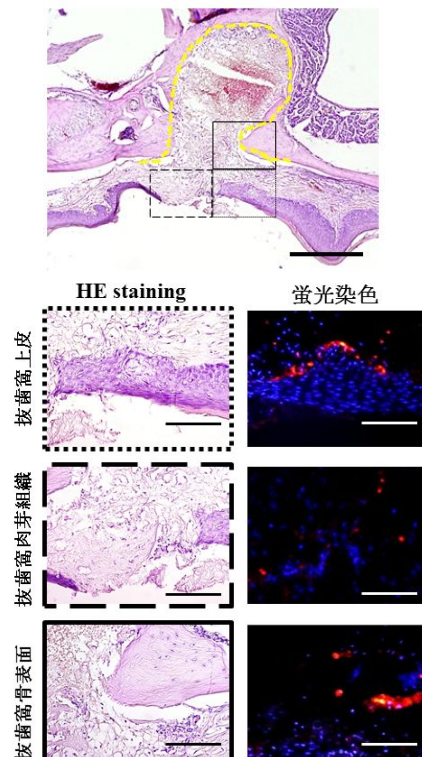


図 3

(3) 細胞移植による抜歯窩の変化

通常マウス抜歯窩は、細胞移植群、対照群ともにCT画像上で6週後には完全な治癒を認めていた(図4-1,2)しかし、細胞移植群では組織学的に抜歯窩に多くの骨髄組織の形成が見られた(図5)。骨髄面積の分析においても細胞移植群において有意に骨髄面積の拡大が見られた(図6)。骨量、密度の分析では、細胞移植をした群の方が、骨量、密度が有意に低くなる傾向を認めたが、これらは骨髄組織の形成促進による結果と考えられる(図7)。

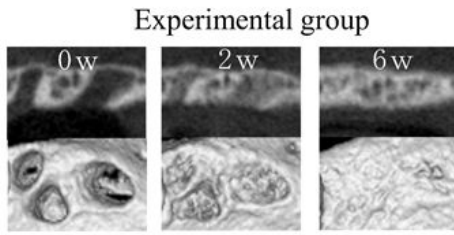


図4-1

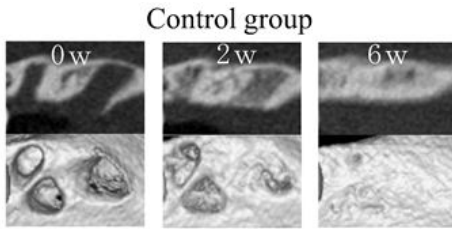


図4-2

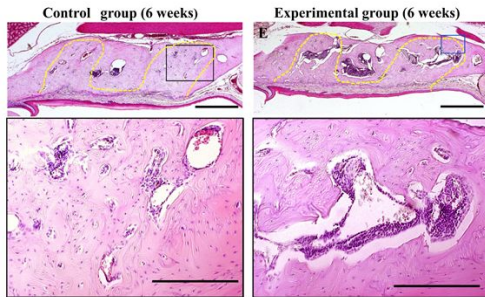


図5

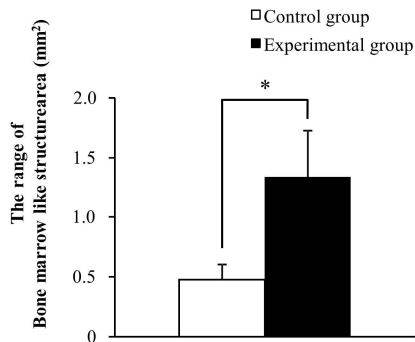


図6

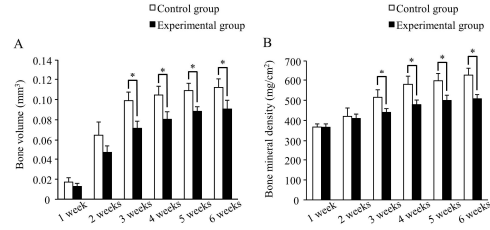


図7

(4) BRONJ マウスの作製

今回、3 製剤投与により、高頻度での BRONJ マウスの作製に成功した。CT 画像より、BRONJ マウスは抜歯後6週後においても抜歯窩の治癒が認められず(図8)組織切片では抜歯窩において TRAP 陽性細胞(赤く染まる細胞)が少ない傾向を認めた(図9)。これは臨床における BRONJ の組織切片の特徴と一致している。

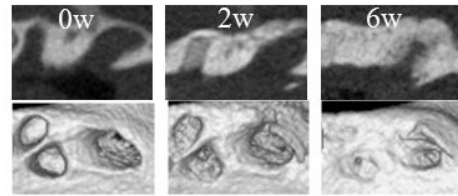


図8

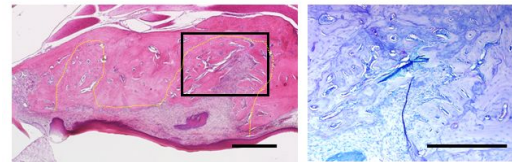


図9

(5) BRONJ マウスへの間葉系幹細胞移植

前述した細胞移植方法、BRONJ マウス作製方法に従い、BRONJ マウスの抜歯窩へ間葉系細胞移植実験を行った。細胞移植群では上記の BRONJ マウスと比較し、抜歯後6週で治癒する症例が多くみられた(図10)。また組織切片においては、抜歯窩にて TRAP 陽性細胞を多く認め(図11)骨髄由来間葉系幹細胞移植による骨髄組織造成および抜歯窩の治癒を促進する傾向が見られた。

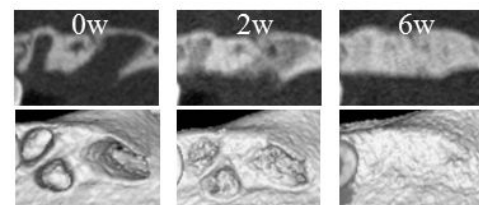


図10

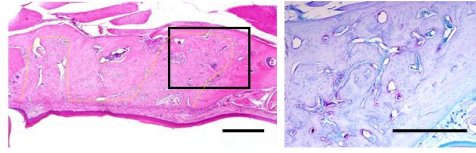


図 11

現時点では、細胞移植したモデルと移植していないモデルとの結果に定量的な有意差はまだないが、移植による BRONJ 症状の改善の可能性は示唆されたと考えている。今後はさらなる追加実験を行い、細胞移植による効果を検討していく予定である。また、今回は、予防方法として、抜歯直後に移植を行う実験のみを行ったが、今後は治療方法の検討のために、BRONJ 発症後の抜歯窩へ細胞移植を行い、その治療効果についての検討も行っていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

井口慎也, 河野英輔, 鈴木大悟, 鶴町仁奈, 真下貴之, 鳥海拓, 磯川桂太郎, 新井嘉則, 佐藤秀一, 本田雅規 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた歯周病に対する細胞治療の可能性 2016年3月17日~19日 第15回日本再生医療学会総会 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真下 貴之 (MASHIMO, Takayuki)

日本大学・歯学部・非常勤医員

研究者番号：30736450