

令和元年6月4日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20572

研究課題名(和文) 口腔粘膜の免疫はビスホスホネート関連骨壊死にどう関わっているか

研究課題名(英文) Does oral mucosal immune system contribute to Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw?

研究代表者

金山 圭一 (KANAYAMA, KEIICHI)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：20454275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビスホスホネート関連顎骨壊死(Medication-related osteonecrosis of the jaw; MRONJ)の患者数自体は多くないものの発症すると症状は重篤で、根本的な治療法もない。MRONJの発生機序を明らかにするための検討が重ねられ、gd(ガンマデルタ)T細胞のような皮膚粘膜に特徴的に存在する免疫細胞がMRONJ症状の類型に関与していることも示唆されている。多様な症状を見せるMRONJの表現型が、どの免疫細胞の応答によるものかONJマウスモデルを使って研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2014年に米国口腔顎顔面外科学会からMRONJに関するポジションペーパーが出され、従来の定義の変更がなされた。骨露出を認めるものに加え、骨露出のない瘻孔型のものも併記された。nBP長期使用患者数は年々累積していくなかTCRD-/-での結果は、gdT細胞と瘻孔型MRONJの表出との関連を示唆している。MRONJの病態解明にはgdT細胞の動態だけでなく口腔粘膜の免疫をつかさどるT細胞、B細胞、NK細胞の働きが鍵を握ると考える。そこで、成熟したT細胞・B細胞を欠損したRag2-/-マウスを使ってMRONJ症状の変化の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw itself is small, symptoms are severe when it develops and there is no causal treatment. A lot of research has been done to clarify the mechanism of BRONJ and it has also been suggested that immune cells are involved in the phenotype of BRONJ symptoms. We studied using the ONJ mouse model as to which immune cell's response the BRONJ phenotype shows various symptoms.

研究分野：歯周病態学

キーワード：ビスホスホネート関連顎骨壊死 マウスモデル 口腔粘膜免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ビスホスホネート関連顎骨壊死 (Medication-related osteonecrosis of the jaw; MRONJ) の患者数自体は多くないものの発症すると症状は重篤で、根本的な治療もない。MRONJ の発生機序を明らかにするための検討が重ねられ、gd (ガンマデルタ) T 細胞のような皮膚粘膜に特徴的に存在する免疫細胞が MRONJ 症状の類型に関与していることも示唆されている。

### 2. 研究の目的

まず野生型 (C57Bl/6 ; B6) のマウスとともに gdT ノックアウトマウス (TCRD<sup>-/-</sup>) で生じる nBP による MRONJ の病態の検討を行った。TCRD<sup>-/-</sup> では B6 に比べ瘻孔型に近い病態を示す割合が増えていた。2014 年に米国口腔顎顔面外科学会から MRONJ に関するポジションペーパーが出され、従来の定義の変更がなされた。骨露出を認めるものに加え、骨露出のない瘻孔型のものも併記された。MRONJ の病態解明には gdT 細胞の動態だけでなく口腔粘膜の免疫をつかさどる T 細胞、B 細胞、NK 細胞の働きが鍵を握ると考える。そこで、成熟した T 細胞・B 細胞を欠損した Rag2<sup>-/-</sup> マウスを使って MRONJ 症状の変化の検討を行った。

### 3. 研究の方法

実験動物は成熟した T 細胞、B 細胞を持たない B6(Cg)-Rag2<sup>tm1.1Cgn</sup>/J マウス (Rag2<sup>-/-</sup>) を使った。上顎左側第一臼歯抜歯の一週間前に、尾静脈にゾレドロン酸ナトリウム (Reclast, Novartis) を 500µg/kg 静脈注射した。生理食塩水を静脈注射したものをコントロールとした。一週間後、イソフルレン吸入麻酔下で上顎左側第一臼歯の抜歯を行った。実験動物は、抜歯の 1 週後もしくは 2 週後に屠殺した。MRONJ の判定は、マウスの上顎デジタル写真で抜歯窩閉鎖の確認と組織切片を染色 (ヘマトキシリンエオジン染色) し、抜歯後の組織修復過程で上皮組織の異常がないか観察した。脱灰したマウス上顎はパラフィンに包埋し連続切片を作製した。組織切片での ONJ 病変の判定は 1) 上皮の異常増生を伴うような骨露出 2) 骨露出はないものの骨表面につながる瘻孔を形成しているものを基準にした。骨壊死の範囲は、5 つ以上隣り合う核の抜けた骨細胞をつないだ範囲とした。TRAP 染色を行い破骨細胞数をカウントした。

### 4. 研究成果

#### 1) 野生型と Rag2<sup>-/-</sup> マウスでの ONJ 発生率の比較

野生型 (WT) では 100% (6/6) の ONJ 発生率で、Rag2<sup>-/-</sup> マウスでは 33% (2/6) の発生率であった。図 1 に各グループの典型的なマウス上顎口腔写真を示す。

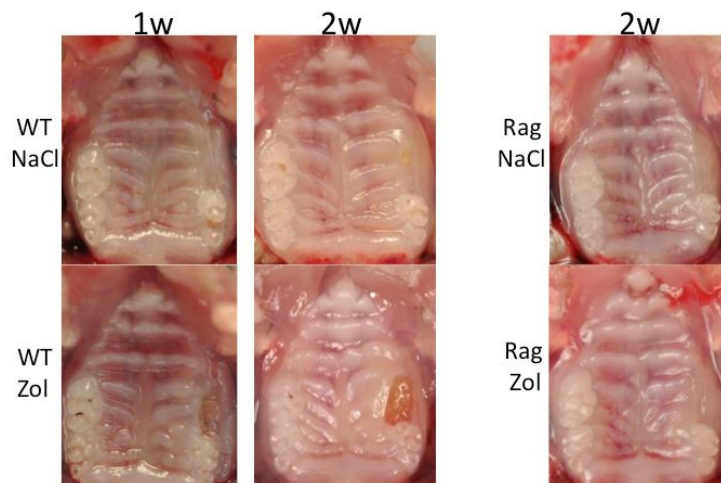


図 1

1w は抜歯後 1 週間の観察期間、2w は 2 週間の観察期間をおいたもの。WT は野生型(B6 マウス)、Rag は Rag2<sup>-/-</sup>マウス。Zol はゾレドロン酸グループ、NaCl は生理食塩水グループ。

2) 野生型と Rag2<sup>-/-</sup>マウスでの骨壊死範囲の比較

WT では抜歯した第一臼歯の遠心部で Rag2<sup>-/-</sup>と比較して、骨壊死の範囲が広がっていた。Rag2<sup>-/-</sup>では NaCl グループ、Zol グループでも遠心、近心部の別で骨壊死範囲に差はなかった。

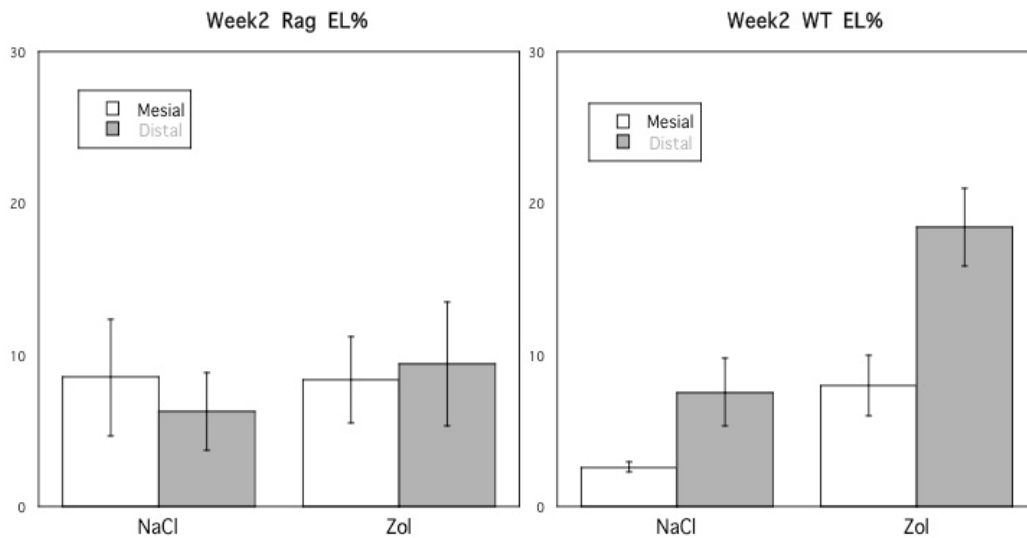
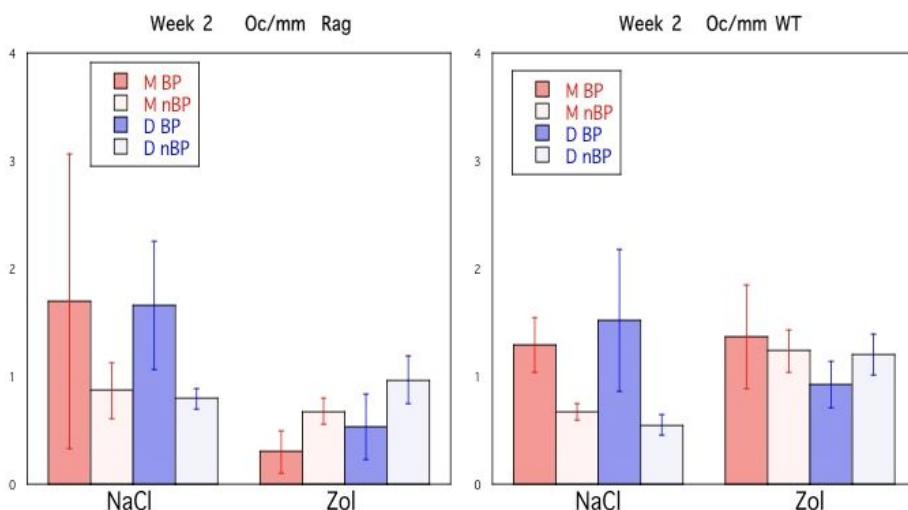


表 1

WT マウス、Rag2<sup>-/-</sup>マウスで EL ( Empty lacunae; 骨細胞の細胞核がぬけ空洞化したもの) が占める範囲を示す。

3) 野生型と Rag2<sup>-/-</sup>マウスでの破骨細胞数の比較

NaCl グループでは、WT・Rag2<sup>-/-</sup>マウスともに骨表面の破骨細胞数が骨髄中よりも多くなっていた。一方、Zol グループでは Rag2<sup>-/-</sup>マウスの破骨細胞数は骨表面でも、骨髄中でも少なかった。骨壊死の範囲は遠心部で近心部を分けた測定で、差が見られたが破骨細胞数においては、部位での差は明らかではなかった。



## 表 2

M : 抜歯部の近心 D : 抜歯部の遠心 ; BP : 歯槽骨表面 nBP : 歯槽骨骨髓での破骨細胞数を骨表面長さあたりで表した。

この研究は成熟した T 細胞、B 細胞が存在しなければ MRONJ は生じないという仮説に基づいている。結果として T 細胞、B 細胞を持たない Rag2<sup>-/-</sup>マウスでは MRONJ の表出は WT と比較して大きく下がった ( WT 100% → Rag2<sup>-/-</sup> 33% )。

Rag2<sup>-/-</sup>の組織学的所見では骨壊死は生じるものの、上皮・粘膜の治癒に異常は観察されなかった。このことは MRONJ の発症には免疫細胞の関与があること、口腔局所の免疫とくに粘膜免疫が MRONJ の症状の拡大、悪化に関係することを示している。

### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 7 件 )

1. M Mizuno, H Morinaga, K Mukai, K Kanayama, T Shibutani. Parathyroid hormone (1-34) enhances bone regeneration in rats with cranial bone defects. *J Hard Tissue Biol*, 査読あり 27(4), 303-308, 2018.
2. 堀田敬史, 金山圭一, 竹内浩子, 森永啓嗣, 向井景祐, 木村洋子, 長谷川徹, 北後光信, 小足周平, 佐藤匠, 清水雄太, 伊神裕高, 澁谷俊昭. 重度歯周炎患者の血中サイトカインと歯槽組織検査値との関係. *岐歯学誌*, 査読あり vol45, 123-128, 2018.
3. A Shibatsuji, K Kanayama, K Mukai, S Otari, H Morinaga, M Kitago, T Hasegawa, Y Kimura, H Takeuchi, Y Doi, T Shibutani. Study of a method to prepare novel carbonate-containing apatite porous bodies. *J Gifu Dent Soc*, 査読あり vol45 ; p49-52, 2018.
4. A Shibatsuji, K Kanayama, K Mukai, S Otari, H Morinaga, M Kitago, T Hasegawa, Y Kimura, H Takeuchi, Y Doi, T Shibutani. Histological study of the unsintered carbonate containing apatite porous body in beagle dog dorsal muscle. *J Gifu Dent Soc*, 査読あり vol45 ; p53-58, 2018.
5. Y Sun, K Kaur, K Kanayama, K Morinaga, S Park, A Hokugo, A Kozlowska, W H. McBride, J Li, A Jewett and I Nishimura. Plasticity of myeloid cells during oral barrier wound healing and the development of bisphosphonate – related osteonecrosis of the jaw. *J Biol Chem*, 査読あり vol291 ; p 20602 - 20616, 2016.
6. K Kanayama, H C Helen Tseng, K Kaur, S H Park, S Park, A Kozlowska, S Sun, C E. McKenna, I Nishimura and A Jewett. Bisphosphonate-induced differential modulation of immune cell function in gingiva and bone marrow in vivo; Role in osteoclast-mediated NK cell activation. *Oncotarget*, 査読あり vol6 ; p 20002 - 20025, 2015.
7. S Park, K Kanayama, K Kaur, H C Helen Tseng, S Banankhah, D T Quje, J W. Sayre, A Jewett and I Nishimura. Osteonecrosis of the jaw developed in mice: Disease variants regulated by  $\gamma\delta$  T cells in oral mucosal barrier immunity. *J Biol Chem*, 査読あり vol290 ; p 17349 -17366, 2015.

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

1. Hirotsugu Morinaga, Keiichi Kanayama, Mao Mizuno, Toshiaki Shibutani. Optimization of chronic periodontitis mouse model. 12th Asian pacific society of periodontology meeting. 2017, Seoul, Korea.
2. 森永啓嗣, 金山圭一, 澁谷俊昭. マウス慢性歯槽骨破壊モデルの確立.

「先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会」, 2017, 大津.

3. Keiichi Kanayama, Kawaljit Kaur, Yujie Sun, Anahid Jewett, Ichiro Nishimura.  
Humanized mice as model system for osteoclast-derived oral immune plasticity. 45<sup>th</sup> American Association for Dental Research, 2016, Los Angeles, USA.
4. Keiichi Kanayama, Synergistic activity of osteoclast with immune cell in inflammatory bone destruction: The 55th General Session of Korean Academy of Periodontology, 2015, Seoul, Korea.  
招待講演.

〔その他〕

ホームページ等研究代表者の Research Map <https://researchmap.jp/read0108689/>  
6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。