

令和元年5月13日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11670

研究課題名(和文)造血因子によるMedication-related顎骨壊死治療の検討

研究課題名(英文) Treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw with hematopoietic factors

研究代表者

吉村 善隆 (YOSHIMURA, Yoshitaka)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：30230816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨吸収抑制剤の服用患者に発症する薬剤関連性顎骨壊死(Medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ)について、モデルマウスを用いて発症機序と免疫機能との因果関係を検討した。この背景に骨髄組織における造血機能の低下があり、造血機能を回復させる薬剤を用いることによりMRONJ様症状を改善・緩和させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨吸収抑制剤の服用患者に発症する顎骨壊死は、重篤な症状を呈することから薬剤関連性顎骨壊死(Medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ)として広く知られている。しかしながら、MRONJは現在においても明らかな発症メカニズムの解明には至っていないため、有効な予防法や治療法は確立されていない。今回の研究成果により、予防法や治療法の基礎が確立された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the causal relationship between the onset mechanism and immune function using model mice for medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) that develops in patients taking bone resorption suppressant preparations. There was a decline in hematopoietic function in bone marrow tissue in this background, and it is suggested that the use of a drug that restores the hematopoietic function may improve or alleviate MRONJ-like symptoms.

研究分野：口腔科学

キーワード：歯学 薬剤関連顎骨壊死

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

## 1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート系製剤および抗 RANKL モノクローナル抗体製剤は、骨粗鬆症、悪性腫瘍骨転移、多発性骨髄腫など骨吸収が亢進する疾患の治療のため広く服用されている薬剤である。このような骨吸収抑制剤の服用患者に発症する顎骨壊死は、重篤な症状を呈することから薬剤関連性顎骨壊死 (Medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ) として広く知られている。しかしながら、MRONJ は現在においても明らかな発症メカニズムの解明には至っていないため、有効な予防法や治療法は確立されていない。本研究ではマウスを用いて MRONJ の発症機序と免疫機能との因果関係を検討した。

## 2. 研究の目的

顎骨壊死発症モデルマウスを用いて、胸腺における T 細胞の分化成熟に焦点を絞り解析を行い、病態の発症機序と免疫機能との因果関係を明らかにすることを目的とした。

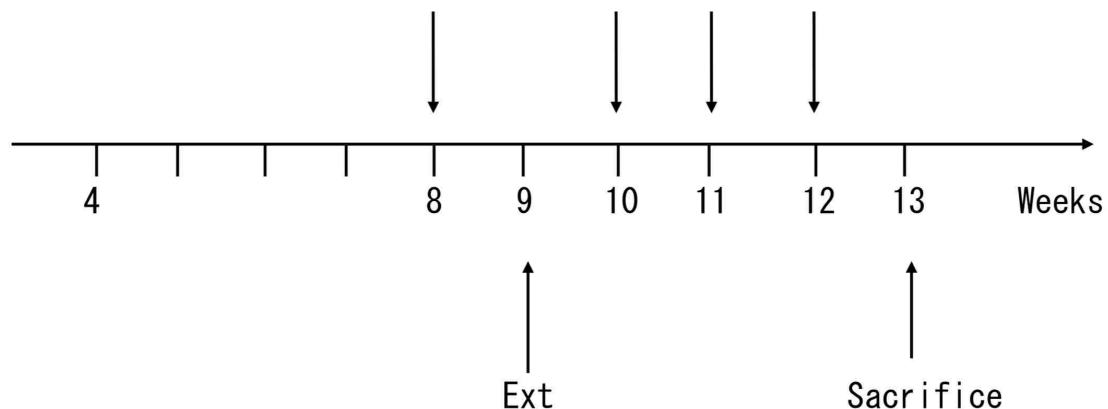
## 3. 研究の方法

4 週齢の C57BL/6J 雌マウスに抗 RANKL 抗体を尾静脈より静脈内投与を行った。抗 RANKL 抗体投与 1 か月後、ペントバルビタールによる全身麻酔を行い、上顎右側第一臼歯の抜歯を行った。抜歯 3 週後に血液を採取し、CO<sub>2</sub> ガスで安楽死させ、抜歯部位の状態を検討した。

採取した血液中のリンパ球の分布についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った。

## 実験プロトコール

### Anti-RANKL antibody (AntiR) and Melphalan



採取した上顎骨と大腿骨は 4% パラホルムアルデヒドで 2 日間浸漬固定を行った。固定した試料は、日立製作所 LCT200 を用いて管電圧: 50kV、ピクセルサイズ 24.0 μm の条件で μCT 撮影を行った。μCT 撮影後に 5% ギ酸水溶液で 3 日間脱灰を行い、脱灰した資料は通法に従いアルコール脱水およびパラフィン包埋を行った。パラフィン包埋した資料は 10 μm の切片を作成し、通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E. 染色) を行った。得られた切片は光学顕微鏡で観察し、骨小腔内の骨細胞の欠損数、骨細胞の欠損を認める骨壊死範囲を評価した。

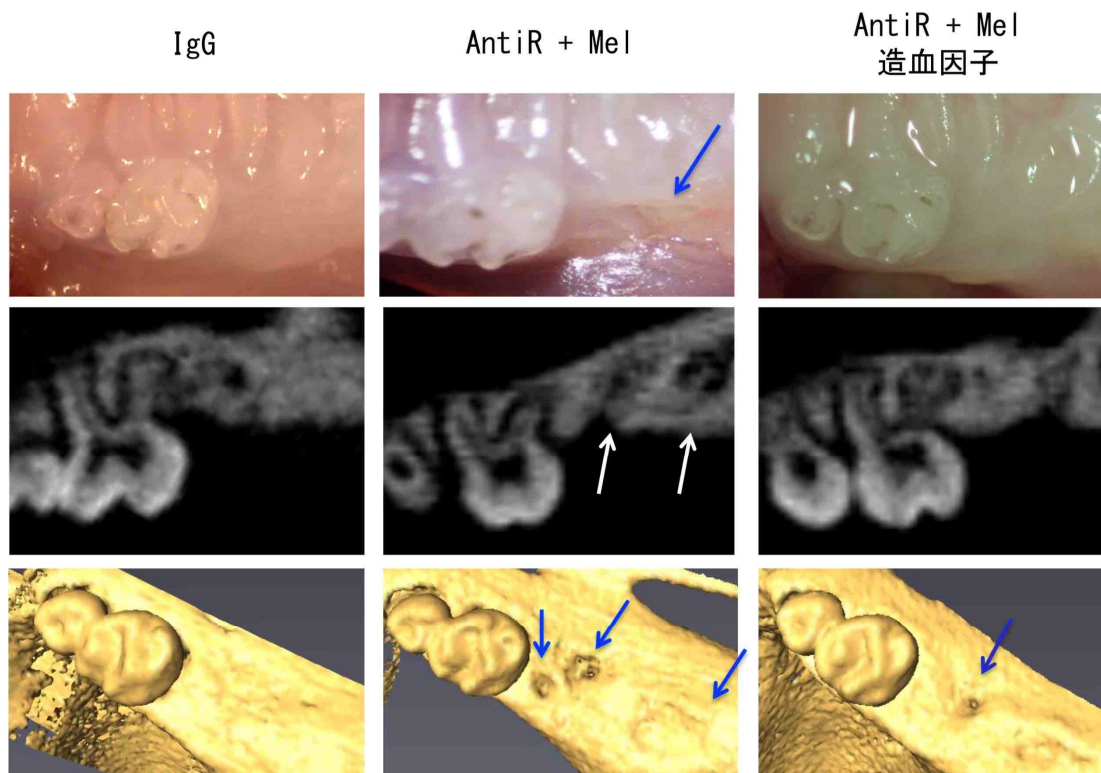
## 4. 研究成果

抗マウス RANKL モノクローナル抗体投与群では、抜歯窩閉鎖不全を伴う歯槽骨の露出と、抜歯窩周囲の歯槽骨における骨細胞の消失といった典型的な顎骨壊死の症状を発症していた。また、末梢血のフローサイトメトリー (FACS) 解析において、制 T 細胞 (Treg 細胞) 数に異常が認められた。さらに、このモデルマウスを解析したところ、胸腺が特徴的に縮小 (萎縮) していることが判明した。

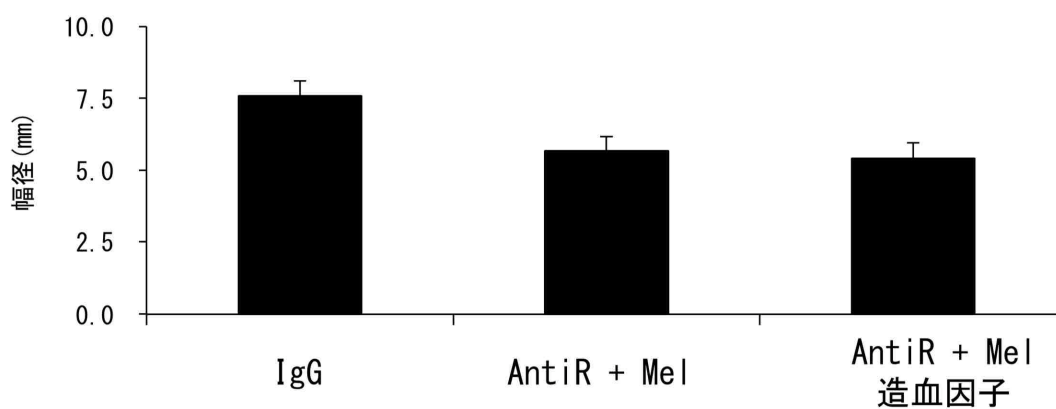
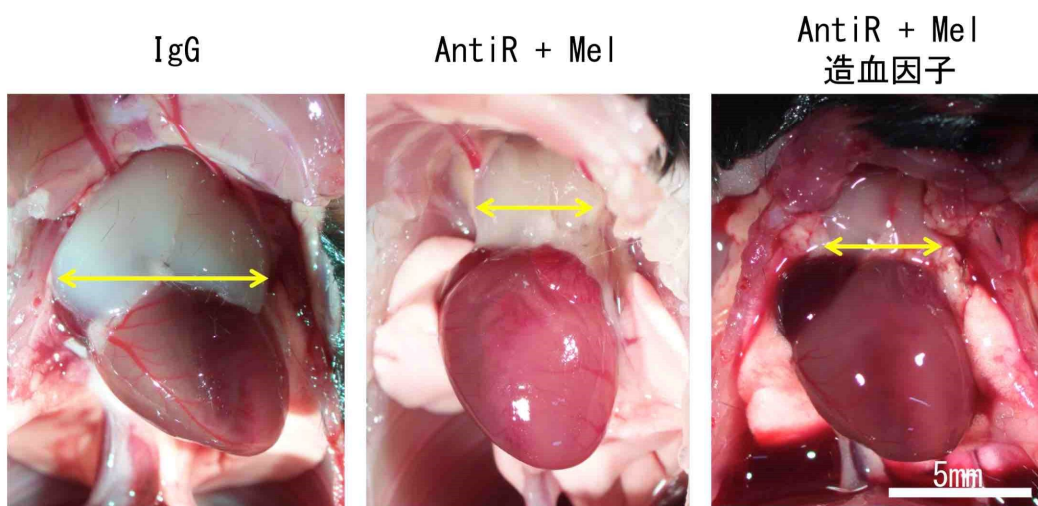
萎縮した胸腺の構造について組織学的に解析を行ったところ、MRONJ 様症状を発症しているマウスの胸腺では、MRONJ 様症状を発症していないマウスと比較して、胸腺皮質に対する胸腺髄質の割合が、優位に減少していた。胸腺髄質に対して、胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) に対する免疫染色を行ったところ、mTEC が喪失していた。mTEC はヘルパー T 細胞のレパートリー選択に重要な役割を果たしていることから、MRONJ 様症状を発症したマウスの末梢血におけるヘルパー T 細胞の分画異常は、mTEC の消失によるものであること

が示唆された。

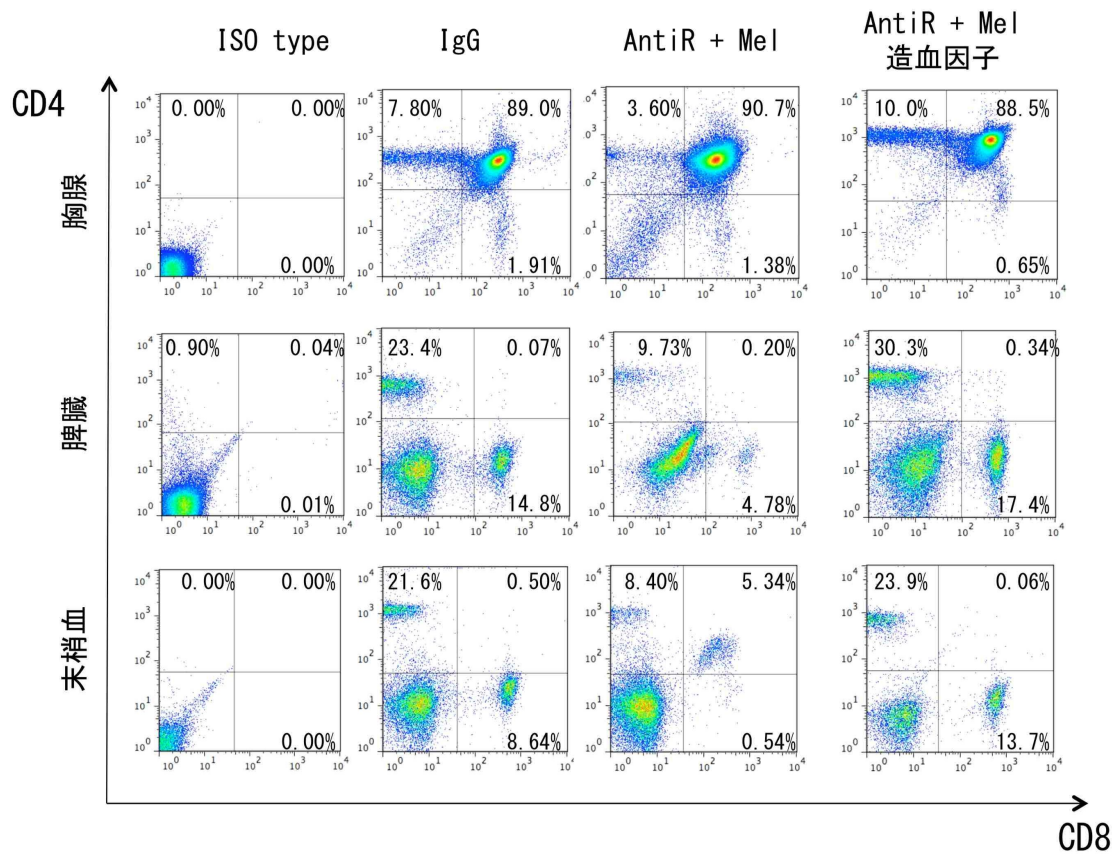
### 抜歯窩の状態



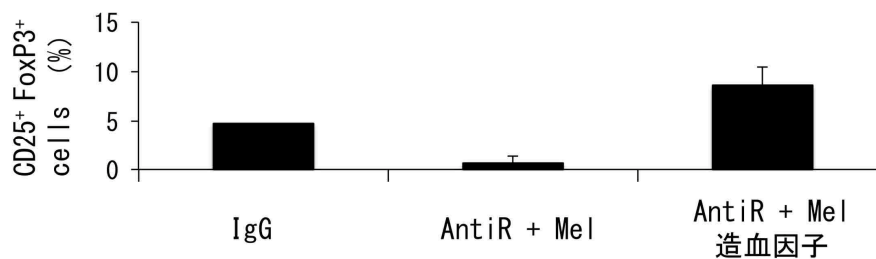
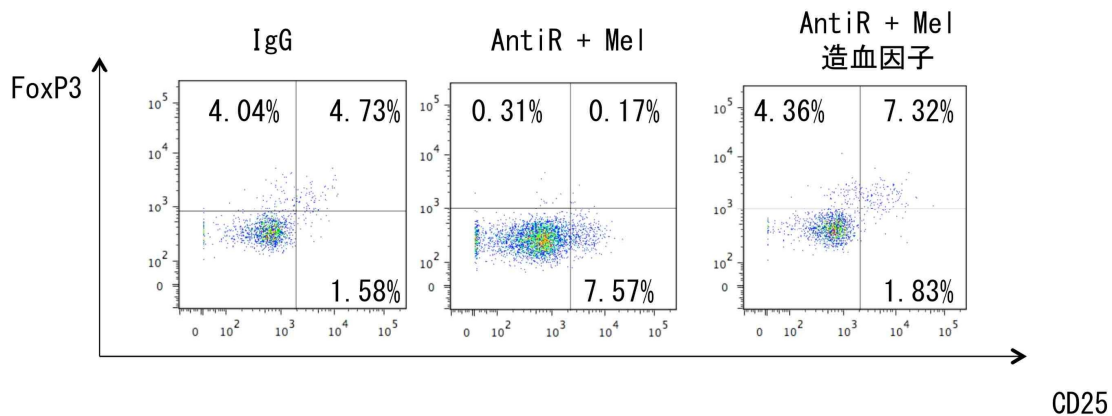
### 胸腺の大きさ



## FACS解析の結果



## 脾臓中のTreg細胞数



以上の実験結果から、骨髄における造血機能の低下がMRONJ様症状発症の発端になっていると推測した。そこで、造血因子を投与することで骨髄の造血機能を回復させることによりMRONJ様症状が改善・緩和するのかを目的として実験を行った。造血因子投与群と非投与群とを比較したところ、造血因子投与群においてMRONJ様症状が緩和されていた。さらに、胸腺におけるmTEC細胞数が有意に増加していること、末梢血におけるヘルパーT細胞の分画異常の部分的な

改善が生じていることが確認された。以上の実験結果から、ヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体製剤による MRONJ 様症状の発症には、その背景に骨髄組織における造血機能の低下があり、造血機能を回復させる薬剤を用いることにより MRONJ 様症状を改善・緩和させる可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：鄭 漢忠

ローマ字氏名：(TEI, Kanchu)

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院歯学研究院

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 80180066

研究分担者氏名：菊入 崇

ローマ字氏名：(KIKUIRI, Takashi)

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院歯学研究院

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 10322819

### (2)研究協力者

なし

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。