

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10246

研究課題名(和文)薬剤関連顎骨壊死の骨髄微小環境と大腸菌由来BMP-2の応用

研究課題名(英文) Bone marrow microenvironment of MRONJ and application of Escherichia coli derived BMP-2

研究代表者

縄稚 久美子 (Nawachi, Kumiko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10379787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤関連顎骨壊死(MRONJ)の病態はまだ不明な点が多い。そのため、明確な治療法は確立されておらず、病態発生メカニズムの解明や治療法の開発が急務である。我々は、強い骨形成能を有したBMP-2がMRONJの治療に有用でないかと考えた。実際、マウスMRONJモデルを作製し、抜歯窩にrhBMP-2を投与した。その結果、非移植群では、抜歯窩の骨形成は抑制されたが、rhBMP-2移植により、骨形成有意に促進された。以上の結果より、BMP-2はMRONJの新たな治療法にな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

近年、骨吸収抑制薬の使用による大腿骨非定型骨折や外耳道骨壊死が報告され、骨吸収抑制薬は顎骨だけではなく全身の骨への影響が示唆されている。本研究で得られるMRONJ発症の理解および治療法の開発は、顎骨以外の全身の骨組織への影響の理解にもつながることは言うまでもなく、骨粗鬆症や大理石骨病などの全身性骨代謝性疾患の治療に十分応用が可能である。したがって、本申請研究による成果は歯科分野に留まることなく、医療分野全体へ広く貢献することは明らかである。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) remains largely unknown. Therefore, it is essential to elucidate the pathogenesis of MRONJ and to develop a treatment for this disease. We hypothesized that BMP-2, which has strong osteogenic potential, might be useful in the treatment of MRONJ. In fact, a mouse MRONJ model was created and rhBMP-2 was administered into the extraction socket. The results showed that bone formation in the extraction socket was suppressed in the non-transplanted group, whereas bone formation was significantly enhanced by rhBMP-2 transplantation. These results suggest that BMP-2 may be a new treatment for MRONJ.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：MRONJ BMP-2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、骨粗鬆症治療や、ガンの骨転移抑制を目的として、多くの患者がビスフォスフォネート (BP) 製剤・副甲状腺ホルモン(PTH)製剤等の骨吸収抑制薬を服用している。一方、歯科領域では、これら骨吸収抑制剤服用中の患者において、口腔粘膜の治癒不全ならびに顎骨壊死を主症状とする「薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ)」が大きな社会問題となっている。骨粗鬆症により大腿骨頸部骨折や大腿骨転子部骨折を受傷すると歩行能力が失われて寝たきりになることから、骨折のリスクに対する予防が優先されることが多い。しかしながら、一旦 MRONJ が発症すると、治療に長期間を要するだけでなく、新たな感染のリスクを抱えることになるため、予知性の高い口腔機能回復が困難となる。その結果、著しい QOL の低下を招くことも忘れてはいけない。

顎骨壊死検討委員会ポジションペーパー2016によると、MRONJ の発症原因はいまだ不明であるものの、骨吸収抑制薬による、破骨細胞活性の過度な抑制、およびそれに伴う骨芽細胞活性の低下、口腔細菌による易感染性の増加、血管新生の抑制、上皮細胞の増殖、遊走阻害、免疫機能の低下などが原因に挙げられている。また、近年、骨芽細胞活性を亢進することが知られている PTH 製剤の全身投与により MRONJ の発症が抑制される事が報告された。このような背景から、MRONJ は、投与された薬剤による過度な骨吸収抑制、骨のターンオーバーの低下、感染等が引金になり発症する疾患と捉えることができる。すなわち、骨吸収抑制剤服用患者の抜歯窩の骨のターンオーバーを局所的にでも促進することができれば、抜歯窩の MRONJ を発症し難くしたり、MRONJ が発症しても生物学的に治療できる様になると考えられる。

一方、骨形成を強力に誘導する骨形成タンパク質 (BMP) -2 は、自家骨移植に代わる有望な次世代骨組織再生材料として期待され、すでに欧米では哺乳動物細胞由来のヒト遺伝子組換え BMP-2 (rhBMP-2) を応用した骨補填材 (INFUSE®, Medtronic, USA) がアメリカ食品医薬品局より認可され、整形外科・歯科領域で臨床応用が開始されている。この BMP-2 は、BMP レセプターを介して骨芽細胞分化を強力に促進するタンパク質として有名であるが、破骨細胞にも BMP レセプターが存在し、破骨細胞活性を亢進し、骨のターンオーバーを促進する作用を有していることが知られている。

現在我々は、本邦初の rhBMP-2 製剤承認に向け、大腸菌発現系 rhBMP-2 の開発を進め、臨床試験の準備を進めている。この開発プロセスにおいても、*in vivo* における rhBMP-2 刺激が、骨代謝活性を劇的に向上させるというデータを得たところである。また、BMP ファミリーは血管新生・維持を司る重要な因子としても知られており、骨硬化により血管が減少する MRONJ においても rhBMP-2 の血管新生・維持能が期待される。そこで、我々は、これらの臨床的・研究的背景を踏まえ、『過度な骨吸収抑制による骨のターンオーバー低下により発症した MRONJ を、この強力な骨代謝活性促進作用のある rhBMP-2 を骨補てん材とともに応用することで治療することができるのではないか?』という、学術的「問い」に至った。

2. 研究の目的

本申請研究では、マウス MRONJ 抜歯窩治癒モデルを用いて、rhBMP-2 の治療効果を *in vivo* にて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

すべての動物実験は岡山大学動物実験委員会の承認のもと実施した。本研究では、Zoledronic Acid Hydrate (ZA, 0.05 mg/kg) と Cyclophosphamide (CY, 100 mg/kg) を3週間投与 (2回/週) した 8~12 週齢の雌マウスの上顎第一臼歯を抜歯し、下記の2つのモデルマウスを構築した。

ZA/CY 投与継続 (腐骨抑制) モデル: 抜歯直後に、抜歯窩に 2.5 mg の E-rhBMP-2 と 1.5 mg の

beta-TCP からなる複合体 (BMP-2 複合体) を移植し, 抜歯後 4 週間 ZA/CY を継続投与した。

ZA/CY 投与中止 (抜歯窩再生) モデル: 抜歯後, 抜歯窩には何も移植せずに, ZA/CY を継続投与した。抜歯 2 週間後に, ZA/CY の投与を中止し, 掻爬した抜歯窩に BMP-2 複合体を移植した。

両モデルにおいて, 移植 4 週間後に組織を回収し, 4% paraformaldehyde (PFA) 固定を行った。そして, マイクロコンピューター断層 (micro-CT) 撮影を行い, X 線学的解析を行った。

次に, 4% PFA にて固定したサンプルを通常に従いパラフィン包埋後, 厚さ 5 mm の切片を作製し, Hematoxylin-Eosin (HE) 染色およびマッソントリクローム染色を行った。また, 免疫組織化学染色 (IHC) を実施するため, 川本法にて 5 mm の凍結切片を作製し, 1% bovine serum albumin (BSA) 含有 5% Goat serum で 1 時間ブロッキング後, 幼弱な血管のマーカである抗エンドムチン抗体, および, 骨芽細胞のマーカである抗オステオポンチン抗体を 4 で一晩反応させた。二次抗体は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG または Alexa Fluor 647 goat anti-rat IgG を使用した。DAPI にて核染色を行った後, 蛍光顕微鏡を用いて観察し, 定量解析を行った。HE 染色の組織画像から, 抜歯窩の新生骨形成面積率, 抜歯窩の新生骨内および抜歯窩周囲の中空の骨小腔数, マッソントリクローム染色の組織画像から創傷治癒に必須であるコラーゲン線維占有面積率を計測した。また, IHC の組織画像から, 抜歯窩のオステオポンチン陽性率, および, エンドムチン陽性率を計測した。

4. 研究成果

はじめに, ZA/CY 非投与マウスの上顎大臼歯を抜歯し, 抜歯 1, 2, 4, 8 週後に組織を回収し, 正常な創傷治癒過程を組織学的に解析した。その結果, 抜歯 1 週後のマウス抜歯窩はすでに幼弱な骨で満たされ, 抜歯窩の新生骨占有率は, 1 週後で $45.6 \pm 11.5\%$, 2 週後で $61.7 \pm 6.9\%$, 4 週後で $87.1 \pm 0.8\%$, 8 週後で $91.2 \pm 2.1\%$ であり, 抜歯窩は抜歯 4 週間にはほぼ骨に置換されることがわかった。そこで, 次に, 腐骨抑制モデルおよび抜歯窩再生モデルにおいて, 移植 4 週間後の抜歯窩および抜歯窩周囲骨を中心に解析した。

ZA/CY 投与継続 (腐骨抑制) モデルにおける BMP-2 複合体移植の効果を検討した。Micro-CT 解析の結果, BMP-2 複合体移植 4 週間後の抜歯窩は, 対照群と比較し X 線不透過像が明らかに増加していた。HE 染色の結果, BMP-2 非投与 (対照) 群の抜歯窩は疎な組織で満たされ, 新生骨形成面積率は $10.3 \pm 7.9\%$ であった。一方, BMP-2 複合体投与群 (BMP-2 群) の抜歯窩では, 残存した beta-TCP の周囲に新生骨の形成を認め, その周囲はコラーゲン線維に富んだ組織で満たされていた。また, 抜歯窩の新生骨形成面積率は $32.5 \pm 17.2\%$ と, 対照群と比較し有意に増加していた。次に, BMP-2 複合体の移植により, 骨壊死が抑制されているかどうかを検討するため, 抜歯窩の新生骨内および, 抜歯窩周囲骨の骨小腔中空数を計測した。その結果, BMP-2 群では対照群と比較し, 新生骨内および抜歯窩周囲骨の骨小腔中空数は有意に減少していた。さらに抜歯窩が完全に骨に置換されなかったことから, 抜歯窩のコラーゲン線維量をマッソントリクローム染色像から算出した。その結果, 対照群および BMP-2 群の抜歯窩コラーゲン線維占有率はそれぞれ $7.0 \pm 7.0\%$, $34.1 \pm 7.0\%$ であり, BMP-2 群の方が有意に高かった。

最後に, ZA/CY 投与中止 (抜歯窩再生) モデルにおける BMP-2 複合体移植の効果を検討した。Micro-CT 解析の結果, ZA/CY 投与継続 (腐骨抑制) モデルの結果同様, BMP-2 複合体移植 4 週間後の抜歯窩は, 対照群と比較し X 線不透過性が亢進していた。HE 染色の結果, 対照群の抜歯窩の新生骨形成面積率は $25.2 \pm 9.7\%$ であった。一方, BMP-2 群の抜歯窩は, 移植した新生骨で満たされており, 新生骨形成面積率は $76.5 \pm 11.5\%$ と, 対照群と比較し有意に増加した。また, BMP-2 群においては, 新生骨内および抜歯窩周囲骨の骨小腔中空数は有意に少なかった。次に, 抜歯窩創傷治癒において重要な役割を担っている血管新生や, 骨形成において重要な役割を担っている骨芽細胞様細胞の抜歯窩占有率を計測した。その結果, エンドムチン陽性の幼弱な血管および OPN 陽性の骨芽細胞の抜歯窩占有率は, 対照群 (エンドムチン陽性血管占有率: $2.0 \pm 0.1\%$, OPN 陽性骨芽細胞占有率: $3.2 \pm 1.3\%$) と比較し, BMP-2 群 (エンドムチン陽性血管占有率: $3.9 \pm 0.3\%$, OPN 陽性骨芽細胞占有率: $21.0 \pm 8.7\%$) において有意に増加していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Mikai Akihiro, Ono Mitsuaki, Tosa Ikue, Nguyen Ha Thi Thu, Hara Emilio Satoshi, Nosho Shuji, Kimura-Ono Aya, Nawachi Kumiko, Takarada Takeshi, Kuboki Takuo, Oohashi Toshitaka	4. 巻 21
2. 論文標題 BMP-2/ -TCP Local Delivery for Bone Regeneration in MRONJ-Like Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7028 ~ 7028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka Yukie, Aung Kyaw Thu, Ono Mitsuaki, Mikai Akihiro, Dang Anh Tuan, Hara Emilio Satoshi, Tosa Ikue, Ishibashi Kei, Ono-Kimura Aya, Nawachi Kumiko, Kuboki Takuo, Oohashi Toshitaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Suppression of Bone Necrosis around Tooth Extraction Socket in a MRONJ-like Mouse Model by E-rhBMP-2 Containing Artificial Bone Graft Administration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12823 ~ 12823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nosho Shuji, Tosa Ikue, Ono Mitsuaki, Hara Emilio Satoshi, Ishibashi Kei, Mikai Akihiro, Tanaka Yukie, Kimura-Ono Aya, Komori Taishi, Maekawa Kenji, Kuboki Takuo, Oohashi Toshitaka	4. 巻 21
2. 論文標題 Distinct Osteogenic Potentials of BMP-2 and FGF-2 in Extramedullary and Medullary Microenvironments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7967 ~ 7967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Pham Hai, Ono Mitsuaki, Hara Emilio, Nguyen Ha, Dang Anh, Do Hang, Komori Taishi, Tosa Ikue, Hazehara-Kunitomo Yuri, Yoshioka Yuya, Oida Yasutaka, Akiyama Kentaro, Kuboki Takuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Tryptophan and Kynurenine Enhances the Stemness and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells In Vitro and In Vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 208 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14010208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Mikai A, Ono M, Noshio S, Tosa I, Hara ES, Kimura-Ono A, Nawachi K, Kuboki T, Oohashi T
2. 発表標題 BMP-2 local administration for MRONJ-mice induced partial bone regeneration.
3. 学会等名 2020 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 納所秋二, 大野充昭, Ha Nguyen, 笈田育尚, 小盛大志, 秋山謙太郎, 大橋俊孝, 窪木拓男
2. 発表標題 骨髄環境におけるBMP-2誘導性骨形成・骨芽細胞分化抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 納所秋二, 大野充昭, Ha Nguyen, 三海晃弘, 窪木拓男, 大橋俊孝
2. 発表標題 BMP-2, FGF-2が骨髄内・外における骨形成に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三海晃弘, 大野充昭, 納所秋二, 土佐郁恵, 縄稚久美子, 大野 彩, 窪木拓男, 大橋俊孝
2. 発表標題 マウス薬剤関連性顎骨壊死モデルにおける BMP-2の骨形成能の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田仲由希恵 , 大野充昭, 納所秋二 , 石橋 啓, 三海晃弘, 土佐郁恵, 笈田育尚 , 大野 彩 , 秋山謙太郎 , 大橋俊孝, 入江洋之, 窪木拓男
2. 発表標題 大型動物歯槽骨欠損モデルを用いた大腸菌由来rhBMP-2の骨再生能の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuji Noshoh, Mitsuaki Ono, Akihiro Mikai, Kumiko Nawachi, Aya Kimura-Ono, Emilio S Hara, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 Bone-inducing effects of rhBMP-2 and rhFGF-2 in bone marrow microenvironment
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Mikai, Mitsuaki Ono, Shuji Noshoh, Ikue Tosa, Emilio S Hara, Aya Kimura-Ono, Kumiko Nawachi, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 BMP-2 local administration for MRONJ-mice induced partial bone regeneration
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	窪木 拓男 (Kuboki Takuo) (00225195)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大野 彩 (木村彩) (Ono Aya) (20584626)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	大野 充昭 (Ono Mitsuaki) (60613156)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	
研究分担者	秋山 謙太郎 (Akiyama Kentaro) (70423291)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関