

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24146

研究課題名(和文) 幹細胞ニッチの観点からの抜歯窩創傷治癒メカニズムおよびMRONJ病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of extraction tooth socket healing mechanism and MRONJ pathological condition from the perspective of stem cell niche

研究代表者

三海 晃弘 (Mikai, Akihiro)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：20845375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、MRONJの発症メカニズムを明らかにすることを目的に、MRONJ様モデルマウスの構築・評価、および遺伝子改変マウスを用いた解析を実施してきた。MRONJ様モデルマウスの抜歯窩は術後4週間経過しても治癒することなく、抜歯窩の周囲骨が壊死することを確認した。さらに遺伝子改変マウスにおける、大腿骨骨折の治癒過程では、間葉系幹細胞が多数観察された一方、抜歯窩の治癒過程では、間葉系幹細胞はほとんどが観察されなかった。本研究において、幹細胞は、骨髄形成に重要な役割を担っていることから、大腿骨と抜歯窩の創傷治癒過程における間葉系幹細胞の量の違いがMRONJ発生に関わっている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が進行する日本では骨粗鬆症患者も増加し続けている。骨粗鬆症の第1選択薬であるビスフォスフォネート(BP)製剤だが強力な骨吸収抑制作用を持つ一方で、投与されている患者において侵襲的歯科治療などを引き金に顎骨壊死が発生するMRONJが社会的問題となっている。MRONJはその発症原因及び治療法も未だ解明されていない。本研究により抜歯を引き金に発生したMRONJの発生メカニズムには何らかの形で間葉系幹細胞が関わっていることが明らかとなった。今後はさらに詳細に検討していく予定である。これらの研究はこれまで解明されていない、MRONJのメカニズムおよび治療法の開発において大きな一歩である。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of clarifying the onset mechanism of MRONJ, we have carried out the construction and evaluation of MRONJ like model mice, and the analysis using genetically modified mice. It was confirmed that the extraction socket of the MRONJ like model mouse did not heal even 4 weeks after the operation, and the bone around the extraction socket was necrotic. Furthermore, while a large number of mesenchymal stem cells were observed during the healing process of femoral fractures in genetically modified mice, most of the mesenchymal stem cells were not observed during the healing process of the extraction socket. In this study, stem cells play an important role in bone marrow formation, suggesting that differences in the amount of mesenchymal stem cells during the wound healing process between the femur and the extraction socket may be involved in MRONJ development.

研究分野：バイオロジー

キーワード：MRONJ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、破骨細胞による骨吸収を治療ターゲットとするビスフォスフォネート (BP) 製剤やデノスマブなどを投与されている患者が抜歯などの侵襲的歯科治療を受けた後、顎骨壊死を発生する、いわゆる薬剤関連顎骨壊死 (Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: 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、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な状況である。当初、MRONJ 患者では、抜歯後の骨吸収が抑制されることによる、カップリング破綻としての骨形成不全 (= 骨再生不全) がその骨壊死の原因と捉える研究者が多かったが、最近では顎骨の治療過程における血管内皮細胞や幹細胞の供給不全や機能不全がその原因であると示唆するものも現れた (Yamashita, 2011)。また、間葉系幹細胞の全身投与により症状が改善する (Kuroshima, 2018) という報告から推測すると、MRONJ を、間葉系幹細胞機能不全もしくは動員不全モデルとしてとらえる科学的根拠が十分蓄積されたと考えても良いだろう。つまり、組織再生療法や、その機能不全モデルである MRONJ の治療法を開発するためには、「再生の場」を分子レベルで理解する必要性がでてきた。

## 2. 研究の目的

顎骨・歯槽骨における創傷治癒モデルを用いて、間葉系幹細胞の供給源および幹細胞ニッチの観点からそのメカニズムと差異を解明することで、顎骨特異的に発症する MRONJ の病態を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) MRONJ 様モデルマウスにおける抜歯窩治癒不全や MRONJ の病態の解明

MRONJ 様モデルマウスの作製：

Zoledronic Acid Hydrate (ZA, 0.05 mg/kg, Zometa; Novartis, Stein, Switzerland) と Cyclophosphamide (CY, 100 mg/kg, C7397; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (CY/ZA) 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た (Kuroshima, 2018 を引用)。抜歯後も組織回収まで薬剤の投与は継続して行なった。

### 組織学的解析

4% PFA にて固定したサンプルを通法に従いパラフィン包埋後、厚さ 5  $\mu$ m の切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行なった。HE 染色の組織画像から、抜歯窩の新生骨形成面積率、また、骨壊死の指標として抜歯窩の新生骨内および抜歯窩周囲の中空の骨小腔数を計測した。

### 2) 遺伝子改変マウスにおける抜歯窩治癒過程の理解

遺伝子改変 (骨芽細胞が可視化された *Col1a1*-GFP, 破骨細胞が可視化された *TRAP*-Tomato および間葉系幹細胞が可視化された *CXCL12*-GFP) マウスにて上顎第 1 臼歯の抜歯を行い、その発現量を解析した。

#### 4 . 研究成果

##### 1) MRONJ 様モデルマウスにおける抜歯窩治癒不全や MRONJ の病態の解明

薬剤投与を行っていない健全なマウスの抜歯窩では 4 週間で抜歯窩の骨性治癒が生じるのに対して、MRONJ 様モデルマウス抜歯窩ではほとんど骨性の治癒は生じなかった。

また、抜歯窩周囲骨への影響を 0-100  $\mu\text{m}$  , 100-200  $\mu\text{m}$  , 200-300  $\mu\text{m}$  ごとに単位面積あたりの骨小腔中空数を計測した。その結果、CY/ZA 投与 3 週間後のマウス上顎第一臼歯の歯根周囲の歯槽骨の骨小腔中空率は、CY/ZA 非投与マウスの歯槽骨と比較し有意な差はなかった。しかし、抜歯 4 週後、CY/ZA 投与マウスの抜歯窩周囲骨の骨小腔中空率は増加した。以上の結果より、CY/ZA 投与マウスにおいて、抜歯窩周囲骨の骨壊死は抜歯により誘導されることが明らかとなった。

##### 2) 遺伝子改変マウスにおける抜歯窩治癒過程の理解

次に、間葉系幹細胞が可視化された *CXCL12*-GFP マウス、骨芽細胞が可視化された *Col1a1*-GFP、破骨細胞が可視化された *TRAP*-Tomato マウスを用いて抜歯窩の創傷治癒過程における骨芽細胞、破骨細胞、間葉系幹細胞の役割を解析した。その結果、抜歯窩における *Col1a1* 陽性および *TRAP* 陽性細胞は多数観察された。一方、*CXCL12* 陽性の間葉系幹細胞は大腿骨の骨折の治癒過程においては、多数観察されたが、抜歯窩の治癒過程においてはほとんどが観察されなかった。*CXCL12* 陽性幹細胞は、骨髄ニッチの形成、維持に重要な役割を担っていることから、大腿骨と抜歯窩の創傷治癒過程における *CXCL12* 陽性の間葉系幹細胞の量の違いが MRONJ 発生に関わっている可能性示唆された。

今後は遺伝子改変マウスを使用して MRONJ 様モデルを作製し、MRONJ が顎骨に特異的に発症するメカニズムを間葉系幹細胞の観点から解析してく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akihiro Mikai, Mitsuaki Ono, Shuji Noshou, 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

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 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 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 Noshou, 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

〔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

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