

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 9 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463016

研究課題名(和文) BRONJ モデルマウスの免疫機能解析と制御性T細胞を応用した予防治療法の開発

研究課題名(英文) Immune function analysis of BRONJ mouse model and development of prophylactic therapy using regulatory T cells.

研究代表者

梯 裕恵 (KAKEHASHI, Hiroe)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30452775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：BRONJ発生リスクと免疫機能の関連性の検討を行うべく、まずBRONJ発生リスクの異なるモデルマウスの作成を行う予定であった。本研究で使用する4種類のモデルマウスは過去の方法に準じて作成する予定であり、研究協力者によりすでに確立されたものがあるため、そのマウスと本研究とのすり合わせを行った。また、各マウスの免疫機能の検討を行う予定であり、1)免疫組織化学染色法を用いたDCの組織内局在の検討、2)末梢血からのDC調製法の確立を行っている段階である。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the relationship between BRONJ occurrence risk and immune function, we first planned to create model mice with different BRONJ occurrence risk. The four model mice used in this study are planned to be prepared in accordance with the past method, and because there is some already established by research collaborators, we have matched the mouse with this study. We also plan to investigate the immune function of each mouse, 1) investigate the tissue localization of DC using immunohistochemical staining method, 2) stage to establish DC preparation method from peripheral blood.

研究分野：骨吸収抑制薬関連顎骨壊死

キーワード：BRONJ ARONJ MRONJ 骨吸収抑制薬 ビスフォスフォネート 抗RANKL抗体 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート (BP) は骨粗鬆症治療の第一選択薬として国内外で広く使用されているが、近年、重篤な副作用としてビスフォスフォネート関連顎骨壊死 (BRONJ) が報告され、患者数は増加している。BRONJ は、抜歯などの侵襲的歯科治療後に発生しやすいことが知られているが、その発生機序や有効な予防法は未だ明らかになっていない。BP 製剤は、骨粗鬆症治療の他、悪性腫瘍による高カルシウム血症や多発性骨髄腫による骨病変、および固形癌骨転移による骨病変治療にも有用性が示されており、臨床現場での使用頻度は今後ますます高まると考えられる。しかし、近年、BP 製剤は重篤な副作用として顎骨壊死や骨髄炎を起こすことが報告された。BRONJ と呼ばれるこの副作用の発生機序は明らかになっていないが、BRONJ が侵襲的歯科治療の後に発生しやすいことを踏まえ、BRONJ の発生には BP 投与で起きる顎骨の代謝異常に加え、顎骨の炎症に対する防御機構としての免疫反応に起こる異常が関与しているものと考えられる。骨の恒常性は骨代謝細胞だけでなく、他組織や細胞種との相互作用で複雑に制御されている。近年、骨と免疫系はサイトカインなど多くの制御タンパク質を共有しており、特に骨芽細胞および破骨細胞の増殖分化にヘルパー T 細胞からの情報が深く関与していることが明らかにされ、骨代謝細胞と免疫系との関与が注目されている (Takayanagi, *Nat. Rev. Immunol.*, 2007)。この骨免疫学的視点に立てば、BP による破骨細胞の活性低下が、免疫担当細胞の機能低下に関わっている可能性は十分に妥当性がある。一方、現在治療に用いられている BP 製剤の多くはアミノ基含有 BP (N-BPs) であり、低分子量 G タンパク質による細胞骨格の構成や細胞内情報伝達などの機能を阻害して細胞機能を抑制するが、これらにより細胞骨格の再構築や波状縁の形成などの破骨細胞の重要な機能に影響が及ぼされる。それ以外にも、N-BPs の一つであるパミドロネートは、*in vivo* においてメバロン酸代謝阻害により単球における isopentenyl-5-pyrophosphate を増加させ、*T* 細胞を活性化させるとの報告がある (Thompson *et al.*, *Adv Exp Med Biol.*, 2010)。さらに、最近では N-BPs が *T* 細胞を活性化させることを利用してインフルエンザウイルスの治療への適用の可能性について検討する研究もなされている (Tu *et al.*, *J Exp Med.*, 2011) また、N-BPs をマウスの腹腔内に投与すると IL-1 と肥満細胞に依存した炎症を生ずることが示された (Norton *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2011, Norton *et al.*, *J Immunol.*, 2012)。以上のように、BP が免疫機構に広く影響を与えていることが明らかになってきた。なお、臨床の現場では、多発性骨髄腫患者の BP 治療で免疫制御細胞の減少が起きることが報

告されている (Castella *et al.*, *J Immunol.*, 2011)。このような理由から、本研究では、BRONJ モデルマウスの免疫担当細胞について検討を行うことにした。

我々は過去の研究で、代表的な細胞内プロテアーゼであるカテプシン E (CE) の欠損マウスから樹状細胞 (dendritic cells : DC) やマクロファージを調製し、それらの性状や機能を比較することによって、本酵素の抗原提示細胞における役割について検討した。DC では、CE の欠損によって細胞そのものに大きな機能変化はみられなかったが、CE 欠損 DCの方が野生型 DC に比べて高い外来性抗原提示能や貪食能、細胞表面の補助刺激分子の発現量の増大を示すことを見出した。さらに、種々のプロテアーゼ阻害剤を用いてプロテアーゼの欠失によって DC では抗原提示を効率よく進めるための何らかの機構が働いているものと考えられた (Kakehashi *et al.*, *J Immunol.*, 2007)。

N-BPs は破骨細胞内のファルネシル・ピロリン酸シンターゼ酵素を阻害し、それによりシグナル伝達タンパク質である低分子 GTP アーゼのプレニル化を阻害することで骨髄腫での骨破壊を抑制する (Guenther *et al.*, *Int J Cancer.*, 2009) ことを踏まえ、BP 投与によって、免疫系に影響を及ぼすプロテアーゼに変化が起きている可能性が考えられる。

本研究の特色は、BRONJ 発生の免疫学的な背景を明らかにする点であるが、特に斬新であるのは、抗原提示細胞である DC の性質に注目する点である。BRONJ は顎骨特異的に発生する BP の副作用であることから、これまでの研究では BP 投与で生じる顎骨の変化 (代謝異常) が主に研究されてきた。一方、BRONJ の免疫学的な背景は、BP 服用患者の多くが細菌感染に対して正常な免疫応答を示すこともあり、これまでほとんど研究されていない。しかしながら、BRONJ が抜歯などの侵襲的歯科治療後に発生しやすいことや口腔清掃が不良な患者で BRONJ の発生頻度が高いことを踏まえ、BRONJ 発生の背景には骨組織に特異的な骨免疫系の異常が必ず関与しているものと考えられる。

そこで、本研究では BRONJ 発生リスクの異なる 4 種類のマウス (ステロイド性骨粗鬆症 + BP、閉経後骨粗鬆症 + BP、BP、生理食塩水) を作製し、それらのマウスの末梢血、リンパ節、胸腺、脾臓における DC の機能と BRONJ 発生リスクの関連性について検討を行うことにした。さらに、本研究では、制御性 T 細胞移植の BRONJ 予防効果についても検討を行う。

制御性 T 細胞などの免疫制御細胞は免疫反応を適切に制御する細胞であり、これらの細胞の異常や減少は自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症に深く関与している。BRONJ 患者の免疫制御能についてはこれまで検討されたことがないが、免疫制御細胞の減少は過

剰な免疫反応と炎症の慢性化を引き起こすため、BRONJ 発生への深い関与が示唆される。また、免疫制御細胞の減少は活性化 T 細胞の増加につながるが (Castella *et al.*, *J Immunol.*, 2011)、活性化 T 細胞は骨前駆細胞や線維芽細胞のアポトーシス誘導作用を有するため (Yamaza *et al.*, *PLoS One.*, 2008, Bendersky *et al.*, *Immunobiology.*, 2010)、免疫制御細胞の減少が副次的に顎骨や口腔粘膜の代謝異常を起こしている可能性もある。以上のことから、BRONJ モデルマウスを用いて BRONJ と免疫制御能低下の関連性を明らかにすることは今後の BRONJ 研究を進展させるうえで極めて重要であり、本研究成果は BRONJ のリスク診断法や予防法の開発を目指す新たな研究にもつながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、BP 投与で起こる免疫機能低下が BRONJ の発生に深く関与しているとの仮説に基づき、発生リスクの異なる 4 種類のマウスを用い、特に樹状細胞ならびに制御性 T 細胞の機能変化に着目した免疫制御能と BRONJ リスクの関連性や、制御性 T 細胞移植の BRONJ 予防効果について検討を行う。将来的には、予防法やリスク診断法の開発につながることを目的とする。

BRONJ は顎骨特異的に発生する副作用であることから、BP 投与後に起こる顎骨の代謝異常が BRONJ 発生の主な背景と考えられている。しかしながら、BP による骨代謝異常は顎骨以外の骨にも発生するため、BRONJ の背景に顎骨の代謝異常以外の重要な因子が存在する可能性は十分にある。我々は、BP 投与で起きる抗原提示細胞の抗原提示能の低下が BRONJ 発生に深く関与していると考えている。

BRONJ は BP 服用患者の侵襲的歯科治療後や、歯周疾患など口腔内環境不良で起こり得ることが知られているが、BRONJ への対処法が確立していない現在は、BP 服用患者の侵襲的歯科治療はできる限り避けることや、保存的治療にとどめることが推奨されている。BRONJ 発生リスクの診断が可能になれば、多くの BP 服用患者が必要な歯科治療を安心して受けられるようになる。さらに、BRONJ の予防法が確立されれば、BRONJ 発生リスクが高い患者の侵襲的歯科治療も可能になるものと考えられる。BRONJ に関する研究はこれまでも多数行われているが、BRONJ 発生の背景や機序については明らかになっておらず、その予防法や治療法も確立されていない。そこで、我々はこれまでとは異なる視点で BRONJ 研究を行うことにした。本研究は、「BP 投与で起こる免疫機能の低下が BRONJ の発生に深く関与している」という斬新な仮説の証明に挑むものである。したがって、本研究が成功した場合には BRONJ に関する従来の概念を一新するだけでなく、BRONJ のリスク診断法や予防法の開発につながる卓越した

成果が得られる。BP 服用患者数は今後も増加が予想されるため、本研究は科学的にも社会的に重要な意義を持つ。

## 3. 研究の方法

BRONJ 発生リスクの異なる 4 種類のマウス (ステロイド性骨粗鬆症 + BP、閉経後骨粗鬆症 + BP、BP、生理食塩水) を作製し、それらのマウスの末梢血、リンパ節、胸腺、脾臓における DC の機能ならびに免疫制御細胞の存在比率と BRONJ 発生リスクの関連性について検討を行う。その後、制御性 T 細胞移植の BRONJ 予防効果を明らかにするために、同種健常マウスから採取した制御性 T 細胞を生体外で培養・増幅し、BRONJ モデルマウスへ移植を行う。本研究における BRONJ の定義は、「抜歯から 8 週間が経過しても  $\mu$ CT 及び組織学的に顎骨壊死と抜歯窩の治癒不全 (骨及び粘膜の閉鎖不全) が認められるもの」であるため、抜歯から 8 週経過時点での顎骨の状態を評価し、予防効果を判定する。

(1) BRONJ 発生リスクと免疫機能の関連性の検討

BRONJ 発生リスクの異なるモデルマウスの作製

本研究で使用する BRONJ 発生リスクの異なる 4 種類のモデルマウス (ステロイド性骨粗鬆症 + BP、閉経後骨粗鬆症 BP、BP、生理食塩水) は過去の方法 (Kikuri *et al.*, *J Bone Miner Res.* 2008, Yamane *et al.*, *Bone.*, 2009) に準じて作製する。BP としてはゾレドロネートを用いる。

BRONJ 高リスク (ステロイド性骨粗鬆症 + BP): 6 週齢 BALB/cAJcl (雌) に週 2 回ゾレドロネート (125  $\mu$ g/kg) とデキサメタゾン (5 mg/kg) を尾静脈から投与。

BRONJ 中リスク (閉経後骨粗鬆症 + BP): 全身麻酔下で卵巣を摘出した同マウスに週 2 回ゾレドロネート (125  $\mu$ g/kg) を尾静脈から投与。

BRONJ 低リスク (BP): 同マウスに週 2 回ゾレドロネート (125  $\mu$ g/kg) を尾静脈から投与。

BRONJ リスクなし (生理食塩水): 同マウスに週 2 回生理食塩水を尾静脈から投与。投与開始後 1 週間目に全身麻酔下で片側の上顎第一大臼歯を抜歯し BRONJ の誘発を行う。薬剤投与は最長 8 週間行い、投与開始から 2 週目と 9 週目にマウスを犠牲死させ、上顎の摘出を行う。摘出した上顎はパラホルムアルデヒドで固定後、 $\mu$ CT 解析と組織学的解析を行い、各マウスの抜歯窩の状態と顎骨壊死の程度を明らかにする。本モデルでの BRONJ の定義は、抜歯から 8 週が経過しても  $\mu$ CT 及び組織学的に顎骨壊死と抜歯窩の治癒不全 (骨及び粘膜の閉鎖不全) が認められるものとする。

各マウスの免疫機能の検討

上記実験 から BRONJ 発生リスクと発生時の重症度が明らかになるため、続いて免疫担

当細胞と BRONJ 発生リスクの関連性について検討する。マウスは実験と同様に8週間の薬剤連続投与で4種類作製するが、本実験では抜歯による BRONJ の誘発は行わない。投与開始から9週目に末梢血の採取と、リンパ節(顎下及び腋窩)、胸腺、脾臓および大腿骨の摘出を行う。

1) 免疫組織化学染色法を用いた DC の組織内局在の検討

マウスから摘出したリンパ節、胸腺、脾臓、大腿骨骨髓における DC の局在を確認し、安定した細胞数の培養系を確立する。

2) 末梢血からの DC 調製法の確立

末梢血から DC を調製し、安定した細胞数の培養系を確立する。

3) 細胞表面抗原、細胞遊走能、タンパク質分解能、貪食能の検討

・細胞表面抗原: MHC class 抗原、接着分子(ICAM-1, VCAM)、補助刺激分子(CD86, CD80, CD40)の発現をフローサイトメトリーを用いて比較検討する。

・細胞遊走能: ボイデンチャンパー方式により、走化性因子である代表的ケモカインの MCP-1 または走化性ペプチドの fMLP を用いて比較測定する。

・タンパク質分解能: 分子内に蛍光団を持ち、切断されると発色する性質を持つ蛍光タンパク質である DQ Ovalbumin を用いて検討する。

・貪食能: 蛍光ラテックスビーズを用いて、細胞内に貪食されたビーズの蛍光量をフローサイトメトリーで測定する。

4) 末梢血における免疫制御細胞の種類、数、機能の解析

各マウスから採取した末梢血に含まれる免疫制御細胞の種類、数、機能について比較を行う。MACS とフローサイトメトリーを用いて T 細胞集団 (Pan T cell) に占める制御性 T 細胞 (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>) の割合と B 細胞集団 (Pan B cell) に占める制御性 B 細胞 (IL-10<sup>+</sup>) の割合をマウス間で比較する。また、分離した免疫制御細胞の機能比較は IL-10 と TGF- $\beta$ 1 の発現量を ELISA で行う。

5) リンパ節、胸腺、脾臓の免疫組織学的解析

各マウスから採取した顎下リンパ節はパラホルムアルデヒドで固定後、免疫制御マーカー IL-10 と炎症マーカー IL-17 の免疫染色を行い、炎症の活動性を比較する。また、腋窩リンパ節、胸腺、脾臓、大腿骨骨髓については同手順で固定後、制御性 T 細胞特異的マーカー Foxp3 と IL-10 の二重染色を行い、単位面積当たりの免疫制御細胞数を比較する。

(2) 制御性 T 細胞移植の BRONJ 予防効果の検討

本実験には BRONJ 発生リスクの高い2種類のモデルマウス(ステロイド性骨粗鬆症 + BP、閉経後骨粗鬆症 + BP)のみ使用する。

移植用制御性 T 細胞の分離・培養・調製  
移植用制御性 T 細胞は同種健常マウス(雄)の末梢血からの採取を行うが、十分な細胞数が確保できない場合に備え、胸腺、脾臓からも採取を行う。採取には実験 1-2-4) で使用したキット (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> 細胞の分離キット) を用いる。分離した制御性 T 細胞は専用の増殖培地で 14 日間培養し、40 倍程度に増幅させる。移植のコントロールに用いる Pan T cell も実験 1-2-4) と同様の手順で分離し、専用培地で増幅させる。移植前にフローサイトメトリーで制御性 T 細胞の純度確認を行う。

T 細胞移植と解析

薬剤投与開始後1週間目に全身麻酔下でモデルマウスの両側上顎第一大臼歯を抜歯し BRONJ の誘発を行うが、抜歯前日に制御性 T 細胞、または、Pan T Cell を尾静脈から同数注入しておく。薬剤投与はその後最長7週間継続し、投与開始から2週目と9週目にマウスを犠牲死させ、上顎とリンパ節の摘出を行う。摘出した上顎の片側はパラホルムアルデヒドで固定後、 $\mu$ CT 解析と組織学的解析で顎骨の状態を評価し、制御性 T 細胞の BRONJ 予防効果を明らかにする。反対側の上顎とリンパ節は同様の手順で固定後、IL-10 と IL-17 で免疫染色を行い、炎症の活動性を評価する。また、マウス XY 染色体 FISH プローブを用いて、移植細胞のトラッキングを行う。

4. 研究成果

BRONJ 発生リスクと免疫機能の関連性の検討を行う計画であり、まず BRONJ 発生リスクの異なるモデルマウスの作成を行う予定であった。本研究で使用する BRONJ 発生リスクの異なる4種類のモデルマウス(ステロイド性骨粗鬆症 + BP、閉経後骨粗鬆症 BP、BP、生理食塩水)は過去の方法(Kikuri et. al., J Bone Miner Res. 2008, Yamane et. al., Bone, 2009)に準じて作成する予定であり、このモデルマウスは研究協力者によりすでに確立されたものがあるため、そのマウスと本研究とのすり合わせを行った。また、各マウスの免疫機能の検討を行う予定であり、1)免疫組織化学染色法を用いた Dc の組織内局在の検討: マウスから摘出したリンパ節、胸腺、脾臓、大腿骨骨髓における DC の局在を確認し、安定した細胞数の培養系を確立する。2)末梢血からの DC 調製法の確立: 末梢血から DC を調製し、安定した細胞数の培養系を確立する。以上の計画であった。DC の局在を調べるためのマーカーとして、MHC Class、CD11c、CD205 を用いて染色を行っている段階である。

一方、臨床研究では、当院では腐骨分離を目指した積極的なデブリードマンと局所洗浄、壊死骨削合、抗菌薬投与による保存的治療を主体としており、保存的治療を行った BRONJ 症例について臨床的検討を行っている。ので報告する。対象は2004年10月から2013

年12月に当院を受診し、BRONJとの診断を得て保存的治療を行い、2年以上経過が追えた76症例であった。使用薬剤は全例ビスフォスフォネートであった。治癒症例は52例で、10例が治療継続中、14例が治療途中で死亡していた。治癒症例の内訳は、年齢：46-88歳（平均73.8歳）、性別：男性7例、女性45例。病期分類はステージ2が最も多く38例で、原疾患は原発性骨粗鬆症30例、悪性腫瘍骨転移8例、続発性骨粗鬆症7例、多発性骨髄腫6例、その他1例であった。ゾレドロネート、ミノドロネートといった骨吸収抑制相対力価の高い薬剤を使用している症例は19/37例（51.4%）、ステロイド剤内服や糖尿病、悪性腫瘍などのリスクファクターがある症例は28/49例（57.1%）であった。治癒までに要した日数は、平均542.3日であった。保存的治療はステージ進行例や骨吸収抑制作用の強い薬剤を使用している症例、リスクファクターがある症例においても有用であると考えられた。

#### 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 4件）

A New Strategy for Surgical Intervention of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: A retrospective study.  
Yamada Shin-ichi, Hayashida Saki, Yanamoto Souichi, Naruse Tomofumi, Matsushita Yuki, Uda Akiko, Rokutanda Satoshi, Takehashi Hiroe, Ikeda Hisazumi, Asahina Izumi, Umeda Masahiro. *Acta medica Nagasakiensia*, 60(3), pp.97-102; 2016

Administration of teriparatide improves the symptoms of advanced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: preliminary findings.  
Takehashi H, Ando T, Minamizato T, Nakatani Y, Kawasaki T, Ikeda H, Kuroshima S, Kawakami A, Asahina I *Int J Oral Maxillofac Surg*. 44: 1558-1564, 2015

ゾレドロネート投与中乳癌骨転移患者の口蓋隆起に発生した顎骨壊死2例の治療経験  
梯 裕恵, 山下裕美, 大場誠悟, 朝比奈 泉  
日口内誌 21: p21-26, 2015.6

重度の骨格性下顎前突症患者に対して二段階の顎矯正手術を施行した1例  
南里篤太郎, 小原 悠, 大場誠悟, 梯 裕恵, 吉田教明, 朝比奈 泉  
日顎変形誌 p25: 42-48, 2015

〔学会発表〕（計 6件）

保存的治療を行った薬剤関連顎骨壊死症例に関する臨床的検討

梯 裕恵, 後藤雄一, 新井伸作, 川野真太郎, 光安岳志, 大部一成, 石井広太郎, 熊丸 涉, 森 悦秀, 中村誠司

第61回 日本口腔外科学会総会・学術大会 2016

粘液嚢胞に対する微小開窓療法 (micro-marsupialization)

梯 裕恵

第60回 日本口腔外科学会総会・学術大会シンポジスト 2015

Administration of teriparatide improves the symptoms of advanced medication-related osteonecrosis of the jaw: preliminary findings

H. KAKEHASHI, T. ANDO, Y. NAKATANI, T. KAWASAKI, H. IKEDA, I. ASAHINA, S. NAKAMURA

第63回 国際歯科研究学会 (JADR) 総会・学術大会 2015

ゾレドロネート投与中乳癌骨転移患者の口蓋隆起に発生した顎骨壊死2例の治療経験

梯 裕恵, 山下裕美, 大場誠悟, 中谷佑哉, 檜原 峻, 四道玲奈, 朝比奈 泉

第69回 日本口腔科学会学術集会 2015

Successful treatment of advanced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, BRONJ, with an adjunctive teriparatide therapy

Hiroe Takehashi, Takao Ando, Tokutaro Minamizato, Shinichiro Kuroshima, Saki Hayashida, Souichi Yanamoto, Masahiro Umeda, Izumi Asahina

EACMFS 2014

骨粗鬆症に併発したBRONJに対するテリパラチド治療

梯 裕恵, 林田 咲, 池田 久住, 柳本 惣市, 梅田 正博, 朝比奈 泉

第59回 日本口腔外科学会総会・学術大会 2014

〔その他〕

歯界展望 125巻 3-5号

集中連載 ビスフォスフォネート製剤に起因する顎骨壊死と歯科治療 1-3

黒嶋伸一郎, 澤瀬 隆 (症例協力: 梯 裕恵)

歯界展望 129巻 5号

集中連載 骨吸収抑制薬関連顎骨壊死と歯科治療 2 - Update in 2017 -

黒嶋伸一郎, 梯 裕恵, 澤瀬 隆

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梯 裕恵 (KAKEHASHI Hiroe)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号：30452775

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
中村 誠司 (NAKAMURA Seiji)  
朝比奈 泉 (ASAHINA Izumi)  
住田 吉慶 (SUMITA Yoshinori)  
黒嶋 伸一郎 (KUROSHIMA Shinichiro)