

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06755

研究課題名（和文）歯髄幹細胞由来エクソソームを用いたビスホスホネート関連顎骨壊死の治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a treatment for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw using dental pulp stem cell-derived exosomes

研究代表者

岡部 一登 (Okabe, Kazuto)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50801453

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト歯髄幹細胞（DPSCs）から単離したエクソソームを用いて難治性疾患であるビスホスホネート製剤関連顎骨壊死（BRONJ）の発症機序を解明し、治療法を確立することが目的である。ビスホスホネート製剤を投与した動物では、拔牙すると粘膜や顎骨は治癒せず、BRONJを発症する。しかしながら、拔牙前にDPSCsから単離したエクソソームを投与することで正常な治癒を促すことが可能であった。投与したエクソソームを網羅的に解析した結果、発症機序としてビスホスホネート製剤による宿主の細胞老化が一因となってい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

BRONJは摂食障害や発音障害、審美障害をもたらし、著しくQOLを低下させる。その発症は2003年に報告されて久しいが、未だ発症機序は不明である。そのため、予防法や治療法が確立されておらず、現状ではBRONJに苦しむ患者は増加の一途をたどる。本研究では、DPSCsから単離したエクソソームの投与によりBRONJの発症を抑制した。閉塞感の漂っていたBRONJへの予防法や治療法へ一石を投じることになり、更なるエクソソームの解析により関連遺伝子を特定することで発症機序の解明や創薬へと引き継がれると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the pathogenesis and to establish a treatment of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ), a intractable disease, using exosomes isolated from human dental pulp stem cells (DPSCs). Animals administered the bisphosphonates develop BRONJ without healing of mucous membranes and jaw bones after tooth extraction. However, it was possible to promote normal healing by administering exosomes isolated from DPSCs before tooth extraction. As a result of microarray analysis of the administered exosomes, it was suggested that the cellular senescence of the host by bisphosphonates may contribute as the mechanism of pathogenesis.

研究分野：口腔再生医学

キーワード：ビスホスホネート関連顎骨壊死 エクソソーム

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

1. 研究開始当初の背景

ゾレドロン酸を代表とするビスホスホネート製剤は破骨細胞を抑制することにより骨吸収を阻害する薬剤であり、骨粗鬆症患者や骨転移を有するがん患者への有効性が広く認知されている。しかしながら、その合併症としての顎骨壊死が臨床の現場において様々な問題を生み出した。ビスホスホネート製剤に関連する顎骨壊死(以下、BRONJ)は放射線治療歴やがんの骨転移がなく、口腔および顎、顔面領域に8週間以上の骨露出を認める状態である。その発症率は、骨粗鬆症患者で経口投与、静脈投与を問わず0.001~0.01%とされ、がん患者でも1%程度と比較的低いとされるが、抜歯などの侵襲的歯科治療を契機とすることが多く、臨床医は抜歯を敬遠するようになった。抜歯が必要であるにもかかわらず、処置を受けられない、いわゆる抜歯難民と呼ばれる患者の存在が社会的問題となっている。

BRONJは2003年に報告されて以来久しいが、発症に想定されるリスク因子やメカニズムだけでは説明できない事象が多く、予防法は確立されていない。治療法は最も治癒率の高い手法として外科的療法を推奨する傾向にあるが、外科的侵襲度は高く、著しく患者のQOL低下を招く場合も少なくない。他の治療法としては、低出力レーザー療法、高圧酸素療法などが試みられているが、予知性に乏しいのが現状である。超高齢社会となった現在において、BRONJに苦しむ患者は増加傾向にあり、確実性のある低侵襲な治療法を開発しなければならない。

幹細胞治療は難治性疾患に対して有効となる治療法として期待されている。近年、その治療効果は移植した幹細胞の分泌因子によるものであることが分かってきた。分泌因子の中でもエクソソームと呼ばれる細胞外小胞が細胞間情報伝達において重要であることが明らかとなり、急速に関心を集めている。小胞体中の情報伝達物質は、細胞の起源によって異なるが、数種類のタンパク質やmRNA、microRNA、がん特異的代謝産物など多岐にわたる。特に骨髄由来間葉系幹細胞(以下、MSCs)のエクソソームを介した細胞間情報伝達は、免疫応答、中枢神経系、心血管系などの生理機能に関与し、さまざまな疾患に対する効果の重要な役割を担っているとされる。

本研究では幹細胞としてMSCsではなく、医療廃棄物となる乳歯や永久歯の内部組織である歯髄に局在する歯髄幹細胞(以下、DPSCs)に注目する。DPSCsはMSCsを由来とする因子より細胞保護因子、血管再生因子、線維化抑制因子、幹細胞集積因子などの治療効果因子を多く含有しており、脊髄損傷などの難治性疾患の病態を改善させる等の組織再生能が高いことが明らかになっている。そのため、DPSCsから単離したエクソソームはBRONJに有用であるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では幹細胞、特にDPSCsを由来とするエクソソームのBRONJに対する治療効果を検証し、その機序を解明することが目的である。

3. 研究の方法

(1) エクソソームの単離

エクソソームはヒトDPSCsの培養上清から超遠心法により単離した。透過型電子顕微鏡で観察後、粒径分布を測定した。またウエスタンブロット法により特異的表面抗原を検出し、蛍光免疫染色により細胞によるエクソソームの取り込みを確認した。

(2) BRONJモデル動物を用いた検討

BRONJモデル動物として過去の報告(Ogata K et al. Bone 74: 95-105, 2015)を応用した。すなわち、Wistar/STラット(8週齢、雌)に対して抜歯3週間前よりゾレドロン酸35µg/kg/week、デキサメタゾン1mg/mL/dayを投与し、作製した。抜歯翌日にDPSCsより回収したエクソソームを尾静脈より投与し、抜歯14日後に抜歯窩とその周囲組織を放射線学的および組織学的に検討した。

(3) BRONJモデル細胞を用いた検討

BRONJモデル動物を用いた検討により、エクソソームによる治療効果を実証した。その機序を解明するため、BRONJモデル細胞を用いて検討した。当初は作製したBRONJモデル動物であるラットの大腿骨よりMSCsを採取する予定であったが、安定した培養増殖が困難であった。そのため、ゾレドロン酸を添加し培養したラットMSCsを代用することでBRONJモデル細胞とした。BRONJモデル細胞にDPSCsから単離したエクソソームを添加して培養し、増殖能、アポトーシス、細胞老化について検討した。細胞増殖能がWST-8、細胞遊走能はScratch Wound Assay、細胞老化はSA-β-Gal染色により評価した。

(4) エクソソームの遺伝子解析

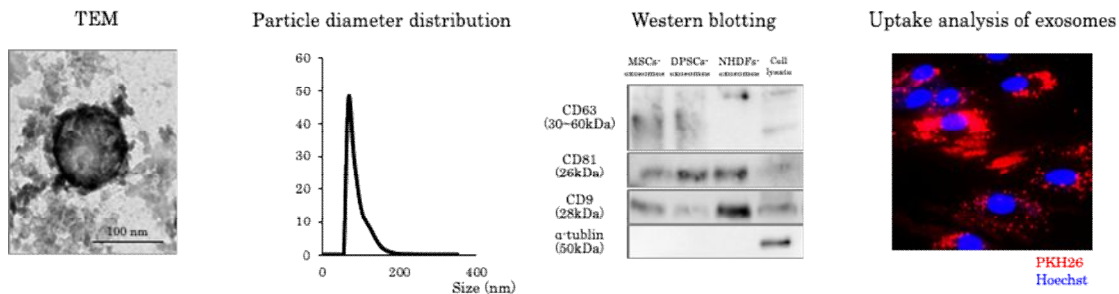
エクソソーム中のmiRNAを網羅的に解析し、特異的なmiRNAとその関連する遺伝子の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) エクソソームの単離

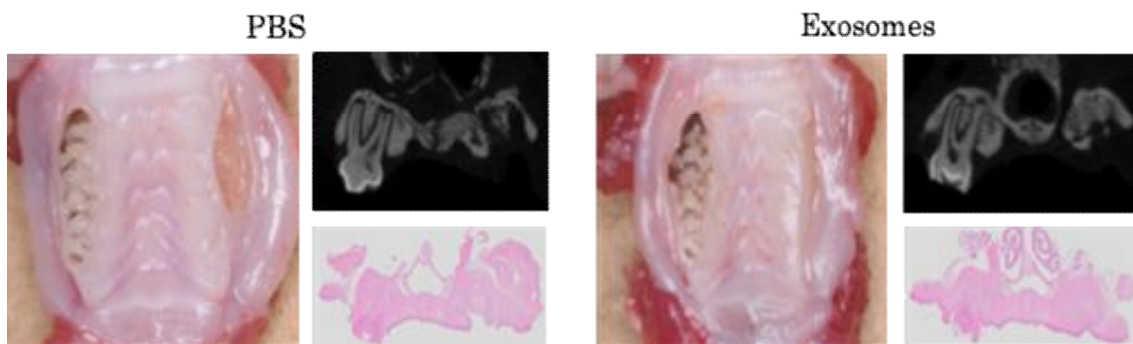
単離したエクソソームの粒径は約100nmであり、ウエスタンブロット法で特異的表面抗原であるCD63、CD81、CD9を検出した。またPKH26により染色したエクソソームが

細胞質内に取り込まれているのを確認した。



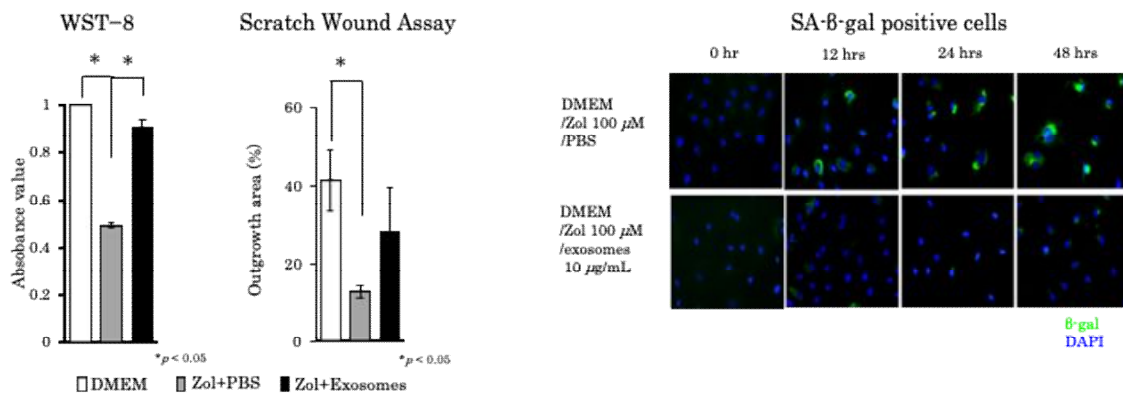
(2) BRONJ モデル動物を用いた検討

PBS を投与した場合、抜歯後 14 日において抜歯窩は上皮化せず、放射線学的および組織学的に治癒がみられなかった。一方、エクソソームの投与より抜歯後 14 日において抜歯窩は上皮化し、治癒を示すようになった。



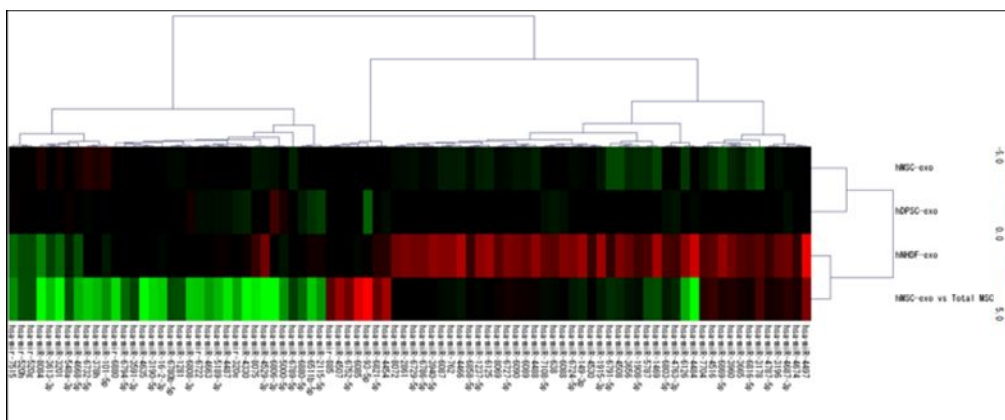
(3) BRONJ モデル細胞を用いた検討

ゾレドロン酸を添加することによりラット MSCs の細胞増殖能や細胞遊走能は低下し、老化細胞数は増加していた。一方、エクソソームの添加により細胞増殖能や細胞遊走能の低下を抑制した。また老化細胞数の減少に至った。



(4) 遺伝子解析

老化や炎症、血管新生に関与する miRNA が含まれていた。今後、その遺伝子の機能解析を実施する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Okabe K, Kaneko R, Kawai T, Mochizuki D, Tsuchiya S, Hibi H. Ophthalmoplegia considered to be Tolosa-Hunt syndrome: A case report. JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY MEDICINE AND PATHOLOGY 査読有 30: 461-465, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2018.04.001>

Tsuchiya S, Sugimoto K, Kamio H, Okabe K, Kuroda K, Okido M, Hibi H. Kaempferol-immobilized titanium dioxide promotes formation of new bone: effects of loading methods on bone marrow stromal cell differentiation in vivo and in vitro. INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE 査読有 13: 1665-1676, 2018.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S150786>

Kano F, Ichimura N, Wakayama Y, Okabe K, Sakakura H, Hibi H. Third molar pericoronitis in neutropenia. IDCASES 査読有 13: e00419, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.idcr.2018.e00419>

〔学会発表〕(計 3 件)

Watanabe Junna, Sakai Kiyoshi, Okabe Kazuto, Sugimura Yukiko, Sakaguchi Kohei, Tsuruta Takeshi, Hibi Hideharu. Effects of Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes for Rat BRONJ Model. The 96th General Session and exhibition of the IADR, 2018.

渡邊純奈, 酒井 陽, 岡部一登, 若山有紀子, 坂口晃平, 鶴田剛士, 日比英晴. ビスホスホネート関連顎骨壊死に対する間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた治療の可能性. 第 72 回日本口腔科学会学術集会, 2018.

渡邊純奈, 酒井陽, 岡部一登, 梶村有紀子, 坂口晃平, 鶴田剛士, 中道瑛司, 日比英晴. 間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた BRONJ に対する治療の有効性の検討. 第 63 回日本口腔外科学会総会・学術集会, 2018.

〔図書〕(計 1 件)

Okabe K, Kaneko R, Usami K, Kawai T, Kano F, Hibi H. Evaluation of the effect of polaprezinc against oral mucositis associated with concurrent chemoradiotherapy. Oral Science in Japan 9-10, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(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。