

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20510

研究課題名(和文) 血管内皮前駆細胞移植によるBRONJの病因解明と標的分子同定による新治療法の開発

研究課題名(英文) Effect of QQ-MNC transplantation on BRONJ-like lesions in mice

研究代表者

中島 和慶 (NAKAJIMA, Kazunori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：40707246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビスフォスフォネート製剤使用患者の一部で、歯科治療後の顎骨壊死が報告されているが、現在でも原因は不明で治療法も開発されていない。一方近年、骨髄中には血管内皮前駆細胞が存在し、この細胞には抗炎症作用や血管新生作用があることが報告されている。この細胞群の効率的な採取法も開発され、得られた細胞をQQ-MNCと呼ぶが、本研究では、マウス顎骨壊死モデルにQQ-MNCを移植して効果を調べた。その結果、QQ-MNC移植は、抜歯部硬組織ではなく、軟組織治癒を促進して顎骨壊死を緩解することが明らかとなった。以上から、QQ-MNCはビスフォスフォネート製剤で起こる顎骨壊死の治療法になり得ることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) occurred in patients taking oral and/or intravenous bisphosphonates. However, the exact mechanisms of BRONJ are not clear. Moreover, definitive treatment strategies of BRONJ have not been developed. On the other hand, it has been demonstrated that epithelial progenitor cells (EPCs) exist in bone marrow. They play important roles in anti-inflammatory and angiogenesis effects on injured tissues. Recently, effective culture method of EPCs has been developed, called as QQ-MNCs. The aim of this study was to investigate the effects of QQ-MNC transplantation on BRONJ-like lesions in mice. QQ-MNC transplantation positively affected soft tissue wound healing of tooth extraction sockets by upregulating angiogenesis, promoting collagen production and decreasing infiltration of polymorphonuclear cells. Therefore, QQ-MNC transplantation would become a treatment method of BRONJ.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：ビスフォスフォネート製剤 QQ-MNC BRONJ 細胞治療 創傷治癒 治療法

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート (BP) 製剤は、骨粗鬆症の治療や悪性腫瘍患者の骨転移ならびに多発性骨髄腫の患者に必要な薬剤であるが、BP 製剤使用患者の一部に顎骨壊死 (Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw: BRONJ) が起こることが報告されて以来 10 年以上が経過した。ところが BRONJ の病因は現在でも不明であり、確定的な治療方法もない。BRONJ は発現頻度こそ低いものの、重症化すると補綴治療が不可能となり患者の口腔内 QOL が著しく低下することから、BRONJ の病因解明と治療方法の開発は急務であると考えられる。

一方、骨髄に由来する**血管内皮前駆細胞** (Epithelial Progenitor Cell: EPC) は、末梢血液中の単核球成分の一部 (CD34 陽性分画) として存在し、血管新生や胎生期だけに存在すると考えられてきた血管の発生が、成体で行われる際に必要不可欠であることが証明された (Asahara T et al. *Science*. 1997)。近年ではこのような作用を利用して、**重症の冠動脈疾患患者や下肢虚血疾患患者に対して EPC の移植治療に関する臨床試験が行われており** (東海大学・治験番号 TRIAS 0704)、**ヒトでも一定の効果が得られる**ことが分かった (Kawamoto A et al. *Stem Cells*. 2009)。さらに近年、難治性骨折モデルへ EPC を移植した動物実験では、骨折部周囲の抗炎症作用と骨形成の活性化による骨折治癒の促進が証明されており、EPC が血管新生・再生効果を有するだけでなく、抗炎症作用や硬組織再生に関与する可能性までもが報告され始めた (Fukui T et al. *Cell Transplant*. 2015)。

従来 EPC は、骨髄からフローサイトメトリーにより分離した CD34 陽性分画を基礎研究

や臨床試験に用いてきたが、操作の煩雑性と特殊装置の必要性がこの方法の大きな欠点であった。ところが 2014 年に Masuda H らは、末梢血から採取した単核球細胞を 5 種類の成長因子を含む特殊な条件下で培養すると、CD34 陽性細胞に富む EPC を含む細胞群 (Quality & Quantity-controlled Mononuclear Cells: **QQ-MNC**) が血管形成能を獲得することを報告した (Masuda H et al. *J Am Heart Assoc*. 2014)。この方法は、特殊な装置を使用せずに末梢血液から極めて簡単に QQ-MNC を樹立でき、従来の欠点を補いつつ良質な QQ-MNC を採取できるという利点を有している。先行研究の多くが細胞供給源を骨髄に求めていることから Masuda H らの方法は極めて臨床的価値が高く、歯科領域への応用が十分に期待できると考えられたため、今回、この方法に着目した。そして、当該講座がすでに所有する BP 製剤関連マウス ONJ モデル (Kuroshima S et al. *Bone*. 2013) に対して QQ-MNC の移植治療を行えば、抜歯窩における炎症を抑制して軟組織治癒を促進し、さらには、骨芽細胞や破骨細胞を活性化して硬組織治癒を促進すると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、顎骨壊死に対して EPC が微小環境内で果たす細胞機能動態を明らかにすることで ONJ の病態の発症機序を解明し、臨床応用可能な新規治療方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) QQ-MNC の培養・樹立

QQ-MNC の樹立方法は、Asahara T らの報告に従った (Asahara T et al. *Science*. 1997)。

すなわち，8~12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスより末梢血を採取し，5 つの成長因子（SCF，IL-6，TPO，VEGF，Flt3-ligand）の存在下で 5 日間にわたって無血清培養を行い，接着細胞を QQ-MNC として樹立し，移植実験に使用した．なお，良質な QQ-MNC の樹立には新鮮な末梢血と，他の細胞混入がないことが必要不可欠である．

(2) マウス BRONJ 様病態モデルの作製

当初は，当講座が所有していたマウス BRONJ 様モデル（抗癌剤であるメルファランと注射 BP 製剤であるゾレドロネートの併用に抜歯を組み合わせて作製，Kuroshima S et al. *Bone*. 2013）を使用していたが，BRONJ 様病態の発現頻度がそれほど高くなかったため，新たに当講座が開発した高頻度発現型マウス BRONJ 様病態モデルを使用した．すなわち，抗癌剤であるシクロフォスファミドとゾレドロネートの併用投与に抜歯を組み合わせて作製した（Akita Y & Nakajima K et al. *J Bone Miner Metab.* 2017, Kuroshima S & Nakajima K et al. *J Bone Miner Res.* 2018）．

(3) 高頻度発現型マウス BRONJ 様病態モデルへの QQ-MNC 移植

薬剤投与 3 週間後に抜歯を行い，同時に尾静脈を介して QQ-MNC をゆっくりと注入移植した．抜歯 / 移植 2 週間後にマウスを屠殺し，肉眼的所見と口腔内写真（口腔内カメラを使用）を用いた創部面積の定量解析，マイクロ CT 撮像による 3 次元的構造解析，各種組織染色 [ヘマトキシリンエオジン染色，トライクローム染色，酒石酸抵抗性フォスファターゼ（TRAP）染色] による組織形態学的解析，ならびに各種免疫染色による免疫組織

化学的解析を行った．

4. 研究成果

シクロフォスファミドとゾレドロネートの併用投与に抜歯を組み合わせると，抜歯後 2 週間後でも 4 週間でも創部が開放し，コントロール群（生理食塩水投与群）と比較して抜歯窩治癒は大きく遅延していた．

抜歯後 2 週間で軟組織治癒を見てみると，シクロフォスファミドとゾレドロネート併用投与群は，ゾレドロネート単独投与群，シクロフォスファミドの単独投与群，ならびにコントロール群と比較して，コラーゲン線維の産生が有意に低下し，多形核白血球の浸潤が有意に増加していた．

一方，硬組織治癒に関しては，抜歯窩内部には新生骨はほとんど認められず，壊死骨が大量に存在していた．

以上から，本研究で用いたモデルマウスは，確かに BRONJ 様病態を呈していることが確認された．

次いでこのモデルに QQ-MNC を尾静脈から注入移植し，各種解析を行った．その結果，抜歯 2 週間後では，QQ-MNC の移植は抜歯窩内の新生骨の増加や壊死骨の減少を誘発することなく，骨性治癒は遅延していた．一方，抜歯部軟組織を検索すると，QQ-MNC の移植は，抜歯部結合組織におけるコラーゲン線維の産生と血管数を有意に増大させ，多形核白血球の浸潤を有意に抑制していた．さらに炎症性マクロファージ M1 と組織修復性マクロファージ M2 の動態を変化させ，BRONJ 様病態で認められる M2/M1 比の減少を有意に回復することが分かった（M2 の割合を有意に増加させた）．さらに QQ-MNC 移植は，抜歯部軟組織における TNF- α や IL-6 といった炎

症性サイトカインの産生を減少し, TGF- β といった抗炎症性サイトカインを増加させていたことから, 総合的に判断して, QQ-MNC 移植は抜歯部の軟組織治癒を促進することが証明された.

以上から, QQ-MNC 移植はマウス BRONJ 様病態に効果を有し, 硬組織ではなく軟組織治癒を促進することで創部閉鎖を誘発していたことから, ヒト BRONJ においても, 培養方法や投与方法, ならびに倫理的問題が解決できれば, 臨床研究を行える可能性が示唆された.

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 2 件)

1. Kuroshima S^{†*}, Sasaki M[†], Nakajima K, Tamaki S, Hayano H, Sawase T. Transplantation of Non-cultured Stromal Vascular Fraction Cells of Adipose Tissue Ameliorates Osteonecrosis of the Jaw-like Lesions in Mice. *J Bone Miner Res.* 33 (1) : 154-166. 2018. doi: 10.1002/jbmr.3292.(査読有)
2. Akita Y[†], Kuroshima S^{†*}, Nakajima K, Hayano H, Kanai R, Sasaki M, Sawase T. Effect of anti-angiogenesis induced by chemotherapeutic monotherapy, chemotherapeutic/bisphosphonate combination therapy and anti-VEGFA mAb therapy on tooth extraction socket healing in mice. *J Bone Miner Metab.* 2017. doi: 10.1007/s00774-017-0872-1. [Epub ahead of print] (査読有)

[学会発表](計 13 件)

1. 早野博紀, 黒嶋伸一郎, 中島和慶, 澤瀬 隆. 骨吸収抑制薬の投与がマウス抜歯窩

治癒に与える影響. 公益社団法人日本口腔インプラント学会第 35 回九州支部学術大会 プログラム・抄録集. p58. 2018 年 1 月 27 - 28 日 (27 日発表). 北九州国際会議場 (博多).

2. 黒嶋伸一郎, 中島和慶, 玉城沙貴, 早野博紀, 佐々木宗輝, 澤瀬 隆. 抜歯部軟組織の血管新生抑制は薬剤関連顎骨壊死の主原因ではない. 公益社団法人日本口腔インプラント学会 第 47 回学術大会プログラム・抄録集 日本口腔インプラント学会誌・第 30 巻特別号. P354. 2017 年 9 月 22 - 24 日 (24 日発表). 仙台サンブラザ, 仙台国際センター (宮城)
3. 黒嶋伸一郎, 佐々木宗輝, 中島和慶, 玉城沙貴, 早野博紀, 澤瀬 隆. 薬剤関連顎骨壊死の基礎・臨床研究の現状とその予防・治療戦略. アップデートシンポジウム. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会. プログラム抄録集. P130. 2017 年 9 月 16 - 18 日 (16 日発表). 松本歯科大学 (松本, 長野)
4. 黒嶋伸一郎, 中島和慶, 佐々木宗輝, 玉城沙貴, 早野博紀, 澤瀬 隆. 抜歯部軟組織の血管新生抑制は薬剤関連顎骨壊死の主原因とはならない. 公益社団法人日本補綴歯科学会 第 126 回学術大会. 公益社団法人日本補綴歯科学会 第 126 回学術大会プログラム・抄録集 日本補綴歯科学会誌・9 巻 126 回特別号. p55. 2017 年 7 月 1 - 2 日 (2 日発表). パシフィコ横浜 (横浜)
5. Kuroshima S, Sasaki M, Nakajima K, Tamaki S, Sawase T. Anti-angiogenesis in tooth extraction sockets is not the main cause of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like lesions in mice. Joint meeting of the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society and the International Federation of Musculoskeletal Research

- Societies. ANZBMS-IFMRS in conjunction with JSBMR. 06/17-21/2017 (19 日発表) (Brisbane, Queensland Australia). Program. p41. Presentation number #172.
6. **Nakajima K**, Kuroshima S, Sasaki M, I Y, Sumita Y, Asahina I, Sawase T. QQ-MNCs transplantation promotes impaired oral wound healing in mice. 95th General Session & Exhibition of the IADR. 03/22-25/2017 (23 日発表) (San Francisco, Calif, USA). Scientific Program. p163. Presentation number #1442.
 7. Kuroshima S, Sasaki M, **Nakajima K**, Sawase T. ADRC transplantation rescues impaired tooth extraction healing in mice. 95th General Session & Exhibition of the IADR. 03/22-25/2017 (23 日発表) (San Francisco, Calif, USA). Scientific Program. p165. Presentation number #1497.
 8. 秋田ヨリ, 黒嶋伸一郎, **中島和慶**, 佐々木宗輝, 右藤友督, 澤瀬 隆. 抗癌剤とビスフォスフォネート製剤の併用で起こる抜歯窩治癒不全の病因探索. 公益社団法人日本口腔インプラント学会第 34 回九州支部学術大会. 公益社団法人日本口腔インプラント学会第 34 回九州支部学術大会プログラム・抄録集. p70. 2017 年 1 月 21 日~1 月 22 日 (22 日発表). 熊本市民会館 (熊本).
 9. 黒嶋伸一郎, 佐々木宗輝, **中島和慶**, 澤瀬 隆. 抜歯窩治癒不全の硬軟組織治癒を促進する脂肪組織由来幹細胞移植が骨髄の微小環境に与える影響. 第 46 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会. 第 29 巻特別号. p61. 2016 年 9 月 16 日~9 月 18 日 (18 日発表). 名古屋国際会議場 (名古屋).
 10. **中島和慶**, 黒嶋伸一郎, 佐々木宗輝, 井隆司, 住田吉慶, 朝比奈 泉, 澤瀬 隆. 血管内皮前駆細胞を主体とする培養濃縮細胞群移植によるビスフォスフォネート製剤関連抜歯窩治癒不全に対する治療効果の検証. 第 46 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会. 第 29 巻特別号 p163. 2016 年 9 月 16 日~9 月 18 日 (17 日発表). 名古屋国際会議場 (名古屋).
 11. Kuroshima S, Sasaki M, **Nakajima K**, Sawase T. Effect of transplantation of adipose-derived regenerative cells on impaired tooth extraction healing and bone marrow microenvironment. The Joint Annual Scientific Meetings 2016 of the Endocrine Society of Australia, the Society for Reproductive Biology and the Australia and New Zealand Bone & Mineral Society. 08/21-08/24/2016 (Gold Coast, QLD, Australia). Scientific Program. p5. Presentation number #318. 22 日発表.
 12. 黒嶋伸一郎, 佐々木宗輝, **中島和慶**, 右藤友督, 澤瀬 隆. 脂肪組織由来細胞移植がビスフォスフォネート製剤関連抜歯窩治癒不全に与える影響. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会. プログラム抄録集. p224. 2016 年 7 月 20 - 23 日 (23 日発表). 大阪国際会議場 (大阪).
 13. 黒嶋伸一郎, 佐々木宗輝, **中島和慶**, 青木ヨリ, 澤瀬 隆. 脂肪組織由来幹細胞による薬剤関連抜歯窩治癒不全への硬軟組織治癒促進効果. 公益社団法人日本補綴歯科学会 第 125 回学術大会プログラム・抄録集 日本補綴歯科学会誌・8 巻 125 回特別号. p43. 2016 年 7 月 8 - 10 日 (9 日発表). 石川県立音楽堂, ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川).
- 〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

中島 和慶 (NAKAZIMA, Kazunori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・

助教

研究者番号：40707246