

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20562

研究課題名(和文) 骨髄由来間葉系幹細胞の局所投与によるBRONJに対する新規治療法の効果検証

研究課題名(英文) Verification of the effect of a novel therapy against BRONJ using local application of bone-marrow derived mesenchymal stem cells

研究代表者

齋藤 太郎 (Saito, Taro)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40758364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は骨髄由来間葉系幹細胞(BMMSC)移植治療の臨床応用実現に向け、ビスホスホネート系薬剤(BP)服用患者の抜歯後に発症する顎骨壊死(BRONJ)に対するBMMSC局所投与の治療効果検証であった。しかしながら、ラットを用いたBRONJ症状を呈する動物モデルの作成が不成功であったことと、BMMSCの局所投与に用いる予定だった足場材が結果的に手に入らなかったために、ほとんど研究の進展がないまま課題終了となった。しかし、BMMSCの細胞機能強化法として低酸素プレコンディショニング、およびヒストンジアセチラーゼ阻害剤とによる“骨再生プライミング”処理の細胞加工製品への有用性のみ確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRONJに対しての適切な治療法の確立や有効な治療薬の開発に至っていない本研究では、BP関連顎骨壊死病変部の組織再生を促す機能的治療の検証を行う予定であったが、成果が得られない結果に終わった。最近、わが国でもヒトBMMSC製品の製造販売承認が得られたことから、BMMSCの細胞移植治療が加速するのは確実である。BRONJが顎骨特異的に発症するメカニズムは不明だが、本研究を顎骨由来BMMSCで行うと、顎骨特異的発症メカニズム解明の糸口が見つかる可能性がある。わずかではあるが、“骨再生プライミング”という観点で研究を進め、BRONJで苦しんでいる世界中の患者様のQOL向上に寄与したい。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to validate the effect of a novel therapy against BRONJ using local application of bone-marrow derived mesenchymal stem cells (BMMSC) for future clinical applications into human. The BMMSCs were seeded into a few biodegradable scaffolds, and the BMMSCs repopulated in these constructs were planned to transplant into the extraction socket of the BRONJ animal model using rat to examine the therapeutic effects by histopathological study. However, this study failed because the animal model was not able to establish and one of the scaffolds were not obtained. Nonetheless, this study confirmed the efficacy of the “priming of bone regeneration” using HDACi and hypoxic culture to enhance the BMMSC functions for developing tissue-engineered constructs.

研究分野：口腔外科

キーワード：ビスホスホネート系薬剤関連顎骨壊死 骨髄由来間葉系幹細胞 局所投与 足場材 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

ビスホスホネート (BP) 関連顎骨壊死 (BRONJ) は BP の副作用として、投与時に顎骨に関連する観血的処置を受けた患者で発症すると考えられている。BRONJ の発症機転として、破骨細胞をターゲットとした骨吸収抑制・顎骨の生理的リモデリング速度・局所的な口腔細菌感染病態・血管新生抑制・上皮細胞増殖抑制など多くの要因が複合的に絡み合って引き起こされると言われているが、その病態は未だ不明な点が多く、明確な治療法や予防法がない。とはいうものの、BRONJ はようやく世界的に認知され、本邦でも 2008 年に日本口腔外科学会が予防・診断・治療に関するガイドラインを策定した。それによると、症状に応じて“うがい”“抗生物質投与”の保存的療法、および腐骨の“外科的切除”が記載されているが、いずれも原因療法となっていない。最近では口腔外科学会を中心として、歯科関連の各学会と骨の生物学を専門とする学会や研究者によって、BRONJ の検討委員会が発足し、この病態に関する正確な化学的情報を収集し、予防策や対応策について統一見解を提言する動きが実施されている。

申請者は、骨のない胃粘膜における潰瘍形成も BRONJ の一症状であることから、BP による口腔粘膜上皮細胞の治癒能力の低下が顎骨壊死に先行するという仮説を立て、創傷遅延メカニズムは Smad シグナル経路の障害による TGF- β 1 レセプターの発現低下による上皮基底膜の形成不全であることを自著で報告した。一方、BP による口腔粘膜線維芽細胞増殖抑制は、BP のメバロン酸代謝経路阻害作用により、その代謝産物であるゲラニルゲラニオール (GGOH) を補充することで細胞増殖能が回復するとの報告があったが、申請者の実験で GGOH は口腔粘膜上皮細胞には奏功しなかった。一時、GGOH が BRONJ の有効な治療薬になり得ると期待されたが、開発に至っていない。最近の BRONJ 治療薬に関する話題としては、テリパラチド (副甲状腺ホルモン断片 1-34) の長期投与が BRONJ に有効との報告があるが、症例報告レベルで、近い将来に承認薬として認められるかは不透明である。以上の経緯から申請者は、BRONJ の病態に対して薬剤に頼らない機能的治療法の確立につながる研究を行いたいと考え、細胞移植治療に用いる再生医療等製品開発の足がかりを作る目的で本申請を着想するに至った。

そのためにまず、BMMSC を利用するアプローチに着目した。BMMSC は局所麻酔下で、比較的低侵襲な術式で採取可能というのが定説である。BMMSC は線維芽細胞様の形態をもってシャーレ上に付着増殖するので、培養方法はほぼ確立しており、現在、再生医療の現場で臨床応用のための細胞ソースとして最も用いられている。BMMSC 自身は骨や軟骨に分化しやすいが、血管への分化能や、その分化をサポートするサイトカインも分泌することも明らかとなり、この点からも BMMSC 細胞移植は種々の疾患治療に有用であることが期待でき、近年、動物を用いて BRONJ 治療の可能性が模索されている。そのアプローチ法としては下記の 3 つが報告されている。

- (1) 経静脈的全身投与 (BMMSC 細胞移植)
- (2) BMMSC 培養上清の静注
- (3) 細胞シート局所投

また、局所投与による細胞移植を、実際の患者に対して行った症例報告が 1 例ある。

BMMSC の細胞治療効果を直接的に引き出すために、本申請では 3 次元足場材料に播種して移植する局所投与によるアプローチを計画した。ただ、懸念される問題として、BRONJ 患者由来の BMMSC では、投与されている BP が BMMSC の効果を減弱している可能性がある。その懸念を克服するために、細胞機能強化法として申請者独自の 2 種類の“骨再生プライミング”を考案した。プライミングとは、先行する刺激 (プライマー) の処理が、後の刺激 (ターゲット) の処理を促進する効果のことで、本申請では骨再生をターゲットとするプライマーとしてまず、“低酸素刺激”すなわち移植前に BMMSC に対し低酸素プレコンディショニングを行う予定にしていた。低酸素プレコンディショニングは BMMSC の細胞機能を増強させ、細胞移植治療の効果を向上させる簡便かつ有用な方法であることが血管再生治療で証明されている (Saito, Izumi et al., 2018)。2 つ目の骨再生プライミングとしては、低酸素プレコンディショニングと同時に、培地にヒストンジアセチラーゼ阻害剤

(HDACi)を添加する。BMMSCを足場材に播種してBRONJモデルラットの局所投与という新規治療法の効果検証を実施する上で、BPモデルラットのBMMSCに対する“骨再生プライミング”に対する相乗効果を期待している。

2. 研究の目的

“BRONJに対する機能的治療法の開発”に向け、本研究ではBMMSCを利用した3次元細胞加工製品を作成後、顎骨壊死様症状を呈す抜歯窩へ移植（局所投与）し、組織学的観察による治療効果を評価。かつ、BP投与ラット由来BMMSCの細胞機能強化のための“骨再生プライミング”効果も検討し、BMMSC細胞加工製品の実用化促進に向け基礎的データを得ることを目的とする。

過去の報告に準じ、ラットにBP薬剤とステロイドを週3回4週間投与期間中の2週目に抜歯を行い、顎骨壊死実験モデルラットを作成する。本実験の目的達成のため、2つの研究目標を掲げる。

(1)ラットのBMMSCを性質の異なる3種類の生体足場材に播種して細胞加工製品を作成し特性を分析。そして、BRONJ症状を呈するラットの抜歯窩へ移植し、BMMSCの局所投与自体による創傷治癒促進、骨再生能力について組織学的な観察・評価を行い、最も治癒効果が高い足場材を選択する。

(2)決定した足場材を使用し、さらに、細胞機能強化のため低酸素プレコンディショニングに、HDACiを併用した“骨再生プライミング”を行った治療法の比較検討も行う。

3. 研究の方法

(1)ラット骨髄由来細胞の分離と細胞培養

4週齢雄性Fisher系ラット(Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan)を4%抱水クロラルの腹腔内投与による深麻酔下で頸椎脱臼した後、両側大腿骨を採取した。大腿骨周囲の軟組織を可及的に除去した後、大腿骨両端を骨幹端部で切断し、骨幹部骨髄腔内に21G針(TERUMO, Tokyo, Japan)をつけたシリンジを挿入し、10mlの基本培地をフラッシュアウトして骨髄液を回収した。

基本培地は10%ウシ胎児血清(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、1%antibiotics-antimycotics (Thermo Fisher Scientific)含有alpha-Minimal Essential Medium (Thermo Fisher Scientific) (以下、10%FBS含有MEM)を使用した。回収した大腿骨2本分の骨髄液はT-150細胞培養フラスコ(Corning, NY, USA)に播種し、血球成分除去のため24時間後に初回の培地交換を行った。

(2)低酸素環境培養

低酸素チャンバー(Billups-Rothenburg, Del Mar, CA, USA)内に細胞培養ディッシュを入れ、各酸素濃度の混合ガスを注入した。使用する培地は、培地中のガス交換を目的に実験前日より低酸素チャンバー内でプレインキュベーションしたものを使用した。

(3)局所投与のためのBMMSCを播種する足場材

当初の計画では、K社が製造販売しているKという足場材、多くの会社から販売されているTCPゼラチンスポンジ、そして本学で開発されるはずであったハイドロキシアパタイトアルジネートゲルを使用する予定にし、各種解析を実施したのちに、もっとも局所投与に有効と思われる1つの足場材を動物実験に使用する予定にしていた。これらのバイオマテリアルは、MSCと親和性が高いと報告されており、抜歯かへの細胞局所投与に有効と考えられる。しかし、ハイドロキシアパタイトアルジネートゲルは課題期間中に手に入ることがなく、他の2つについても、細胞の播種方法の最適化までいかなかった。

(4)BRONJのラット動物モデルの作成

報告されている方法を参考にラットBRONJモデル作成を試みるも、達成できなかった。原因は究明できなかった。

4. 研究成果

まず、本課題の予備実験として実施したHDACiを併用したBMMSCをTCPゼラチンスポンジに播種し、ラット頭蓋骨に自然治癒不可能なサイズの骨欠損を作成し、HDACiで前処理したBMMSC群と未処理群で、コラーゲン担体をキャリアとして移植した予備実験の結果

は、術後 μ CT 像より、HDACi 前処理群は未処理群に比較し、初期の骨形成が亢進するという、健常は母床組織におけるものであるが、予備データを示した。また、低酸素プレコンディショニングでは、骨芽細胞分化に必須の転写因子である Runx2 は低酸素プレコンディショニング群で mRNA レベルの発現は低下した一方、血管新生因子である VEGFA は低酸素プレコンディショニングにより、発現が上昇した。これは、BRONJ 病変部において、骨形成よりも、血管形成を誘発するであろう機転が想像でき、病変の治癒に効果をもたらす可能性を見出した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：泉 健次

ローマ字氏名：Kenji Izumi

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。