

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11822

研究課題名（和文）マクロファージをターゲットにしたBRONJ発症機序の解明と治療法の開発

研究課題名（英文）BRONJ pathogenesis and treatment method targeting macrophages

研究代表者

佐藤 明（Sato, Akira）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：90271684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ビスフォスフォネート（Bisphosphonate：BP）製剤は、骨粗鬆症および癌の骨転移に伴う骨関連事象の予防などに広く使用されている骨吸収抑制剤であるが、その重大な副作用のひとつとして、BP関連顎骨壊死（Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw：BRONJ）が問題視されている。しかし、BRONJは発症機序が明らかになっていないため、治療法に関しても統一した見解を得ていない。

本研究では、BRONJ発症機序について、免疫細胞がどのようにその発症に関わっているか検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生後8週齢のC57BL/6J雌マウスに対して、第3世代BP製剤であるゾレドロン酸水和物（Zoledronic Acid Hydrate：ZOL）と抗悪性腫瘍薬であるメルファラン（Melphalan：MEL）を投与することによりBRONJ様マウスを作製した。

ZOLおよびMEL投与群では典型的なBRONJの病理所見が確認されたが、単独投与群ではBRONJ様症状は認められないことより、BRONJ様症状の発症にはMELによる薬理作用（骨髄機能抑制）による免疫応答の不均衡が関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Bisphosphonate preparations are widely used bone resorption inhibitors, such as for the prevention of bone-related events associated with osteoporosis and bone metastases of cancers. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) has been regarded as one of its significant side effects. However, BRONJ do not have a uniform view on treatment modalities because the pathogenesis is not clear. In this study, we investigated how macrophages are involved in the development of BRONJ on the pathogenesis of BRONJ.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯学 ビスフォスフォネート製剤 顎骨壊死 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

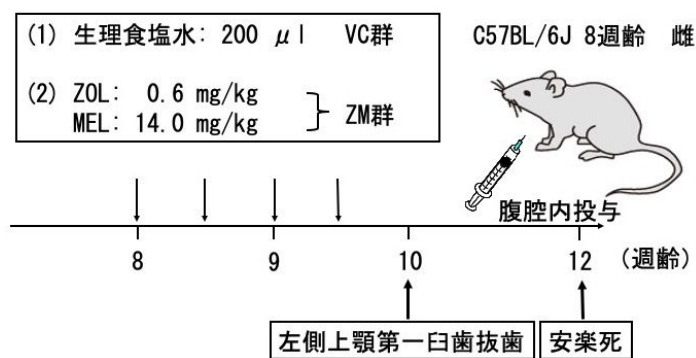
骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート(BP)剤は強力な骨吸収抑制活性を持ち、骨粗鬆症、乳癌や前立腺癌などによる腫瘍性骨破壊、骨パジェット病などの骨吸収の亢進した骨病態に対して治療薬として広く使用されている薬剤である。日本骨粗鬆症学会によると、国内の骨粗鬆症患者数は推定で1100万人ともいわれており、多数の患者が骨吸収抑制剤を服用していることから、顎骨壊死の発症は、単に口腔領域における重篤な疾患にとどまらず、社会的に大きな問題となっている。BRONJ最初の発表以来、多くの症例報告や基礎研究の蓄積により、顎骨壊死の病態に対する多くの知識が明らかになってきたが、未だに発症機序は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

BP剤は、リン酸カルシウム結晶と親和性が高いため特異的に骨のみに沈着、破骨細胞より分泌される酸により骨から遊離、破骨細胞の内部へと取り込まれる。そのため、BP剤は、破骨細胞以外の細胞では取り込まれないと考えられていた。しかし、BP剤は、破骨細胞の他に免疫細胞、特にマクロファージに感作することが報告されている。本申請課題の目的は、BP剤と免疫細胞との直接の相互作用に関して、マクロファージに焦点を絞りBRONJ発症の原因を明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験には第3世代のBP剤であるZometa(ZOL)とメルファラン(MEL)の腹腔内投与を行い、一週間後に上顎臼歯の抜歯を行った(下図)。

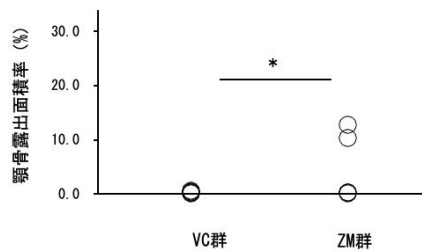


抜歯4週間後に屠殺を行った。抜歯した上顎骨の肉眼的所見、軟X写真、CT画像ならびに病理組織学的所見の検討を行った。

また、抹消血、脾臓細胞、腹腔内細胞に対してFACS解析を行い、および免疫細胞およびマクロファージの計測を行い、関連性について検討した。

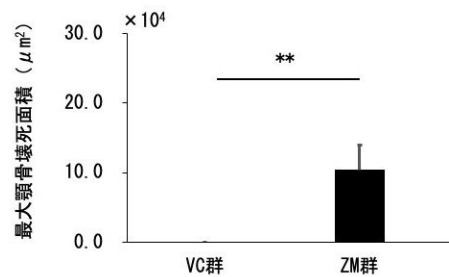
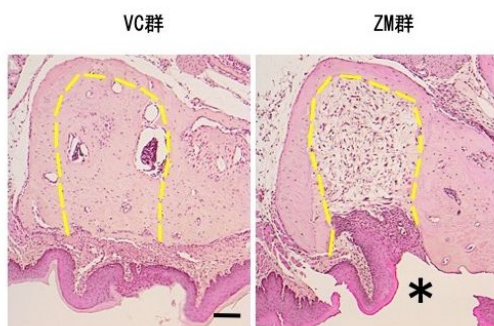
4. 研究成果

肉眼的観察では、VC 群はすべてのマウスにおいて、抜歯窩の口腔粘膜上皮での閉鎖を確認した。一方、ZM 群では 40%のマウスにおいて、抜歯窩は口腔粘膜上皮で閉鎖されず、顎骨露出を認めた。



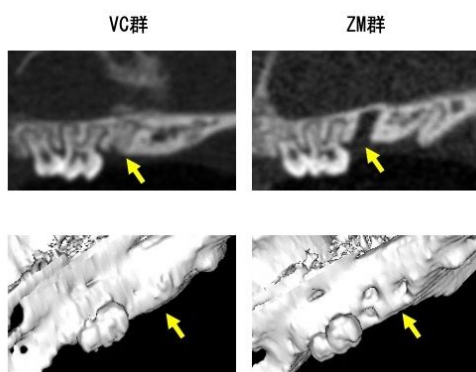
右側第一臼歯咬合面観面積を 100%として顎骨露出面積率を算定した。

HE 染色。VC 群ではすべてのマウスの抜歯窩（黄色破線）は、骨組織で満たされていた。一方、ZM 群では、上皮が閉鎖していたマウスも含め全てのマウスの抜歯窩には、骨組織の添加はみられず、類上皮細胞、マクロファージ、組織球、巨細胞などの炎症細胞を含んだ幼若な肉芽組織とで埋まっていた。

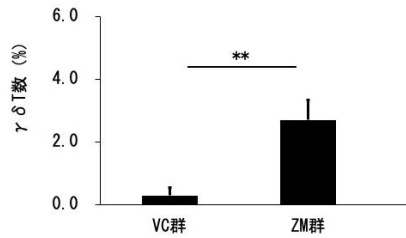


5 個以上隣接して骨小腔内の骨細胞が喪失している範囲を顎骨壊死部と判定し、切片上で最大顎骨壊死面積とし計測した。

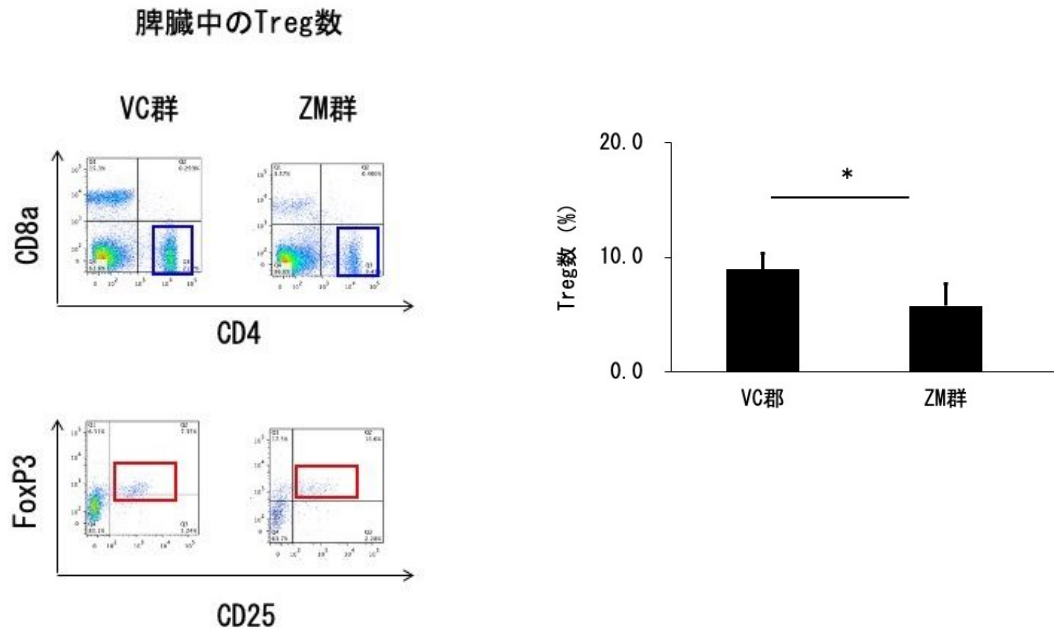
μCT 撮影による断層画像および 3D 画像にて、VC 群の抜歯窩は新生骨で満たされていたが、ZM 群では新生骨の添加は認めず、抜歯窩が残存した状態であった。



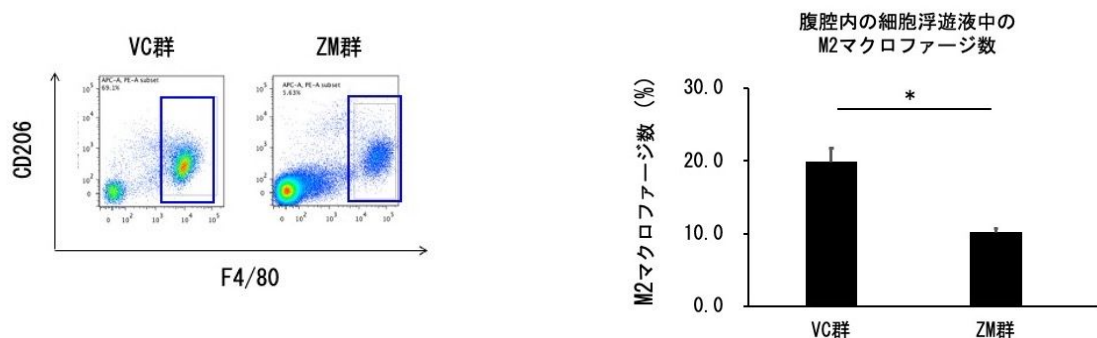
末梢血での T 細胞 (T) について、リンパ球区画における CD3 および TCR ダブルポジティブの細胞数を割合で示した。VC 群では $0.3 \pm 0.3\%$ であったのに対して、ZM 群では $2.7 \pm 0.6\%$ と有意に増加していた。



脾臓細胞での抑制性T細胞 (Treg) について、CD4 陽性細胞区画における CD25 および Foxp3 ダブルポジティブの細胞数を割合で示した。VC 群では $9.0 \pm 1.4\%$ であったのに対して、ZM 群では $5.8 \pm 1.9\%$ と有意差は認められなかったが、減少していた。



腹腔内の滲出細胞浮遊液でのM2マクロファージについて、マクロファージ区画における F4/80 および CD206 ダブルポジティブの細胞数を割合で示した。VC 群では $20.0 \pm 1.8\%$ であったのに対して、ZM 群では $10.2 \pm 0.4\%$ と有意に減少していた。



本研究において ZM 群のみに顎骨露出という典型的な BRONJ 様症状が発現した事象は、Treg の減少と T の増加という双方の作用が強く関わっているものと推測される。つまり、ZOL の影響で T が増加し、その状況で抜歯を行ったことにより、T による過剰な免疫反応が亢進、かつ、活性化した T を抑制する Treg が減弱しているため、制御を失った T によって抜歯窩周囲の正常な骨組織が傷害を受け、BRONJ 様症状が引き起こされたものと考えられる。

マクロファージは自然免疫において中心的な役割を果たしているが、疾患の発症に関わるさ

さまざまなサブタイプのマクロファージが存在していることが明らかになっており、細菌やウイルス感染、アレルギー応答などの際に活性化する M1 マクロファージと、抗炎症・免疫抑制機能をもった M2 マクロファージに大別される。 M1 マクロファージは、多くの炎症性サイトカインを発現し Th1 型の免疫応答を誘導する。 M2 マクロファージは、抗炎症性メディエーターを産生して損傷反応の消退と組織修復を促進する。そこで、BRONJ マウスにおける M1 マクロファージと M2 マクロファージの比率について検証した。 VC 群では $20.0 \pm 1.8\%$ 、 ZM 群で $10.2 \pm 0.4\%$ であった。

M2 マクロファージは PGE_2 、 $\text{TGF-}\beta$ 、 IL-10 などのサイトカインを産生し、 Treg の浸潤を促すことが知られている。つまり、 ZM 群における BRONJ 様症状は、 M2 マクロファージの減少が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	南川 元 (Minamikawa Hazime) (70625607)	北海道大学・歯学研究院・助教 (10101)	