

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17181

研究課題名(和文)細胞シートによるBRONJの新規治療法の開発と次世代シーケンサーによる病態解明

研究課題名(英文) Novel treatment and clarifying pathophysiology of BRONJ using cell sheet engineering and next generation sequence

研究代表者

貝淵 信之 (Kaibuchi, Nobuyuki)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：50621330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：未だに治療法が明確になっていないビスホスホネートによる顎骨壊死(BRONJ)に対する新規の治療法として、間葉系幹細胞シートによる治療の検討を行った。これまでにラットによる実験で有効性の確認を行っていたが、本研究で臨床研究を目指したトランスレーショナルリサーチとしてビーグル犬を用いた実験を行い、ラット実験と同様の有効性を示した。また、BRONJの病態の解明も十分ではないため、本研究で患者から採取した歯肉由来間葉系幹細胞を次世代シーケンサーによる網羅的に遺伝子解析を行った。その結果については今後報告予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRONJは骨粗鬆症やがん患者にとって重大な懸念となっているが、明確な治療法が確立しているとは言えず、対応に苦慮している。治療戦略として、軽症例のうちに治癒を得ることが重要であるが、現在の治療のコンセンサスでは根本的な治療が得られる治療法は確立しているとは言えない。今回の研究で、間葉系幹細胞シートによるBRONJの治療は画期的な新規治療法となり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the use of mesenchymal stem cell sheets as a novel treatment for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ), for which there is still no clear treatment. We had previously confirmed the efficacy in experiments using rats. As a translational research aimed at the clinical study, we conducted an experiment using beagle dogs and showed the same efficacy as the rat experiment. In addition, since the pathogenesis of BRONJ is not fully understood, gingival-derived mesenchymal stem cells collected from patients were comprehensively analyzed for genes by next-generation sequencing. We will report the results in the future.

研究分野：口腔外科学、再生医学

キーワード：ビスホスホネート 顎骨壊死 デノスマブ 間葉系幹細胞 細胞シート 再生医療等製品 骨粗鬆症 骨転移

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ビスホスホネート(BP)は骨吸収抑制作用を有する薬剤であり、骨粗鬆症においては第一選択薬となっている。さらには癌領域においては骨転移予防や骨関連事象(SRE)の治療薬としてその有効性が確かめられている。しかし、2003年にビスホスホネート関連顎骨壊死(BRONJ)が初めて報告された後、世界中から相次いで報告され問題となっている。2015年に日本口腔外科学会が行った実態調査では本邦の患者数は4797名であった。欧米や日本の学会を中心に様々な提言が行われたものの、発症機序・予防法・処置法などは未だ不明である。多くの基礎研究や臨床研究から病因として、骨代謝の過抑制、血管新生障害、免疫機能障害、軟組織毒性、口腔細菌の感染、顎骨への外科的侵襲などが指摘されている (Ruggieroら *J Oral Maxillofac Surg* 2014)。また、CYP2C8のSNPなどの遺伝子変異が影響している可能性が指摘されているが (Sarasqueteら *Blood* 2008)、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析の報告は少ない (Kimら *PLoS ONE* 2015)。治療法に関しては、ステージ1、2において、学会の指針では洗浄と抗菌薬投与のみしか推奨されておらず、積極的な治療法は存在しない。現状の保存的治療ではステージの進行により難治化するケースが多く、患者の生活面への長期にわたる支障は大きい。また、ステージ3では顎骨区域切除などの手術が行われることがあるが、その手術による顎骨への侵襲の影響により再発する症例が多く見られる (Grazianiら *J Oral Maxillofac Surg* 2012)。

近年、MSCsの血管新生促進作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、免疫調整作用などの効果を期待し、経静脈投与による治療が動物実験で行われ、BRONJに有効であることが報告された。また、BP投与によってregulatory T細胞は減少し、IL17陽性ヘルパーT細胞は増加するが、MSCsの投与によってその影響を抑制できることが報告されている (菊入ら *J Bone Miner Res* 2010)。しかし、移植したMSCsのほとんどが患部に届かないだけでなく、肺塞栓などにより死に至る可能性や、癌細胞の増殖や転移を促す可能性も憂慮される (Cyranoskiら *Nature* 2010, Karnoubら *Nature* 2007)。我々の実験においても静脈投与ではMSCが患部に生着していないことを確認した (貝淵ら *Acta Biomater* 2016)。我々はこれらの問題点を克服しうる細胞移植法として「細胞シート工学」の応用が本疾患の治療に有効であると考えた。すなわち、シート状に加工された細胞シートは患部への移植が容易であり、拡散のリスクがきわめて低く、幹細胞を効率良く移植することが可能である。実際、様々な疾患に対してこの技術を用いた幹細胞移植の臨床応用がすでに実施され安全性・有効性が確認されている (西田ら *N Engl J Med* 2004)。

2. 研究の目的

我々はこれまでにMSCシートをラットBRONJモデルに移植する実験を行ったところ、MSCシート移植群では対照群と比較して有意に骨露出の治癒がみられることを確認した (貝淵ら *Acta Biomater* 2016)。さらに、細胞シート移植群は非移植群やMSCの静脈投与群と比較して有意に新生血管が移植床に認められることやBP投与によって減少した破骨細胞が再度の増加がみられた。また、MSCsからVEGFやHGFのタンパクの分泌及びRANKLの遺伝子発現を確認した。以上のことから、MSCsには免疫調整機能や血管新生促進作用、骨代謝促進作用があり、シート状で移植することでその効率が効果的に発揮されることが推察された。これらの知見をもとに我々は大動物実験から臨床研究へと進めていく。さらに、次世代シーケンサーを用いて、患者由来MSCsの網羅的な遺伝子解析を行い病態解明も行っていく。

3. 研究の方法

ラットモデル作製実験で行ったのと同様に、大動物(ビーグル犬の使用を予定)にBP系製剤であるゾレドロネート及びデキサメタゾン投与し、抜歯や骨の切除など顎骨に侵襲の加わる処置を施し顎骨壊死の発症を試みる。条件検討を行い、より安定した大動物モデルが作製できるプロトコルを確立する。また、モデル動物からMSCsソースとなる組織を採取し、細胞増殖能、細胞分化試験、タンパク質分泌量、遺伝子発現などを調べ検討し、使用細胞ソースの選定を行う。それと並行して、学内倫理委員会の承認を取り、実際の患者(BP投与前後やBRONJ発症した患者など)からもMSCsソースとなる組織を採取し検討を行い、臨床試験に用いる細胞ソースの選定や病態の解明を行う。選定した細胞ソースを用いて、条件検討を行い、適切なMSCシートの作製プロトコルを確立する。それらの結果をもとに、大動物を用いた移植実験を行い、治療効果の確認を臨床的、組織学的解析やマイクロCTなどの画像解析により行う。

4. 研究成果

我々はこれまでに行なったラットでの実験結果をもとに、この治療法を臨床応用へと発展して行くために大動物による移植実験による有効性の確認を行い、非臨床POCの取得を目指した。抜歯を行い一部無歯顎の顎堤のあるビーグル犬を作製し、さらにゾレドロロン酸とデキサメタゾン投与し、粘膜剥離、顎骨の切削を行いBRONJモデルの作製を試みた。外科処置1ヶ月後に

処置を行なった顎堤に骨露出と周囲粘膜の炎症所見が確認された。治療効果を検討するための移植実験に使用可能なモデルであった。また、同様な処理を行なったビーグル犬に予防的に MSC シートを移植することで、顎骨壊死の発症を予防できることも確認した。また、細胞シートの移植を行っていない対照群では、病理組織学的にも骨髄炎の様な所見が得られた。

また、並行して患者から採取した細胞を用いて、臨床研究で使用する移植細胞の選定要件の確立を行うために、次世代シーケンサーを用いた解析を行った。BRONJ 患者 6 名とヘルシードナー 4 名の検体を採取し解析を行った。解析結果について現在、考察中で、その成果を学会および論文にして発表予定である。

これらの結果は第 28 回日本口腔インプラント学会で報告し、デンツプライシロナ賞を受賞した。さらに、Regenerative Therapy 誌、European Cells and Materials 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 KAIBUCHI Nobuyuki †, IWATA Takanori, ONIZUKA Satoru, YANO Kosei, TSUMANUMA Yuka, YAMATO Masayuki, OKANO Teruo, ANDO Tomohiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Allogeneic multipotent mesenchymal stromal cell sheet transplantation promotes healthy healing of wounds caused by zoledronate and dexamethasone in canine mandibular bones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2018.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 N. Kaibuchi, T. Iwata, T. Okamoto, Y. Kawase-Koga, M. Yamato	4. 巻 41
2. 論文標題 Cell therApy for mediCAtion-relAted osteoneCrosis of the jAw: updAte on treAtment strAtegies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Cells and Materials	6. 最初と最後の頁 31-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22203/eCM.v041a03	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 貝淵信之 矢野孝星 熊坂 士 岡本俊宏
2. 発表標題 ビーグル犬を用いた間葉系幹細胞シート移植によるビスフォスフォネート関連顎骨壊死の予防効果の検討
3. 学会等名 第48回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------