

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10182

研究課題名(和文)免疫活性化作用を有するMSC亜集団を用いた顎骨壊死治療法の検討

研究課題名(英文) Study on treatment of jaw bone necrosis using a subpopulation of MSCs that activate immunity

研究代表者

西澤 悟(Nishizawa, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00646200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤関連顎骨壊死は骨粗鬆症の治療薬などの投与で発生する疾患であり治療法はまだ確立されていない。間葉系幹細胞による細胞治療は、間葉系幹細胞が骨を作る細胞の供給源となるだけでなく、骨細胞の活性促進因子を供給するため、有効な治療法と期待されている。しかし間葉系幹細胞は免疫抑制作用を有するため、感染が進行した難治性の患者を治療する目的で投与することはリスクが高い。一方、間葉系幹細胞の免疫調整機能には不明な点が多く、免疫を活性化することを示した報告もある。そこで本研究では免疫活性化作用をもつ間葉系幹細胞の亜集団を検索し、難治性薬剤性顎骨壊死に対する治療効果を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞による顎骨壊死に対する細胞治療の研究は、殆どが発症初期のモデルを用いて評価している。しかし臨床に展開していく上では難治性のモデルを用いた評価をおこなうことが重要である。本研究の特色は、間葉系幹細胞の免疫制御作用に着目し、これまで免疫抑制作用がクローズアップされてきた間葉系幹細胞による細胞治療を感染の進行により憎悪するリスクのある疾患に対し、安全かつ確実に適応させるための方策を新たに作出する点にある。得られた知見は細胞治療の分野において有意義なものとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Drug-related osteonecrosis of the jaw is a disease caused by the administration of drugs such as those for osteoporosis, and no treatment has yet been established. Cell therapy using mesenchymal stem cells is expected to be an effective treatment because mesenchymal stem cells are not only a source of bone-building cells but also provide factors that promote bone cell activity. However, because mesenchymal stem cells are immunosuppressive, their administration for the purpose of treating refractory patients with advanced infection is risky. On the other hand, the immune regulatory function of mesenchymal stem cells remains unclear, and some reports have shown that they activate immunity. In this study, we searched for a subpopulation of mesenchymal stem cells with immune-activating properties and investigated their therapeutic efficacy against refractory drug-induced osteonecrosis of the jaw.

研究分野：再生医療

キーワード：細胞治療 薬剤関連顎骨壊死 間葉系幹細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1)増加する薬剤関連顎骨壊死

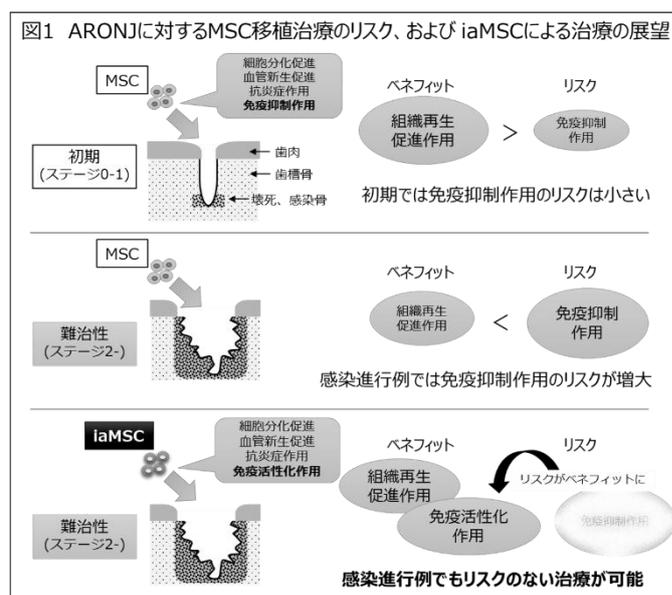
薬剤関連顎骨壊死 (ARONJ) は骨粗鬆症、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症、および骨転移の治療薬ビスフォスフォネートや、同様な効果があるデノスマブなどの生物学的製剤の投与で発生する顎骨壊死症状である。ARONJ はそれらの薬剤によって骨微細構造の変化及び血流障害が生じて顎骨の骨芽細胞、破骨細胞が死滅し、さらに抜歯などの外科処置によって感染が加わることで発症すると考えられている。[顎骨壊死検討委員会ポジションペーパー2016]。そのため、口腔外科領域の外科的治療後に発生、顕在化することが多く、発症後の症状は進行性かつ難治性である。ARONJ に対する予防法、対処法は確立されておらず、本邦においても発生例が増加しつつあることから、ARONJ に対する有効な治療法の確立は、口腔外科における重要な課題となっている。

(2)ARONJ の細胞移植治療と課題

骨髄、脂肪組織から採取した間葉系幹細胞(MSC)を全身または局所に投与すると傷害部位に集積し、新生組織形成を担う細胞の供給源となるのみならず、MSC のパラクリン作用により、ホスト側の細胞分化を促進させたり、炎症反応を低減させたり、病変組織を保護したりする効果があることが明らかとなってきた。[Glenn JD 2014 World J Stem Cells]この MSC が有する特性を例えば加齢による皺の修復や変形性関節症の治療などに応用した細胞移植治療が近年注目されつつある。

ARONJ に対する細胞移植療法の有効性を疾患モデル動物で評価した先行研究では、MSC 投与群において骨壊死領域の有意な減少および血清中の炎症マーカーの有意な低減を示したことを報告している。[Takashi K 2010 JBMR] しかし腐骨形成や骨髄炎の進行していないステージで評価しており、骨髄炎を併発した難治性の ARONJ に対する有効性は検討されていない。また一般に MSC は、T 細胞増殖抑制作用といった免疫抑制作用がある細胞として認知されている。これは MSC を原料とする細胞治療薬「テムセル®HS 注」が、急性移植片対宿主病(GVHD)の治療薬として既に実用化していることから明らかである。そのため腐骨形成や細菌感染が進行した ARONJ に対し、免疫抑制作用を有する MSC を適用することには議論がある (図1)。

いっぽうで MSC には免疫活性化作用があるという報告もあり[E Traggiai 2008 Stem Cells]、MSC の免疫制御の機序やメカニズムは、様々な分子が複雑に関与しており、その詳細は未だ解明されていない。このことが ARONJ に対する MSC 細胞移植治療の実用性を不確実なものとしている。



2. 研究の目的

慢性骨髓炎を併発した難治性の ARONJ に対する MSC 細胞移植治療を確実にこなうためには、従来の MSC ではなく、免疫活性化作用の高い MSC を移植する必要があると考えた。本研究の目的は、免疫活性化作用をもつ MSC 亜集団 (immune activation MSC, iaMSC) を同定し、難治性 ARONJ モデル動物を用いて、この細胞による移植治療の有効性を実証することである。

3. 研究の方法

(1) 難治性 ARONJ モデル動物作出方法の検討

C57BL/6J マウス 6 週齢♀に対し、ゾレドロン酸およびシクロフォスファミドを 3 週間投与し、左側上顎臼歯を抜歯、2、5、7 週後に上顎骨を回収した。抜歯時に電気メスによる歯肉焼却、止血剤塗布等を加えて検討した。ARONJ の病態は口腔内写真、CT、組織学的所見で評価した。

(2) 免疫活性化特性を有する MSC 亜集団の同定

C57BL/6 マウスの大腿骨から採取した MSC をセルソーターで解析し 50~60 個の亜集団に分離する。脾臓細胞から採取した T 細胞、B 細胞、樹状細胞など各種免疫系細胞と共培養をおこない、培養後の免疫系細胞の増殖および分化度、培養上清の抗体量を指標として免疫細胞を活性化させる特性を有する MSC 亜集団を検索した。

(3) 免疫活性化特性を有する MSC による治療効果の検証

C57BL/6 マウスにゾレドロン酸およびシクロフォスファミドを腹腔内投与し、上顎第一大臼歯を抜歯後、抜歯窩に止血剤を過量投与することで stage2 相当の難治性 ARONJ モデルマウスを作成した。そして(2)項で同定した MSC をマウス尾静脈から投与した。通常の MSC および saline 投与群をコントロールとした。移植後 6、24 時間、3、7、10、14、30 日の時点でマイクロ CT 撮影、血液検査をおこない、顎骨壊死の病変進行度、血清中の炎症マーカー値 (IL-10, IL-6, IL-17, CRP) を評価した。30 日の撮影後に安楽死させ、口腔粘膜ごと一括切除した上顎骨の組織学的評価 (H.E. 染色による壊死性骨領域測定、TRAP 染色による成熟破骨細胞活性評価、GFP を指標としたホスト/ドナー細胞の識別) を行い、マイクロ CT 所見とあわせて評価し、免疫活性化特性を有する MSC による難治性 ARONJ の治療効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 難治性 ARONJ モデル動物作出方法の検討

ゾレドロン酸投与群は全検体で抜歯窩の骨形成不良を認めた。歯槽骨露出はゾレドロン酸単独投与群では認めず、シクロフォスファミドの併用投与群、電気メスによる歯肉焼却群、止血剤塗布群では多くの検体で認めた。抜歯時に止血剤塗布、歯肉焼却など侵襲を加えることでヒト ARONJ に近似する難治性の抜歯窩の治療不全を得ることができた。

(2) 免疫活性化作用を有する MSC 亜集団の同定

マウス骨髓由来 MSC に含まれる免疫活性化作用を有する亜集団を検索し、相対的に高い免疫活性化作用を有する MSC 亜集団を同定した。

(3)免疫活性化特性を有するMSCによる治療効果の検証

難治性ARONJモデルマウスに(2)項で同定したMSC亜集団を投与すると対照群に比べて上皮化が促進し、壊死骨が減少する傾向がみられた。この効果の違いが投与したMSCの免疫調整作用の差違によるものか詳細に検討するため、病変部に集積した免疫系細胞の特性をqPCR、WB、IHCなどの手法で調査している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiroshi Kawakami, Satoru Nishizawa, Atsuhiko Hikita, Kazuto Hoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Histochemical and Morphometrical Analyses of Scarless Wound Healing in Mouse Fetal Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tokai J Exp Clin Med.	6. 最初と最後の頁 33-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Fujihara Yuko, Abe Takahiro, Asawa Yukiyo, Nishizawa Satoru, Saijo Hideto, Hikita Atsuhiko, Hoshi Kazuto	4. 巻 27
2. 論文標題 Influence of Damage-Associated Molecular Patterns from Chondrocytes in Tissue-Engineered Cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2019.0185	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 Nishizawa Satoru, Kanazawa Sanshiro, Fujihara Yuko, Asawa Yukiyo, Nagata Satoru, Harai Motohiro, Hikita Atsuhiko, Takato Tsuyoshi, Hoshi Kazuto	4. 巻 9
2. 論文標題 Glial Fibrillary Acidic Protein as Biomarker Indicates Purity and Property of Auricular Chondrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioResearch Open Access	6. 最初と最後の頁 51~63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/biores.2019.0058	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 五十嵐久郎、西澤悟、疋田温彦、星和人
2. 発表標題 病態の解明および新規治療法開発に向けたマウスARONJモデルの確立
3. 学会等名 第18回日本口腔ケア学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hisao Igarashi, Satoru Nishizawa, Atsuhiko Hikita, Kazuto Hoshi
2. 発表標題 Establishment of mouse ARONJ model for the elucidation of its pathophysiology and the establishment of novel treatment methods.
3. 学会等名 The 1st Annual Meeting of the International Society of Oral Care (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究分担者	浅輪 幸世 (Asawa Yukiyo) (10769912)	東京大学・医学部附属病院・特任講師 (12601)	
研究分担者	星 和人 (Hoshi Kazuto) (30344451)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	

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
---------	---------