

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17112

研究課題名（和文）大腸菌発現系由来rhBMP-2を応用したMRONJに対する治療・予防薬の開発

研究課題名（英文）Development of a treatment and preventive drug for MRONJ Using E. coli derived rhBMP-2

研究代表者

三海 晃弘 (mikai, akihiro)

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：20845375

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）：薬剤関連顎骨壊死（MRONJ）は発症と病態が未解明の部分が多い。骨組織の骨細胞ネットワークは骨基質のミネラル維持や機械的ストレス応答に重要だが、MRONJでの変化は不明である。本研究では、MRONJ発症と骨形成タンパク質-2（BMP-2）治療が抜歯窩周囲骨の骨細胞ネットワークおよび骨リモデリングに与える影響を解析した。MRONJモデルの抜歯窩周囲歯槽骨では骨基質のクラッキング、骨細胞ネットワークの減少、骨リモデリングの遅延が観察された。BMP-2含有人工骨移植により、これらは健常骨と同程度に回復することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が進む日本では骨粗鬆症患者が増加し、治療にビスフォスフォネート（BP）製剤が使用されている。しかし、BP製剤は強力な骨吸収抑制作用を持つ一方で、侵襲的歯科治療により顎骨壊死が発生することが社会問題となっている。顎骨壊死の発症メカニズムや病態を正確に理解し、新たな治療法を開発することは、患者のQOL（生活の質）を向上させるだけでなく、医療費の削減にも寄与するため、社会的に重要である。

研究成果の概要（英文）：Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) has unknown aspects regarding its onset and pathology. This study examined the effects of MRONJ and BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) treatment on the microstructure, osteocyte networks and bone remodeling around the extraction socket. In the MRONJ model, bone matrix cracking, reduced osteocyte networks, and delayed bone remodeling were observed. BMP-2-containing artificial bone transplantation restored these conditions to levels comparable to healthy bone.

研究分野：バイオロジー

キーワード：MRONJ BMP-2

## 1. 研究開始当初の背景

近年、骨粗鬆症や、がんの骨転移に対して、多くの患者が骨吸収抑制薬であるビスフォスフォネート (BP) 製剤を服用している。一方、歯科領域では、骨吸収抑制剤投与中の患者における、口腔粘膜の治癒不全ならびに顎骨壊死を主症状とする薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) が大きな社会問題となっている。骨粗鬆症により大腿骨頸部骨折や大腿骨転子部骨折を受傷すると、歩行能力が失われて寝たきりになることから、骨折のリスクに対する予防 (骨吸収抑制剤投与) が優先されることが多い。しかし、一旦 MRONJ が発症すると有効な治療法はなく、進行性の顎骨壊死により複数回にわたる腐骨除去術が必要になったり、壊死した腐骨に慢性の感染を伴う場合では、腐骨の分離が進むまで口腔ケアや消毒が必要になる場合があるなど、著しい QOL の低下を招くことになる。

MRONJ の発症原因は未だ不明であるが、骨吸収抑制薬による、破骨細胞活性の過度な抑制、およびそれに伴う骨芽細胞活性の低下、血管新生の抑制、口腔細菌に対する易感染性、上皮細胞の増殖、遊走阻害などが関与していると考えられている。このような背景から、MRONJ は、薬剤に起因する骨の代謝回転の低下や血管新生抑制を本態としており、感染や外科的侵襲等が引金になり発症する疾患と捉えることができる。すなわち、骨吸収抑制剤服用患者の抜歯窩の骨の代謝回転や血管新生を局所的にでも改善できれば、MRONJ を発症しにくくしたり、発症しても生物学的に治療できる様になると考えられる。

一方、骨形成を強力に誘導する骨形成タンパク質 (BMP)-2 は、自家骨移植に代わる有望な次世代骨組織再生材料として期待されている。すでに欧米では哺乳動物細胞由来のヒト遺伝子組換え BMP-2 (rhBMP-2) を応用した骨補填材 (INFUSE<sup>®</sup>, Medtronic, USA) がアメリカ食品医薬品局より認可され、整形外科・歯科領域で臨床応用が行われている。我々の研究グループは、これまで量産化が難しかった大腸菌発現系由来 rhBMP-2 (E-rhBMP-2) の開発に成功し、骨再生療法に広く用いられている  $\beta$ -Tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) をキャリアに用いた E-rhBMP-2 含有人工骨の開発を進めてきた。そしてその前臨床試験として、大型動物における本品の劇的な有効性を実証し、2021 年 7 月より、顎骨再生療法に関する第 1 相 Ⅰ 相医師主導臨床試験を日本医療研究開発機構 (AMED) 令和 3 年度臨床研究・治験推進研究事業の支援により開始した。

BMP-2 は、BMP レセプターを介して骨芽細胞分化を強力に促進するタンパク質として有名であるが、破骨細胞にも BMP レセプターが存在し、破骨細胞活性を亢進し、骨代謝活性を促進する作用を有することが知られている。また、BMP ファミリーが血管前駆細胞の分化・増殖を制御すること、遺伝性出血性抹消血管拡張症や原発性肺高血圧の原因遺伝子が BMP 受容体であることから、BMP ファミリーは血管新生や維持に関与している可能性が高いと考えられる。そこで、E-rhBMP-2 をマウス背部皮下に移植したところ、骨のみならず血管を含む骨髄組織が形成されることが明らかとなり、BMP-2 が血管新生能を持つことが示唆された。以上から、骨代謝活性の低下と血管新生の抑制が主な原因と考えられている MRONJ の治療法として BMP-2 の局所投与が有効ではないかと考えるのは無理がないと思われる。

そこで、既報 (Kuroshima *et al.*, JBMR, 2018) に従い、BP 製剤 (ゾレドロネート, ZA) と抗がん剤 (シクロホスファミド, CY) を併用しマウス MRONJ モデルを作製した。そして、無治療では骨性治癒を生じない MRONJ 様モデルマウス抜歯窩に E-rhBMP-2 含有人工骨を移植した。その結果、抜歯窩内の新生骨形成面積率が有意に増加することが明らかとなった。さらに、興味深いことに、抜歯窩の新生骨および既存周囲骨において、通常の MRONJ 様モデルマウスでは骨壊死様病変の指標である中空の骨小腔が多数認められるのに対し、E-rhBMP-2 含有人工骨移植群ではその数が有意に減少することが明らかとなった (Mikai *et al.*, IJMS, 2020)。以上により、MRONJ 様モデルマウスの抜歯窩骨形成において E-rhBMP-2 含有人工骨移植が有効であることが明らかとなった。さらに、抜歯窩周囲骨に見られる骨壊死様病変が、E-rhBMP-2 含有人工骨移植により抑制される可

能性が示唆された。

しかし、正常マウスと比較して、MRONJ 様モデルマウスの抜歯窩周囲骨に、微細形態学的、生物学的にどのような影響が及んでいるのか、その詳細が明らかでないため、中空の骨小腔が存在する範囲や頻度だけを指標に E-rhBMP-2 含有人工骨移植の効果を評価するには限界がある。すなわち、正常モデルと比較して、MRONJ 様モデル動物における骨壊死様病変やその周辺の骨組織が生物学的、微細形態学的にどのような変化を来しているのか、さらには E-rhBMP-2 含有人工骨移植が MRONJ 様モデルにおける抜歯窩周囲骨の組成や微細構造、またそこに存在する骨代謝関連細胞にどのような影響を与えているのかを明らかにする必要があると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究では、MRONJ の新規治療法の確立を最終目標とし、正常モデルマウスと比較して、MRONJ 様モデルマウスの抜歯窩および周囲骨に存在する骨代謝関連細胞にどのような影響が生じているのか、さらには E-rhBMP-2 含有人工骨移植がこの骨代謝関連細胞にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにする。また、骨組織の微細 3 次元解析等を行い、正常モデルマウスと比較して MRONJ 様モデルマウスの骨組織はどのような微細構造変化が生じているのか、さらには E-rhBMP-2 含有人工骨移植が MRONJ 様モデルマウスの抜歯窩周囲骨の組成や微細構造にどのような影響を及ぼしているのかを検討する。

## 3. 研究の方法

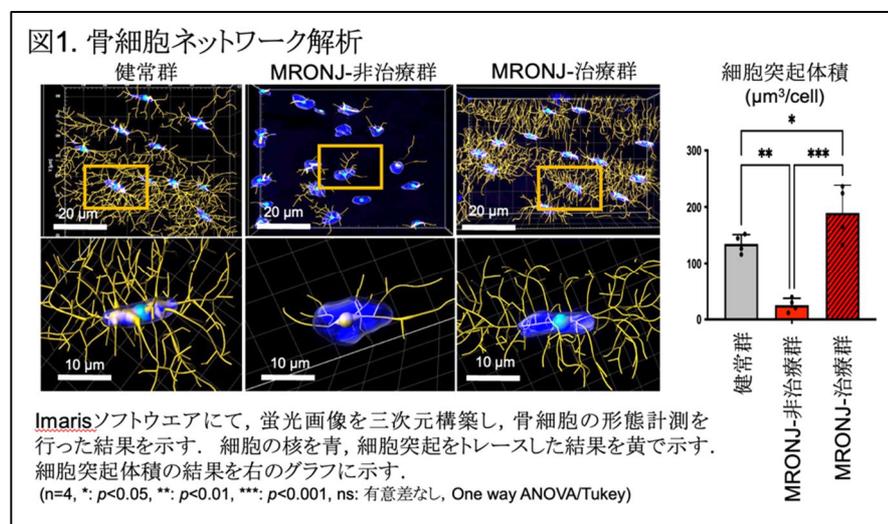
マウスに Zoledronic Acid Hydrate と Cyclophosphamide (ZA/CY) を 3 週間投与 (2 回/週) し、上顎第一臼歯を抜歯した後、ZA/CY を 2 週間投与し MRONJ 様モデルを作製した。組織を回収し、ZA/CY 非投与の健常群と比較した。さらに、MRONJ 様モデルの抜歯窩に beta-TCP をキャリアに用いた BMP-2 含有骨補填材 (BMP-2 人工骨) の移植を行い、4 週後に組織を回収し (治療群)、移植なしの非治療群と比較した。

- (1) 走査型顕微鏡にて抜歯窩周囲の歯槽骨の表面構造を観察し、比較検討した。
- (2) 骨細胞ネットワークを観察するため 組織切片を作製し 細胞骨格をファロイジン 核を Dapi にて染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて撮影した蛍光画像を三次元構築し、形態計測を行い、比較検討した。
- (3) カルセイン動的二重蛍光骨標識法を用いて、骨リモデリングを評価した。

## 4. 研究成果

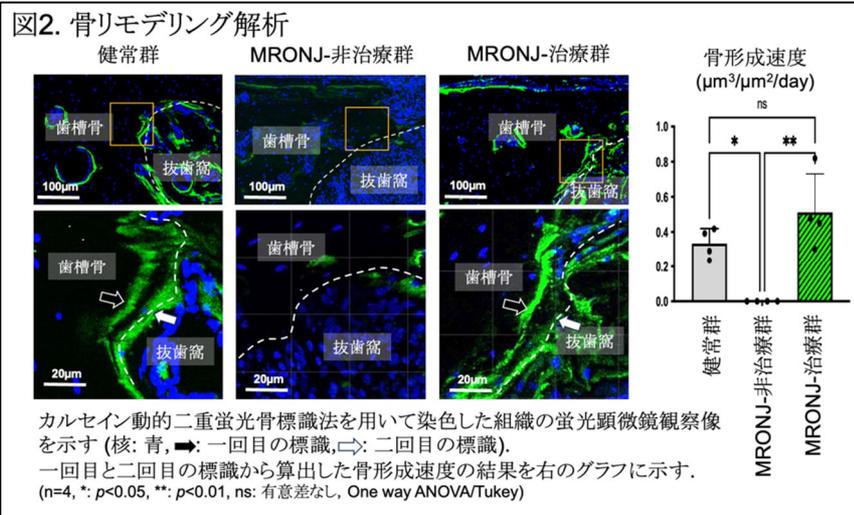
(1) 走査型顕微鏡にて歯槽骨の表面構造を詳細に観察した結果、MRONJ 様モデルでは、健常群と比較し抜歯窩周囲骨に多数のクラッキングが観察された。しかし、BMP-2 を用いた治療群では健常群とほぼ同等まで減少していた。

(2) MRONJ 様モデルでは、抜歯窩周囲骨の骨細胞あたりの細胞突起体積や主突起数は、健常群と比較し有意に減少した。さらに、治療群では非治療群と比較しこれら全てのパラメーターが有意に増加し、健常群とほぼ同等まで回復した (図 1)。



(3) MRONJ 様モデルでは、抜歯窩周囲骨の骨形成速度は、健常群と比較し有意に減少した。しかし、BMP-2 を用いた治療群では非治療群と比較し骨形成速度が有意に増加し、健常群とほぼ同等であった (図 2)。

以上より、MRONJ 様モデルの抜歯窩周囲の歯槽骨では、骨にクラッキングが観察され、骨細胞ネットワークの減少と骨リモデリングの遅延が認められること、BMP-2 人工骨の移植によりこれらは健常骨と同程度に回復することが明らかとなった。



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

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