

学内グラント 報告書

平成23年度 学内グラント終了時報告書

ビスフォスフォネート関連顎骨壊死に対する
低侵襲な外科療法開発のための基礎的研究

研究代表者 佐藤 毅 (大学病院 歯科・口腔外科)

研究分担者 福島 洋介¹⁾, 佐藤 智也²⁾, 千田 大¹⁾

緒言

ビスフォスフォネート関連顎骨壊死 (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw : BRONJ) はビスフォスフォネート (bisphosphonate : BP) の投与時に顎骨に関連する観血的処置を受けることで発症すると考えられている。その病態については、破骨細胞をターゲットとした骨吸収抑制・骨細胞の減少・口腔細菌感染・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¹⁾。BPには経口剤と注射剤があるが、前者は骨粗鬆症に対して、後者は悪性腫瘍による高カルシウム血症・多発性骨髄腫による骨病変および固形癌骨転移による骨病変・乳癌の溶骨性骨転移に対して適応がある。経口剤の投与期間が3年未満である場合は、休薬することで観血的処置を行うことが可能であるが、注射剤の場合は悪性腫瘍骨転移に伴う、病的骨折・放射線治療・手術療法・高カルシウム血症などの骨転移に伴って発生する事象である骨関連事象 (skeletal-related event : SRE) を悪化させる可能性があるため原則として休薬は推奨されない²⁾。現在BRONJに対する治療法として、消毒薬による定期的洗浄、抗生剤の長期投与、顎骨の外科的切除があるが、洗浄や抗生剤投与の効果は期待できない。一方で、外科的切除は根治的治療法であるが、侵襲が大きく咀嚼機能が著しく損なわれる。注射BP製剤は、SRE発生の抑制効果があり、疼痛軽減・全身状態QOLの維持効果・進行再発癌骨転移の発生遅延効果・体動能力の保持をもたらす。そこで我々は、BRONJ病態モデルにおけるBRONJに対する侵襲の少ない治療法の開発についての基礎研究を立案した。本研究では、マウスにBPを静脈内投与して抜歯を行い、BRONJを発

症させた病態モデル動物を作製し、マウスの皮下より採取した脂肪組織から脂肪組織由来間葉系幹細胞 (AD-MSC) を分離して、BRONJ病態モデルマウスに投与することでBRONJが治癒するかどうかを組織学的に検討した。

材料と方法

BALB/cマウスを日本SLC社より購入した。Zometaはノバルティス社より分与されたものを用いた。BALB/cマウス(テストおよびコントロール各々4匹)にZometa (125 µg/kg)を3日おきに、3週間静脈内投与し、Day 10にて上顎切歯を麻酔下にて抜歯した (BRONJ-mice)。別のBALB/cマウスの腹部より白色脂肪を採取して間質細胞成分を遠心分離して除去し、ディッシュで培養して増殖させ、 1×10^6 個に調整した脂肪細胞由来間葉系幹細胞 (AD-MSC) をPBSで希釈したものを用意した。テスト群としてBRONJ-miceにおいて抜歯直後にAD-MSCを尾静脈内より注射してAD-MSCを移植したB4AD (+) mice (4匹)を、コントロール群としてBRONJ-miceにおいて抜歯直後にPBSを尾静脈内より注射したマウスB4AD (-) mice (4匹)を作製した。抜歯後14日目で過剰麻酔 (ソムノペンチル100 mg/kg, i.p.) による安楽死後、1塊として取り出した上顎骨サンプルと、脊椎骨 (L4) サンプルの非脱灰標本を作製した。上顎骨サンプルの組織学的評価については、HE染色とTrichrome染色を行い壊死骨・新生骨・結合組織を染め分け、顕微鏡下で5箇所以上の部位の撮影を行い、画像を取り込んでNIH image Jにて全面積に対する壊死骨の面積を計測した。また、脊椎骨は骨形態計測を行い、骨量 (bone volume/tissue volume) についてテストとコントロールとの比較を行った。

結果

上顎骨サンプルについては、B4AD (-) miceと比較

1) 大学病院 歯科・口腔外科

2) 大学病院 形成外科・美容外科

して, B4AD (+) miceにおいて壊死骨面積が有意に減少した(図1). 脊椎骨については, B4AD (-) miceと比較して, B4AD (+) miceにおいて骨量が増加した(図2, 図3).

考 察

今回, われわれは脂肪細胞由来間葉系幹細胞が, 注射BP製剤投与マウスの骨組織に対して骨量増加に作用することを見出した. Kikuiiriらは, 骨髄細胞由来間葉系幹細胞がBRONJの治癒を促進することを報告

したが³⁾, 脂肪細胞においても同様に治癒を促進する可能性があることを示唆している. AD-MSCは骨髄からの採取に比較して簡便, かつ大量の幹細胞が採取可能で, 患者への負担が少なく最近注目されている細胞治療であり, 腫瘍や炎症性疾患に対する応用が期待されている^{4,5)}. 今回の研究結果から, 細胞移植にて創部の治癒を期待できる可能性が示唆された. 今後は, より臨床に近いモデルマウスとして, 乳癌骨転移モデルマウスにBP製剤を投与して, 同様に骨形態計測や免疫学的解析を行い発展的な研究を行う予定である.

参考文献

- 1) Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab* 2010;28(4):365-83.
- 2) Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. Task force on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw -2009 update. *Aust Endod J* 2009;35(3):119-30.
- 3) Kikuiiri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 2010;25(7):1668-79.
- 4) Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24(4):150-4.
- 5) Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res* 2010;70(9):3718-29.

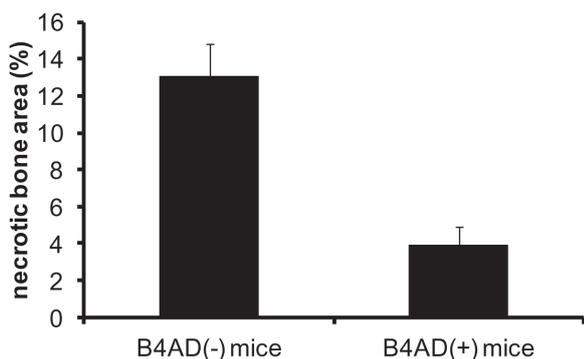


図1. 上顎骨における壊死骨面積.

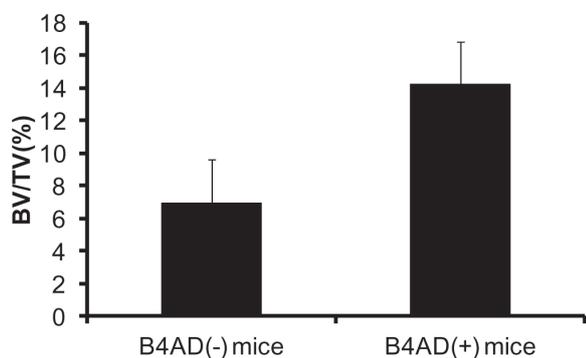


図2. 脊椎骨における骨量.

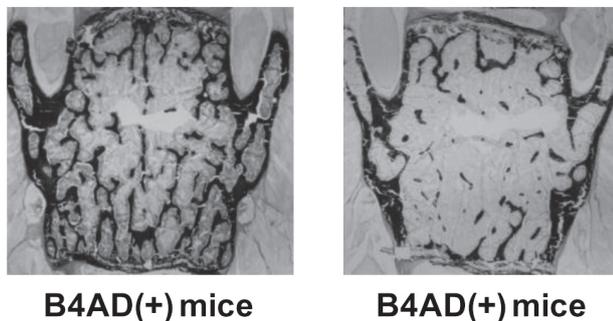


図3. 脊椎骨のvon Kossa染色.

研究成果リスト

なし