



Title	Anti-RANKL Ab induces osteonecrosis of the jaw in mice via imbalance of immune responses [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中村, 裕介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12166号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62221
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Nakamura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 中 村 裕 介

学 位 論 文 題 名

Anti-RANKL Ab induces osteonecrosis of the jaw in mice
via imbalance of immune responses

（抗 RANKL 中和抗体が関与した顎骨壊死は免疫応答の不均衡によって引き起こされる）

【諸言】デノスマブは 2010 年に米国 FDA に承認された新規の骨吸収抑制薬であり（日本での認証は 2012 年）、RANKL 分子を標的とする完全ヒト型モノクローナル抗体である。これは元来使用されていたビスフォスフォネート製剤とは薬理学的に作用機序の異なる新しい骨吸収抑制薬である。これらの骨吸収抑制薬は骨粗鬆症、前立腺癌や乳癌などの骨転移に伴う骨病変に対して使用されており、その重大な副作用の一つとして抜歯などの歯科的侵襲を契機として発症する顎骨壊死が報告されている。この薬剤関連顎骨壊死（以下、MRONJ）は、一旦発症すれば症状は進行性できわめて難治性である。また、その症状は重症例となると摂食障害などの著しい QOL の低下を引き起こす可能性がある。

デノスマブは破骨前駆細胞の RANKL と特異的に結合し破骨細胞の分化を直接抑制することから、当初顎骨壊死のような副作用は起こらないものと期待されていた。しかし、デノスマブ投与患者においても、顎骨壊死が発症することが報告され、その症状はビスフォスフォネート関連顎骨壊死同様に非常に重篤な症状であることが明らかになっている。MRONJ の発症率はデノスマブ投与患者のおおよそ 1.9%程度とされているが、その発症機序や有効な治療法については未だ確立していない。よって、MRONJ の治療法を確立するため、デノスマブによる顎骨壊死モデルマウスを作製し、その発症機序について検討を行った。

【材料と方法】生後 4 週齢の C57BL/6J 雌性マウスに全身麻酔管理下にて卵巣摘出手術を施

行し、骨粗鬆症モデルマウスを作製した。卵巣摘出術 4 週後よりマウス抗 RANKL 中和抗体（以下、anti-R ; 0.1、0.4、1.0 mg/kg）ならびに強力な骨髄抑制作用を有する抗癌剤であるメルファラン（以下、Mel ; 7.0 mg/kg）の腹腔内投与（週 1 回）を開始し、その 1 週後に左上顎第 1 臼歯を抜去した。抜歯後も薬剤の投与を週 1 回継続し、抜歯 4 週後にマウスを安楽死させ、上顎骨、胸腺、脾臓、末梢血を採取した。

摘出した上顎骨は 4%パラホルムアルデヒドに浸漬固定した後、 μ CT にて抜歯窩の観察を行った。 μ CT 撮影後、10%EDTA (pH 7.4) にて 3 週間脱灰を行い、パラフィン包埋した。包埋したサンプルは 5 μ m で薄切し、上顎骨については HE 染色、TRAP 染色、マッソントリクローム染色、胸腺については HE 染色、免疫染色 (AIRE)、TUNEL 染色を行い、組織学的解析を行った。

また、末梢血、胸腺細胞、脾臓細胞中の T 細胞のポピュレーションを調べるため、それぞれの CD4、CD8、CD25、Foxp3 を蛍光染色し、フローサイトメトリーにて解析を行った。

【結果】 anti-R (1.0 mg/kg)/Mel 投与群にて、抜歯窩閉鎖不全を伴う歯槽骨の露出と抜歯窩周囲の歯槽骨における骨細胞の消失、抜歯窩内の新生骨の欠如といった典型的な顎骨壊死の症状を発症していた。また、anti-R (1.0 mg/kg)、Mel をそれぞれ単独で投与した場合、顎骨壊死の症状は認めなかった。TRAP 染色では、anti-R を投与することで有意に TRAP 陽性破骨細胞の分化が抑制されたが、破骨細胞数は anti-R の濃度に依存しなかった。マッソントリクローム染色では、anti-R の濃度に依存して抜歯窩周囲骨の膠原線維が不整になっていた。

胸腺においては anti-R/Mel 投与群にて、明らかなサイズの縮小と萎縮を認めた。また、組織学的検索では、胸腺髓質 (mTEC)/胸腺皮質 (cTEC) 比が小さくなった。このことより anti-R、Mel を投与することで、胸腺髓質の分化は抑制されたことが示唆された。また、anti-R/Mel 投与群において、胸腺髓質細胞中の AIRE の発現ならびに TUNEL 陽性細胞の減少を認めた。

さらに末梢における T 細胞の動態をフローサイトメトリーにて解析を行ったところ、anti-R/Mel 投与群にて $CD4^+CD8^+$ T 細胞の増加、 $CD4^+CD8^-/CD4^-CD8^+$ T 細胞の減少を認めた。また、anti-R/Mel 投与群で $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T 細胞（制御性 T 細胞）の減少を認めた。

【考察】anti-R(1.0 mg/kg)/Mel 投与時の μ CT、組織学的所見によって顎骨壊死モデルマウスを作製することに成功した。また、低濃度 anti-R (0.1、0.4 mg/kg)、anti-R(1.0 mg/kg)単独もしくは Mel 単独投与では、完全に抜歯窩被覆上皮が治癒し、明らかな顎骨壊死は認められなかった。また、anti-R(0.1、0.4、1.0 mg/kg)/Mel 投与群、Mel 単独投与群にて、抜歯窩上皮が閉鎖しても組織学的に腐骨を認めたが、その面積は anti-R の濃度に依存して大きくなった。これらの結果より、顎骨壊死は anti-R の濃度に依存して、発症することが示唆された。さらに、Mel を併せて投与することで顎骨壊死が発症することから、免疫抑制状態と顎骨壊死との関連性が示唆された。

anti-R/Mel 投与群の胸腺組織標本では、胸腺の萎縮に伴う mTEC 面積の減少と、mTEC に発現している autoimmune regulator (AIRE) の欠失が認められた。AIRE は、胸腺内における T 細胞成熟および自己抗原を認識する不要な T 細胞クローンの除去、制御性 T 細胞 (Treg) の産生に関与している。また、AIRE は未熟な胸腺髄質細胞の RANK ならびに CD40 を介し発現することから、anti-R の投与により AIRE の発現が減弱されたものと推測された。加えて、anti-R/Mel 投与群にて mTEC の TUNEL 陽性細胞が有意に減少していたことから、mTEC における不要 T 細胞のアポトーシスの機能に異常が生じている可能性、すなわちネガティブセレクションが破綻していることが推測された。

フローサイトメトリーでの解析では、anti-R/Mel 投与群の末梢血中で $CD4^+CD8^+$ T 細胞数が増加していた。 $CD4^+CD8^+$ T 細胞は胸腺髄質にてネガティブセレクションを受け、CD4、CD8 いずれかの分子が発現した状態となり、ヘルパー T 細胞もしくはキラー T 細胞へと分化する。このことからネガティブセレクションに異常をきたし、 $CD4^+CD8^+$ T 細胞が末梢血へ入ったのではないかと推測された。加えて、anti-R/Mel 投与群では $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T 細胞 (Treg)

が減少した。Treg は末梢で自己反応性リンパ球の活動を抑制する機能を有し、末梢性の免疫寛容を担っているが、胸腺髄質における Treg 産生に異常をきたした可能性が示唆された。

【結論】顎骨モデルマウスを用いた解析では、anti RANKL 抗体によって発症する顎骨壊死は、胸腺の機能障害に起因する免疫応答の不均衡が関与しているものと推測された。