



Title	薬剤関連顎骨壊死は制御型T細胞の減少によって生じる
Author(s)	杉山, 孝博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13058号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13058
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89181
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Sugiyama.pdf



博 士 論 文

薬剤関連顎骨壊死は制御型 T 細胞の減少によって生じる

平成 3 0 年 3 月 申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

杉 山 孝 博

抄録：

骨吸収抑制製剤の服用患者に発症する薬剤関連性顎骨壊死 (Medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ) は、一旦発症するとその症状は重篤であり、さらに極めて難治性であることから、重大な問題となっている。しかしながら、MRONJ は現在においても明らかな発症メカニズムの解明には至っていないため、有効な予防法や治療法は確立されていない。本研究では、マウスを用いて MRONJ の発症機序と治療法について検討を行った。生後 4 週齢の C57BL/6J 雌マウスに対して、第三世代のビスホスホネート製剤であるゾレドロン酸 (ZOL) および化学療法剤であるメルファラン (MEL) を 5 週間にわたり週 2 回の割合で腹腔内投与後に上顎左側第一臼歯の抜歯を行った。抜歯 2 週後にマウスを屠殺し、抜歯窩周囲の顎骨の状態について組織学的な解析と、末梢血および脾臓中のリンパ球の動態についてフローサイトメトリーを用いて測定を行った。ZOL および MEL の単独投与群では、抜歯窩は正常な治癒経過を示す組織像を呈し、顎骨壊死は発症していなかった。一方、ZOL・MEL 併用投与群は、抜歯窩周囲の顎骨部では広範囲にわたり骨小腔内の骨細胞が消失しており、典型的な顎骨壊死の組織像を示した。さらに、制御型 T 細胞 (Treg) の減少と $\gamma\delta$ T 細胞の増加が確認された。健全マウスの脾臓から磁気細胞分離法を用いて採取した Treg 細胞を併用投与群のマウスに注入したところ、骨細胞が欠損している骨小腔の個数および骨細胞が欠損している骨範囲は減少していた。以上の結果から、ZOL による MRONJ は Treg 細胞の機能低下に起因する $\gamma\delta$ T 細胞との免疫応答の不均衡が関係していると示唆された。また、Treg 細胞移植による免疫治療が MRONJ の治療に有効であることが示唆された。

緒言

ビスホスホネート (Bisphosphonate: BP) 製剤は、骨粗鬆症、転移性乳癌や転移性前立腺癌に伴う骨痛や病的骨折などの骨関連事象、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症や多発性骨髄腫などの治療において臨床効果の高い薬剤として使用されている。しかし、これらの有効性にもかかわらず、抜歯などの外科処置後に重篤な副作用として顎骨壊死が発症することが報告された¹⁾。このBP製剤に関連した顎骨壊死はBRONJ (Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: BRONJ) として広く認知され、欧米だけでなく、本邦においても多数の報告がなされている²⁾。さらに、BP製剤と全く作用機序が異なる骨吸収抑制製剤である抗RANKL抗体のデノスマブ製剤³⁾や血管新生阻害薬においても顎骨壊死の報告がみられることから⁴⁾、これらの顎骨壊死は薬剤関連性顎骨壊死

(Medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ) と総称され、現在に至っている⁵⁾。MRONJは、一旦発症すると重篤な症状を呈することから、骨吸収抑制製剤を服用している患者における歯科治療は慎重な対応を行うことが求められている。しかし、MRONJは、最初の報告から15年以上が経過しているにも関わらず、発生機序、発症リスク因子、休薬の是非、ならびに治療法などについては、未だに統一した見解は得られていない。これは、MRONJが、BP製剤のみならず、RANKL中和抗体、血管新生阻害剤など、作用機序の全く異なる骨吸収抑制製剤の副作用として発症しているため、MRONJ発症における本質的な病態生理に対する理解をより困難なものとしている。さらに、MRONJの発症患者では複数の疾患を併発していることが多いことから、病理学的発症機序の決定が困難になっている。エビデンスに基づいたMRONJの治療法を確立するためには、臨床的関連性の高い顎骨壊死動物モデルを用いて病態生理を解析し、発症機序を明らかにすることが重要であると思われる。MRONJ発症機序を解明するために、いくつかのマウスモデルが報告されている⁶⁻⁹⁾。これらのマウスモデルの特徴は、BP製剤のみの投与ではMRONJ様症状が発現せず、別の薬剤を併用するか遺伝子操作マウスを使用していることである。マウスモデルによる報告から、ヒトにおいてもMRONJはBP製剤のみの副作用によって起こるものではなく、何らかの他因子との相互作用によってはじめてMRONJが発現している可能性が示唆される。つまり、MRONJ発症機序を解明するためには、まずマウスモデルでBP製剤と相互作用を引き起こす薬剤を見出すことが重要であると思われる。また近年、BP製剤とT細胞分画のひとつである $\gamma\delta$ T 細胞との関連性について注目がされている。 $\gamma\delta$ 細胞は、細菌感染やウイルス感染、癌化に伴う細胞の変化を察知し、迅速に生体防御反応を誘導する役割を担っている¹⁰⁾。さらに、BP製剤服用者に出現する、T細胞の減少を伴う発熱などの急性期反応は、末梢血中の $\gamma\delta$ T 細胞が関与するとの報告がある¹¹⁾。MRONJにおける $\gamma\delta$ T 細胞の関連性についてはParkらが、

γ δ T 細胞はMRONJの発症に直接関わっていないが、粘膜上皮の治癒過程に影響を与えると報告している¹²⁾。しかし、関節リウマチにおいては、 γ δ T 細胞が自己反応性T細胞と協調して関節炎を引き起こすという報告もあり¹³⁾、MRONJにおいても γ δ T 細胞が他の免疫細胞との相互作用によって発症原因となっている可能性は否定できない。

そこで、本研究では、MRONJの発症機序を明らかにすることを目的に、ゾレドロン酸（ZOL）と抗がん剤であるメルファランによってMRONJを発症するモデルマウスを作製し、発症機序に γ δ T細胞がどのように関わっているかについて検討を行った。

方法

1. 使用薬剤

ゾレドロン酸水和物注射液（ZOL）はノバルティスファーマから、メルファラン（MEL）はアスペンジャパンから購入した。

2. 動物実験モデルの作製

4週齢のC57BL/6J JmsSlc雌マウス（三協ラボサービス）をランダムに抽出し、(1) 薬剤を添加していない生理食塩水 100 μ l のみを腹腔内投与した群 6 匹（vehicle control: VC）、(2) ZOL (0.6mg/kg) の単独投与群 5 匹、(3) MEL (7mg/kg) の単独投与群 5 匹、(4) ZOL (0.6mg/kg) と MEL (7mg/kg) 併用投与群 7 匹の 4 つ群に分けた。すべての薬剤は、週 2 回の頻度で 5 週間にわたり腹腔内に投与した。薬剤投与開始 5 週後に、ペントバルビタール（ソムノペンチル[®]、共立製薬）による全身麻酔を行い、上顎右側第一臼歯の抜歯を行った。抜歯から 2 週間後に全てのマウスを CO₂ ガスで安楽死させ、上顎骨、大腿骨、脾臓、末梢血の採取を行い各種の解析を行った。

なお、本研究の動物実験にあたっては北海道大学動物実験指針を遵守し北海道大学動物実験委員会承認 (15-0015) を得て行った。

3. 試料の観察

採取した上顎骨と大腿骨は 4% パラホルムアルデヒドで 2 日間浸漬固定を行った。固定した試料は、日立製作所 Latheta LCT200 を用いて管電圧：50kV、ピクセルサイズ 24.0 μ m の条件で μ CT 撮影を行った。撮影試料における全骨体積および骨梁体積は、Latheta LCT200 標準付属の解析ソフトウェアを使用して計測した。 μ CT 撮影後に 5% ギ酸水溶液で 3 日間脱灰を行い、脱灰した資料は通法に従いアルコール脱水およびパラフィン包埋を行った。パラフィン包埋した資料は 10 μ m の切片を作成し、通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色（H. E.

染色)を行った。得られた切片は光学顕微鏡で観察した。また、切片画像の取り込みと解析はImage-Pro Premier(日本ローバー)を用いた。切片上で、骨細胞が喪失している骨小腔が連続して5個以上の隣接する範囲を顎骨壊死部と判定し、骨細胞が喪失している骨小腔の個数と顎骨壊死面積を計測した。また、顎骨壊死面積は、抜歯側における顎骨全体の面積に対する比率で表示した。

4. フローサイトメトリー分析

末梢血はヘパリンコートしたガラス毛細管を用いて眼底静脈叢より採血した。採取した末梢血は、FITC anti-mouse CD3 (Biolegend)、PE/Cy7 anti-mouse CD4 (Biolegend)、PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD8a (Biolegend)、PE anti-mouse TCR γ/δ (Biolegend) で多重染色を行った後に1X RBC Lysis Buffer(eBioscience)を用いて赤血球の溶血を行い1%BSA添加PBSにて遠心洗浄を行った。染色した末梢血は、FACSVerse™ (BD Biosciences)を用いて測定を行った。

脾臓は0.01M EDTA添加PBSで数回洗浄後に、100 mm 径のナイロンメッシュのセルストレイナーを使用して脾臓細胞浮遊液を得た。脾臓細胞浮遊液は1%BSA添加PBSにて遠心洗浄した後、PE-Cy7 anti-mouse CD4 (Biolegend)、APC anti-mouse CD25 (Biolegend) で多重染色を行った。染色後、FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (Biolegend)を用いて固定と透過処理を行った。透過処理後に、PE anti-mouse FoxP3 (Biolegend)で染色を行なった。染色した脾臓細胞は、FACSVerse™ (BD Biosciences)を用いて測定を行った。

大腿骨内にある造血幹細胞数を測定するために、大腿骨を摘出し、骨端部を外科用剪刀で切断した。切断面に30ゲージ注射針を挿入し1%BSA添加PBSで骨髓細胞を洗い流し、回収した。回収した骨髓細胞に対して、FITC anti-mouse CD34 (BD Biosciences)、PE anti-mouse c-kit (BD Biosciences)、PE-Cy7 anti-mouse Sca-1 (BD Biosciences)、APC anti-mouse Lineage Cocktail (B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1, Ter119) (BD Biosciences)の多重染色を行った。染色した骨髓細胞は、FACSVerse™を用いて測定を行い、Lineage Cocktail 抗体(B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1, Ter119)陰性、c-Kit 陽性、Sca-1 陽性、CD34 陰性細胞を造血幹細胞として同定した¹⁵⁾。

測定後のデータはFlowJo (Tomy Digital Biology)で分析を行った。また、Isotype ControlとしてFITC Rat IgG2b, κ (Biolegend)、PE/Cy7 Rat IgG2b, κ (Biolegend)、Per/Cy5.5 Rat IgG2b, κ (Biolegend)、PE Armenian Hamster IgG (Biolegend)、PE Rat IgG2b, κ (Biolegend)、APC Rat IgG1, λ (Biolegend)を使用した。

5. Treg 細胞の採取

Treg 細胞は薬剤投与をおこなっていない 9 週齢の C57BL/6J JmsSlc 雌マウスから脾臓を採取し、CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を使用した磁気細胞分離法によって Treg 細胞を得た。採取した Treg 細胞は、抜歯 1 週間前に ZOL・MEL 併用投与群に対して、一匹あたり 3.0×10^5 個の Treg 細胞を尾静脈から注入した (図 1)。

6. 統計分析

各群間は、解析ソフトウェア Statview (SAS) を用いて多重比較検定による有意差検定を行なった。

結果

1. 大腿骨の観察と分析

大腿骨の μ CT 画像では、ZOL 単独投与群および ZOL・MEL 併用投与群において VC 群と比較して、骨幹端に骨密度の増加が認められた (図 2-A)。全骨体積計測による全体的な評価では VC 群と他の実験群間には、統計学的に有意な差はなかった (図 2-B)。また、骨梁体積計測による評価では、VC 群に対して、ZOL 単独投与群のみが有意に骨梁体積の増加がみられた (図 2-C)。全骨体積と骨梁体積の両方の項目において、有意差が確認されたのは、MEL 単独投与群に対して ZOL 単独投与群のみであった (図 2-B、図 2-C)。H.E. 染色による組織学的観察の結果では、ZOL 単独投与群および ZOL・MEL 併用投与群では、VC 群と比較し、骨幹端に骨梁の添加がみられた (図 2-D 上段列および中段列)。MEL 単独投与群の骨髓内には、VC 群と比較し長径 50 から 200 μ m の大きさの円形もしくは類円形の空隙が多数みられた (図 2-D 下段列)。大腿骨骨髓中の造血幹細胞数をフローサイトメトリーにて計測を行った結果、ZOL 単独投与群では VC 群と比較し、造血幹細胞数が増加していた。また、MEL 単独投与群および ZOL・MEL 併用投与群では、VC 群と比較して造血幹細胞数が減少していた (図 2-E)。

2. 顎骨の観察

抜歯 2 週後にマウスを屠殺し抜歯窩の状態を確認した。VC 群、ZOL 単独投与群および MEL 単独投与群のマウス全てにおいて、抜歯窩は口腔粘膜上皮で閉鎖されていた (図 3-A)。一方、ZOL・MEL 併用投与群では、7 匹中 4 匹のマウスでは、抜歯窩が口腔粘膜上皮で閉鎖されていたが、7 匹中 3 匹のマウスにおいて抜歯窩は閉鎖されず顎骨露出が認められた (図 3-A 赤線、図 3-C)。 μ CT の画像では、ZOL 単独投与群と VC 群間では、骨密度の増加が認められたものの、全骨体積、骨梁体積を統計学的に検討したところ、差は認められなかった。(図 3-B、図 3-D、図 3-E)。MEL 単独投与群および ZOL・MEL 併用投与群では、VC 群およ

び ZOL 単独投与群と比較し、骨梁体積が有意に減少していた (図 3-E)。全骨体積と骨梁体積の両方の項目において、有意差が確認されたのは、MEL 単独投与群に対して ZOL 単独投与群のみであった (図 3-D、図 3-E)。VC 群と ZOL 単独投与群では、抜歯窩に新生骨の CT 像が確認されるのに対し、MEL 単独投与群と ZOL・MEL 併用投与群では、抜歯窩に新生骨はほとんど確認されなかった (図 3-B)。MEL 単独投与群と ZOL・MEL 併用投与群において、骨梁体積が減少している理由は、抜歯窩における新生骨の量が影響したものと思われる。

H. E. 染色による組織学的観察の結果では、VC 群および ZOL 単独投与群では、抜歯窩に新生骨が確認された。しかし、MEL 単独投与群および ZOL・MEL 併用投与群では、抜歯窩には新生骨が僅かに確認される程度か全く新生骨が確認されなかった。VC 群および ZOL 単独投与群、MEL 単独投与群では、抜歯窩周囲のすべての骨小腔内に骨細胞が残存していたのに対して、ZOL・MEL 併用投与群では、抜歯窩周囲の骨小腔内の骨細胞は一部の範囲で消失していた (図 4-A)。また、ZOL・MEL 併用投与群に対して、上皮が被覆したマウスと被覆しなかったマウスについて、骨細胞が喪失している骨小腔の範囲および個数を比較したところ、有意差は確認されなかった (図 4-B、図 4-C)。

2. 末梢血液および脾臓細胞のフローサイトメトリー分析

末梢血 (図 5、図 7) および脾臓細胞 (図 6) のフローサイトメトリー分析の結果を図に示す。末梢血の CD8 陽性細胞数は、リンパ球区画における CD8 陽性細胞の割合で示した。VC 群は $10.3 \pm 2.5\%$ であったのに対し、ZOL 単独投与群では 16.0 ± 2.5 と有意に増加していたが、MEL 単独投与群 ($7.3 \pm 1.9\%$) および ZOL・MEL 併用投与群 ($6.2 \pm 2.5\%$) では、VC 群と比較して有意差はみられなかった (図 5-A、図 5-B)。

CD4 陽性細胞数は、VC 群 ($17.4 \pm 1.6\%$) と比較して、CD8 陽性細胞と同様に ZOL 単独投与群 ($21.6 \pm 3.9\%$) では有意に増加していた (図 5-A、図 5-C)。一方、MEL 単独投与群 ($11.6 \pm 2.7\%$) および ZOL・MEL 併用投与群 ($7.8 \pm 3.3\%$) では、VC 群と比較し有意に減少していた (図 5-C)。

一方、脾臓の Treg 細胞数の変化は、CD4 陽性細胞の区画における CD25 および Foxp3 ダブルポジティブの細胞数を割合で示した。VC 群における Treg 細胞数は ($16.4 \pm 2.6\%$) であったのに対し、ZOL 単独投与群 (20.6 ± 4.3)、MEL 単独投与群 ($12.3 \pm 1.4\%$) と有意差はみられなかった。しかし、ZOL・MEL 併用投与群 ($9.9 \pm 0.8\%$) は、VC 群と比較して有意に減少していた (図 6-A、図 6-B)。

$\gamma \delta$ T 細胞数はリンパ球区画における CD3 および TCR $\gamma \delta$ ダブルポジティブの細胞数を割合で示した。VC 群では $0.61 \pm 0.13\%$ であったのに対して、ZOL 単独

投与群 ($0.98 \pm 0.15\%$) と ZOL・MEL 併用投与群 ($1.05 \pm 0.20\%$) と有意に増加していた (図 7-A、図 7-B)。

3. Treg 細胞移植後の変化

図 8 に ZOL・MEL 併用投与し Treg 細胞を移植した群の H.E. 染色による組織像とその解析結果、 μ CT 像、末梢血および脾臓細胞のフローサイトメトリー分析の結果を示す。Treg 移植群では全てのマウスの抜歯部位の上皮は被覆されていた。H.E. 染色による組織学的観察の結果では、ZOL・MEL 併用投与群においては抜歯窩に僅かな新生骨を認めたのに対し (図 4-A 黄色破線)、Treg 細胞移植群では抜歯窩に新生骨がみられた (図 8-A 黄色破線)。また、顎骨部には骨細胞が喪失している骨小腔が観察された (図 8-A 左青枠および右赤破線)。顎骨壊死面積率および骨細胞が喪失している骨小腔の数は ZOL・MEL 併用投与群と比較して有意に減少していた (図 8-C、図 8-D)。Treg 細胞移植群における抜歯部位を μ CT で観察したところ、抜歯窩に新生骨と思われる CT 像が確認された (図 8-B)。

フローサイトメトリーの解析では、末梢血中の CD8 陽性細胞は各群において有意差はみられなかった (図 8-E)。一方、CD4 陽性細胞は ZOL・MEL 併用投与群で減少していた CD4 陽性細胞は Treg 移植群では、VC 群の値まで改善していた (図 8-F)。脾臓中の Treg 細胞数 ($20.8 \pm 1.8\%$) は、ZOL・MEL 併用投与群と比較して有意に増加しており、VC 群の値まで改善していた (図 8-G)。 $\gamma \delta$ T 細胞数は、ZOL・MEL 併用投与群と比較して $0.56 \pm 0.33\%$ と、有意に減少していた (図 8-H)。

考察

1. MRONJ 発症マウス作製について

MRONJ の発症は、多発性骨髄腫または乳癌などの骨転移性腫瘍の治療に用いられる ZOL 服用患者において最も頻度が高いことが報告されている¹⁶⁾。ZOL 服用患者は、一般的に高齢者であり、化学療法剤、副腎皮質ステロイドもしくは免疫抑制剤で治療されていることが多い。そのため、これまで報告されている MRONJ 発症マウスは、ZOL の投与に加え、ステロイド剤あるいは化学療法剤が併用されているか、免疫機能に異常がある遺伝子操作マウスが用いられている (表 1)。本研究では、MRONJ を発症させるために、野生型マウスである C57BL/6J に対して、MRONJ の原因となる代表的な薬剤である ZOL と化学療法剤である MEL の併用投与を行った。また、報告されている MRONJ 発症マウスでは、ZOL は尾静脈からの静脈内投与が行われているが、予備実験において腹腔内投与を行っても骨吸収抑制効果があることを確認したため、ZOL を含めた全ての薬剤は腹腔内投与を行った。報告にあるすべての MRONJ 発症マウスは、抜歯後も屠殺するまで期間、薬

剤の投与は継続されているが（表1）、本研究では抜歯後の治癒過程における薬剤の影響を回避するため、すべての薬剤の投与は抜歯直前までに終了し、抜歯後には薬剤の投与は行わなかった。Parkらの研究において¹²⁾、抜歯部位における潰瘍の範囲は抜歯2週間まで拡大し、その後、縮小したと報告していることから、本研究においても抜歯2週後に解析を行った。本実験の結果、ZOL単独投与群とMEL単独投与群の全てのマウスでは、抜歯窩は口腔粘膜上皮で被覆されており、 μ CT画像および組織切片の所見では、抜歯窩に新生骨が再生していることが確認された（図3-A、図3-B）。一方、ZOLおよびMEL併用投与群では一部のマウスにおいて、顎骨が露出していた。顎骨露出を起こしていたマウスは7匹中3匹であり、4匹のマウスで抜歯窩が閉鎖していた。顎骨露出の範囲については、Kikuriら⁶⁾やZhangら⁸⁾の報告では抜歯を行った臼歯とほぼ同じ大きさの顎骨が露出しているのに対し、本実験における顎骨露出していた3匹のマウスにおいては、骨露出は抜歯窩の一部であり、これまでの報告に比べて縮小していた。顎骨露出の範囲が限局的であったことは、抜歯後に投薬を行っていないことがその理由の一つであると推測される。ZOLは上皮細胞の遊走阻害作用を有することが報告されている¹⁷⁾。上皮閉鎖について、ZOL単独投与群ではすべてのマウスで上皮が閉鎖している一方、ZOL・MEL併用投与群においてはじめて上皮閉鎖不全が発症した。MELの上皮細胞への影響については今回の実験では検証していないが、上皮閉鎖不全においても、Treg細胞と γ δ T細胞の双方の相互作用が影響して発症している可能性もあり、今後の検討が必要である。ZOL・MEL併用投与群では抜歯窩が閉鎖したマウスにおいても、顎骨の組織像を解析したところ、抜歯窩周囲では骨細胞が喪失した骨小腔が多数観察された。さらに骨細胞が喪失している骨小腔の範囲は、顎骨露出しているマウスと比較して有意差はみられなかった（図4-B、図4-C）。抜歯窩が閉鎖したマウスにおいても顎骨内で骨小腔内の骨細胞の喪失という典型的なMRONJが観察されたことから、上皮が閉鎖したとしても組織学的には顎骨内でMRONJ症状が進行していることが明らかになった。臨床においても顎骨露出はないが疼痛などのMRONJ症状を訴える場合があり、そのため2014年の米国口腔顎顔面外科学会のポジションペーパーでは、骨露出はないがMRONJ症状を呈する症例をステージ0と診断するよう提唱している⁵⁾。また、Fedeleらは、ステージ0と診断された症例の半分近くが顎骨露出へと進展すると報告していることから¹⁸⁾、本研究で作製したMRONJ発症マウスは、ヒトのMRONJを解析するうえで適切なモデルであったと考えられる。

2. 発症機序について

MRONJ発症機序の仮説として、破骨細胞抑制による骨組織リモデリングの異常、血管新生の抑制による血流低下、免疫機能の低下、上皮細胞の増殖・遊走阻害、

口腔内細菌による持続的な感染などの様々な仮説が挙げられている¹⁹⁾。本実験では、ZOL・MELを併用した場合のみMRONJが発症していた。このことから、本実験におけるMRONJ発症には、MELによる薬理作用が付加要因として強く関与している可能性が示唆された。MELは、DNAのアルキル基に結合することで、細胞分裂を阻害する抗悪性腫瘍薬であり、また、強い骨髄機能抑制作用を有する。我々は、MELの骨髄抑制作用がMRONJ発症の付加要因であるという仮説のもと、骨髄機能不全によって引き起こされる免疫機能低下に焦点を当て検索を行った。多発性骨髄腫は形質細胞に生じる血液悪性腫瘍であり、治療としてMEL・プレドニゾン併用による薬物療法が行われている。また、多発性骨髄腫は、溶解性骨病変が伴うことが知られている。そのため、多発性骨髄腫の溶解性骨病変に対する標準薬としてBP製剤が服用されていることが多いことから、多発性骨髄腫罹患患者はMRONJが高頻度で発症することが報告されている。本研究におけるマウスを用いた実験結果から、ヒトにおける多発性骨髄腫のMRONJの発症にも、MELが誘発因子として関与している可能性が高いと推測される。末梢血および脾臓中のリンパ球の状態についてフローサイトメトリー分析を行ったところ、MEL投与群ではCD4陽性細胞、特にTreg細胞の減少が明らかになった(図5-C、図6-B)。このTreg細胞の減少は、骨髄内の骨梁の減少と骨髄組織中に円形もしくは類円形の空隙が多数にみられていることから、この骨髄内の形態的变化とTreg細胞の減少と関連性があると推測された(図2-D)。Treg細胞は、自己免疫疾患や感染性微生物に対する急性炎症などの生体防御応答を含めた様々な過剰な免疫応答を負に制御することにより、自己免疫寛容と免疫恒常性の維持に必須な役割を担っている²⁰⁾。Kikuriらは、免疫不全マウスを用いて、Treg細胞の欠損による免疫機能の破綻がMRONJ発症の誘因であると報告している⁶⁾。また、Zhangらは、糖尿病発症マウスを用いた実験で、自然免疫機構による炎症応答に重要なタンパク質であるインフラマソームの活性化がMRONJ症状を増悪すると報告している⁸⁾。いずれの報告も、MRONJ発症は、免疫応答の不均衡によって引き起こされている可能性が高いことを明らかにしており、本実験におけるMRONJ発症には、骨髄抑制に起因するTreg細胞の減少が関与しているという仮説と相違するものではないと思われる。一方、MEL単独投与群においても、ZOL・MEL併用投与群と同様に、Treg細胞が減少しているが、MRONJ発症は確認されなかった。以上の実験結果から、MRONJは、Treg細胞の減少に加えて、ZOLにより刺激された $\gamma\delta$ T細胞の増殖・活性化により発症していると推察された。Treg細胞が標的とする免疫細胞の一つに、 $\gamma\delta$ T細胞がある。 $\gamma\delta$ T細胞は、感染早期の防御機構に関わり、活性化した $\gamma\delta$ T細胞は細胞障害性を示すことが知られている²⁰⁾。Treg細胞は活性化した $\gamma\delta$ T細胞に対して抑制的に作用することで、活性化した $\gamma\delta$ T細胞が引き起こす細胞障害を沈静化することで、組織の恒常性を維持している²¹⁾。 $\gamma\delta$

T細胞は、 γ 鎖と δ 鎖からなるT細胞受容体を持つCD4・CD8ダブルネガティブのT細胞亜集団であり、T細胞の大部分を占める $\alpha\beta$ T細胞とは異なる機能を有している²²⁾。 $\gamma\delta$ T細胞は主として外界と接する皮膚や腸管、子宮、肺などに分布し、細菌による感染の際に、感染初期防御に働くことが知られている²³⁾。BP製剤との関連性については、 $\gamma\delta$ T細胞をZOLで刺激培養すると、増殖・活性化することが報告されており、悪性腫瘍に対する免疫細胞治療に応用されている²⁴⁾。また、自己免疫疾患の一つである関節リウマチの発症は、活性化した $\gamma\delta$ T細胞が病因となっていることが報告されている^{13, 14)}。そこで $\gamma\delta$ T細胞の動態についてフローサイトメトリー分析を行ったところ、ZOL単独投与群ではZOLの作用と推測される $\gamma\delta$ T細胞の増加が確認された（図7-B）。一方、MEL単独投与群では、 $\gamma\delta$ T細胞は有意に減少していた。しかし、ZOL・MEL併用投与群では、Treg細胞が減少しているにもかかわらず、 $\gamma\delta$ T細胞数はVC群が $0.6 \pm 0.1\%$ であったのに対して $1.0 \pm 0.2\%$ へと有意に増加していることが判明した（図7-B）。これは、MELによる骨髄抑制によって減少していた僅かな $\gamma\delta$ T細胞がZOLに感作し、増加したものと考えられる。本実験においてZOL・MEL併用投与群のみに顎骨露出というMRONJ症状が発現している事象は、ZOL・MEL併用投与群においてTreg細胞の減少と $\gamma\delta$ T細胞の増加という双方の結果が強く関わっているものと推測された。さらに、ZOL・MEL併用投与群に対して、健全マウスから採取したTreg細胞を尾静脈から移植したところ、MRONJ様症状は改善されていた。つまり、外部から移植したTreg細胞が正常に機能したことで、 $\gamma\delta$ T細胞による過剰な免疫応答が抑制され、MRONJの発症が緩和されたものと考えられる。本実験においても、MRONJ様症状を発症したマウスでは、 $\gamma\delta$ T細胞が増加・活性化した状況で拔牙を行ったことで、 $\gamma\delta$ T細胞による過剰な炎症反応の亢進とTreg細胞による抑制機構の減弱によりMRONJが引き起こされたものと考えられる。Treg細胞の移植によってMRONJ様症状が軽症化したことから、Treg細胞は、 $\gamma\delta$ T細胞の細胞障害活性に対して負の制御を行うことでMRONJの発症を抑える重要な役割を果たしていると推測される。つまり、ZOLによるMRONJは、Treg細胞に対して相対的に $\gamma\delta$ T細胞が優位な状態で拔牙を行った結果、Treg細胞の機能不全によって $\gamma\delta$ T細胞による不要な免疫応答が亢進し、拔牙窩周囲の正常な骨細胞が攻撃され最終的に壊死することで発症すると考えられる。 $\gamma\delta$ T細胞はIL-17やINF- γ などの炎症性サイトカインを産生することから、ZOL・MEL併用投与群においても $\gamma\delta$ T細胞から放出されたサイトカインが骨細胞の壊死を誘導されたものと推測される。また、骨細胞は骨基質中で細胞間ネットワークを形成していることから、この骨細胞ネットワークを介してサイトカインが骨基質中の細胞間ネットワークを介して、骨細胞の壊死が顎骨内に波及したものと推測される。

拔牙窩の治癒評価については、拔牙窩に再生している骨梁を解析することが

重要となる。 μ CT 3次元骨形態計測の結果、MEL単独投与群とZOL・MEL併用投与群では、VC群およびZOL単独投与群と比較して有意に骨梁体積が減少していた（図3-E）。 μ CTの結果から、MEL単独投与群とZOL・MEL併用投与群では、抜歯窩の治癒不全あるいは遅延が生じており、これは、H.E.染色による組織像と一致した結果を示すものであった（図4-A）。本実験における抜歯窩の治癒不全・遅延は、MELによる影響が強く作用している可能性が推測される。つまり、骨の再生は、骨髓中に存在している間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞が重要な役割を果たしていることから、本実験における抜歯窩の治癒不全・遅延は、MELによる骨髓抑制がその原因のひとつとして関与している可能性は高いと思われる。また大腿骨に対する μ CTによる計測では、MEL単独投与群ではZOL単独投与群と比較し、全骨体積と骨梁体積が減少していた。幹細胞の維持には、ニッチと呼ばれる微小環境が必要である。造血幹細胞におけるニッチとして、骨表面の骨芽細胞性ニッチと血管周囲の血管性ニッチの二つのニッチが同定されている^{25, 26)}。特に、細胞周期が静止期にある造血幹細胞は骨芽細胞と接着して存在していることから、骨髓内の造血幹細胞の維持には、骨芽細胞との細胞接触が重要である²⁷⁾。本研究において、MEL単独投与群にみられた全骨体積と骨梁体積の減少は、骨芽細胞性ニッチの構築の低下を引き起こしている可能性があり、MEL単独投与群における造血幹細胞数減少の原因となっている可能性が考えられる（図2-E）。しかし、ZOL・MEL併用投与群では、VC群と比較して全骨体積と骨梁体積に有意差がないのにもかかわらず、造血幹細胞数が減少していた（図2-E）。以上の結果から、造血幹細胞数の減少は、単にMELの副作用によるものなのか、造血幹細胞ニッチを介して起きていることなのか、さらなる検討が必要だと思われる。

興味深いことに、MEL単独投与群の全てのマウスでは、上皮が被覆していたことから、抜歯窩の治癒不全・遅延と上皮の被覆とは、密接な関連性はないと示唆される。一方、ZOL・MEL併用投与群のみで、骨細胞の喪失という典型的な骨壊死の所見と上皮の被覆不全に伴う顎骨露出を併発していた。しかし、ZOL・MEL併用投与群の半数以上のマウスでは、骨細胞が喪失しているのにも関わらず上皮が被覆していることから、骨壊死と上皮の被覆との関連性については直接の因果関係は低いと推測される。しかし、本研究では、上皮が被覆せず顎骨が露出したことについての作用機序についての実験をおこなっていないことから、骨壊死と上皮の被覆との関連性についてはさらなる検証が必要であると思われる。

3. Treg 細胞移植による MRONJ 症状の変化について

MRONJ を発症する ZOL・MEL 併用投与群に対して健全マウスから採取した Treg 細胞を移植した所、末梢血中の CD4 陽性細胞数は増加していたが(図 8-E)、CD8 陽性細胞数に増減は認められなかった(図 8-F)。移植した Treg 細胞は、磁気細胞分離法によって CD4 陽性および CD25 陽性細胞を選択的に採取したためであり、移植した細胞が移植群の末梢血で機能していることを示唆する結果と推測される。Treg 細胞移植群では Treg 細胞の値が VC 群の値まで回復し、 γ δ T 細胞の値は VC 群の値まで低減していた(図 8-F~H)。さらに Treg 細胞移植群では、MRONJ 症状が軽症化しており、この MRONJ 症状の軽症化は Treg 細胞移植によって Treg 細胞と γ δ T 細胞の不均衡が改善されたことによる可能性が高いと思われる。MRONJ 発症において、Treg 細胞と γ δ T 細胞の免疫応答についてさらに詳細に検討する必要があるが、Treg 細胞移植による免疫治療が MRONJ の治療に有効であることが示唆された。

4. 結語

骨吸収抑制剤は多発性骨髄腫や癌の骨転移に対する骨関連症状を改善し患者の QOL の改善に重要な薬剤である。近年の高齢化社会において国内だけでも約 1300 万人と推定される骨粗鬆症患者の多くが何らかの骨吸収抑制剤を服用していることから、これら薬剤の副作用である MRONJ の発生は今後さらに重大な問題となることが予想される。骨吸収抑制剤服用者に対して事前に MRONJ 発症の危険度を診断することで、不要な MRONJ の発症を防ぐことが出来る。ヒトの MRONJ も本研究で明らかにした作用機序で同じ機序で発症しているなら、エビデンスに基づいた診断法を確立することが可能である。そのためには、実際に MRONJ を発症している患者の Treg 細胞と γ δ T 細胞の動態を検討する必要がある。また、Treg 細胞移植による免疫治療が MRONJ の予防に有効であることが示唆されたことから、さらに臨床応用に向けての研究が必要であると思われる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に御援助、御協力いただきました北海道大学大学院歯学研究院口腔病態学分野口腔診断内科学教室ならびに細胞分子薬理学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Marx RE : Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg 61 : 1115-1117, 2003.
- 2) 浦出雅裕 : ビスフォスフォホネート治療による顎骨壊死発症の現状、日口外誌 156 : 292-297, 2010.
- 3) Saad F : Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active- controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. Ann Oncol 23 : 1341-1347, 2012.
- 4) Aragon-Ching JB, Ning YM, Chen CC, Latham L, Guadagnini JP, Gulley JL, Arlen PM, Wright JJ, Parnes H, Figg WD, Dahut WL : Higher incidence of osteonecrosis of the jaw (ONJ) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer treated with antiangiogenic agents. Cancer Invest 27 : 221-226, 2009.
- 5) Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F : American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw-2014 Update. J Oral Maxillofac Surg 72 : 1938-1956, 2014.
- 6) Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, Chen C, Chen W, Wang S, Le AD, Shi S : Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. J Bone Miner Res 25 : 1668-1679, 2010.
- 7) Bi Y, Gao Y, Ehrichtiou D, Cao C, Kikuri T, Le A, Shi S, Zhang L : Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. Am J Pathol 177 : 280-290, 2010.
- 8) Zhang Q, Yu W, Lee S, Xu Q, Naji A, Le AD : Bisphosphonate Induces Osteonecrosis of the Jaw in Diabetic Mice via NLRP3/Caspase-1-Dependent IL-1 β Mechanism. J Bone Miner Res 30 : 2300-2312, 2015.
- 9) Akita Y, Kuroshima S, Nakajima K, Hayano H, Kanai R, Sasaki M, Sawase T : Effect of anti-angiogenesis induced by chemotherapeutic monotherapy, chemotherapeutic/bisphosphonate combination therapy and anti-VEGFA mAb therapy on tooth extraction socket healing in mice. J Bone Miner Metab (in press).
- 10) Hayday, AC : γ δ T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response. Immunity 31 : 184-196, 2009.

- 11) Rossini M, Adami S, Viapiana O, Ortolani R, Vella A, Fracassi E, Gatti D : Circulating $\gamma \delta$ T cells and the risk of acute-phase response after zoledronic acid administration. *J Bone Miner Res* 27 : 227-230, 2012.
- 12) Park S, Kanayama K, Kaur K, Tseng HC, Banankhah S, Quje DT, Sayre JW, Jewett A, Nishimura I : Osteonecrosis of the jaw developed in mice: disease variants regulated by $\gamma \delta$ T cells in oral mucosal barrier immunity. *J Biol Chem* 290 : 17349-17366, 2015.
- 13) Akitsu A, Ishigame H, Kakuta S, Chung SH, Ikeda S, Shimizu K, Kubo S, Liu Y, Umemura M, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Saijo S, Iwakura Y : IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2⁺ $\gamma \delta$ T cells. *Nat Commun* 6 : 7464, 2015.
- 14) Andersson A, Grahnemo L, Engdahl C, Stubelius A, Lagerquist MK, Carlsten H, Islander U : IL-17-producing $\gamma \delta$ T cells are regulated by estrogen during development of experimental arthritis. *Clin Immunol* 161 : 324-332, 2015.
- 15) Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL : Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241 : 58-62, 1988.
- 16) Lee SH, Chan RC, Chang SS, Tan YL, Chang KH, Lee MC, Chang HE, Lee CC : Use of bisphosphonates and the risk of osteonecrosis among cancer patients: a systemic review and meta-analysis of the observational studies. *Support Care Cancer* 22 : 553-560, 2014.
- 17) Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D, Vunjak-Novakovic G, Kousteni S, Raghavan S : Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Ann NY Acad Sci* 1218 : 62-79, 2011.
- 18) Fedele S, Porter SR, D'Aiuto F, Aljohani S, Vescovi P, Manfredi M, Arduino PG, Broccoletti R, Musciotto A, Di Fede O, Lazarovici TS, Campisi G, Yarom N : Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *Am J Med* 123 : 1060-1064, 2010.
- 19) Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S, Taguchi A, Toyosawa S, Nagata T, Urade M : 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 28 : 365-383, 2010.
- 20) Sakaguchi S : Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol 22 : 531-562, 2004.
 - 20) Strominger JL : The gamma delta T cell receptor and class Ib MHC-related proteins: Enigmatic molecules of immune recognition. Cell 57 : 895-898, 1989.
 - 21) Park SG, Mathur R, Long M, Hosh N, Hao L, Hayden MS, Ghosh S : T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing $\gamma \delta$ T cells. Immunity 24 : 791-803, 2010.
 - 22) Tagawa T, Nishimura H, Yajima T, Hara H, Kishihara K, Matsuzaki G, Yoshino I, Maehara Y, Yoshikai Y : V δ 1⁺ $\gamma \delta$ T cells producing CC chemokines may bridge a gap between neutrophils and macrophages in innate immunity during *Escherichia coli* infection in mice. J Immunol 173 : 5156-5164, 2004.
 - 23) Shibata K, Yamada H, Sato T, Dejima T, Nakamura M, Ikawa T, Hara H, Yamasaki S, Kageyama R, Iwakura Y, Kawamoto H, Toh H, Yoshikai Y : Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing $\gamma \delta$ T cells. Blood 118 : 586-593, 2011.
 - 24) Dieli F, Vermijlen D, Fulfar, F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Roberts A, Buccheri S, D'Asaro M, Gebbia N, Salerno A, Eberl Matthias, Hayday AC : Targeting Human $\gamma \delta$ T Cells with Zoledronate and Interleukin-2 for Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer. Cancer Res 67 : 7450-7457, 2007.
 - 25) Chen JY, Miyanishi M, Wang SK, Yamazaki S, Sinha R, Kao KS, Seita J, Sahoo D, Nakauchi H, Weissman IL : Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. Nature 11 : 223-227, 2016.
 - 26) Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT : Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 23 : 841-846, 2003.
 - 27) Nagasawa T : The chemokine CXCL12 and regulation of HSC and B lymphocyte development in the bone marrow niche. Adv Exp Med Biol 602 : 69-75, 2007.

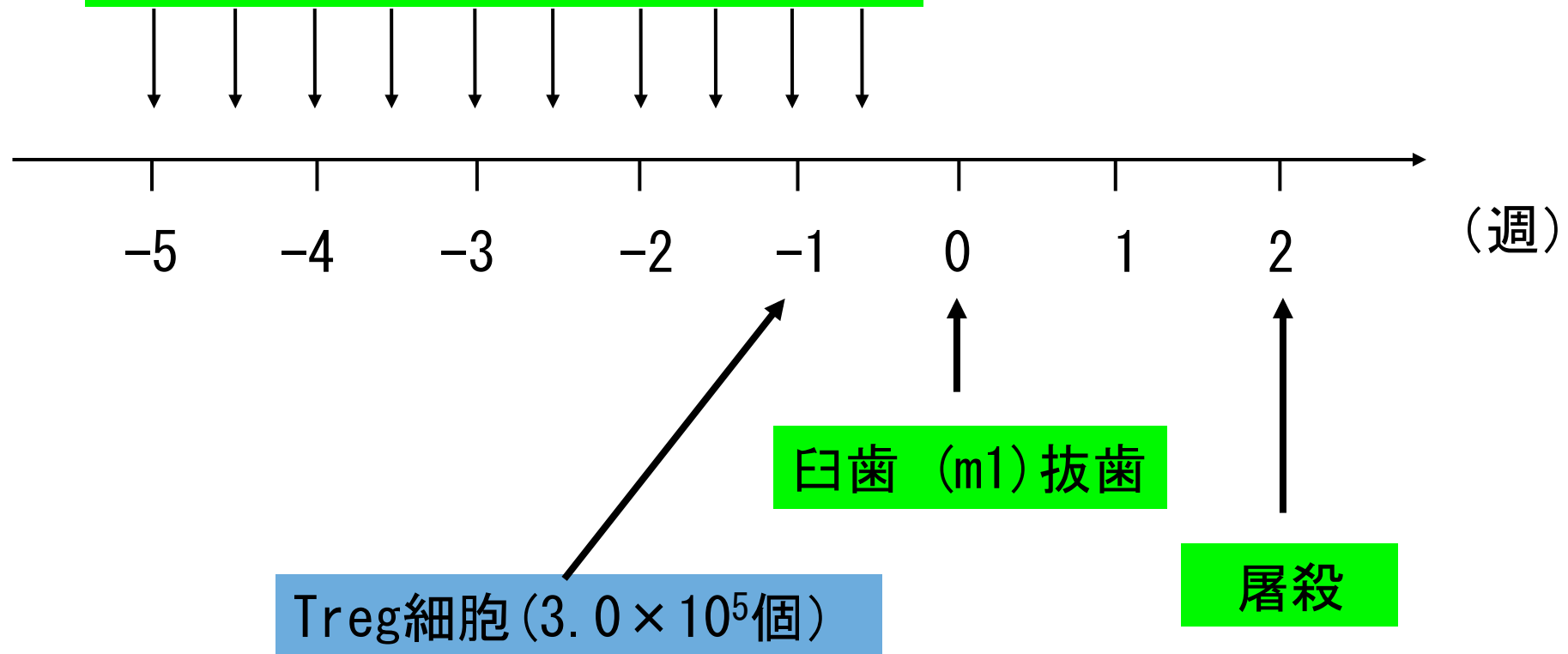
C57BL/6J 4週齡 雌

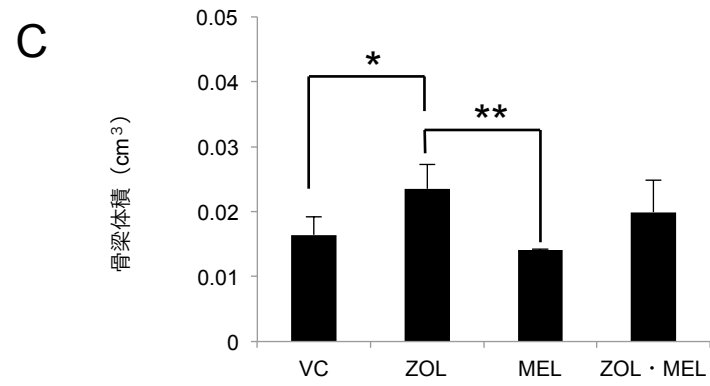
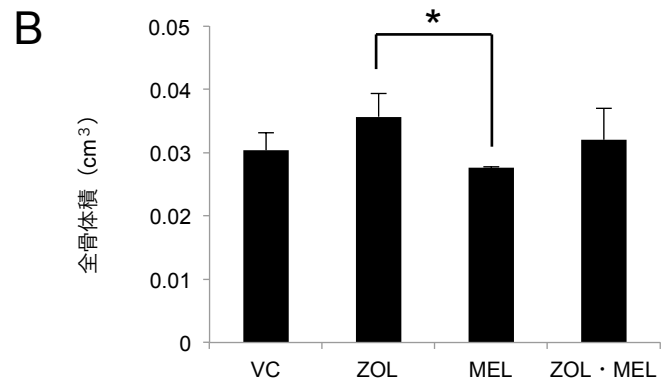
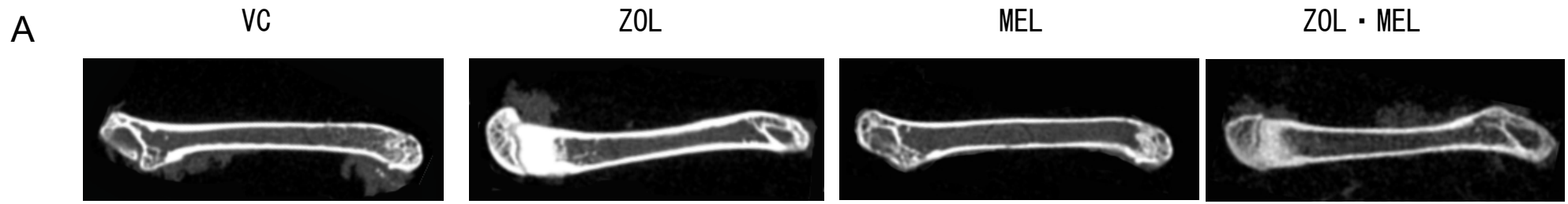
VC (生理食塩水)

ZOL (0.6mg/kg)

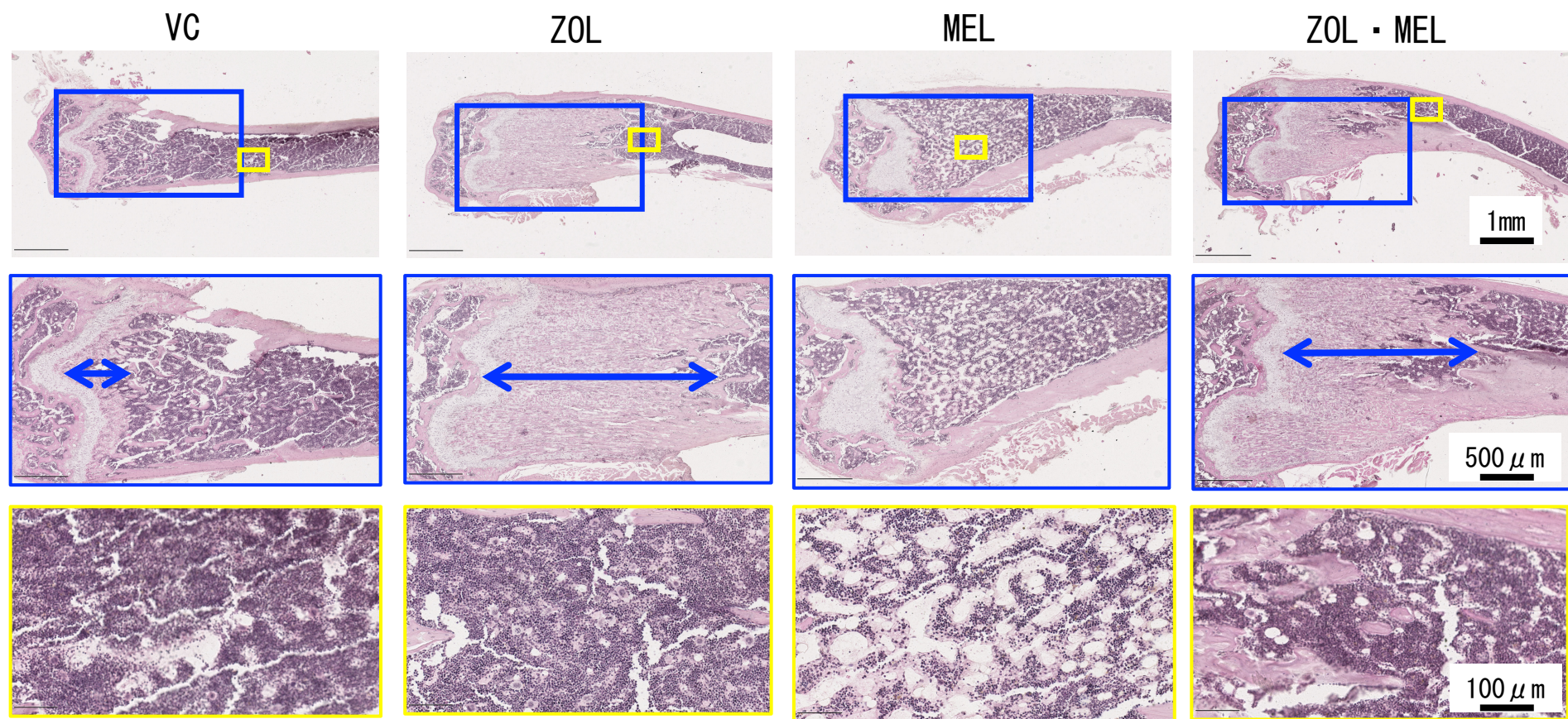
MEL (7.0mg/kg)

腹腔内投与

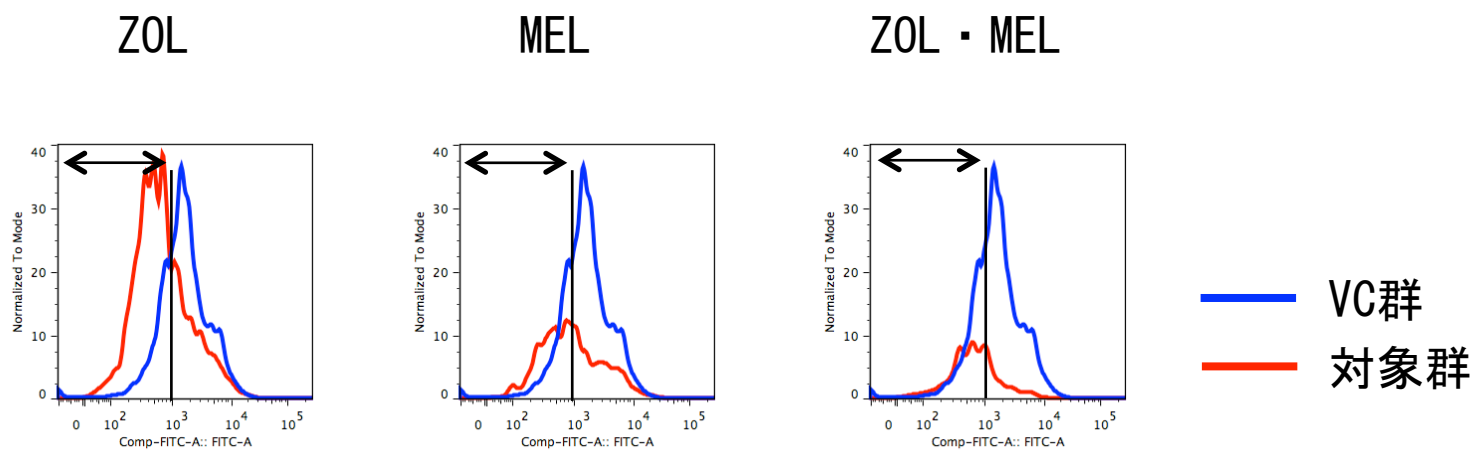
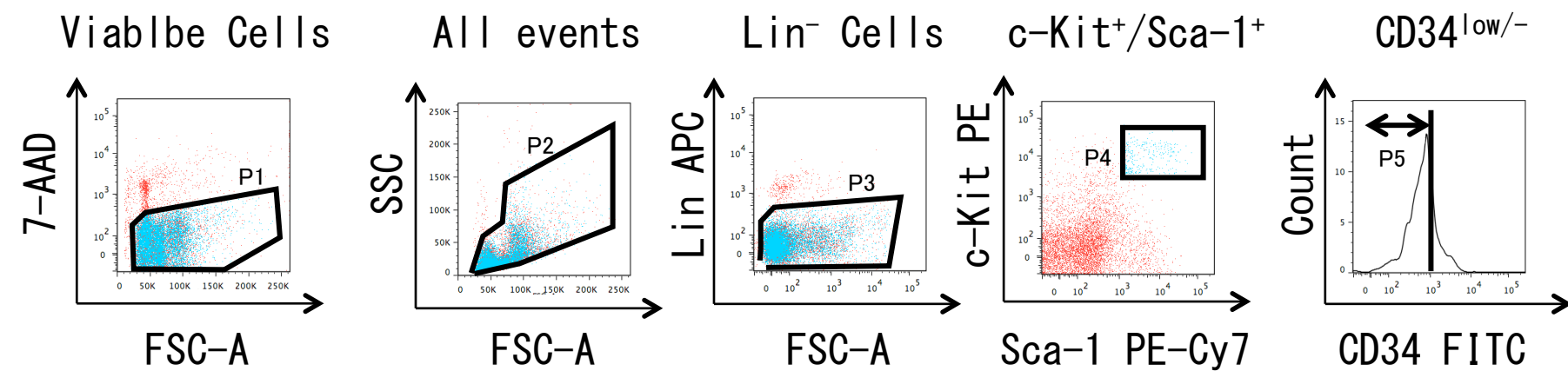


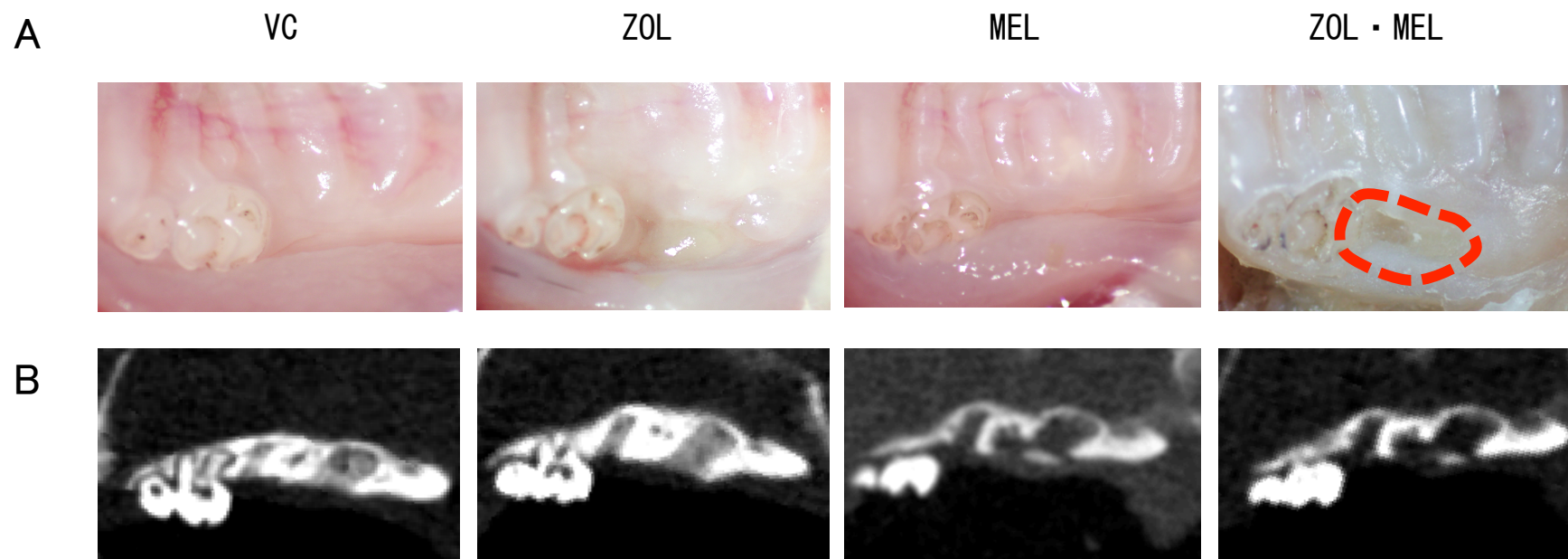


D



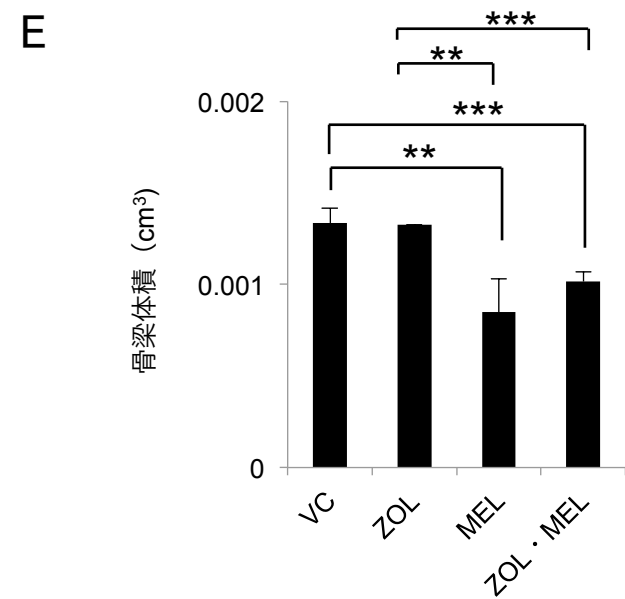
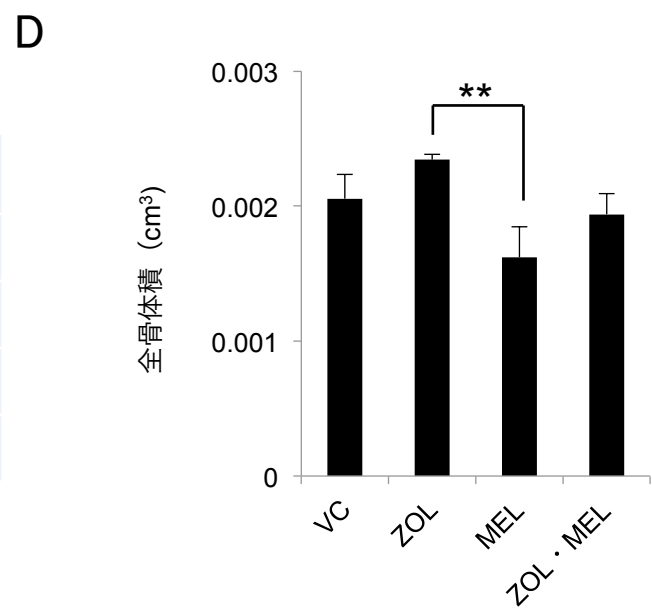
E





C

	実験に用いた マウス数	顎骨が露出した マウス数
VC	6	0
ZOL	5	0
MEL	5	0
ZOL・MEL	7	3

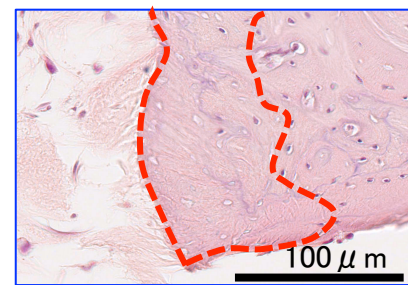
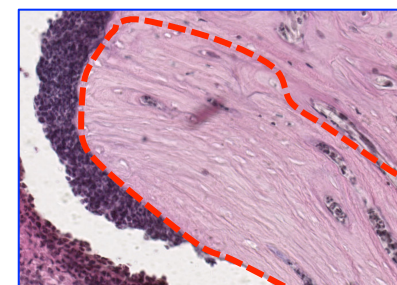
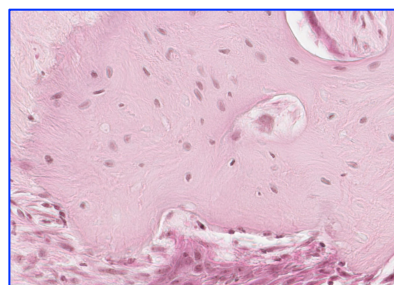
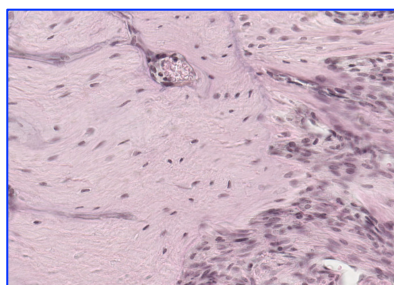
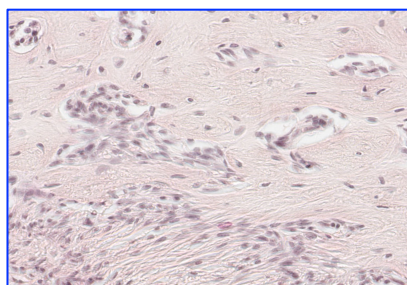
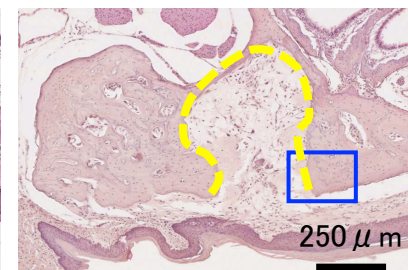
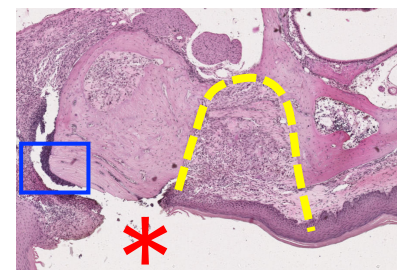
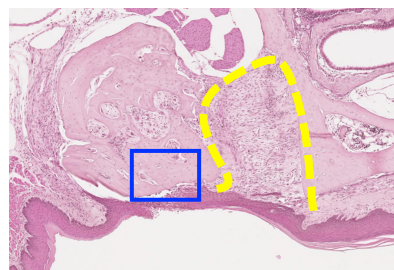
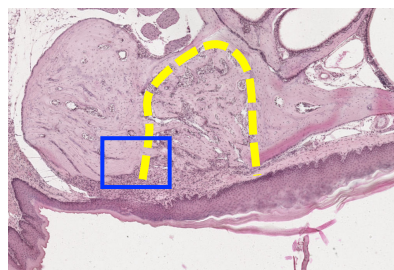
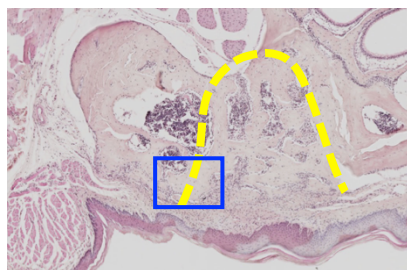


A

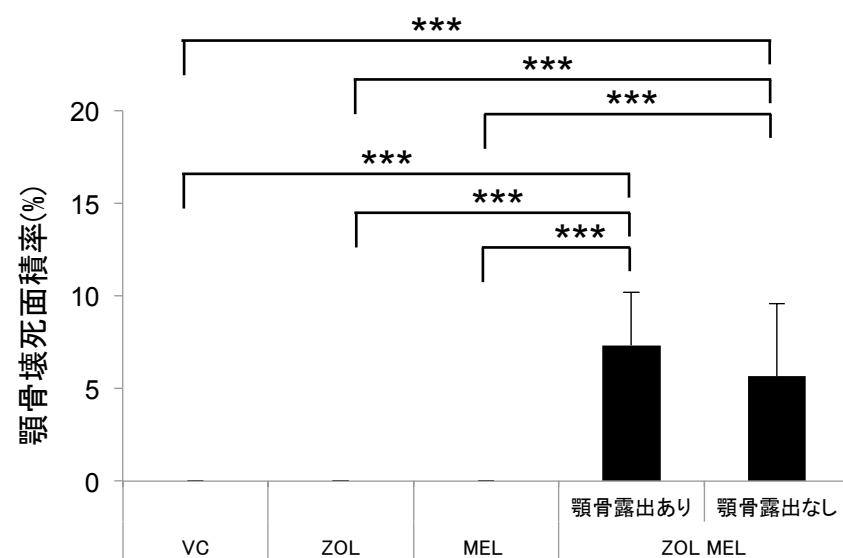
VC

ZOL

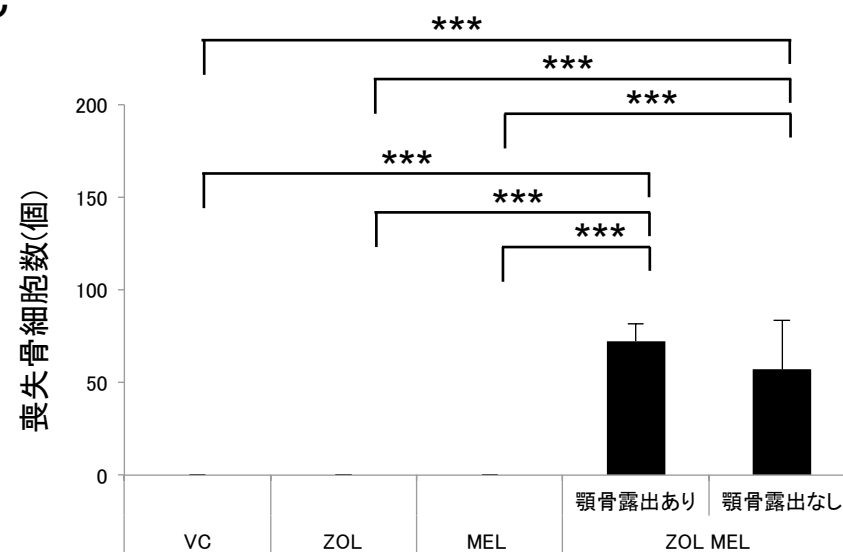
MEL

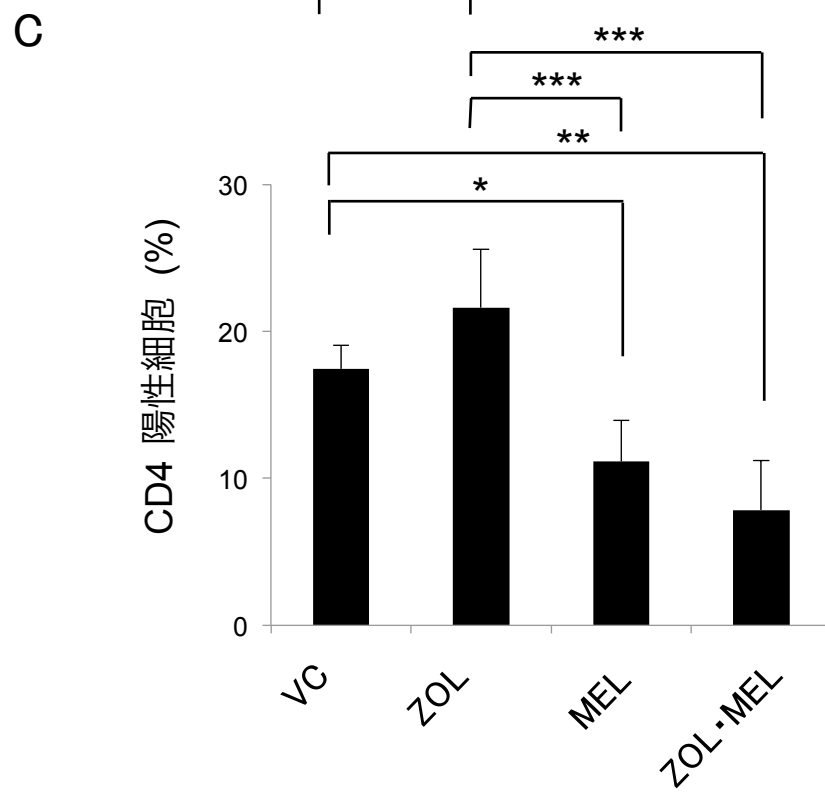
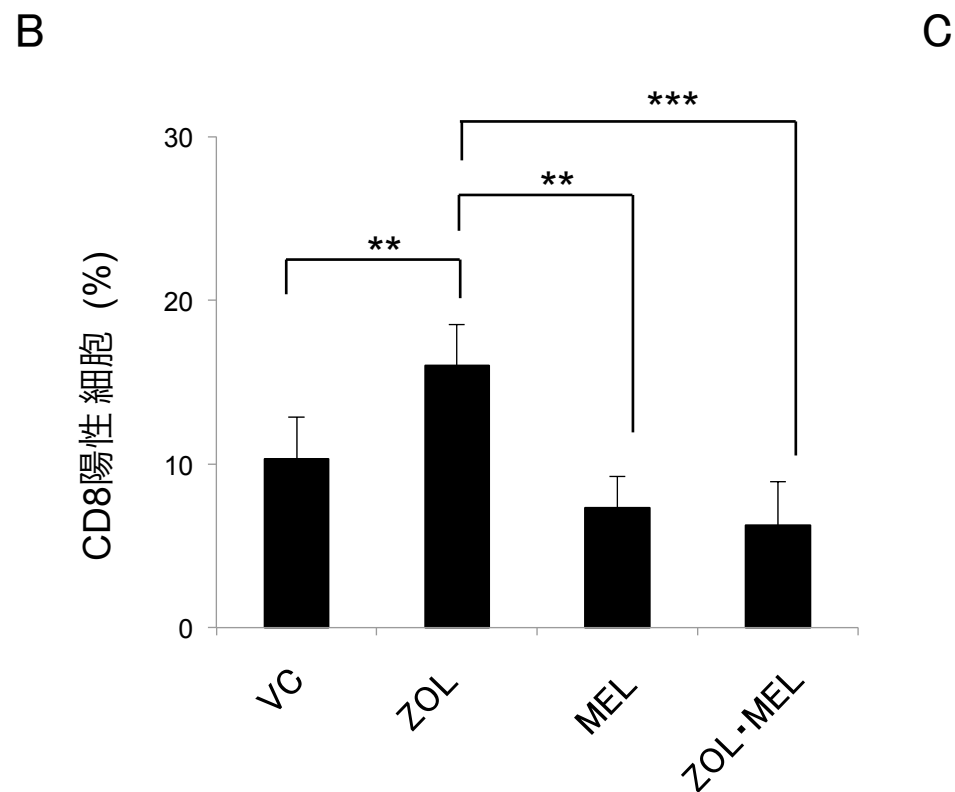
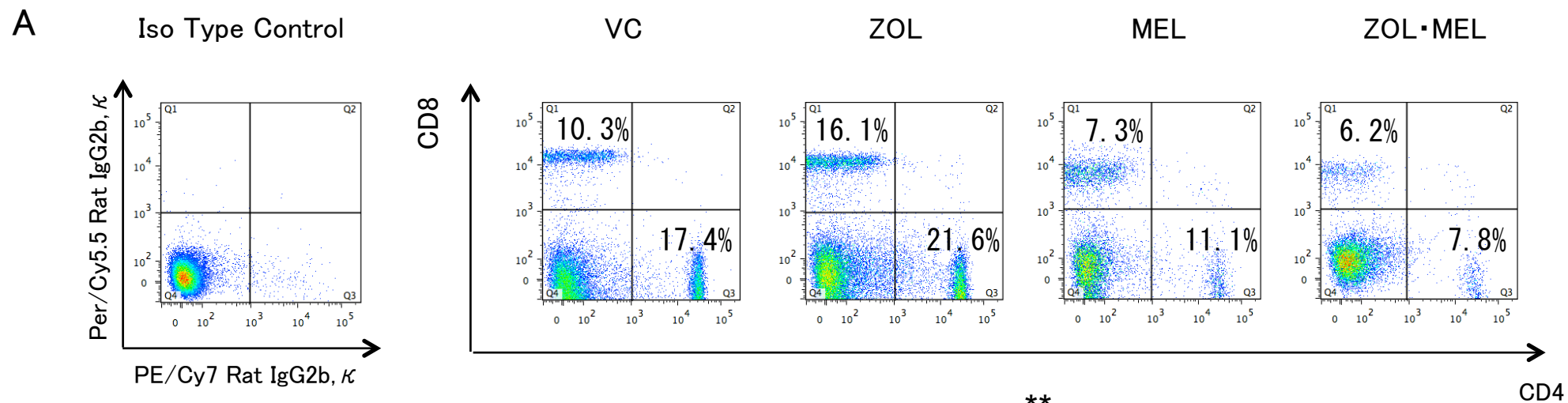
ZOL・MEL
顎骨露出ありZOL・MEL
顎骨露出なし

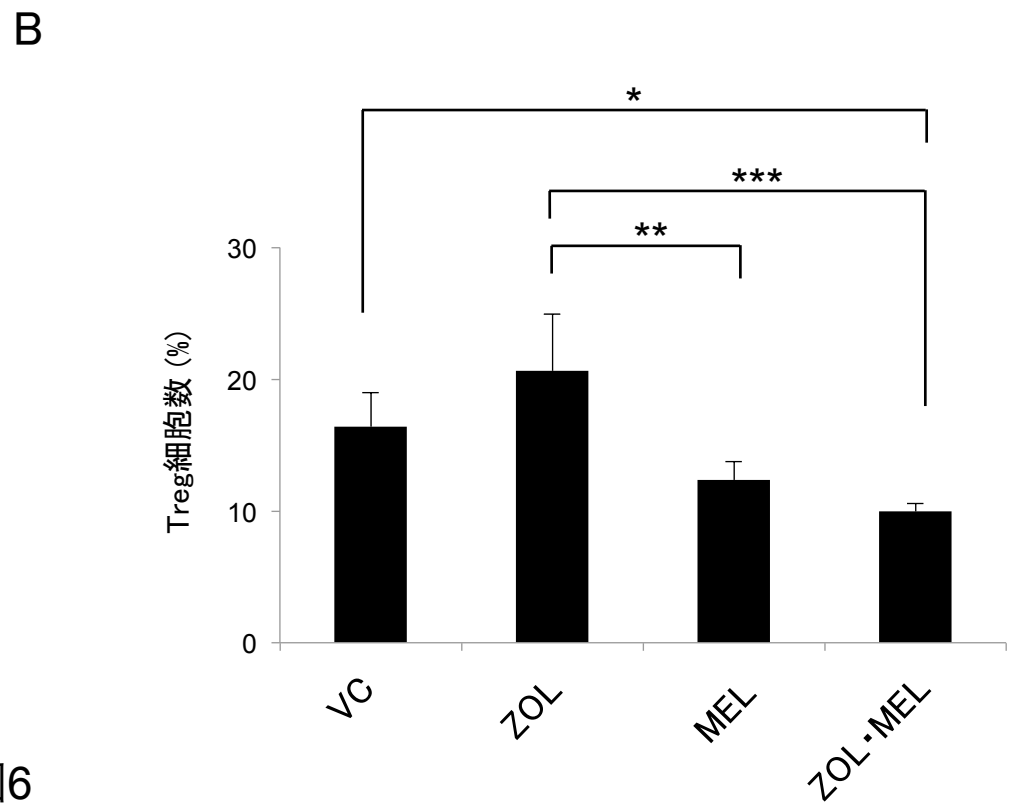
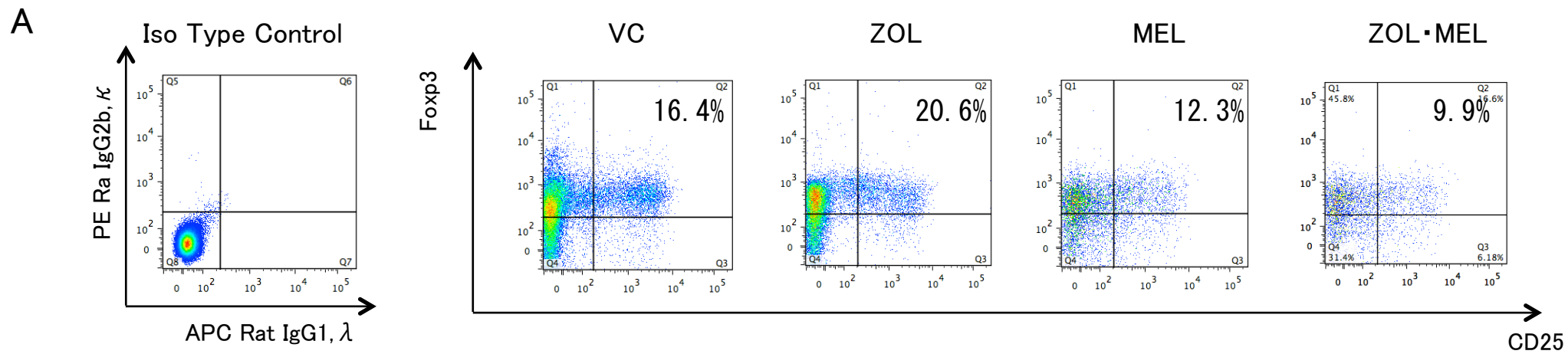
B

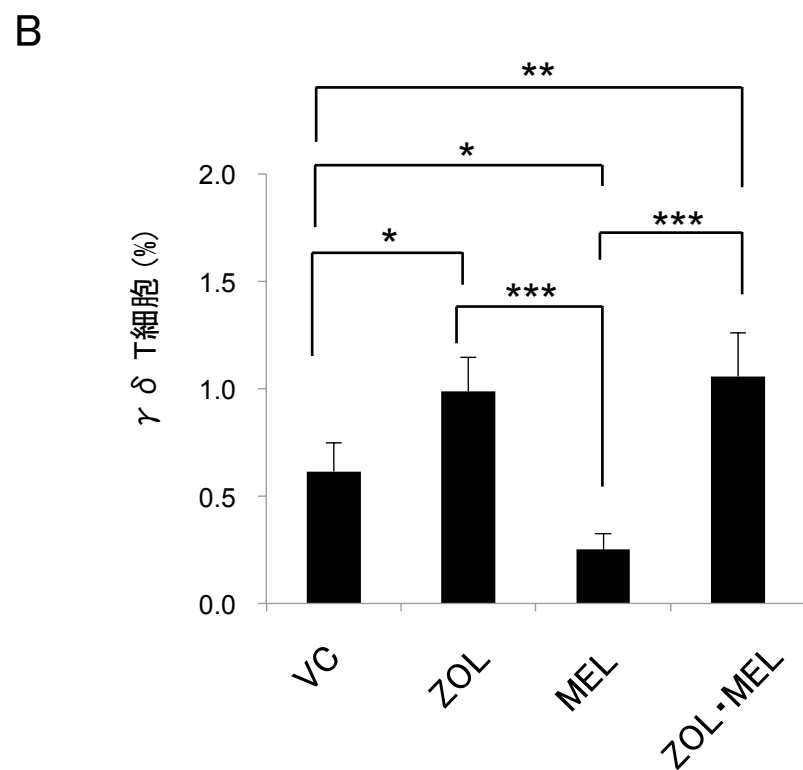
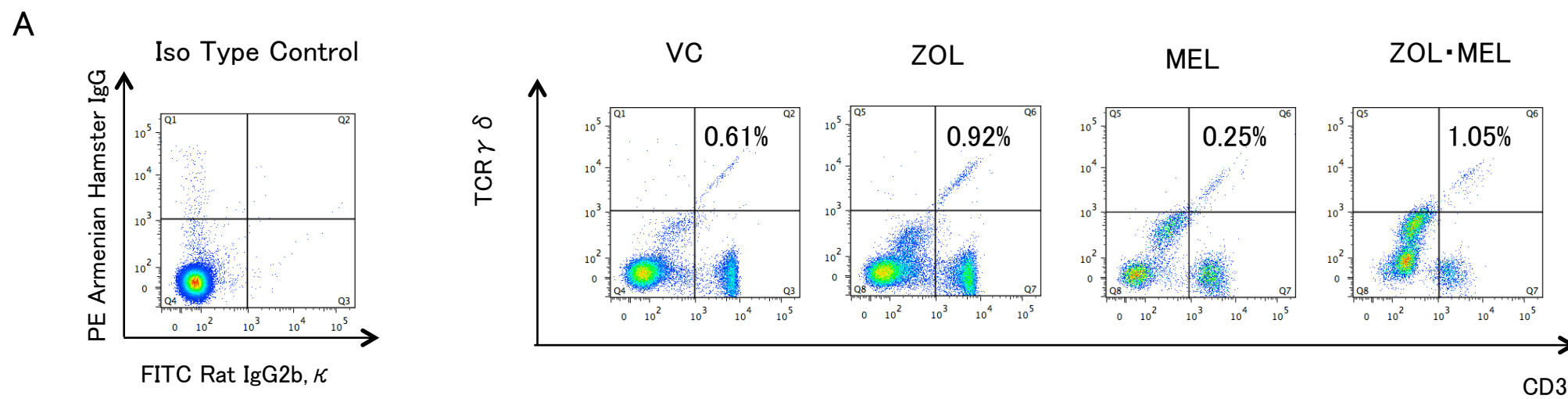


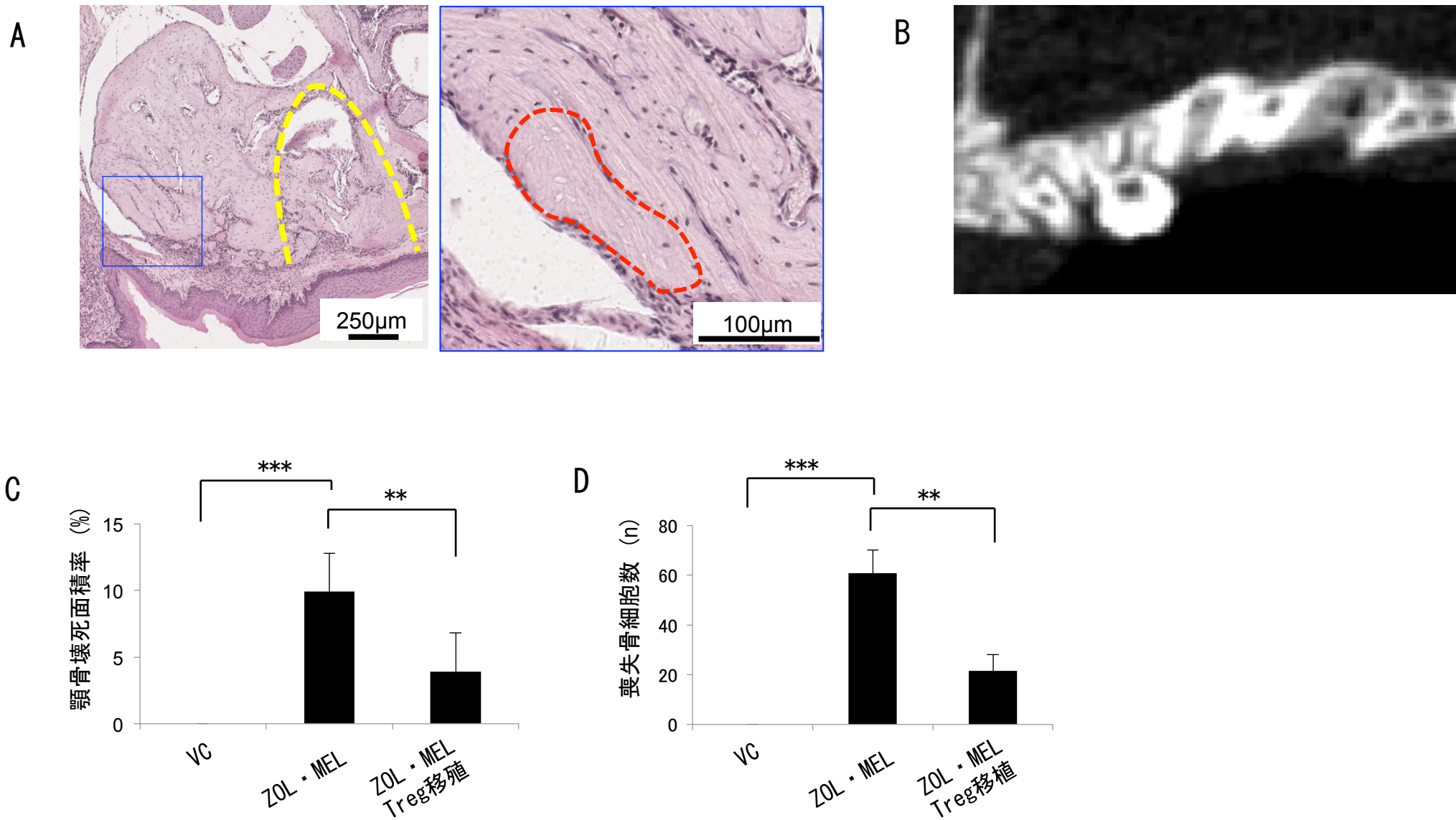
C



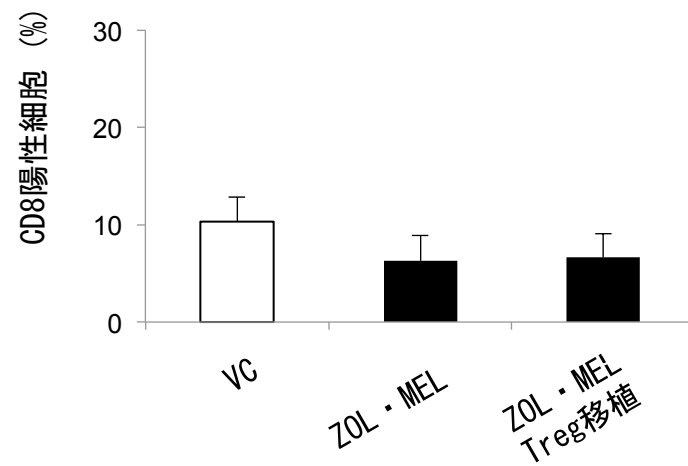




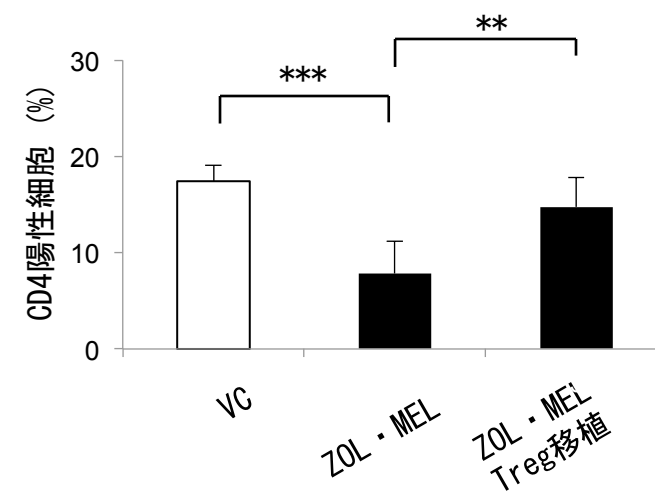




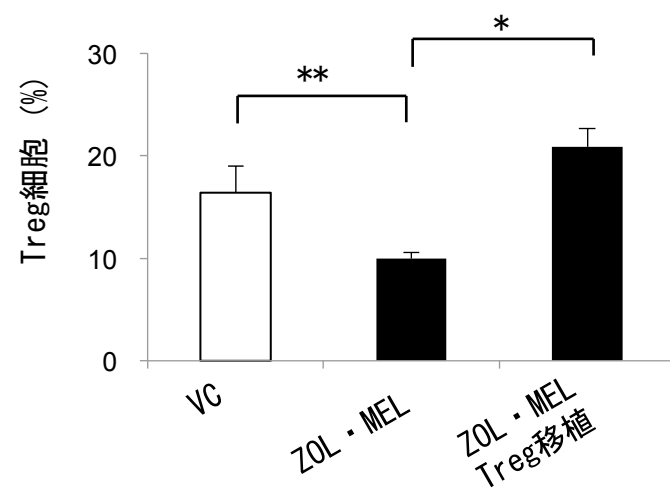
E



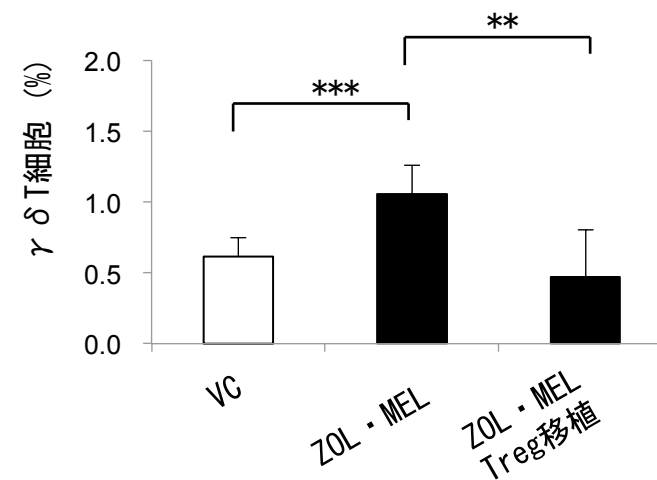
F



G



H



マウス系統	ZOL濃度	併用薬剤	投与方法	投与期間	参考論文
beigne nude/nude Xid(Ⅲ)	0.125 mg/kg	－	i. v.	抜歯前1週 抜歯後7週	6)
C57BL/6J	0.125 mg/kg	DEX (4 mg/kg)	i. v.	抜歯前3週 抜歯後12週	7)
BKS. Cg-Dock7mp/pLeprdb/J	0.125 mg/kg	－	i. v.	抜歯前1週 抜歯後2週	8)
C57BL/6J	0.1 mg/kg	CY (150 mg/kg)	s. c.	抜歯前1週 抜歯後7週	9)
C57BL/6J	0.5 mg/kg	MEL (7.0 mg/kg)	i. p.	抜歯前5週	本論文

表1 主なMRONJ発症マウス一覧

図1 実験プロトコール

C57BL/6J 雌に、VC 群（生理食塩水）、ZOL 単独投与群（ZOL 0.6mg/kg）、MEL 単独投与群（MEL 7.0mg/kg）、ZOL・MEL 併用投与群（ZOL 0.6mg/kg，MEL 7.0mg/kg）に対して、それぞれ週2回、5週にわたり計10回、それぞれの薬剤を腹腔内より投与した。計10回の薬剤投与後に、上顎第1臼歯を抜歯し、抜歯後2週後にマウスを屠殺行った。Treg細胞は、抜歯の1週前に尾静脈から注入した。

図2 抜歯2週後の大腿骨の状態

A：大腿骨における μ CT画像を示す。

B：大腿骨における μ CT 3次元骨形態計測による全骨体積量の解析結果を示す。
(* $P<0.01$)

C：大腿骨における μ CT 3次元骨形態計測による骨梁体積量の解析結果を示す。
(* $P<0.01$ ，** $P<0.005$)

D：H.E.染色像。上段は弱拡大画像、スケールバーは1mmである。中段は青枠の拡大画像、青矢印線は骨幹端の骨梁、スケールバーは500 μ mである。下段は黄色枠の拡大画像、スケールバーは100 μ mである。

E：上段は、造血幹細胞の同定における各階層化ゲートによる絞り込みを示す。7-AADにて死細胞除去を行い(P1)、単核球分画にゲーティングを設定した(P2)。単核球分画中のLineage Cocktail抗体陽性細胞を除去し(P3)、c-KitおよびSca-1陽性細胞を絞り込んだ(P4)。CD34陰性もしくはCD34弱陽性細胞を造血幹細胞としてカウントした(P5)。下段は、各実験群の造血幹細胞数（赤線）とVC群の造血幹細胞数（青線）との重ね合わせ。

図3 抜歯2週後の上顎骨の状態

A：各群における抜歯後の口腔粘膜上皮の状態 赤点線は、顎骨露出部位を示す。

B：上顎骨の矢状断面の μ CT画像を示す。

C：実験に用いたマウスの匹数と顎骨露出を起こしたマウスの匹数を示す。

D：上顎骨における μ CT 3次元骨形態計測による全骨体積量の解析結果を示す。
(** $P<0.005$)

E：上顎骨における μ CT 3次元骨形態計測による骨梁体積量の解析結果を示す。
(** $P<0.005$ ，*** $P<0.001$)

図4 上顎骨における組織学解析結果

A : H. E. 染色像。上段は弱拡大画像、スケールバーは $250\mu\text{m}$ である。黄色破線は抜歯窩を、赤*は上皮の閉鎖不全部位を示す。下段は強拡大画像、スケールバーは $100\mu\text{m}$ である。赤点線は、骨細胞が消失した壊死骨の範囲を示す。

B : 骨細胞が喪失している骨小腔が連続して5個以上の隣接する部位を顎骨壊死部と判定し、抜歯側における顎骨全体の面積に対する比率で表示した。

(*** $P<0.001$)

C : 喪失骨細胞数。(*** $P<0.001$)

図5 末梢血中におけるCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞数

A : 各群におけるフローサイトメトリー分析の結果を示す。

B : 各群におけるCD8陽性細胞数の割合を示す。(** $P<0.005$, *** $P<0.001$)

C : 各群におけるCD4陽性細胞数の割合を示す。(* $P<0.01$, ** $P<0.005$, *** $P<0.001$)

図6 脾臓におけるTreg細胞数

A : 各群におけるフローサイトメトリー分析の結果を示す。

B : 各群におけるTreg細胞数の割合を示す。(* $P<0.01$, ** $P<0.005$, *** $P<0.001$)

図7 末梢血中における $\gamma\delta$ T細胞数

A : 各群におけるフローサイトメトリー分析の結果を示す。

B : 各群における $\gamma\delta$ T細胞数の割合を示す。(* $P<0.01$, ** $P<0.005$, *** $P<0.001$)

図8 Treg細胞を移植した実験群の解析結果

A : H. E. 染色像。左図は弱拡大画像、スケールバーは $250\mu\text{m}$ である。黄色破線は抜歯窩を示す。右図は強拡大画像、スケールバーは $100\mu\text{m}$ である。赤点線は、骨細胞が消失した壊死骨の範囲を示す。

B : 上顎骨の矢状断面の μCT 画像を示す。

C : 顎骨壊死面積率。骨細胞が喪失している部位を顎骨壊死とし、顎骨全体の面積の比で表した。(** $P<0.005$, *** $P<0.001$)

D : 喪失骨細胞数。(** $P<0.005$, *** $P<0.001$)

E : 末梢血中のCD8陽性細胞の割合。

F: 末梢血中の CD4 陽性細胞の割合。(** $P<0.005$, *** $P<0.001$)

G: 脾臓における Treg 細胞数の割合。 $P<0.01$, ** $P<0.005$

H: 末梢血中の $\gamma \delta$ T 細胞数の割合。(** $P<0.005$, *** $P<0.001$)

表 1 主な MRONJ 発症マウス一覧

ZOL: ゼレドロン酸水和物、MEL: メルファラン、DEX: デキサメタゾン、CY: シクロホスファミド、i. v. : 静脈内注射、s. c. : 皮下注射

Medication-related osteonecrosis of the jaw is caused by a decrease in regulatory T cells

Takahiro Sugiyama ¹⁾, Takashi Kikui ²⁾, Yusuke Nakamura ³⁾, Daigo Yahata ⁴⁾, Daisuke Izumiyama ⁴⁾, Yoshitaka Yoshimura ⁵⁾, Hajime Minamikawa ⁵⁾, Kuniaki Suzuki ⁵⁾ and Yoshimasa Kitagawa ³⁾

¹⁾ Department of Oral Diagnosis and Medicine, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University,

²⁾ Department of Dentistry for Children and Disabled Person, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University,

³⁾ Department of Oral Diagnosis and Medicine, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University,

⁴⁾ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University,

⁵⁾ Department of Molecular Cell Pharmacology, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University,

Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

Corresponding author: Dr. Yoshitaka Yoshimura

Keywords: Medication-related osteonecrosis of the jaw, regulatory T cells, Zoledronate

Bone resorption inhibitors are the most extensively used drugs for the treatment of diseases with accelerated bone resorption, including osteoporosis, malignant bone metastasis and multiple myeloma. The development of jaw osteonecrosis in the patient receiving an antiresorptive preparation is known as medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). Since the mechanism of onset of MRONJ remains unclear, an effective prophylactic or therapeutic method has not yet been established. Therefore,

in this study we aimed to investigate the pathogenesis and therapy of MRONJ using mice model. Zoledronate (ZOL) and melphalan (MEL) were administered intraperitoneally to 4-week-old C57BL/6J female mice twice a week for 5 weeks, and extraction of the first molar of the left maxillary was performed. Two weeks after tooth extraction, the mice were sacrificed and histological analysis of the jawbone surrounding the tooth extraction site was performed. Further measurement of the dynamics of lymphocytes in peripheral blood and spleen was analyzed using flow cytometry. In the group administered with ZOL or MEL alone, the histological image of tooth extraction socket exhibited a normal course of healing, and jaw osteonecrosis did not occur. However, in the group administered with a combination of ZOL and MEL, osteocytes in the bone lacuna disappeared over a wide area within the jawbone around the extraction tooth socket, exhibiting a typical histomorphism of osteonecrosis of the jaw. Besides, the number of regulatory T cells (Treg) in peripheral blood and spleen significantly decreased but oppositely the number of $\gamma \delta$ T cells in peripheral blood significantly increased. Furthermore, Treg cells were collected from the spleen of healthy mice using magnetic cell separation method. Injection of Treg cells from healthy donor alleviated symptoms of osteonecrosis of the jaw in mice administered with ZOL and MEL. These results indicate that MRONJ induced by ZOL may be involved in an aberrant immune responses caused by the decreased function of Treg cells and the increased number of the $\gamma \delta$ T cells. Furthermore, the findings of this study also suggest the possibility of treatment or prevention of MRONJ by the administration of Treg cells.