



Title	BRONJ様マウスに対するヒト脱落乳歯歯髄幹細胞の無血清培養上清を用いた治療効果の検討
Author(s)	泉山, 大介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13871号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13871
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94364
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Izumiya.pdf



博 士 論 文

BRONJ 様マウスに対するヒト脱落乳歯歯髄幹細胞の
無血清培養上清を用いた治療効果の検討

令和 2 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

泉 山 大 介

博 士 論 文

BRONJ 様マウスに対するヒト脱落乳歯歯髄幹細胞の
無血清培養上清を用いた治療効果の検討

令和 2 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

泉 山 大 介

目 次

抄録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁

材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 頁

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 1 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 6 頁

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 2 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 3 頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 4 頁

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 5 頁

抄 録

ビスフォスフォネート (Bisphosphonate : BP) 製剤投与患者に発症する BP 関連顎骨壊死 (Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw : BRONJ) は、顎骨に発症する難治性の疾患である。しかし、BRONJ の治療法に関して統一された見解は得ていない。本研究では、マウスを用いた動物実験を行い、ヒト脱落乳歯歯髓幹細胞の培養上清 (Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-Conditioned Medium: SHED-CM) の投与が BRONJ の治療に有効であるか検証した。

生後 8 週齢の C57BL/6J 雌マウスに対して、ゾレドロン酸水和物 (Zoledronic Acid Hydrate : ZOL) とメルファラン (Melphalan : MEL) を 2 週間にわたり週 2 回腹腔内投与し、抜歯することで顎骨の露出を伴う BRONJ 様症状を発症させた。

このマウスでは、抹消血中の $\gamma \delta$ T 細胞 ($\gamma \delta$ T) の増加と、脾臓中の制御性 T 細胞 (Treg) の減少を認めた。SHED-CM の腹腔内投与によって、 $\gamma \delta$ T の増加抑制と Treg の増加をもたらす、BRONJ 様症状を軽減していた。

BRONJ の発症には、 $\gamma \delta$ T と Treg との不均衡が関与しており、SHED-CM の投与は、この不均衡を改善することで BRONJ 様症状に対して治療効果を示した。SHED-CM は BRONJ に対する有効な治療法となることが示唆された。

緒 言

ビスフォスフォネート (Bisphosphonate : BP) 製剤は、骨粗鬆症および癌の骨転移にともなう骨関連事象の予防などに広く使用されている骨吸収抑制薬である。しかし、その重大な副作用のひとつとして、難治性の骨露出を特徴とするBP関連顎骨壊死 (Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw : BRONJ) が問題視されている¹⁾。また、BP製剤とは異なる機序で同じ骨吸収抑制作用を示す抗RANKL抗体製剤であるデノスマブもまた顎骨壊死を発症することが報告されている²⁾。発症機序も含めBRONJの病態生理はいまだ不明な点が多く、そのため、BRONJの治療法について統一した見解は存在していない。BRONJが報告された当初は、保存的療法が第1選択であり、積極的な外科的療法は推奨されていなかった。しかしながら最近では、外科的療法の方が有用との報告が多数あり、外科的療法を推奨傾向にある³⁾。しかし、これらの報告は後ろ向き研究によるものであり、十分なエビデンスに基づいたものではない。

乳歯の歯髄組織に存在する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell : MSC) であるヒト脱落乳歯歯髄幹細胞 (Stem cells from human exfoliated deciduous teeth : SHED) は、MSCの特性である多分化能と増殖能が他の組織に由来するMSC

より高く，再生医療における細胞ソースとして多くの臨床研究が進んでいる⁴⁾．また，SHEDから放出される分泌因子には，アルツハイマー病，心筋梗塞，関節リウマチなどの難治性疾患に対して高い治療効果を発揮することが，小動物を用いた実験において報告されている⁵⁻⁸⁾．

本研究では第3世代BP製剤であるゾレドロン酸水和物（Zoledronic Acid Hydrate：ZOL）と抗悪性腫瘍薬であるメルファラン（Melphalan：MEL）を併用投与することによりBRONJ様マウスを作製し，SHED分泌因子による治療効果について検討した．

材料と方法

1. 細胞培養

北海道大学病院自主臨床研究審査委員会承認（自 010-0116）のもと，北海道大学病院小児・障害者歯科にて患者の同意を得て提供された脱落乳歯より通法にしたがい，SHED を分離した⁹⁾．分離した SHED は，20%牛胎児血清（Roche Diagnostic, Sydney, NSW, Australia）を添加した α minimum essential medium: α MEM（Wako Pure Chemical, Osaka, Japan）を用いて，37°C，5%CO₂ の気相下にて継代培養を行った．80%コンフルエントとなった段階で血清無添加の α MEM 培地に交換，24 時間培養したのち，培養上清を回収し，濾過フィルター（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を使用して細胞残骸を除去した．これを SHED 無血清培養上清（SHED-Conditioned Medium: SHED-CM）として，実験に用いた．

2. BRONJ 様マウス作製方法および SHED-CM による治療効果の検討

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．生後 8 週齢の C57BL/6J Jms Slc 雌マウ

ス (Sankyo Labo Service Corporation, Tokyo, Japan) をランダムに抽出し、以下の群に分類した。

- (1) Vehicle control (VC) 群：生理食塩水 (Otsuka Pharmaceutical Co, Ltd, Tokyo, Japan) (200 μ l) を投与。
- (2) ZOL, MEL 投与 (ZM) 群：ゾメタ® (ZOL, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ, USA) (0.6 mg/kg) ・アルケラン® (MEL, Aspen, Durban, KZN, South Africa) (14.0 mg/kg) を併用投与。
- (3) SHED-CM 投与 (ZMS) 群：ZOL (0.6 mg/kg) ・MEL (14.0 mg/kg) に加え、SHED-CM (300 μ l) を併用投与。

すべての薬剤は 2 週にわたり週 2 回の頻度で腹腔内投与した。薬剤投与開始 3 週後に、ソムノペンチル® (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) による全身麻酔を行い、左側上顎第一臼歯の抜歯を行った。薬剤投与開始 5 週後に CO₂ ガスを用いてマウスを安楽死させ、上顎骨、末梢血、脾臓、腹腔内の滲出細胞浮遊液を採取し、各種解析を行った (図 1)。

3. 試料の観察

採取した上顎骨の抜歯窩を実体顕微鏡にて観察した。そののち、4%パラホルムアルデヒドに 3 日間浸漬固定を行い、Latheta LCT200 (Hitachi, Ltd, Tokyo,

Japan) で管電圧 50 kV, ピクセルサイズ 24.0 μm の条件で μCT 撮影を行った.

断層画像および 3D 画像は Latheta LCT200 標準付属のソフトウェアにて dicom 画像を出力し, OsiriX (Pixmeo SARL, Bernex, GE, Switzerland) にて作製した.

μCT 撮影後に 5%ギ酸水溶液で 3 日間脱灰し, 通法にしたがってアルコール脱水・パラフィン包埋を行った. 4.5 μm に薄切し連続切片を作製, 通法にしたがってヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E. 染色) を行った. 作製した切片を光学顕微鏡にて観察し, Image-Pro Premier (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) にて切片画像の取り込みを行った. 切片画像の解析は ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で行った. 5 個以上隣接して骨小腔内の骨細胞が喪失している範囲を顎骨壊死部と判定し, 連続切片上で最大の顎骨壊死面積を認める切片をその試料の最大顎骨壊死面積とし計測した.

4. フローサイトメトリー分析

末梢血・脾臓・腹腔内の滲出細胞浮遊液は以下の処理を行ったのち, FACSVerse™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて測定した. 測定結果を FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA) にて分析した.

(1) 末梢血

眼底静脈叢よりヘパリンコートしたガラス毛細管を用いて採血した. 1X RBC Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific) にて溶血したのち, FITC anti-mouse CD3 (Biolegend, San Diego, CA, USA) , PE/Cy7 anti-mouse CD4 (Biolegend) , PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD8a (Biolegend) , PE anti-mouse TCR γ / δ (Biolegend) , APC anti-mouse/human CD45R/B220 (Biolegend) にて細胞表面抗原の多重染色を行った.

Isotype Control として FITC Rat IgG2b, κ (Biolegend) , PE/Cy7 Rat IgG2b, κ (Biolegend) , Per/Cy5.5 Rat IgG2a, κ (Biolegend) , PE Armenian Hamster IgG (Biolegend) , APC Rat IgG2a, κ (Biolegend) を使用した.

(2) 脾臓

摘出した脾臓を切断し, 直径 70 μm のセルストレーナー (Falcon, Corning, NY, USA) を使用してシングルセルサスペンションとした. 1X RBC Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific) にて溶血したのち, FITC anti-mouse CD3 (Biolegend) , PE/Cy7 anti-mouse CD4 (Biolegend) , PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD8a (Biolegend) , APC anti-mouse CD25 (Biolegend) で細胞表面抗原の多重染色を行った. そののち, FOXP3/Transcription Factor Fixation & Permeabilization Buffer Kit (R&D Systems, Minneapolis,

MN, USA) にて細胞膜透過処置を行い, PE Rat anti-mouse FoxP3 (BD Biosciences) で細胞内染色を行った.

Isotype Control として FITC Rat IgG2b, κ (Biolegend) , PE/Cy7 Rat IgG2b, κ (Biolegend) , Per/Cy5.5 Rat IgG2a, κ (Biolegend) , PE Rat IgG2b, κ (Biolegend) , APC Rat IgG1, λ (Biolegend) を使用した.

(3) 腹腔内の滲出細胞浮遊液

冷 PBS10 ml を腹腔内に注入し, 滲出細胞浮遊液を得た. 洗浄したのち, APC anti-mouse F4/80 (Biolegend) , PE anti-mouse CD206 (Biolegend) で細胞表面抗原の多重染色を行った.

Isotype Control として APC Rat IgG2a, κ (Biolegend) , PE Rat IgG2a, κ (Biolegend) を使用した.

5. 統計分析

各群間は, Statview (SAS Institute, Cray, NC, USA) を用いて多重比較検定による有意差検定を行った.

図1

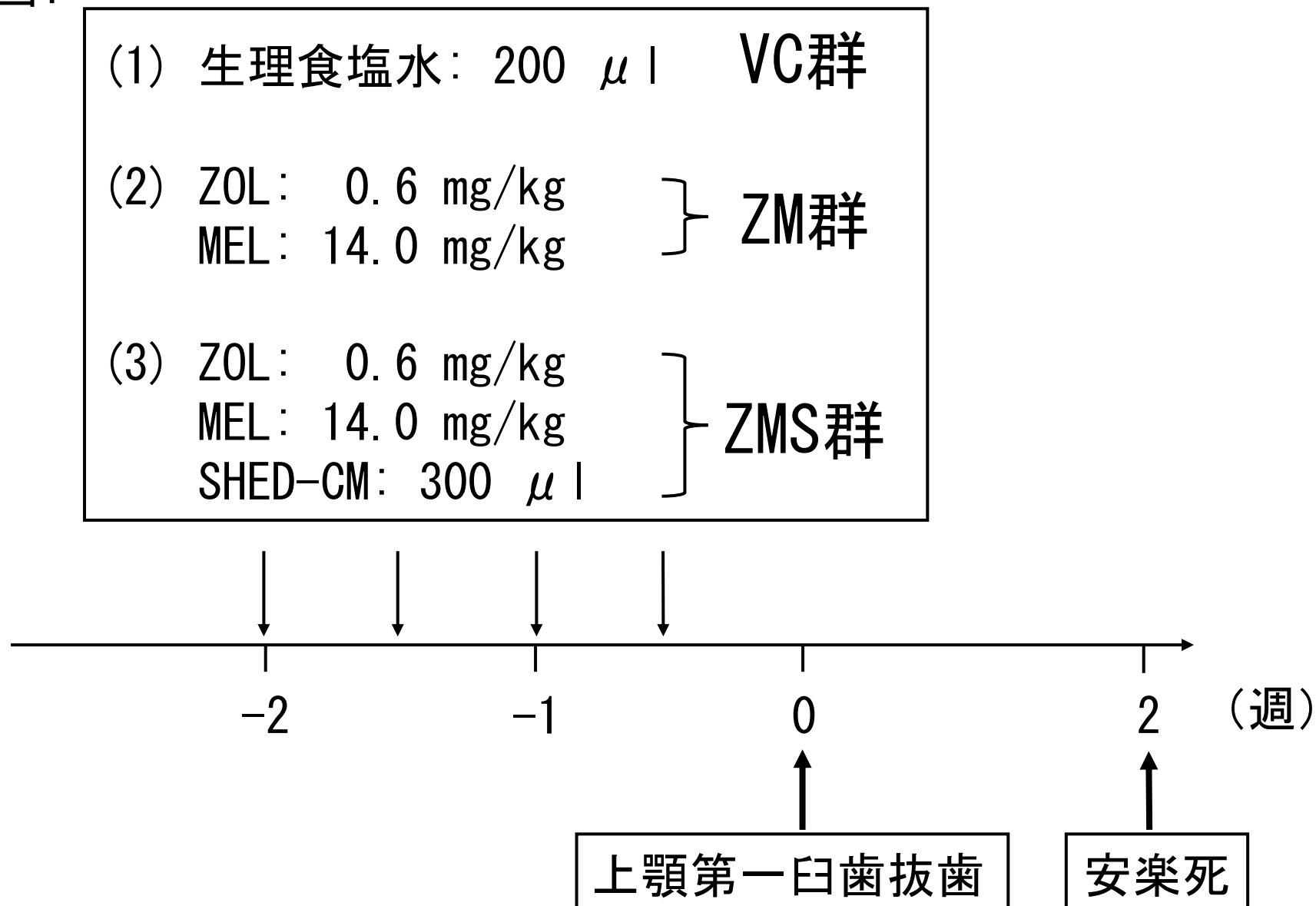


図 1 実験プロトコール

マウスを、生理食塩水を投与した VC 群、ZOL・MEL を併用投与した ZM 群、ZOL・MEL に加え SHED-CM を併用投与した ZMS 群に分類した。すべての薬剤を 2 週にわたり週 2 回の頻度で腹腔内投与し、薬剤投与開始 3 週後に左側上顎第一臼歯の抜歯を行い、薬剤投与開始 5 週後に安楽死させ、各種解析を行った。

結 果

1. 顎骨の観察

抜歯 2 週後にマウスを安楽死させ、抜歯窩を観察した。

(1) 肉眼的観察

VC 群では 5 匹中 5 匹すべてにおいて、抜歯窩の口腔粘膜上皮での閉鎖を確認した。一方、ZM 群では 5 匹中 2 匹 (40%) において、抜歯窩は口腔粘膜上皮で閉鎖されず、顎骨露出を認めた。治療・予防検討マウスの ZMS 群では 10 匹すべてにおいて口腔粘膜上皮での抜歯窩の閉鎖を認めた (図 2)。また、顎骨露出面積を計測し、右側上顎第一臼歯咬合面観面積を 100% として顎骨露出面積率を計測した (図 3)。

(2) μ CT

μ CT 撮影にて作成した断層画像および 3D 画像にて、VC 群の抜歯窩は新生骨で満たされていたが、ZM 群では新生骨の添加は認めず、抜歯窩が残存した状態であった。ZMS 群では VC 群ほどではないが、抜歯窩内に新生骨の添加を認めた (図 4)。

(3) 組織学的観察

H. E. 染色した切片を観察したところ、VC 群では抜歯窩は新生骨で置換されていた。しかし、ZM 群では抜歯窩内にわずかな新生骨を認める程度もしくは全く新生骨を認めない状態であった。一方、ZMS 群では VC 群ほどではないが新生骨を認めた (図 5)。

顎骨壊死部を、VC 群では 5 匹中 0 匹 (0%)、ZM 群では 5 匹中 5 匹 (100%)、ZMS 群では 10 匹中 8 匹 (80%) に認めた。最大顎骨壊死面積は ZM 群では $(10.4 \pm 3.5) \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 、ZMS 群では $(2.8 \pm 2.9) \times 10^4 \mu\text{m}^2$ であり、ZMS 群では有意に減少した (図 6)。

2. 末梢血、脾臓および腹腔内の滲出細胞浮遊液のフローサイトメトリー分析

末梢血での $\gamma \delta$ T 細胞 ($\gamma \delta$ T) について、リンパ球区画における CD3 および TCR γ / δ ダブルポジティブの細胞数を割合で示した (図 7)。VC 群では $0.3 \pm 0.3\%$ であったのに対して、ZM 群では $2.7 \pm 0.6\%$ と有意に増加していた。一方、ZMS 群では $0.7 \pm 0.5\%$ と ZM 群と比較し、有意に減少していた (図 8)。

次に、脾臓での抑制性 T 細胞 (Treg) について、CD4 陽性細胞区画における CD25 および FoxP3 ダブルポジティブの細胞数を割合で示した (図 9)。VC 群では $9.0 \pm 1.4\%$ であったのに対して、ZM 群では $5.8 \pm 1.9\%$ と有意差は認められ

なかったが，減少していた．一方，ZMS 群では $13.0 \pm 3.2\%$ と ZM 群と比較し，有意に増加していた（図 10）．

また，腹腔内の滲出細胞浮遊液での M2 マクロファージについて，マクロファージ区画における F4/80 および CD206 ダブルポジティブの細胞数を割合で示した（図 11）．VC 群では $20.0 \pm 1.8\%$ であったのに対して，ZM 群では $10.2 \pm 0.4\%$ と有意に減少していた．一方，ZMS 群では $18.4 \pm 4.1\%$ と ZM 群と比較し，有意に増加していた（図 12）．

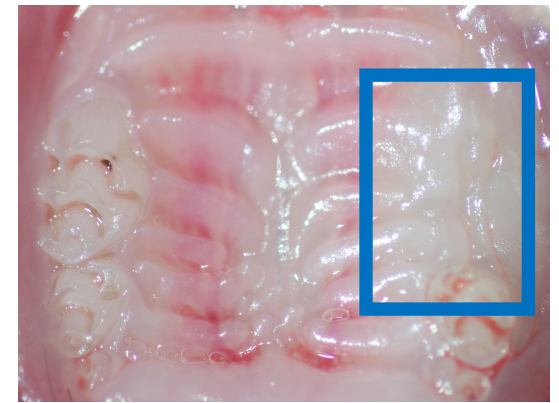
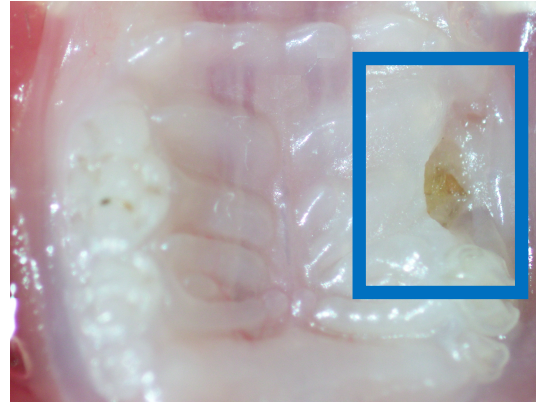
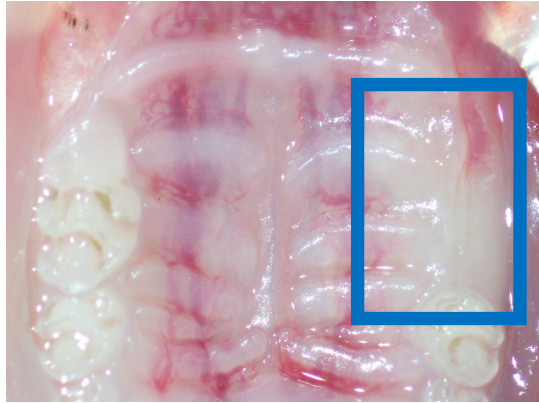
図2

VC群

ZM群

ZMS群

(A)



(B)

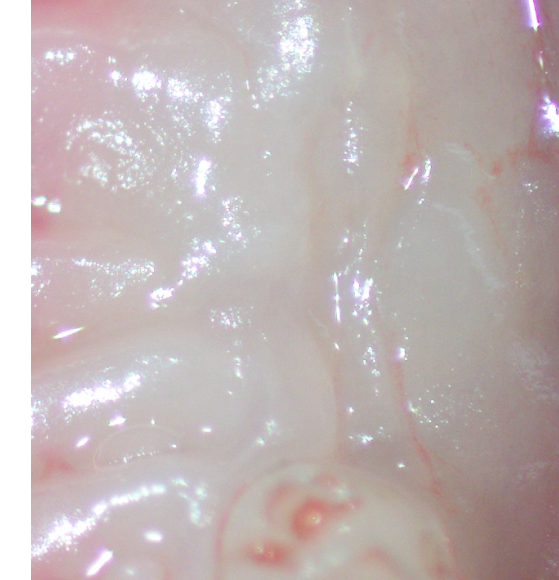
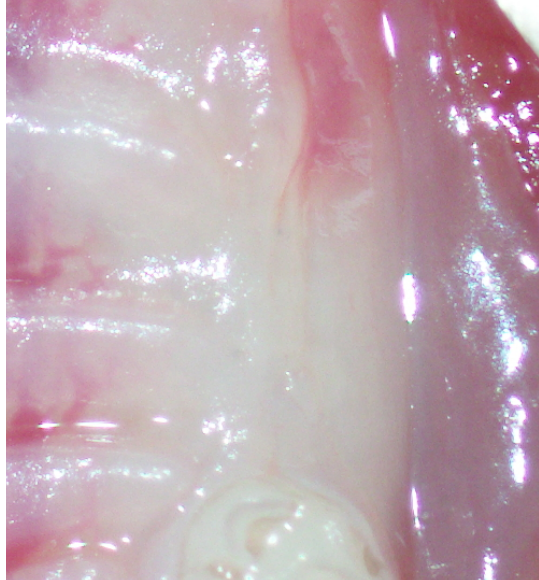


図 2 抜歯 2 週後の抜歯窩の状態

(A) : 弱拡大画像.

(B) : 強拡大画像. 黄色破線は顎骨露出部を示す.

図3

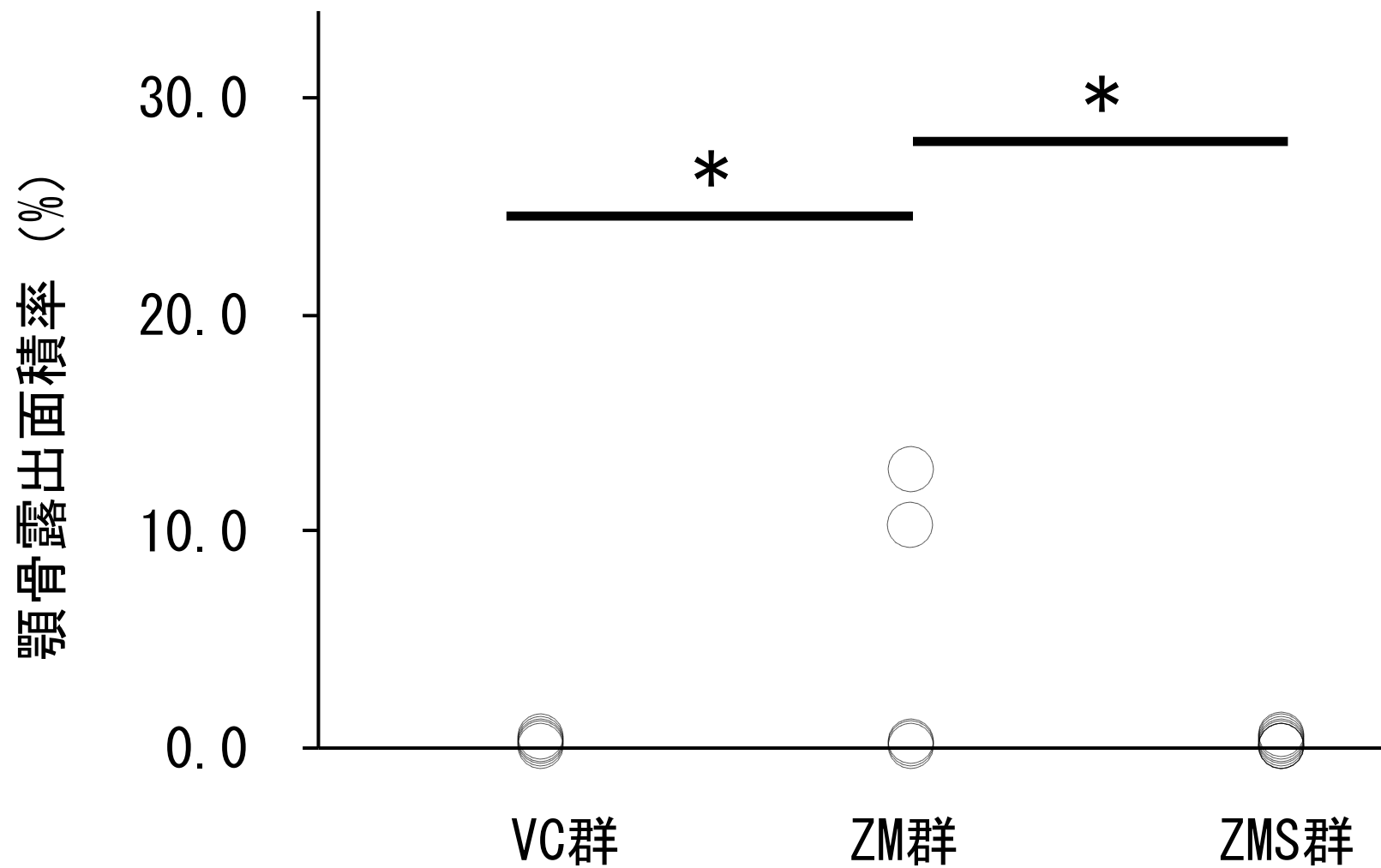


図 3 顎骨露出面積率

ZM 群では 5 匹中 2 匹に顎骨露出を認めた.

有意差検定： $*P < 0.05$

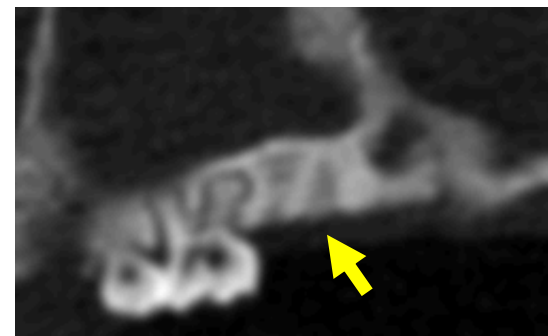
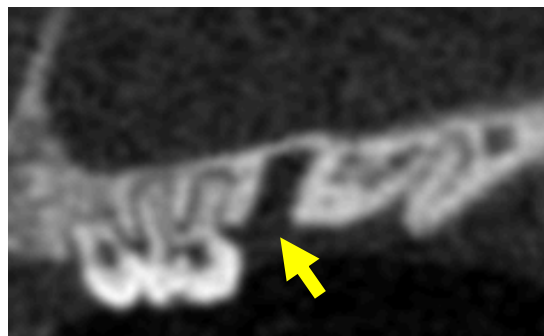
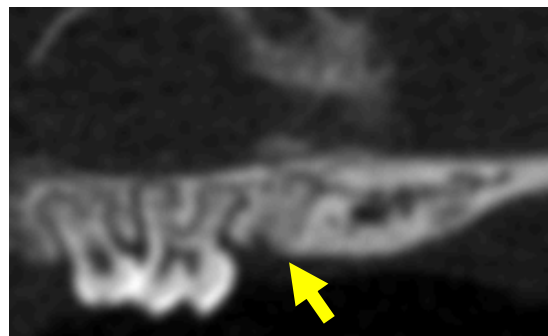
图4

VC群

ZM群

ZMS群

(A)



(B)

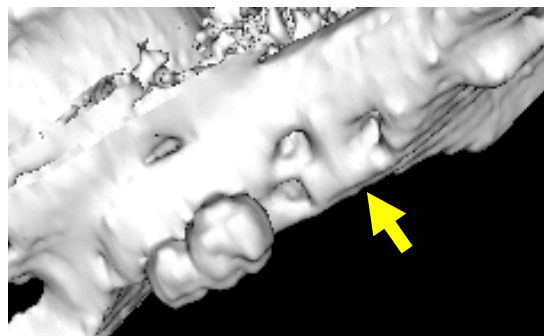
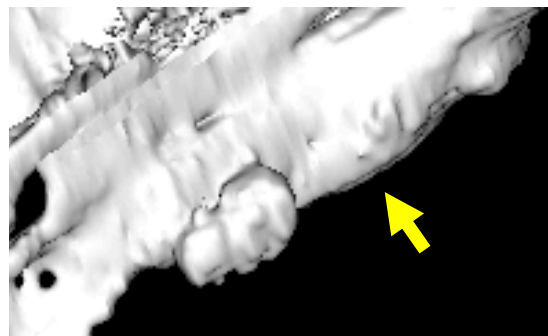


図 4 抜歯 2 週後の μ CT 画像

(A) : 断層画像.

(B) : 3D 画像.

黄色矢印は抜歯窩を示す.

図5

VC群

ZM群

ZMS群

(A)



(B)

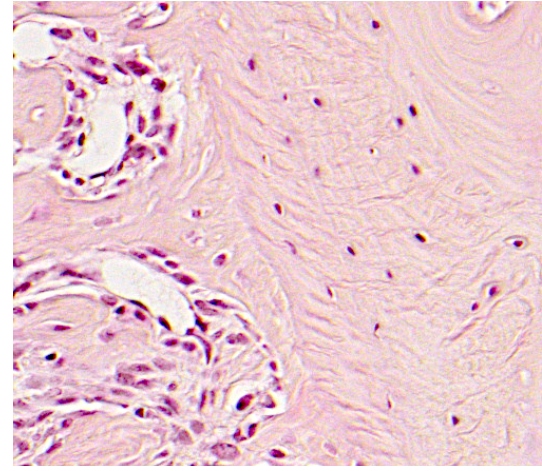
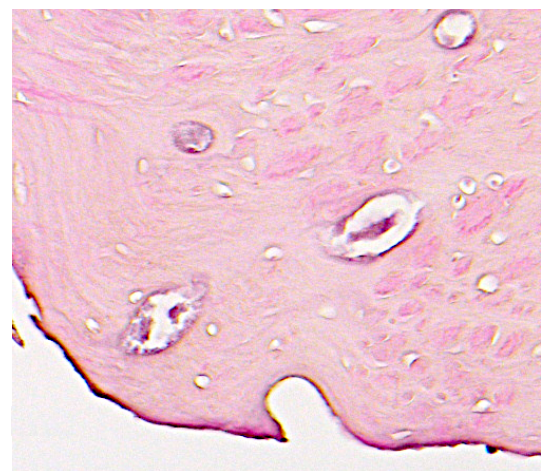
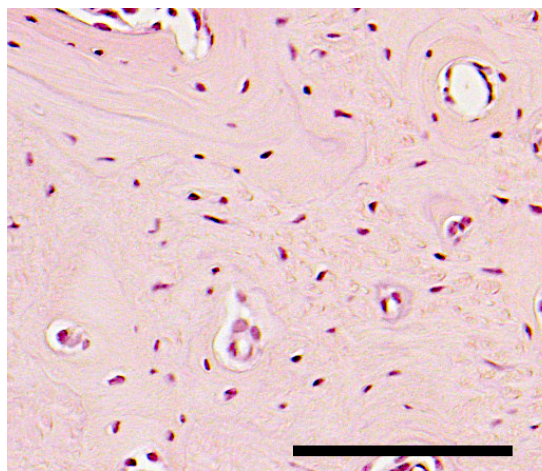


図 5 上顎骨の組織像 (H. E. 染色)

(A) : 弱拡大. バー, 100 μm .

(B) : 強拡大. バー, 100 μm .

黄色破線は抜歯窩を示す. *は顎骨露出部を示す.

図6

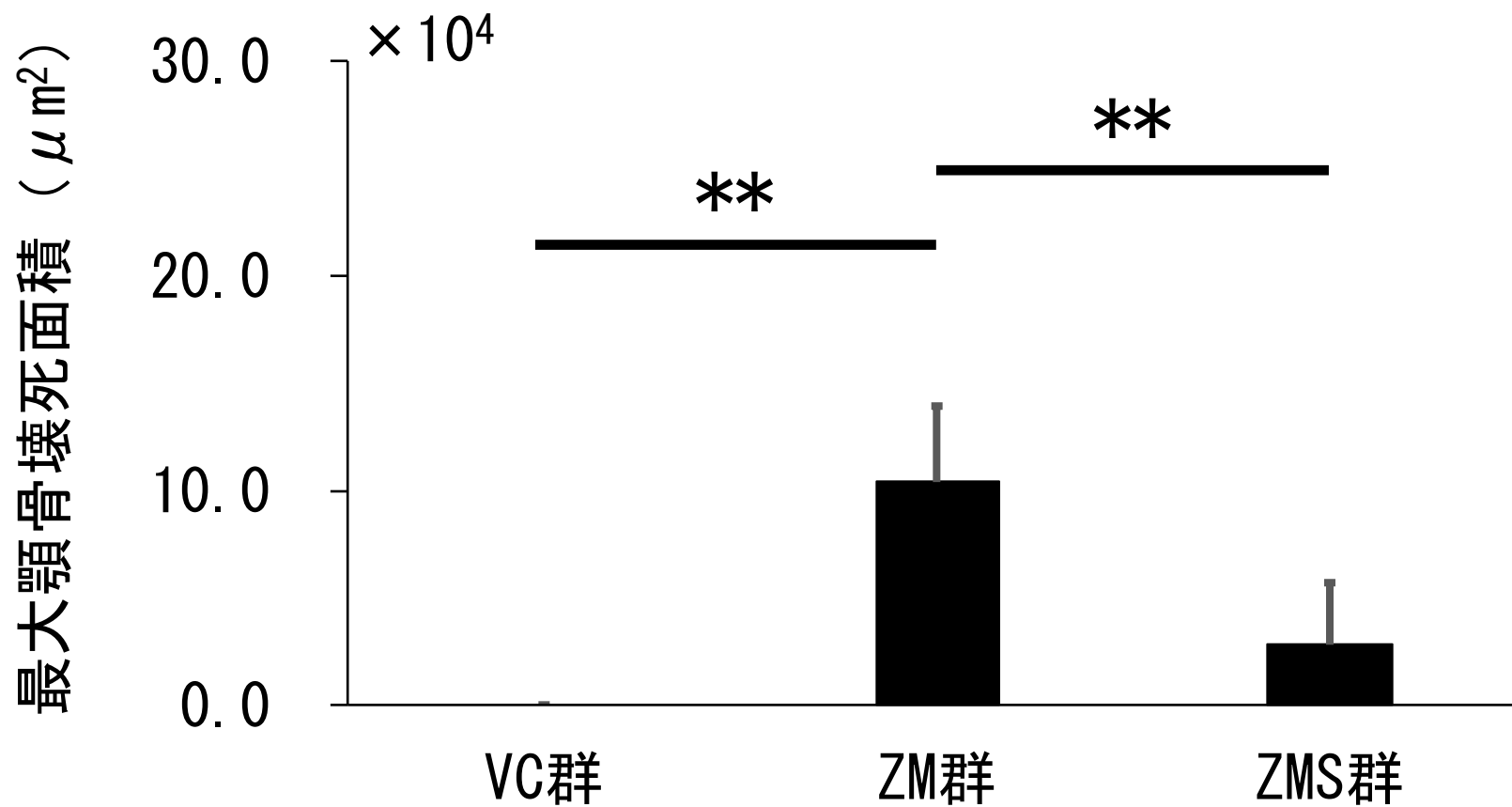


図 6 最大顎骨壊死面積

骨小腔内の骨細胞が喪失している範囲.

有意差検定： $**P < 0.001$

図7

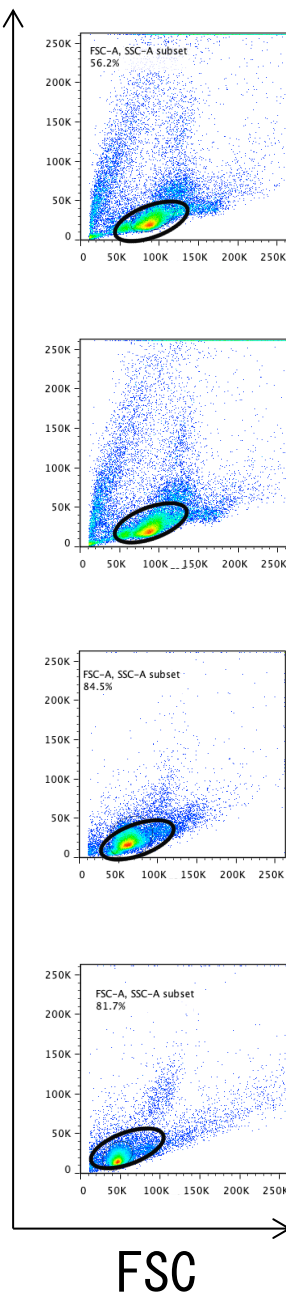
ISO type

VC群

ZM群

ZMS群

SSC



PE TCR γ/δ

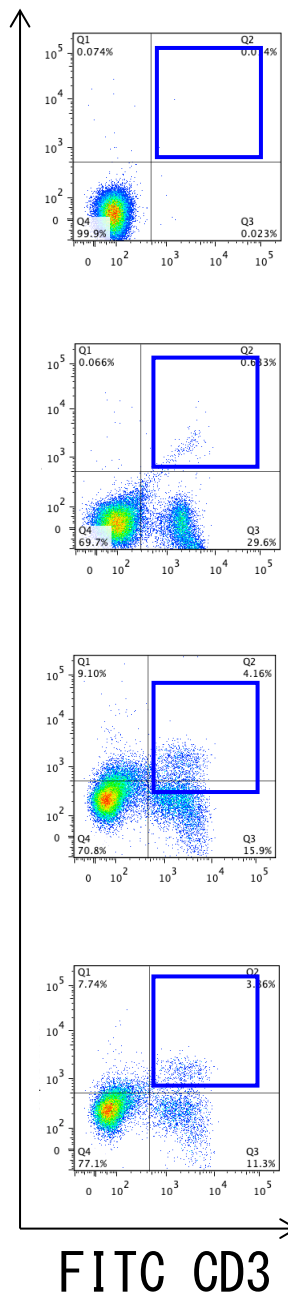


図 7 末梢血における $\gamma \delta T$ のフローサイトメトリー分析

图8

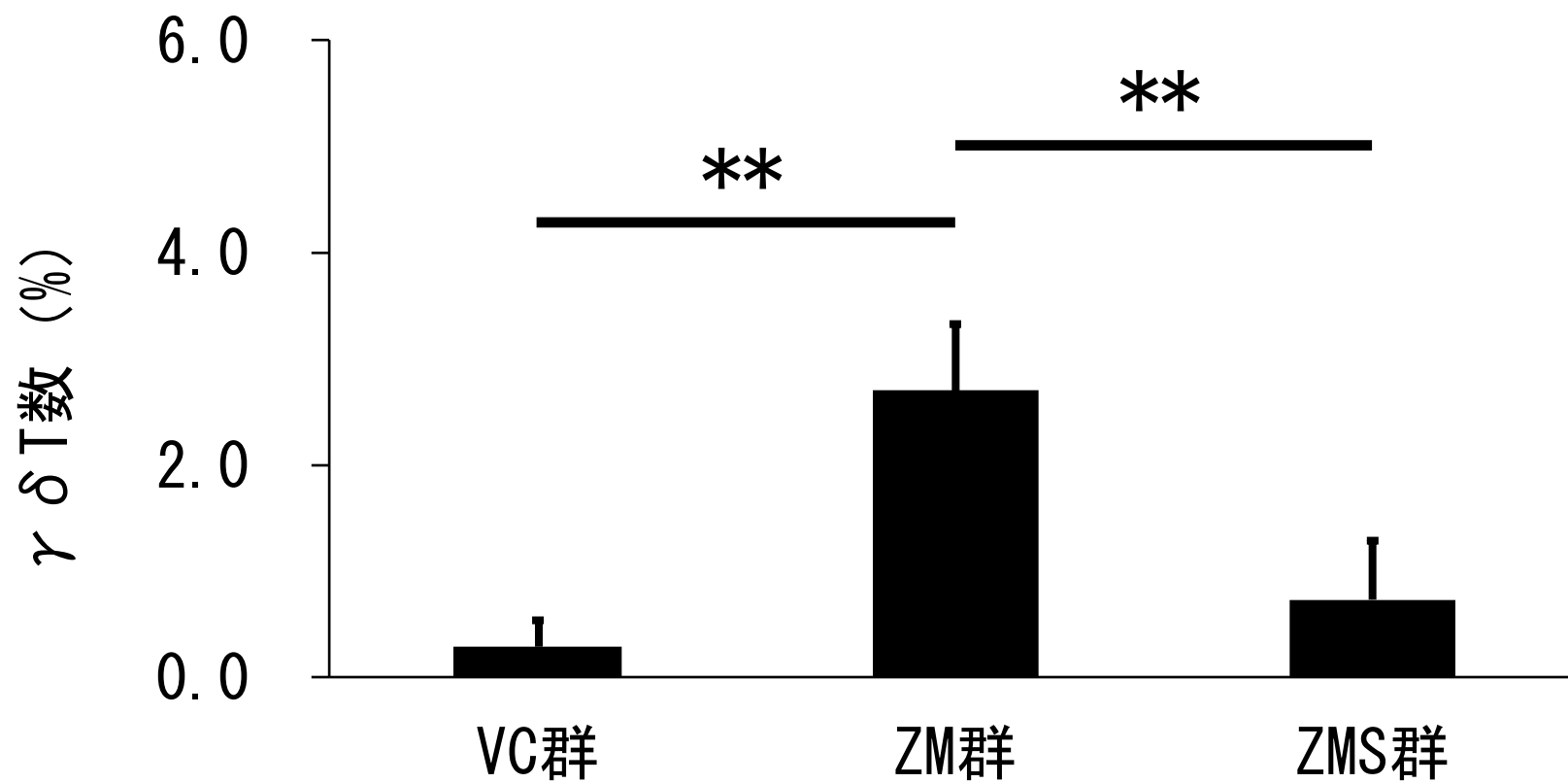


図 8 末梢血における $\gamma \delta T$ の細胞数

有意差検定： $**P < 0.001$

图9

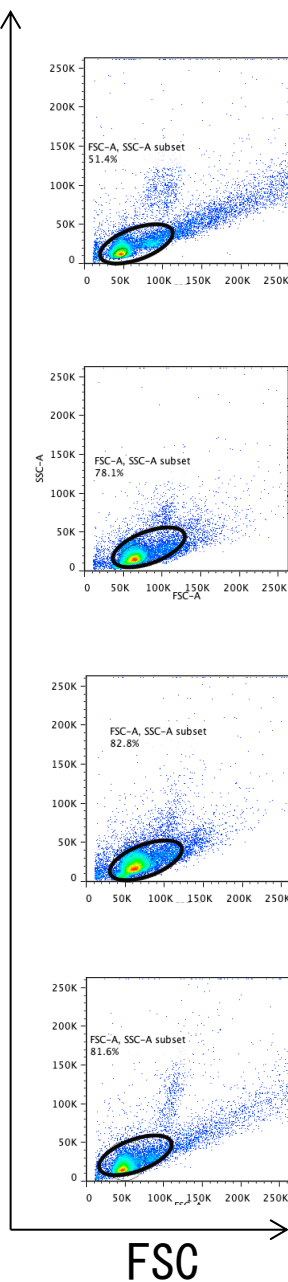
ISO type

VC群

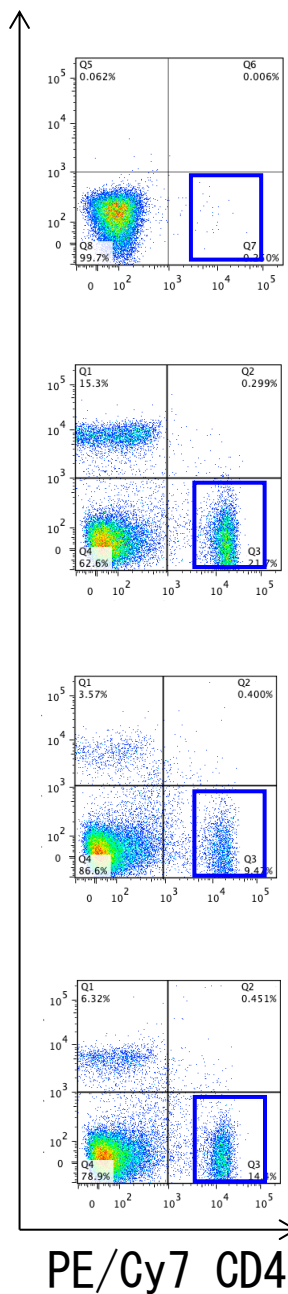
ZM群

ZMS群

SSC



PerCP/Cy5.5 CD8a



PE FoxP3

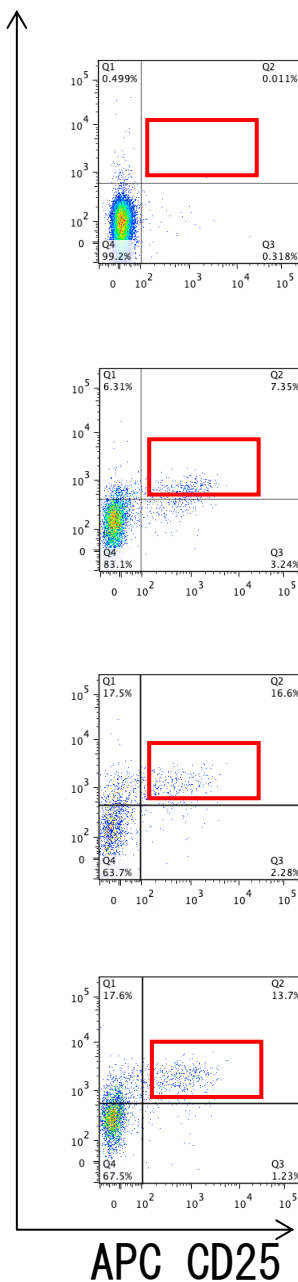


図 9 脾臓における Treg のフローサイトメトリー分析

图10

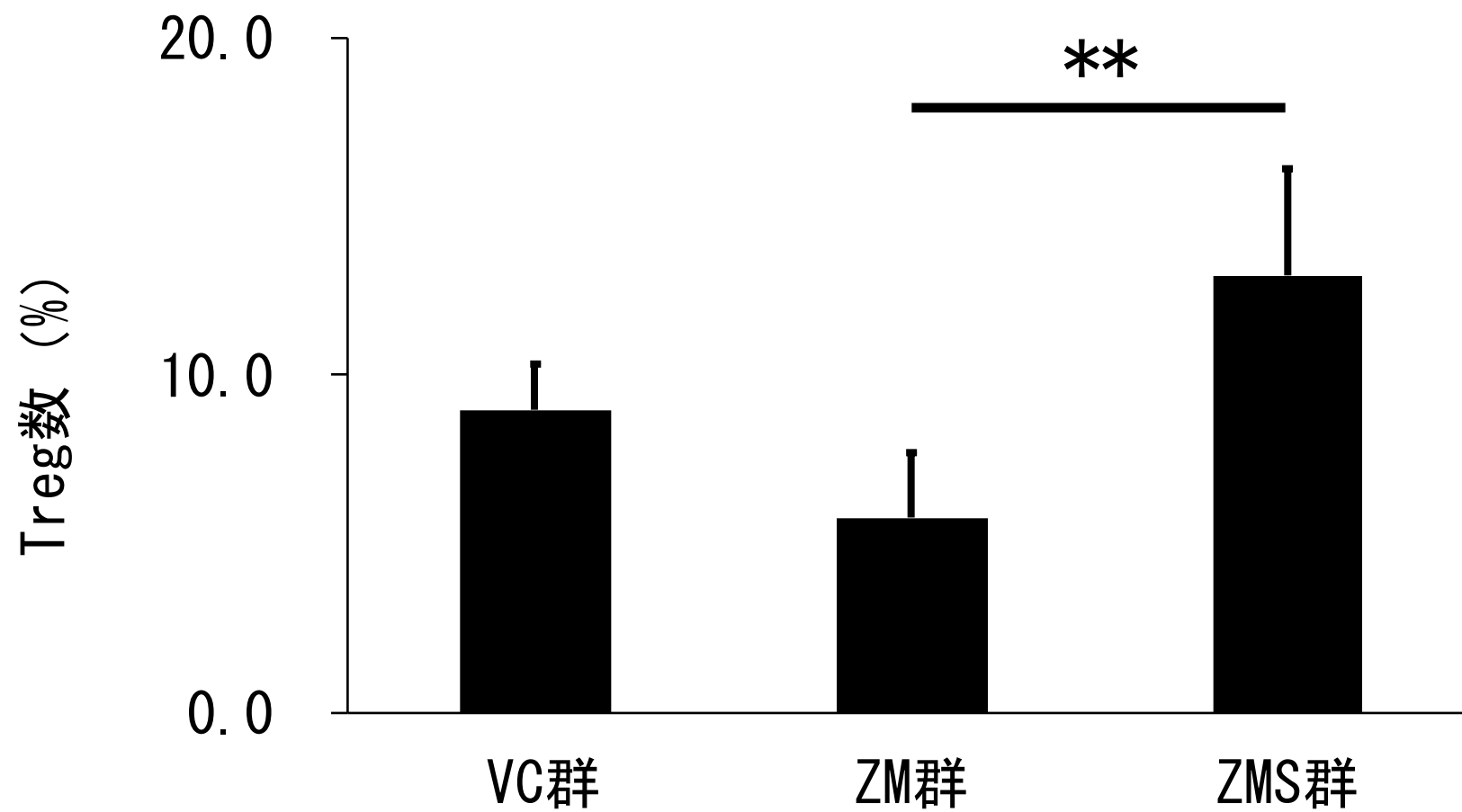


図 10 脾臓における Treg の細胞数

有意差検定： $**P < 0.001$

図11

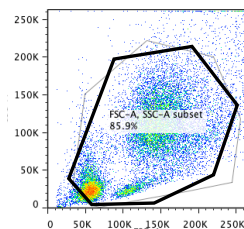
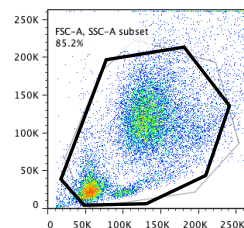
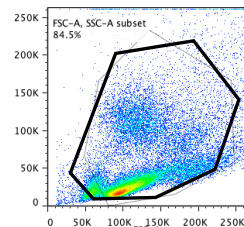
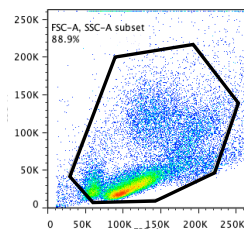
ISO type

VC群

ZM群

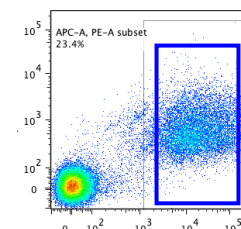
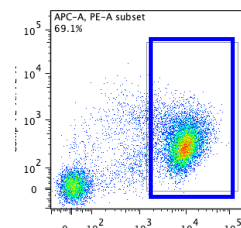
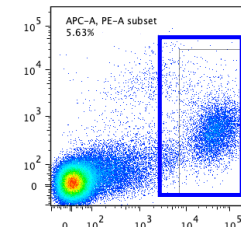
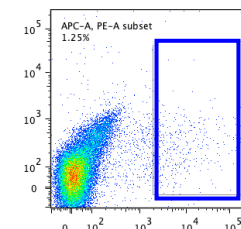
ZMS群

SSC



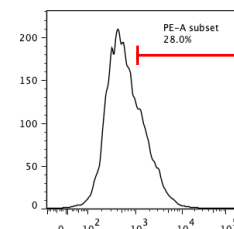
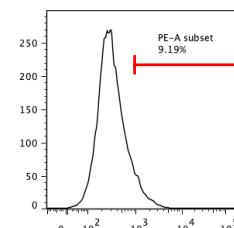
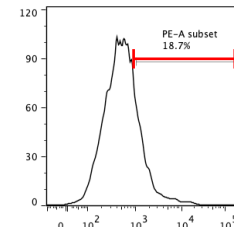
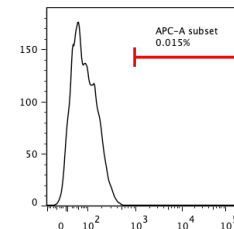
FSC

PE CD206



APC F4/80

counts



PE CD206

図 11 腹腔内における M2 マクロファージのフローサイトメトリー分析

図12

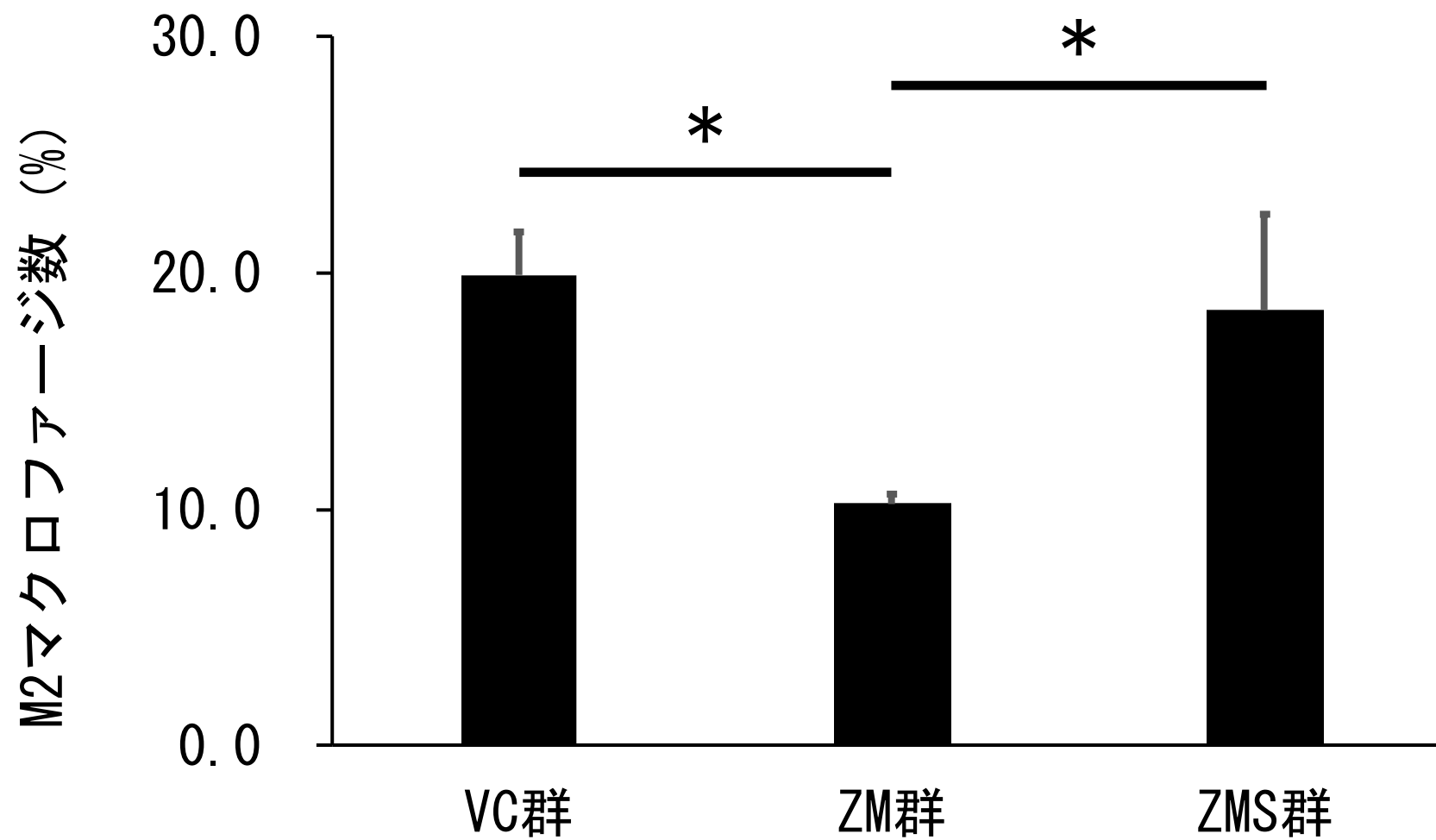


図 12 腹腔内の M2 マクロファージの細胞数

有意差検定： $*P < 0.05$

考 察

BRONJ は感染をともなう顎骨露出，持続性の著しい疼痛，歯肉腫脹および排膿などの重篤な症状を発現し，治療に対して抵抗性を示すため治癒傾向が認められないことが多い．そのため，BRONJ が報告された当初は，病変の進行予防や患者の QOL の維持を目的とし，疼痛緩和や局所洗浄あるいは抗菌薬による感染予防などの保存的な管理が推奨されていた¹⁰⁾．しかし，保存的療法では効果が得られない症例も多く，実臨床においても保存的療法を行なっている間に病状が進行することはたびたび経験することである．そのため，近年では，外科的療法を積極的に行うことが有効であったという報告が増えてきている^{11, 12)}．BRONJ に対する外科的療法についてはいまだに議論の余地があるが，米国口腔顎顔面外科学会（American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons : AAOMS）は，ステージ 3 の重篤な症状を発症している場合において外科的療法を行うことを提唱している¹³⁾．一方，最近の systematic review では，早期の外科的療法の介入による治療成績の優位性が示されるようになっており，そのなかでも壊死骨のみを除去する conservative surgery よりも壊死骨とともに周囲の骨も骨削する extensive surgery の方が優れていると報告している^{3, 12)}．しかし，骨の治癒能力が十分にあれば積極的に腐骨除去や搔爬を行っても治癒する可能性

が高いとされているが、骨の治癒能力が低下した状態であれば、積極的に外科的処置を行うことが骨壊死の拡大に繋がることになる。さらに、BP 製剤を投与されている患者の全身状態を考慮した場合、外科的療法が適応できない場合も少なからず存在する。非外科的療法として、低出力レーザー療法、高圧酸素療法、血小板由来増殖因子の局所投与などの治療が試みられているが、その有用性については明らかになっておらず、また、これらの治療法は BRONJ の病態生理に基づいたものではない。そのため、BRONJ の病態生理に基づいた治療法を確立することは、今後の BRONJ 治療を行う上で大変重要な要件である。

BRONJ に対する治療法を検討する上で、BRONJ の正確な病態生理を理解することは不可欠であるが、いまだ十分には解明されていない。BRONJ の病態生理を明らかにするためには、ヒトの BRONJ と酷似した症状を発症する動物モデルが欠かせないが、BRONJ 患者が報告され始めた当初は BRONJ 様症状を発症する小動物モデルは存在していなかった。近年、ヒトの BRONJ 様症状を発症する動物モデルについての報告がなされるようになり、BRONJ の病態生理がわずかずつ明らかになり始めている^{14, 15)}。本研究では、野生型マウスである C57BL/6J に対して、BRONJ の原因となる代表的な薬剤である ZOL と抗悪性腫瘍薬である MEL を投与することで BRONJ 様症状を発症させた。その結果、ZOL と MEL を併用投与した ZM 群では、約半数のマウスにおいて、BRONJ の特徴的症狀である、抜歯窩における

顎骨露出が認められた (図 2). 半数のマウスでは抜歯窩が閉鎖していたが, H. E. 染色による組織学的観察では, 上皮が閉鎖していたマウスも含めてすべてのマウスで, 抜歯窩周囲の歯槽骨で骨小腔内の骨細胞の消失という典型的な BRONJ の病理所見が確認された (図 5). ZOL および MEL 単独投与群では, すべてのマウスで顎骨露出は認めず, 組織像でも骨壊死の所見を認めなかった. 以上の結果から, ZM 群における抜歯後の所見は, 単に抜歯後の治癒不全ではなく ZOL と MEL の副作用によって引き起こされたものであると推測された. 単独投与群では BRONJ 様症状を認めなかったことから, BRONJ 発症の要件として, 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, 強い骨髄機能抑制作用を有する. 骨髄の重要な機能として, 造血機能があげられ, MEL による造血機能の低下が BRONJ 発症に関わっていることが示唆されたことから, それぞれの実験群における T 細胞の動態について検索を行った. その結果, ZM 群では VC 群と比較し, 末梢血中の CD3 陽性細胞数が減少していた. 減少している CD3 陽性細胞中で, 唯一 $\gamma \delta$ T の割合が増加していた. 成熟 T 細胞は, T 細胞受容体が α 鎖と β 鎖で構成される $\alpha \beta$ T 細胞と γ 鎖と δ 鎖で構成される $\gamma \delta$ T の 2 群に分けられる. 末梢血中では $\alpha \beta$ T 細胞が大多数を占めるのに対し, $\gamma \delta$ T は, 全 T 細胞の 1~5% と割合はわずかであるが, 感染早期の防御機構に関わり, 活性化

した $\gamma \delta T$ は細胞傷害性を示すことが知られている¹⁶⁾。また、活性化した $\gamma \delta T$ は、自己免疫疾患の一つである関節リウマチの発症の病因となっていることが報告されている⁸⁾。ZM 群における末梢血中の T 細胞数の減少は、MEL による造血機能の低下によるものと推測されるが、その中でも $\gamma \delta T$ の割合が増加している理由は、ZOL が $\gamma \delta T$ の増殖と活性化を促すことから¹⁷⁾、 $\gamma \delta T$ が ZOL に感作したためと考えられる。一方、ZM 群では VC 群と比較し、脾臓における Treg が減少していた (図 10)。Treg は過剰な免疫反応の抑制と免疫応答の恒常性維持の役割を果たしている¹⁸⁾。本実験において ZM 群のみに顎骨露出という典型的な BRONJ 様症状が発現した事象は、Treg の減少と $\gamma \delta T$ の増加という双方の作用が強く関わっているものと推測される。つまり、ZOL の影響で $\gamma \delta T$ が増加し、その状況で抜歯を行ったことにより、 $\gamma \delta T$ による過剰な免疫反応が亢進、かつ、活性化した $\gamma \delta T$ を抑制する Treg が MEL の影響で減弱しているため、制御を失った $\gamma \delta T$ によって抜歯窩周囲の正常な骨組織が傷害をうけ、BRONJ 様症状が引き起こされたものと考えられる。

MSC は、全身の間葉系組織に分布する体性幹細胞であるが、多分化能以外に強力な免疫調整能を有している⁵⁾。Shi らは、動物実験において、MSC 移植による BRONJ の治療について報告している¹⁴⁾。しかし、細胞移植は、移植した細胞の免疫拒絶の危険性、移植細胞の生着率の低さ、移植した細胞の腫瘍形成や培養に関

わる安全性など、実際に臨床応用を実施する上で、解決しなければならない課題が多く存在している。SHED の分泌液中には、数百種類以上のサイトカインや成長因子、ケモカイン、エクソソームなど多くの生理活性物質が含まれており、これらの生理活性物質は、きわめて高い組織修復能や免疫調整能を有していることから、多くの難治性疾患に対して高い治療効果を示している⁵⁻⁸⁾。そこで本研究は、BRONJ 様マウスに対して SHED-CM を腹腔内に投与することで、BRONJ 様症状の治療に効果があるか検討を行った。

その結果、SHED-CM の投与を行った ZMS 群では、ZOL および MEL を投与しているにも関わらず、すべてのマウスで抜歯窩は上皮で閉鎖されていた。さらに、切片における組織診断では、ZMS 群では 10 匹中 8 匹のマウスで骨細胞の喪失が観察されたが、残りの 2 匹のマウスにおいては骨細胞の喪失は確認されなかった。さらに、最大顎骨壊死面積を比較したところ、ZMS 群では ZM 群と比較してほぼ 1/3 まで縮小していた (図 6)。以上の結果から、SHED-CM は、BRONJ 様症状の発症を軽減する効果があることが判明した。

SHED-CM が BRONJ に対して治療効果を示した理由について、われわれはマクロファージに注目した。マクロファージは自然免疫において中心的な役割を果たしているが、疾患の発症に関わるさまざまなサブタイプのマクロファージが存在していることが明らかになっており¹⁹⁾、細菌やウイルス感染、アレルギー応

答などの際に活性化する M1 マクロファージと、抗炎症・免疫抑制機能をもった M2 マクロファージに大別される。M1 マクロファージは、多くの炎症性サイトカインを発現し Th1 型の免疫応答を誘導する。M2 マクロファージは、抗炎症性メディエーターを産生して損傷反応の消退と組織修復を促進する。そこで、マウスの腹腔内の滲出細胞浮遊液における M1 マクロファージと M2 マクロファージの比率について検証した。VC 群では $20.0 \pm 1.8\%$ 、ZM 群では $10.2 \pm 0.4\%$ であったが、SHED-CM を投与した ZMS 群では $18.4 \pm 4.1\%$ と有意に増加していたことが確認された（図 12）。つまり、SHED-CM を投与したことで M2 マクロファージ比率の増加が引き起こされたと推測される。

M2 マクロファージは PGE_2 、 $\text{TGF-}\beta$ 、IL-10 などのサイトカインを産生し、Treg の浸潤を促す^{20,21)}。つまり、SHED-CM を投与すると M2 マクロファージが増加し、産生されるサイトカインが増加、その結果 Treg が増加する。これにより Treg と $\gamma \delta \text{T}$ の均衡が改善されたため、BRONJ 様症状が軽減したと考えられる。また、SHED-CM 中には多くの抗炎症性メディエーターが含まれるため、これらの生理活性物質により BRONJ 様症状が改善された可能性も考えられる。今後、SHED-CM 中に存在しているこれらの有効因子を同定する必要があるが、SHED-CM は BRONJ のあらたな治療方法として有用だと考えられる。

結 論

BRONJ に対する SHED-CM の治療効果について検討を行った．BRONJ 様症状の発症には，Treg と $\gamma \delta$ T の不均衡が関与しており，SHED-CM は M2 マクロファージを介して Treg と $\gamma \delta$ T の不均衡を改善することで，BRONJ 様症状に対して治療効果を示した．BRONJ に対する SHED-CM 投与は有効な治療となることが示唆された．

謝 辞

本稿を終えるにあたり数々のご援助，ご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究院口腔顎顔面外科学教室，薬理学教室および学術支援部の教室員各位に厚く御礼申し上げます．

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

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. 2003 Sep;61(9):1115-1117.
- 2) Hellstein JW, Adler RA, Edwards B, Jacobsen PL, Kalmar JR, Koka S, Migliorati CA, Ristic H: Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. J Am Dent Assoc. 2011 Nov;142(11):1243-1251.
- 3) Carlson ER: Management of antiresorptive osteonecrosis of the jaws with primary surgical resection. J Oral Maxillofac Surg. 2014 Apr;72(4):655-657.
- 4) Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikui T, Akiyama K, Lee JS, Shi S: SHED repair critical-size calvarial defects in mice. Oral Dis. 2008 Jul;14(5):428-434.
- 5) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S,

- Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R: Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002 Jan;30(1):42-48.
- 6) Mita T, Furukawa-Hibi Y, Takeuchi H, Hattori H, Yamada K, Hibi H, Ueda M, Yamamoto A: Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2015 Oct;293:189-197.
- 7) Yamaguchi S, Shibata R, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Tanigawa T, Ueda M, Murohara T, Yamamoto A: Dental pulp-derived stem cell conditioned medium reduces cardiac injury following ischemia-reperfusion. *Sci Rep.* 2015 Nov;5:16295.
- 8) Ishikawa J, Takahashi N, Matsumoto T, Yoshioka Y, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Ishiguro N, Ueda M, Furukawa K, Yamamoto A: Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. *Bone.* 2016 Feb;83:210-219.
- 9) Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci*

U S A. 2003 May;100(10):5807–5812.

10)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. 2010 Jul;28(4):365–383.

11)Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O’Ryan F, Reid IR, Ruggiero SL, Taguchi A, Tetradis S, Watts NB, Brandi ML, Peters E, Guise T, Eastell R, Cheung AM, Morin SN, Masri B, Cooper C, Morgan SL, Obermayer-Pietsch B, Langdahl BL, Al Dabagh R, Davison KS, Kendler DL, Sándor GK, Josse RG, Bhandari M, El Rabbany M, Pierroz DD, Sulimani R, Saunders DP, Brown JP, Compston J: Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. J Bone Miner Res. 2015 Jan;30(1):3–23.

12)Fliefel R, Tröltzsch M, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S: Treatment

- strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 May;44(5):568-585.
- 13) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Mar;65(3):369-376.
- 14) Kikui 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.* 2010 Jul;25(7):1668-1679.
- 15) Aghaloo TL, Cheong S, Bezouglaia O, Kostenuik P, Atti E, Dry SM, Pirih FQ, Tetradis S: RANKL inhibitors induce osteonecrosis of the jaw in mice with periapical disease. *J Bone Miner Res.* 2014 Apr;29(4):843-854.
- 16) 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(+)V γ 6(+) γ δ T cells.
Nat Commun. 2015 Jun;6:7464.
- 17) Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Roberts A, Buccheri S, D'Asaro M, Gebbia N, Salerno A, Eberl M, Hayday AC: Targeting human γ δ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res. 2007 Aug;67(15):7450-7457.
- 18) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995 Aug;155(3):1151-1164.
- 19) Murray PJ, Wynn TA: Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol. 2011 Oct;11(11):723-737.
- 20) 富岡治明, 多田納豊, 佐野千晶, 清水利朗: M1, M2 マクロファージポピュレーション —抗酸菌感染で誘導・活性化されるマクロファージとの関連から。—結核. 2016 Feb;91(2):75-82.
- 21) 竹屋元裕: ヒト悪性腫瘍における M2 マクロファージ浸潤の意義. 炎症と免

疫. 2016 Apr;24(3):243-248.