

氏名	三海 晃弘
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6375号
学位授与の日付	令和3年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	BMP-2/ β -TCP Local Delivery for Bone Regeneration in MRONJ-Like Mouse Model (薬剤関連顎骨壊死様モデルマウスにおける BMP-2/ β -TCP の局所投与が骨再生に与える影響の検討)
論文審査委員	松本 卓也 教授 皆木 省吾 教授 佐々木 朗 教授

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

近年、骨粗鬆症治療の第1選択薬としてビスフォスフォネート(BP)製剤が国内外で広く使用されており、癌の骨転移や骨代謝疾患などの治療にも応用されている。このBP製剤など骨吸収抑制薬を投与されている患者が侵襲的歯科治療を受けた際、抜歯窩治癒不全や顎骨壊死を発生する薬剤関連顎骨壊死 (Medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ) が大きな社会問題となっている。MRONJの発症原因は不明な点が多いものの、破骨細胞活性の過度な抑制とそれに伴った骨代謝活性の低下が一因であると考えられている。現在、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、骨折の予防が優先されることが多い。一方で、MRONJが発症すると、その病勢を予知性高く阻止することは難しく、患者のQOLを著しく低下させるため、感染源除去等の最低限の抜歯処置ですら慎重にならざるを得ないのが現状である。一方、Bone morphogenetic protein(BMP)-2はBMPレセプターを介して骨芽・破骨細胞活性を共に亢進し、骨のターンオーバーを促進する作用を有していることが知られている。我々は β -Tricalcium phosphate (β -TCP)をキャリアに用いて、強力な骨形成能を有する大腸菌発現系由来 recombinant human BMP-2 (E-rhBMP-2)を応用した骨形成活性を有する人工骨の開発を進めており、本邦においてもヒトにおける臨床応用が目前となってきた。このような研究背景から、骨代謝を活性化することが可能なE-rhBMP-2を応用し、抜歯窩の骨代謝活性を促すことで、骨壊死の抑制や抜歯窩の再生を促すことができるのではないかと考えた。

そこで、本研究では、骨壊死抑制と抜歯窩再生におけるE-rhBMP-2/ β -TCPの有効性をMRONJ様モデルマウスを用いて明らかにすることとした。

【材料と方法】

Kuroshimaらの方法に従い (Kuroshima et al., Bone, 2018), Zoledronic acid hydrate (ZA)

とCyclophosphamide (CY)を3週間投与 (2回/週)した8~12週齢の雌マウスの上顎第一臼歯を抜歯し、MRONJ様モデルマウスを作製した。

E-rhBMP-2の骨壊死抑制効果を検討するため、抜歯と同時にE-rhBMP-2と β -TCPの複合体 (E-rhBMP-2/ β -TCP)を抜歯窩に移植し、その後もZA/CY投与を継続した (ZA/CY継続投与モデル, 5-8)。また、E-rhBMP-2/ β -TCPの抜歯窩再生治療効果を検討するため、MRONJ様モデルマウスの抜歯2週間後にZA/CY投与を中止し、抜歯窩を搔爬した後、E-rhBMP-2/ β -TCPを移植した (ZA/CY投与中止モデル, n=5-8)。骨壊死の指標として、抜歯窩の新生骨内および抜歯窩周囲の中空の骨小腔数を計測した。さらにマッソントリクローム染色を行い、創傷治癒に必須であるコラーゲン線維の占有率を計測した。また、骨芽細胞マーカーであるオステオポンチンおよび、血管内皮細胞マーカーであるエンドムチンの免疫組織化学染色、破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP)の染色を行った。それぞれのモデルマウスの抜歯窩に何も移植しない群を対照群 (n=5-13)とした。

【結果】

E-rhBMP-2の骨壊死抑制効果をZA/CY継続投与モデルにて検討した。組織学的解析の結果、対照群の抜歯窩は疎な組織で満たされ、新生骨形成面積率は $10.3 \pm 7.9\%$ であった。一方、E-rhBMP-2/ β -TCP群の抜歯窩は、コラーゲン線維に富んだ組織で満たされ、抜歯窩の新生骨形成面積率は $32.5 \pm 17.2\%$ と、対照群と比較し有意に増加していた (unpaired t-test, $p < 0.001$)。また、E-rhBMP-2/ β -TCP群の抜歯窩の新生骨内 ($p < 0.01$) および、抜歯窩周囲骨 ($p < 0.05$)の骨小腔中空数は対照群と比較し有意に減少した (unpaired t-test)。

次に、E-rhBMP-2の抜歯窩再生効果をZA/CY投与中止モデルで検討した。その結果、E-rhBMP-2/ β -TCP群の抜歯窩の新生骨形成面積率は $76.5 \pm 11.5\%$ であり、対照群の $25.2 \pm 9.7\%$ と比較して有意に高かった (unpaired t-test, $p < 0.001$)。また、ZA/CY投与中止モデルにおいても、抜歯窩の新生骨内 ($p < 0.001$) および抜歯窩周囲骨 ($p < 0.001$)の骨小腔中空数はE-rhBMP-2/ β -TCP移植により有意に減少した (unpaired t-test)。また、両群ともにTRAP陽性破骨細胞が観察され、E-rhBMP-2/ β -TCP群の抜歯窩の新生骨周囲には、オステオポンチン陽性骨芽細胞が対照群と比較して有意に増加していた (unpaired t-test, $p < 0.01$)。

【結論と考察】

MRONJ様モデルマウスの抜歯窩にE-rhBMP-2/ β -TCPを移植することで、抜歯窩の新生骨形成面積率およびコラーゲン線維占有率の増加、抜歯窩新生骨内および抜歯窩周囲骨の骨小腔中空数が減少することから、E-rhBMP-2/ β -TCPの移植は、ZA/CY投与の継続・中止にかかわらず骨壊死様変化の抑制、および抜歯窩再生において一定の効果があることが明らかとなった。つまり、本研究により抜歯窩へのE-rhBMP-2/ β -TCPの移植は、骨代謝の活性化を促し、MRONJの骨壊死予防や抜歯窩再生における有効な治療法となる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

骨吸収阻害剤による骨代謝異常が病因として考えられている薬剤関連顎骨壊死 (Medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ) の病態は依然不明な点が多い。そのため、明確な治療法は確立されておらず、病態発生メカニズムの解明や治療法の開発が急務である。一方 Bone morphogenetic protein (BMP)-2 は BMP レセプターを介して骨芽・破骨細胞活性を共に亢進し、骨代謝を促進する作用を有していることが知られている。学位申請者らのグループは β -Tricalcium phosphate (β -TCP) をキャリアに用いて、強力な骨形成能を有する大腸菌発現系由来 recombinant human BMP-2 (E-rhBMP-2) を応用した骨形成活性を有する人工骨の開発を進めている。そこで骨代謝を活性化することが可能な E-rhBMP-2 を応用し、抜歯窩の骨代謝活性を促すことで、顎骨壊死の抑制や抜歯窩の創傷治癒を促すことができるのではないかと考えた。本学位研究では、顎骨壊死抑制と抜歯窩創傷治癒における E-rhBMP-2/ β -TCP の有効性を MRONJ 様モデルマウスを用いて検討した。

研究結果は、以下の内容であった。

1. 健全なマウス抜歯窩は抜歯後 4 週でほぼ新生骨により満たされ、新生骨形成の占める面積率は抜歯後 8 週と比較して差がなかった。また、健全なマウスの抜歯窩に移植した E-rhBMP-2/ β -TCP は 4 週でほぼ骨に置換していることを組織学的に確認した。
2. 骨壊死抑制モデルにおいて、移植を行っていない対照群と比較して E-rhBMP-2/ β -TCP 群の抜歯窩内の新生骨形成の占める面積率は有意に増加し、新生骨の骨小腔中空数も有意に減少していた。また、E-rhBMP-2/ β -TCP 群の抜歯窩はコラーゲン線維に富んだ組織で満たされていた。
3. 骨壊死治療モデルにおいて、対照群と比較して E-rhBMP-2/ β -TCP 群の抜歯窩において新生骨形成の占める面積率は有意に増加し、新生骨の骨小腔中空数も有意に減少していた。また、OPN 陽性の骨芽細胞面積の有意な増加を認め、破骨細胞の存在も確認された。

以上の結果より、抜歯窩への E-rhBMP-2/ β -TCP の移植により、骨代謝の活性化を促すことで、MRONJ の顎骨壊死予防や抜歯窩創傷治癒における有効な治療法となる可能性が示唆された。なお、本論文はすでに *International Journal of Molecular Sciences*, 第 21 巻, 第 19 号 (発刊年月日: 2020 年 9 月 24 日) に掲載されており、国際的にも評価されている。

以上に基づき、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。