

令和元年6月17日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11607

研究課題名(和文)糖代謝を標的としたMRONJに対する分子医学的病態制御ストラテジーの確立

研究課題名(英文) Establish of molecular biological strategy to MRONJ by glucose metabolism

研究代表者

柄 慎太郎 (Tsuka, Shintaro)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20759386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ビスフォスフォネート(BP)製剤投与中の骨粗鬆症治療患者に対し、歯科治療を発端とするMRONJが大きな問題となっている。我々は骨代謝と全身の糖代謝の関連性に着目し、糖尿病治療薬を用いてBP製剤による抜歯後の顎骨治癒遅延に対する効果を明らかにすることを目的とした。抜歯後を行った顎骨の3次元構造評価では実験群において抜歯窩の有意な治癒改善を認め、さらに壊死骨面積の評価をしたところ、実験群が有意に低い値を示した。以上より、抜歯やインプラント治療におけるMRONJ発症のリスクを薬物療法でコントロールできる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、BP製剤とは異なる作用機序により骨吸収を抑制する薬剤でも、同頻度で顎骨壊死が発症するとの報告がある。BP製剤自体の問題でなく、それらが持つ、骨吸収抑制作用に起因すると推測される。顎骨壊死の詳細な機序については、未だ明らかにされていないが、本研究で糖代謝の関連性が判明すれば、MRONJの病態解析、新規骨吸収阻害創薬が可能となり、インプラント治療に限らず、BP製剤がもたらす歯科治療への弊害を軽減することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：MRONJ, which proceeds with dental treatment, is a major problem for osteoporosis-treated patients who are receiving bisphosphonate (BP). We focused on the relationship between bone metabolism and general glucose metabolism, and aimed to clarify the effect of BP on jaw bone healing delay after tooth extraction using a diabetes drug. Three-dimensional structural evaluation of the jaw bone after tooth extraction showed significant healing improvement of the tooth extraction socket in the experimental group. Furthermore, when the necrotic bone area was evaluated, the experimental group showed a significantly lower value. These results suggest that the risk of MRONJ for tooth extraction and implant treatment can be controlled by drug therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨代謝 糖代謝 MRONJ 歯科インプラント

## 1. 研究開始当初の背景

わが国においては、人口の急速な高齢化に伴い骨粗鬆症の患者が年々増加しつつあり、その数は現時点で 1300 万人と推測されている。骨粗鬆症では椎体、前腕骨、大腿骨近位部などの骨折が生じやすい。それが転機となり、寝たきりの容体になる高齢者も多く、その対策が医療のみならず社会的にも重要な課題となっている。また、糖尿病といった生活習慣病も、骨折リスクが高い、すなわち骨質劣化型の骨粗鬆症を合併しやすいことは世界的なコンセンサスが得られている。その一方で、骨粗鬆症治療薬である BP 製剤を服用中患者の、歯科治療を発端とする BRONJ が大きな問題であった。近年、BP 製剤以外にも、抗 RANKL モノクローナル抗体、抗 VEGF 抗体といった骨吸収抑制剤も、顎骨壊死を引き起こすことが報告されており、MRONJ と呼ばれているが、その詳細な原因は不明である。このような中、BP 製剤服用中患者は、絶食時血糖値が有意に高いという報告や、MRONJ 発症患者の多くが糖尿病を発症していたという報告がある。これらの報告は、骨吸収抑制剤が有する骨代謝制御と、糖代謝の低下が密接に関与している可能性を示唆するものである。すなわち骨粗鬆症患者に対して BP 製剤を投与することで糖尿病様の症状が引き起こされ、その結果として起こる自然免疫低下や組織脆弱性などが MRONJ を惹起すると考えられる。また、基礎研究では骨基質タンパク質の一つであるオステオカルシンが、糖代謝調節に必須なインスリンを分泌する膵臓細胞に作用して増大させる、また、骨芽細胞が有するインスリン受容体の活性化によって骨のリモデリングが亢進することが知られている。これらのことから、骨代謝と糖代謝は互いに正の相関を有している可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では抜歯を行った MRONJ モデルラットを用いて糖尿病治療薬が持つ、BP 製剤による顎骨治癒遅延に対する影響を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験動物には 4 週齢雄性 Wistar 系ラットを 24 匹用いた。生理食塩水を投与したコントロール群 (Con 群)、ゾレドロン酸とデキサメタゾンを経口投与した MRONJ 誘発群 (ZD 群)、ZD 群に糖代謝関連薬剤であるインスリンを経口投与したインスリン投与群 (Ins 群) と ZD 群にメトホルミンを経口投与したメトホルミン投与群 (Met 群) を作製し、薬剤投与 2 週間後に、三種混合麻酔を用いた全身麻酔下にて、上顎右側第一臼歯を抜歯した。(各群 n=6)。薬剤投与期間中は週一回、体重測定を行い、2 週ごとに採血を行った。

### (1) $\mu$ CT による抜歯窩評価

歯槽骨の形態学的評価のために  $\mu$ CT 撮影を用いて分析した。上顎右側第一臼歯抜歯窩周囲について、 $5\mu\text{m}$  のスライス幅での断層撮影を行った。撮影した像を 3D 構築し、上顎骨の冠状断、矢状断像を作成した。画像解析ソフトにて分析し、頬舌的、近遠心的な抜歯窩の治癒状態を観察した。頬舌的な観察では、上顎第一臼歯抜歯窩相当部の断層画像において頬側の歯槽骨頂と舌側の歯槽骨頂を結んだ線より下方にある骨欠損部の面積を測定した。近遠心的な観察では、抜歯窩の最近心の骨頂と遠心の骨頂を結んだ線の下方にある骨欠損部の面積を測定した。

### (2) 病理組織学分析

通法によりパラフィン包埋を行った上顎骨を矢状方向に  $5\mu\text{m}$  の厚さで薄切切片を作製し、ヘマキシリン・エオジン染色、TRAP (酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ) 染色を行った。デジタルマイクロスコープで染色された組織切片を観察し、抜歯窩内部、および形成された骨欠損部に認められる壊死骨の範囲、破骨細胞の数を計測した。壊死骨の範囲に関しては Allen and Burr の定義に従って、空骨細胞間の領域が  $>500\mu\text{m}^2$  である領域を壊死骨と判定した。また抜歯窩に認められる TRAP 陽性多核細胞である破骨細胞の数を計測した。

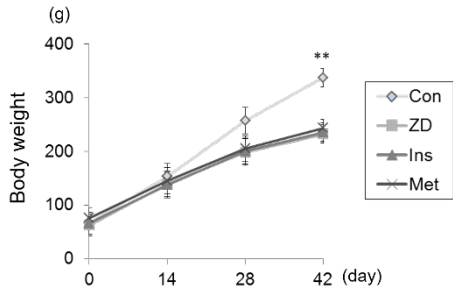
### (3) 血中オステオカルシン濃度

実験期間中、各群で第 4 週齢から 2 週間毎にラットの外側足根静脈より採血を行い、ELISA 法により血中オステオカルシン濃度を測定した。

## 4. 研究成果

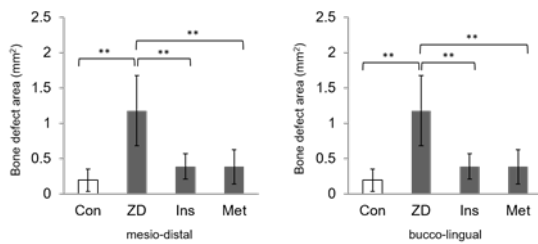
### (1) 体重変化

ZD 群は Con 群と比較すると実験期間中に有意な体重の低下を認めた。また、糖代謝改善薬を投与した Ins、Met 群でそれらが改善されることはなかった。



### (2) $\mu$ CT による抜歯窩評価

ZD 群においてのみ、肉眼的所見で抜歯窩の骨露出を認めた。  $\mu$ CT による抜歯窩周囲骨の 3 次元解析をしたところ、上顎骨の近遠心および頬舌方向ともに Con 群と比較して、ZD 群では治癒不全が認められた。その多くは抜歯窩が大きく残ったままであった。一方、Ins、Met 群では ZD 群と比較して抜歯窩の治癒改善が認められた。インスリンとメトホルミンによる糖代謝の活性化が、抜歯窩の治癒を改善したと考える。

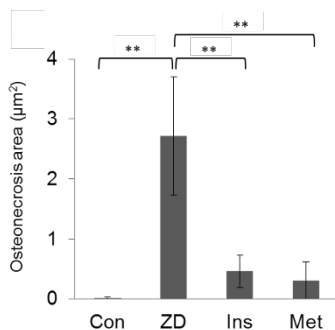
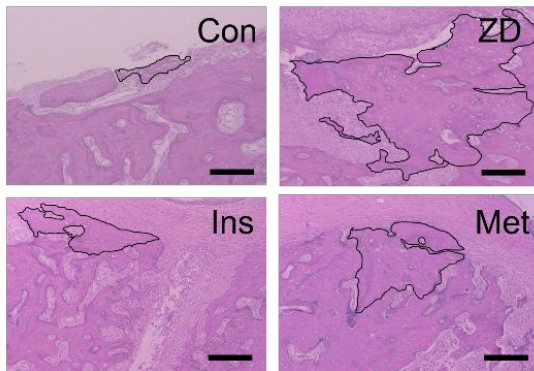


### 3) H-E 染色による壊死骨面積の評価

抜歯窩周囲の骨壊死評価のために H-E 染色を行った。ZD 群で骨細胞が空洞化もしくは核が萎縮している範囲が有意に多く認められた。Ins、Met 群では骨壊死の面積が ZD 群と比較して有意に減少し、Con 群と同等にまで改善した。糖代謝の活性化が、壊死骨領域を減少させたと考えられる。

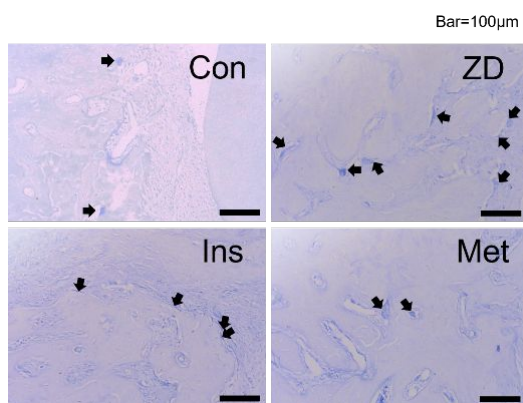
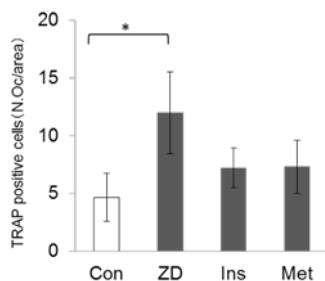
#### HE 染色

Bar=100 $\mu$ m



#### 4) TRAP 陽性細胞数の評価

破骨細胞の分布を評価するために TRAP 染色を行ったところ、ZD 群では Con 群と比較して破骨細胞数が有意に増加していた。Ins、Met 群の破骨細胞数は ZD 群に比べ減少する傾向にあったが有意差は認められなかった。ZA 投与が破骨細胞のアポトーシスを誘導したことにより、TRAP 陽性細胞が多く残存していたと考えられる。



#### (5) 血中オステオカルシ(GluOC)濃度

ELISA により GluOC 濃度を測定した。骨基質タンパクであるオステオカルシンが血中に放出された GluOC は膵臓の細胞に作用し、インスリン分泌を増加させ、骨芽細胞におけるインスリン受容体の活性化は骨のリモデリングを促進する。今回の研究においても壊死骨領域が改善した Ins、Met 群で上昇が認められると考えたが、4 群間で有意な差は認められなかった。局所的な骨吸収・骨形成の変化の評価することはできないことが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

青沼史子, 竹内弘, 柄慎太郎, 近藤祐介, 友枝圭, 石田秀幸, 正木千尋, 細川隆司. 老化因子が骨代謝におよぼす影響の細胞生物学的解析. 日本口腔インプラント学会第 34 回九州支部学術大会. 熊本. 2017/1/22.

柄慎太郎, 近藤祐介, 田村暁子, 青沼史子, 金田和彦, 竹内敏洋, 佐藤義輝, 駒井英基, 正木千尋, 細川隆司. 下顎無歯顎に対する即時荷重インプラント治療の多施設 10 年間後ろ向き臨床研究. 平成 29 年度日本補綴歯科学会九州支部学術大会. 鹿児島. 2017/8/27.

Masaki C, Kondo Y, Aonuma F, Tamura A, Tsuka S, Mukaibo T and Hosokawa R. A 10-year retrospective multi-center study of immediate loading implants in the fully edentulous maxilla in Japanese population. 2017 BIENNIAL JOINT CONGRESS OF CPS-JPS-KAP. China. 2017/10/19.

中川智仁, 柄慎太郎, 青沼史子, 田村暁子, 向坊太郎, 近藤祐介, 正木千尋, 細川隆司. 糖代謝制御が骨治療に与える影響についての検討. 日本口腔インプラント学会第 36 回九州支部学術大会. 那覇. 2019/1/27.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：