

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09746

研究課題名(和文)スタチンの血管新生作用と骨形成作用による薬剤関連顎骨壊死の予防・治療法の開発

研究課題名(英文)Development of prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw by angiogenic and osteogenic effects of statins

研究代表者

中川 貴之(Nakagawa, Takayuki)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：30456230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、薬剤関連顎骨壊死の原因が薬剤による破骨細胞障害で緻密骨が増加、さらに血管新生そのものが障害されることにより、骨髓腔や血管腔が狭小化することで、顎骨や歯周組織への血行障害をきたし、易感染性や栄養障害に陥ることが原因であると考え、顎骨への血流障害を改善できる薬剤としてスタチンに着目して研究を行ってきた。しかしながら、細胞実験においてスタチンの濃度依存的に骨形成作用が阻害され、期待した結果は得られなかった。一方、動物実験ではゾレドロン酸による顎骨壊死モデルラットの作製に成功した。顎骨壊死モデルラットは次の研究課題でも動物実験を継続して行っていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回着目したスタチンはラットの実験で骨形成作用により骨折部の治癒が得られるとの報告があるが、顎骨の血行再建に有用かは明らかになっていない。これまで申請者らもスタチンに関する血管新生作用、骨形成作用について検討を行ってきたが、細胞実験でも血管新生作用や骨形成作用が得られなかった。さらに高脂血症患者の中でも顎骨壊死を発症する症例があるため、スタチンの本来の生理的な用量では予防効果に乏しく、治療効果も得られにくいと考えられる。このため全く異なるアプローチが必要であると考えた。

研究成果の概要(英文)：We believe that the cause of drug-related osteonecrosis of the jaw is the increase of dense bone due to drug-induced osteoclast damage and the narrowing of the bone marrow and vascular spaces due to the impairment of angiogenesis itself, which leads to impaired blood circulation to the jawbone and periodontal tissues, resulting in easy infection and nutritional impairment. We have focused on statins as drugs that can improve blood flow to the jawbone. However, in cell experiments, statins inhibited osteogenesis in a concentration-dependent manner, and the expected results could not be obtained. On the other hand, in animal experiments, we succeeded in producing a rat model of osteonecrosis of the jaw induced by zoledronic acid. We plan to continue animal experiments on the rat model of osteonecrosis of the jaw in our next research project.

研究分野：口腔外科学

キーワード：薬剤関連顎骨壊死 スタチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤関連顎骨壊死の原因薬剤の一つである窒素含有 BP 製剤はメバロン酸経路を阻害し、GTP 結合タンパク質の機能を障害することで破骨細胞を抑制している。一方、デノスマブは抗ヒト RANKL モノクローナル抗体で RANKL シグナル経路を阻害することで破骨細胞に作用して骨代謝を抑制している。作用機序は異なるがいずれも破骨細胞の分化・機能障害を生じることで骨吸収を抑制する。申請者らはこれまで顎骨壊死を発症するメカニズムを解明するために、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、破骨細胞分化におけるゾレドロン酸の標的遺伝子の同定を試みた。その結果、マウスとヒトの破骨細胞前駆細胞にて破骨細胞分化因子に加え、重要な血管新生因子の一つである VEGFR2 の発現がゾレドロン酸により抑制されていることを見出した。つまり BP は骨吸収阻害作用以外に血管新生阻害作用も有している可能性が示唆された。

これらの知見から申請者らは、薬剤関連顎骨壊死は破骨細胞障害や血管新生障害により血管腔が狭小化し、顎骨や歯周組織への血行障害が生じることで易感染性や栄養障害に陥ることが原因であると考えている。これまでの BRONJ に対する薬物療法研究の殆どが、抗菌薬による感染予防と骨形成促進をターゲットにしているが、それは誤りであり、申請者らは血管新生をターゲットにすべきだと考えている。今回用いるスタチンは虚血性心疾患に対する血管新生療法の治療薬として期待されている。さらに、スタチンは BMP-2 を介して骨形成作用を有している。また高脂血症薬として長年、臨床応用されており安全性が確認されている。スタチンの血管新生作用や骨形成作用が顎骨壊死を生じている部位で効果を発揮すれば有効な予防法あるいは治療法となると期待される。

2. 研究の目的

今回、申請者らが着目したスタチンは側副血行路の発達を促進し虚血を改善する一方、VEGF などの成長因子のように腫瘍や動脈硬化などの病的な血管新生を促進する作用はなく、あくまで正常組織での血行再建に作用すると思われる。またスタチンは BMP-2 を介して骨形成を促進し、ラットを用いた実験では経口投与により骨量が増加することが知られている。よって、本研究の目的は薬剤性顎骨壊死の原因に血管新生阻害と骨形成阻害が大きくかかわっていることを示し、その治療薬としてスタチンの血管新生作用と骨形成作用の有用性を検討することである。申請者らが Pub Med と医学中央雑誌で検索した限りスタチンを MRONJ の治療に用いようとする研究の報告はない。

スタチンは高脂血症治療薬として広く臨床応用されており、長期投与における安全性も示されているため治験や薬事承認においても有利である。また経口投与が可能で患者にとっては注射剤のような苦痛もない。患者へ安全かつ容易に投与できることは、治療薬が具備すべき条件として非常に重要である。本研究で顎骨壊死の治療薬としての有効性が示されれば、顎骨壊死に苦しむ患者への早期の応用が期待できる。

さらに経口投与よりも効率よく病変部へ作用させる方法として、当研究室で開発を行った炭酸アパタイトにスタチンを含浸させ、病変部へ局所投与する方法も検討している。われわれの研究室で開発した新規の骨置換性バイオマテリアルである炭酸アパタイトは骨と置換する新規の生体材料で、基礎的な研究から始まり、現在治験を終了し、厚労省の承認を受け薬事申請中である。担体を使用しない局所投与ではスタチンは速やかに拡散、失活して効果を失うと考えられるが、この炭酸アパタイトにスタチン徐放能を付与することにより局所に必要十分なスタチンの薬効を与えることが期待できる。しかもこの炭酸アパタイトは生体内での正常な骨治癒が得られれば、生理的な吸収により骨へと置換する。申請者らは本研究でスタチンの経口投与での有用性を確認した後に、局所投与を目的とした、スタチン含浸炭酸アパタイトの有効性について BRONJ モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

本研究ではスタチンの血管新生作用を介した顎骨壊死の予防・治療への有用性を明らかにするために下記の実験を計画した。

(1)スタチンの培養細胞(血管内皮細胞、骨芽細胞)に及ぼす影響の評価

スタチンの予防作用の機序解明のため、上記の培養細胞を用いて、1~10 μ g/ml のスタチンを添加した培地で培養し、増殖に与える影響を評価する。血管内皮細胞では VEGF の発現量をリアルタイム PCR で測定する。また、ゾレドロン酸とスタチンの同時併用による細胞への影響も評価する。骨芽細胞の活性化については、アルカリホスファターゼ、タイプ I コラーゲン、オステオカルシン、また、破骨細胞形成への影響として RANKL の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて測定する。

(2)ラットの BRONJ モデル作製

動物の BRONJ モデルは種々あるが、100%の確率で、BRONJ を発症させる方法は未だない。よって、BRONJ 発症動物の数を確保するには、動物の数を増やす必要があるのでラットあるいはマウスが適していると考えている。申請者らは多くの文献検索を行い、現在のところ、最も高率に、しかも臨床症状とよく似たモデルとして Zandi らの報告(Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model., J

Craniomaxillofac Surg, 271-8, 2016)に準じてラットの BRONJ モデルを作製する予定である(上図)。すなわち、Wister 系ラットにゾレドロン酸 60 μ g/kg/週を週 2 回皮下投与する。4 週後に左右の臼歯を各 1 本抜歯する。抜歯 4 週後に口腔内の状態を観察し、骨露出が継続するものを BRONJ 発症ラットとする。

(3)スタチンの経口投与による BRONJ 予防実験と治療実験

予防実験：実験 1 にて樹立したラット BRONJ モデルを用いて、スタチンの BRONJ 予防効果を評価する。スタチンは過去の報告から、有効性の高いシンバスタチンを選択し、投与量は 0.5mg ~ 2.0mg/kg に設定する。投与法は栄養チューブを用いて胃に連日注入する。抜歯 4 週後に下顎骨を摘出し、BRONJ の発症率を測定する。試料は中性緩衝ホルマリンで固定後、脱灰し、パラフィン切片を作製、病理組織学的に評価する。また、一部の試料はリゴラック樹脂に包埋して、非脱灰切片を作製して、 μ CT と image J を用いて骨の状態を詳細に評価する。対照群には生理食塩水を栄養チューブで投与する。

治療実験：実験 2 と同様に BRONJ 発症ラットを作製する。BRONJ 発症ラットの口腔内を写真撮影し、骨露出面積を測定する。同ラットにシンバスタチンを栄養チューブで毎日投与する。シンバスタチンの投与量は 0.5mg ~ 2mg/kg に設定する。シンバスタチン投与 4 週、8 週後に下顎骨を摘出し、BRONJ の治療状況を骨露出面積を中心に評価する。試料は中性緩衝ホルマリンで固定後、脱灰し、パラフィン切片を作製、病理組織学的に評価する。また、一部の試料はリゴラック樹脂に包埋して、非脱灰切片を作製して、 μ CT と image J を用いて骨の状態を詳細に評価する。これによって、スタチンの治療効果を判定する。

なお、スタチンの効果が十分に得られない場合は、過去の文献を参考にスタチンを 10mg/kg まで増量する。さらに、新規に開発された HMG-CoA 還元酵素阻害活性が最も強いロスバスタチンの使用も考慮する。

(4)スタチンの局所投与による BRONJ 予防実験と治療実験

予防実験：スタチンの局所での治療効果を高めるため、スタチンを炭酸アパタイトに含浸させ、抜歯窩へ填入し、BRONJ の予防効果を検討する。具体的には Rojbanji らはシンバスタチン生型リン酸三カルシウムやハイドロキシアパタイトに含ませて、シンバスタチンを徐放させられることを報告している(J Biomed Mater Res 488-98, 2011)。申請者らは、これまで骨置換性の炭酸アパタイトを開発し、現在、臨床応用に向けた治験を進行中である。炭酸アパタイトはハイドロキシアパタイトと同じく骨と化学的に結合するだけでなく、生体内で骨と置換する性質を有する。そこで、Rojbanji らの方法で炭酸アパタイトにシンバスタチンを含浸させる。実験 1 の BRONJ 作製の際、抜歯窩にスタチンを含浸させた炭酸アパタイトを填入後、抜歯窩を縫合閉鎖する。抜歯 4 週後に実験 2 と同様の方法で、スタチン局所投与による BRONJ の予防効果を評価する。

治療実験：実験 4 と同様に作製した BRONJ モデルの顎骨壊死部の近傍の骨内にスタチンを含浸させた炭酸アパタイトを埋入する。その後、実験 4 と同様にスタチン局所投与による BRONJ の治療効果を評価する。

4. 研究成果

2018・2019 年度はスタチンの培養細胞に及ぼす影響の評価とラットの BRONJ モデル作製を行った。培養細胞を用いた検討では、プラバスタチンとロスバスタチンを用いてマウス骨芽細胞(MC3T3-E1)に対する影響を、細胞増殖能試験、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色、アリザリンレッド染色と骨分化因子に関するリアルタイム PCR を施行した。プラバスタチン、ロスバスタチンのいずれも 1 ~ 100 μ M の濃度で細胞増殖能の検討を行ったところ、プラバスタチンでは濃度間で細胞増殖能に差は見られなかったが、ロスバスタチンでは 50, 100 μ M で濃度依存的に増殖能の低下がみられた。このため、プラバスタチン、ロスバスタチンのいずれも 0 ~ 10 μ M の濃度で培養し、ALP 染色とアリザリンレッド染色を行ったが、プラバスタチンでは骨細胞分化誘導とスタチン濃度との相関は見られなかった。リアルタイム PCR により I 型コラーゲン、ALP、オステオカルシン、オステオポンチン、BMP2 の発現を検討した。その結果プラバスタチン濃度依存的に BMP2 の発現の上昇がみられた。ロスバスタチンでは骨細胞分化誘導の低下が認められた。またプラバスタチンとロスバスタチンのヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対する影響を、細胞増殖能試験を行って検討したが、ロスバスタチンに関しては濃度依存的に細胞増殖能の低下がみられた。

これらの in vitro 実験の結果は当初申請者らが予想していた、スタチンによる骨形成作用の増大とは相反する結果であり、in vivo の実験を優先し、その検証として in vitro 実験を行う方針とした。そのためゾレドロン酸による顎骨壊死モデルラットを作製した。具体的には Wister 系ラット、実験群 5 匹 と対照群 5 匹にそれぞれ Zoledronate 100 μ g/kg/週を皮下投与し、投与後 1 週間後右側の臼歯の周囲歯肉を 4-0 絹糸で結紮した(左側は結紮を行わない)。4 週後に左右の臼歯を各 1 本抜歯した。抜歯 4 週後に骨露出が継続するものを BRONJ 発症ラットとし、抜歯 4 週後に下顎骨を摘出し、BRONJ の発症率を測定した。その結果、対照群では BRONJ 発症ラットはいなかったが、実験群で 1 匹の BRONJ 発症ラットを認めた。

2020 年度ではこれまで用いてきたプラバスタチンとロスバスタチンの培養細胞系の実験での結果が予想外であったことを考慮し、過去の報告から有効性の高いシンバスタチンを選択し、マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1) の増殖能と骨細胞への分化能に対する影響を評価した。シンバスタチンを 0 ~ 10 μ M の濃度で培養し、MTT アッセイを行ったところ、培養開始 48 時間後に 5 μ M、10 μ M の群で細胞数の低下がみられた。さらに ALP 染色を行ったが、シンバスタチンの濃度依存的に骨分化誘導の低下が認められた。この予想と相反する結果はこれまで用いてきたプラバスタチンやロスバスタチンよりも顕著であり、スタチンによる骨形成促進作用が本研究では示されなかった。さらに海外の *in vivo* の先行研究では、ラットの骨量増加をもたらすスタチンの投与量は現在高脂血症改善に用いられている量の数倍であり、ヒトへの応用の際には有害事象が発生する危険性がある。さらに高脂血症患者の中でも顎骨壊死を発症する症例があるため、スタチンの本来の生理的な用量では予防効果に乏しく、治療効果も得られにくいと考えられる。このため顎骨壊死治療用材料の開発のためには全く異なるアプローチが必要であると考えた。

また、ゾレドロン酸による顎骨壊死モデルラットを作製に関しては、COVID-19 の蔓延により動物実験施設利用の制限があったため、十分な検証実験を行うことができなかった。このラットの BRONJ モデルの確立は次の研究課題でも継続して検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakagawa Takayuki, Kudoh Keiko, Fukuda Naoyuki, Kasugai Shohei, Tachikawa Noriko, Koyano Kiyoshi, Matsushita Yasuyuki, Sasaki Masanori, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 49
2. 論文標題 Application of low-crystalline carbonate apatite granules in 2-stage sinus floor augmentation: a prospective clinical trial and histomorphometric evaluation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal & Implant Science	6. 最初と最後の頁 382 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5051/jpis.2019.49.6.382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Takayuki, Ohta Kouji, Uetsuki Ryo, Kato Hiroki, Naruse Takako, Murodumi Hiroshi, Yokoyama Syo, Sakuma Miyuki, Ono Shigehiro, Takechi Masaaki	4. 巻 58
2. 論文標題 Zoledronate Inhibits Osteoclast Differentiation via Suppressing Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Genetics	6. 最初と最後の頁 473 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10528-020-09961-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福田 直志 (Fukuda Naoyuki) (10804156)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	宮本 洋二 (Miyamoto Youji) (20200214)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	玉谷 哲也 (Tamatani Tetsuya) (30274236)	徳島大学・病院・非常勤講師 (16101)	
研究分担者	真野 隆充 (Mano Takamitsu) (80325125)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・徳島大学特別 研究員 (16101)	
研究分担者	栗尾 奈愛 (Kurio Naito) (80622141)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関