

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17204

研究課題名(和文)薬剤関連顎骨壊死に対するテリパラチドの効果についての研究

研究課題名(英文)Evaluation of therapeutic effects of teriparatide in a bisphosphonate-related osteonecrosis

研究代表者

鶴島 弘基 (TSURUSHIMA, HIROKI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30725198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：MRONJラットに対するテリパラチド(TPTD)投与の動物実験では、下顎骨・大腿骨ともにTPTD投与により新生骨の増加と壊死骨の減少が確認できた。カルセイン2重標識では、下顎骨、大腿骨ともに、TPTD投与によって骨のリモデリングが、有意に活性化されていることが確認できた。非脱灰標本に対してVillanueva骨染色を行い、下顎骨・大腿骨共にTPTD投与によって破骨細胞数の有意な増加が認められた。血清中のRANKL, OC, CTXの濃度は、いずれもTPTD投与によって有意に増加しており、破骨細胞分化因子、骨形成マーカー、骨吸収マーカーが共に増加したことが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テリパラチド(TPTD)投与による壊死骨面積の減少および破骨細胞数の増加、RANKLとCTXの上昇から、MRONJによって形成された壊死骨が、破骨細胞により吸収されたことが推察された。MRONJに対するTPTD療法は、骨芽細胞による新生骨形成の促進だけでなく、破骨細胞の活性化による壊死骨の吸収によって、治療効果を発揮する可能性が示された。これらは、MRONJに対するTPTDの有用性を示しただけでなく、破骨細胞の壊死骨吸収の促進が一因である可能性を示した画期的な報告であったと考える。

研究成果の概要(英文)：Serum receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), osteocalcin (OC), and C-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen (CTX) were also examined. TPTD administration reduced necrotic bone area of the mandibles and femurs in the BRON rat model and induced new bone formation. In addition, TPTD injection increased the number of osteoclasts. The suggested underlying mechanism is the induction of protein levels of RANKL by TPTD. Furthermore, the serum levels of bone metabolism biomarkers (OC and CTX) were upregulated in the TPTD injection group. In conclusion, ZOL has negative effects on osteoclasts. TPTD was found to be effective in eliminating the negative effects of ZOL. TPTD had positive effects in preventing bone resorption and promoting osteogenesis. In addition, TPTD improved osteoclastogenesis, which in turn led to the improvement of BRON.

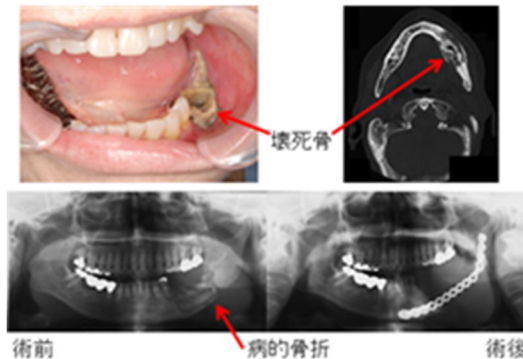
研究分野：口腔外科

キーワード：薬剤関連顎骨壊死 MRONJ テリパラチド TPTD

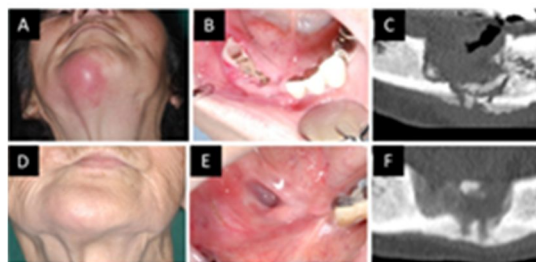
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤関連顎骨壊死 (Medication - Related Osteonecrosis of the Jaw: MRONJ) の発生頻度は、骨粗鬆症患者に対する BP 経口投与では患者 10 万人年当たり 1.04~69 人、静注使用例で 10 万人年当たり発生率は 0~90 人とされており、がん患者に対するゾレドロン酸、デノスマブ投与ではそれぞれ、1.8%、1.3%とされている。MRONJ の発生頻度は前述のように低いが、予防法・治療法が見つかっておらず、広範囲な骨壊死・骨露出や感染を引き起こすものもあり、疼痛・排膿や咀嚼障害などが生じ、患者の QOL に与える影響は極めて大きい。また、MRONJ は難治性であり保存的治療だけでは症状が増悪し、広範囲な外科的治療が必要となることも多い。MRONJ の明らかな治療法が見つけれられていないため、多くの歯科医師が治療に難渋しているのが現状である。さらに、抜歯を含む顎骨に対する外科的侵襲が MRONJ の原因の一つとも言われており、歯科医師が関連薬剤服用患者の歯科治療に消極的であったり、治療を敬遠することもあり問題となっている。



その様な中、2010 年に、遺伝子組み換えヒト副甲状腺ホルモンであるテリパラチド (Teriparatide:TPTD) によって MRONJ の stage3 の病的骨折が治癒したとの報告がされ、その後も、同様の症例報告が散見されつつあるが、科学的根拠のある報告に乏しく、特にこれらの報告を基礎研究にて証明するものは現時点では認められない。そこで、われわれは MRONJ モデルラットを開発し、口腔内感染症の主な原因菌であるグラム陰性桿菌に着目し、その一つである *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(A.a) の死菌の局所投与



テリパラチドの投与により症例の改善を認めた。BRONJ 症例 (上段:テリパラチド投与前。下段:テリパラチド投与後)

を行い骨壊死の増悪を確認した。また、A.a の死菌の主たる抗原性であるリポ多糖 (以下:LPS) に着目し LPS の局所投与にて骨壊死の増悪を確認した。これらの実験によって、LPS が MRONJ の発症の一因である可能性を示した。

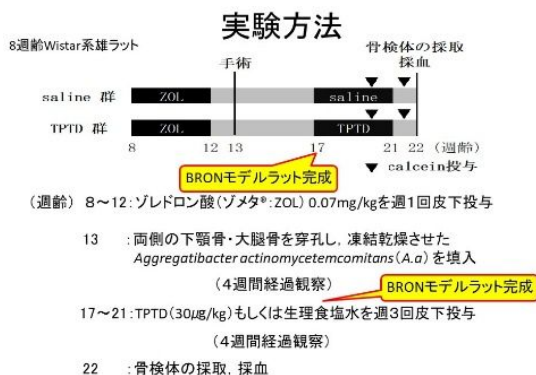
2. 研究の目的

本研究の目的は MRONJ の病態解明と TPTD による治療効果の検証、治療法の確立にある。この難治性で患者の QOL を極端に低下させる MRONJ の治療法を確立することは、患者や歯科医師に多大な利益をもたらすだけでなく、それらの薬剤を処方する医師にとっても予防策を提供し、発症した場合にも的確な治療法が確立されていることで安心して有用な薬剤 (BP 製剤、デノスマブや血管新生阻害薬等) を使用することを助ける根拠となることが期待される。

3. 研究の方法

過去に当教室で報告したモデルのプロトコール (Tsurushima H, Tominaga K et al. Int J Oral Maxillofac Surg. 2013 Nov;42(11):1481-7) に準じて MRONJ モデルラット作製。8 週齢 Wistar 系雄性ラット 18 匹を用いて、BP 製剤であるゾレドロン酸 (以下 ZOL) を週に 1 度、4 週間皮下投与。その後、両側の下顎骨および大腿骨に対して骨穿孔を行い、骨穿孔部に歯周病原菌である A.a を凍結乾燥させたもの填入。その後 4 週間経過観察を行い、MRONJ モデルを作製。

作製した MRONJ モデルラットを、2 群に群分けし、TPTD 投与群 (TPTD 群) と生理食塩水群 (生食群) を作製。TPTD または同量の生理食塩水を週に 3 回、4 週間投与。1 週間の経過観察ののち、末梢血の採血および骨検体を採取。なお、骨採取の 10 日前および 3 日前に骨の蛍光標識のためにカルセインを腹腔内投与。採取した骨検体から脱灰標本と非脱灰標本を作製し、両群の検体を比較。また、血清中の含まれる、破骨細胞分化因子の RANKL、骨形成マーカーのオステオカルシン、骨吸収マーカーの CTX について ELISA 法を用いて比較。



4. 研究成果

下顎骨・大腿骨の双方において、生食群では穿孔部の皮質骨には新生骨が見られず、周囲骨には核を伴わない骨小腔が広範囲に存在しており、骨壊死が確認できた。TPTD 群では、一部壊死骨が認められたが、穿孔部には新生骨が確認できた。

下顎骨・大腿骨ともに、TPTD 新生骨の増加と壊死骨の減少が確認でき、いずれの差も統計学的に有意であった。また、下顎骨と大腿骨の比較すると、TPTD 群では、新生骨面積は下顎骨の方が有意に高値であった。また、壊死骨面積は TPTD 群・生食群共に大腿骨の方が高値であった。

骨採取の 10 日前および 3 日前にカルセインを投与して 2 重標識を行った下顎骨非脱灰標本において、TPTD 群では生食群と比較して、二重染色の幅が広く、より骨のリモデリングが活性化されていることが確認できた。大腿骨でも同様に、TPTD 群では、より骨のリモデリングが活性化されていることが確認できた。カルセインによる二重染色の幅を統計学的に比較したところ、下顎骨、大腿骨ともに、TPTD 投与によって骨のリモデリングが有意に活性化されていることが確認できた。また、下顎骨と大腿骨を比較すると TPTD 群では、下顎骨の方が有意に高値を示した。

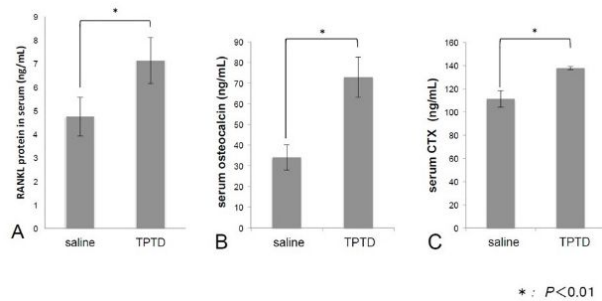
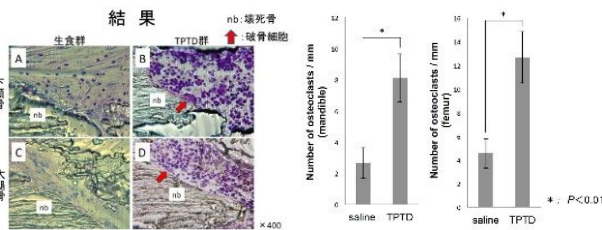
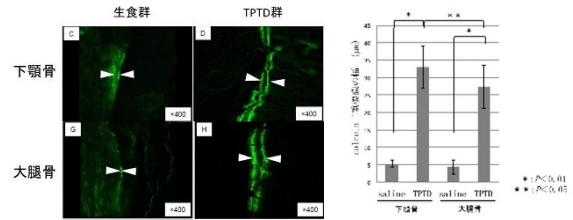
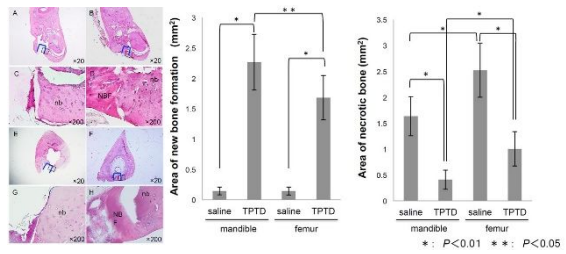
非脱灰標本に対して Villanueva 骨染色を行った下顎骨および大腿骨共に、TPTD 投与によって骨芽細胞や間葉系細胞が増加していることが確認できた。また、TPTD 群では壊死骨周囲には付着した破骨細胞が確認できた。壊死骨表面に付着した破骨細胞について、その個数を計測し比較したところ、下顎骨・大腿骨共に TPTD 投与によって破骨細胞数の有意な増加が認められた。

血清中に含まれる破骨細胞分化因子：receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)、骨形成マーカー：osteocalcin (OC)、骨吸収マーカー：C-terminal telopeptides of type 1 collagen (CTX) について ELISA 法を用いて計測したところ、血清中の RANKL、OC、CTX の濃度はいずれも TPTD 投与によって有意に増加しており、破骨細胞分化因子、骨形成マーカー、骨吸収マーカーが共に増加したことが確認できた。

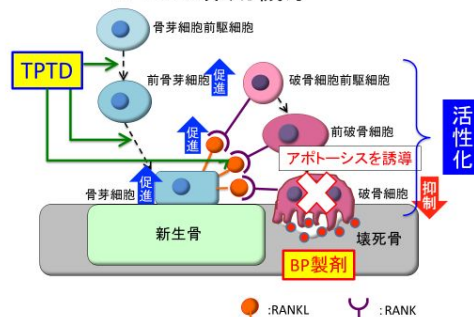
骨粗鬆症モデルラットへの TPTD の間欠的投与により、骨芽細胞が活性化され、新生骨の形成を促進することは、過去にも報告されており、今回の BRONJ モデルラットでも、下顎骨・大腿骨ともに有意な新生骨形成の増加が認められた。また、TPTD 投与による壊死骨面積の減少および破骨細胞数の増加、RANKL と CTX の上昇から、形成された壊死骨が破骨細胞により吸収されたことが推察された。

今回の結果から推察される、骨のリモデリングにおける TPTD の作用機序のシェーマを右に示す。BP 製剤によって破骨細胞のアポトーシスが誘導され、破骨細胞が抑制されている状態の BRONJ に対して、TPTD が前骨芽細胞および骨芽細胞の活性化を促進し、血清中の RANKL の発現を上昇させ、二次的に破骨細胞の活性化が促進され、壊死骨の吸収および新生骨の形成が促進されたと推察される。つまり、BP 製剤によって抑制されていた骨代謝回転が、TPTD 投与によって促進されることで、BRONJ の治癒に参与している可能性を示すことができた。

本結果から、BRONJ に対する TPTD 療法は、骨芽細胞による新生骨形成の促進だけでなく、破骨細胞の活性化による壊死骨の吸収によって、治療効果を発揮する可能性が示された。しかし依然としてその分子生物学的作用機序について



BRONモデルラットの骨リモデリングにおける TPTD の作用機序



ては不明な点も多く、今後 *in vitro* を含めた更なる作用機序に関する研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉賀大午、池田浩之、鶴島弘基、田中純平、坂口修、原口和也、土生学、笹栗正明、吉岡泉、富永和宏
2. 発表標題 ビスホスホネート製剤による骨壊死モデルラットに対する副甲状腺ホルモン製剤（テリパラチド）の治療効果に関する研究
3. 学会等名 第72回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉賀大午、池田浩之、田中純平、坂口修、鶴島弘基、金子純也、富永和宏、吉岡泉
2. 発表標題 ビスホスホネート製剤による骨壊死モデルラットに対するテリパラチドの治療効果
3. 学会等名 第63回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----