

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870523

研究課題名(和文)ビスフォスフォネート関連顎骨壊死の病因解明と治療・予防方法の開発

研究課題名(英文) Pathophysiology and therapeutic development for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw

研究代表者

黒嶋 伸一郎 (KUROSHIMA, Shinichiro)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：40443915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯科治療で誰もが一度は経験する抜歯ですが、近年、ビスフォスフォネート製剤を服用している患者様の一部に、抜歯しても治癒が起らず、骨が腐ってしまうこと(顎骨壊死)が分かってきました。ところが現在でも原因がよく分からず、治療方法もないことから、本研究は、顎骨壊死の病因と治療方法の開発を目的として、マウスを用いて研究を行いました。その結果、顎骨壊死には免疫に關与する複数の細胞と因子が關連していることが分かりました。このことは、今後の治療方法の開発へ大きく貢献できる結果だと思われます。

研究成果の概要(英文)：Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BR-ONJ) mainly occurs following tooth extraction with patients taking oral and/or intravenous bisphosphonates. However, the mechanisms of BR-ONJ is unclear. The aim of this study was to address pathophysiology of BR-ONJ using mouse ONJ model in the combination of intravenous bisphosphonate treatment, chemotherapy and tooth extraction. This model indicated that immune suppression might be associated with BR-ONJ due to some immune-related cells and proteins. This findings may contribute to the development of ONJ therapy.

研究分野：口腔外科学

キーワード：ビスフォスフォネート製剤 顎骨壊死 免疫 骨壊死 マクロファージ リンパ管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート (BP) 製剤は、骨粗鬆症治療、ならびに悪性腫瘍の骨転移治療に頻用される薬剤である。ところが2003年の報告<sup>1</sup>を契機としてBP製剤使用患者の一部にBRONJが起ることが、さらにはBRONJの約70%が抜歯に起因することが明らかとなってきた<sup>2</sup>。なお、広範囲にBRONJが起るとその後の補綴処置がほとんど行えずに顎骨切除に至る場合もあり、患者のQOLは著しく低下する。しかし、BP製剤服用の利点はBRONJという欠点を大きく上回り、休薬や投与中止は基本的には行われないことから、BRONJの病因を解明して治療方法や予防方法を確立することが必要であるが、BRONJに対する基礎研究はONJモデルの作製が非常に困難なために国内外でほとんど行われておらず、その病因は不明である。

そこで申請者はBRONJ誘発モデルを作製すべくミシガン大学で研究を行い、BP関連マウス口蓋粘膜創傷治癒不全モデルを開発し、BP製剤が全身のマクロファージ (Mφ) に影響を与える可能性を明らかにした<sup>3</sup>。このことは、近年の*in vitro*による報告でも証明されている<sup>4</sup>。そして遂に申請者は、抜歯を行ったマウスに抗癌剤とBP製剤を併用し、BRONJを高率(80%)で惹起させることに成功した<sup>5</sup>(図1)。なお、臨床的には抗癌剤とBP製剤の併用によりBRONJが最も高率で発生する。

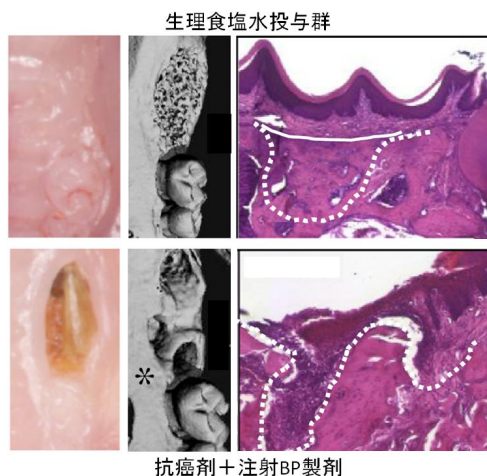


図1：BP製剤と抗癌剤の併用が惹起するONJ<sup>5</sup>(左側：肉眼所見により下段の抗癌剤+注射BP製剤投与群では明らかに軟組織の閉鎖が行われていないことが理解できる。真ん中：マイクロCT所見より、抗癌剤+注射BP製剤投与群では抜歯窩が全く治癒していないことが観察される。右側：ヘマトキシリン・エオジン染色により、抗癌剤+注射BP製剤投与群では、軟組織の閉鎖が行われておらず、壊死骨が有意に多く存在する。)

一方申請者は以前から、リンパ管微小循環系の検索も行っており、口腔軟組織に存在するリンパ管内皮細胞 (Lymphatic endothelial cell : LEC) が、樹状細胞 (Dendritic cell : DC) の遊走に寄与するケモカイン Cys-Cys chemokine ligand21 (CCL21) を発現し、炎症によりその発現動態を変化させることを明らかにしてきた<sup>6, 7</sup>。一方近年、頭頸部領域の炎症時には軟組織のリンパ管形成が増大し、CCR7 (CCL21の受容体) 陽性DCがCCL21依存性にリンパ管から頸部リンパ節に流入して免疫応答に寄与することが<sup>8</sup>、また、リンパ管形成には、Mφが産生するVascular endothelial cell growth factor-C (VEGF-C) が重要であることが証明された<sup>9</sup>。一方申請者は、BP製剤と炎症性サイトカインで処理したマウスMφが、対照群と比較して優位にVEGF-Cの発現を低下させることを見出した<sup>5</sup>。

以上の研究報告と申請者の一連の研究成果から、薬剤の影響を受けたMφがリンパ管形成不全を惹起した結果、DCのリンパ節への遊走障害が免疫応答機構の異常を誘発し、感染状態が持続してBRONJを引き起こすのではないかという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、BRONJの病因を解明し、

治療方法または予防方法の開発に挑戦することにある。

### 3. 研究の方法

[ 当初の研究計画 ]

申請者が開発したマウスBRONJ モデルで、リンパ管を介した免疫応答機構に異常があるかを検索する。具体的には、抜歯部位歯肉組織と頸部リンパ節において、以下のことを明らかにする。

- A) リンパ管の形成不全が起こっているか
- B) MφとDC の分布に異常が起こっているか
- C) LEC、MφまたはDC が発現する免疫機構に関わる蛋白質に異常があるか

LEC、MφおよびDC の単独培養および共培養を行い、*In vivo* で使用した各種薬剤に対するそれぞれの細胞への直接的な影響、ならびに細胞間相互作用を検討する。

### 4. 研究成果

[ 実際に行った研究計画と研究成果 ]

当初の実験計画では、申請者の研究成果より得られたマウス BRONJ モデルを作製予定であった。このモデルの作製には抗癌剤であるメルファランと注射 BP 製剤（ゾレドロン酸）が必要であるが、これらの BRONJ 発現頻度は80%であり、すべてのマウスがBRONJになることはなかった。ここで申請者は、すべてのマウスが BRONJ になるモデルを開発することで、より病因が明確になる可能性が高く、ひいては治療方法の開発研究にも極めて有用であるとの考えに至り、まず 100%が ONJ を発症するモデルの開発に取り組んだ。

その結果、1年かけて、ある抗癌剤 A のある濃度と注射 BP 製剤（ゾレドロン酸）の組み合わせが、抜歯を伴う BRONJ を 100%発症することをついに突き止めた。加えて、ONJ

の発現頻度は抗癌剤 A の濃度と強く相関しており、抗癌剤 A の濃度が高いほど ONJ の発現頻度が高くなることが分かった（図 2）。抗癌剤 A の濃度を 4 段階に振り分けた結果、1 番低い濃度では BRONJ が起こらず、2 番目に高い濃度では 27.3%が BRONJ を発症、3 番目に高い濃度では 100%が BRONJ を発症し、4 番目に高い濃度では抜歯後 1 週間で 100%のマウスが死亡した。さらに投与量と BRONJ との関連性に関しては、抜歯後に抗癌剤の投与量を倍増すると（濃度は同じ）、BRONJ の発現頻度は 27.3%から 71.5%と約 2.7 倍になることも分かった。すなわち、抗癌剤による免疫抑制の程度と、BP 製剤による何らかの作用の組み合わせが BRONJ を発症させている可能性が強く考えられた。

そこで、抗癌剤 A の各種濃度と注射 BP 製剤（濃度は一定）の組み合わせに抜歯を併用したそれぞれのマウスから、脛骨、大腿骨、上顎骨を摘出し、マイクロ CT による 3 次元構造的構造解析、光学顕微鏡による組織形態学的解析、さらには蛍光顕微鏡による免疫組織化学的解析を行い、以下の結果を得た。

マイクロ CT による 3 次元構造的構造解析

抗癌剤の濃度に関わらず、抗癌剤と注射 BP 製剤の併用は、有意に長管骨の骨量や骨密度を増大させ、骨微細構造を変化させた。上顎骨においては、抗癌剤の濃度に依存して抜歯窩における骨量と骨密度は有意に減少し、骨微細構造も有意に変化した。

光学顕微鏡による組織形態学的解析

上顎骨組織においては抗癌剤の濃度に依存して、抜歯窩における壊死骨量、空の骨小腔数と炎症性細胞数は有意に増大し、創傷治癒不全の状態を呈していた。

蛍光顕微鏡による免疫組織化学的解析

#### 1) 血管形成

抜歯窩周囲軟組織において、対照群と比較した血管数は、抗癌剤の濃度に関わらずすべての実験群において有意差は認められなかった。この結果は申請者の現在までのすべての報告と一致するもので、科学的根拠は高いことが予想されるが、近年血管新生阻害薬でも ONJ が起こることが報告されており、さらなる研究が必要である。

#### 2) リンパ管形成の阻害と質

血管新生だけでなく、リンパ管内皮細胞に対する特異抗体を用いてリンパ管検索を行った。その結果、抗癌剤の濃度に依存してリンパ管の数が減少し、100%BRONJ を発症した群ではリンパ管の数が有意に少ないことが分かった。さらに免疫機構に重要な役割を果たす Toll 用受容体 (Toll-like receptor; TLR) 4 陽性リンパ管内皮細胞数が減少していることも突き止めた。

#### 3) マクロファージの数的および質的变化

次にマクロファージ (F4/80 で検出) について検索を行った。BRONJ を発症した群では、抗癌剤の濃度依存性に抜歯窩周囲軟組織におけるマクロファージの数が減少していた。さらにマクロファージにおけるある特異的タンパク質 B の検索を行った結果、組織内の特異的タンパク質 B の発現は有意な減少を認められた。

#### 4) 樹状細胞の関わり

本研究では、マクロファージのほか、樹状細胞の検索も行った。上皮内の樹状細胞は、対照群でも大量には存在しなかったが、実験群において、その数が減少

していた。また、樹状細胞における TLR4 の発現が減少していた。

#### 5) 特異的タンパク質による ONJ の緩解

最後に、組織内で発現低下を示した特異的タンパク質 B に対する特異抗体を用い、ONJ が緩解するかどうかを検索した。100%が ONJ になる濃度の抗癌剤と注射 BP 製剤を投与したマウスに抜歯を併用し、さらに抜歯後に特異抗体 B を皮下注射し、軟組織の治癒を解析した。その結果、肉眼的所見であるが、開放創となった部分の面積は、対照群と比較して有意に小さくなったことから、この特異的タンパク質 B は BRONJ の病因である可能性が示唆された。

ただし、研究期間内に上記実験内容に対する詳細な解析が行えなかったことから、現在組織切片を作製して研究を継続している段階である。

以上から、本研究で用いた抗癌剤 A と注射 BP 製剤の組み合わせと抜歯の併用で惹起された BRONJ に関して、

- 1) 血管の関与はない。
- 2) リンパ管の形成阻害とリンパ管内皮細胞自身が担う免疫機構の低下
- 3) マクロファージの量的減少と質的变化
- 4) 樹状細胞の数的減少と免疫応答機構の阻害
- 5) 特異的タンパク質 B の関与が明らかとなった。

一方、ラットの BRONJ モデルやメルファラン(抗癌剤)を用いたマウス ONJ マウス(ミシガン大学で行っていた研究)の組織解析の一部は、ミシガン大学から長崎大学へ着任後に行う必要性があったことと、ONJ に関する極めて重要な知見が含まれていたことから

本研究期間内に行われ、学会発表等もなされた。

次の段階として、本研究成果を基盤とし、申請者が新たに代表者を務める、平成 27 年度以降の基盤研究 C により、継続して ONJ の病因と治療方法の開発に臨む計画である。

< 参考論文 >

1. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; **61**: 1115-1117.
2. Reid IR, Cornish J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol* 2012; **8**: 90-96.
3. Kuroshima S, Go VA, Yamashita J. Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term zoledronic acid therapy in mice. *Endocrinology* 2012; **153**: 17-28.
4. Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebetino FH, Rogers MJ. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone* 2008; **42**: 848-860.
5. Kuroshima S, Yamashita J. Chemotherapeutic and antiresorptive combination therapy suppressed lymphangiogenesis and induced osteonecrosis of the jaw-like lesions in mice. *Bone* 2013; **56**: 101-109.
6. Kuroshima S, Sawa Y, Yamaoka Y, Notani K, Yoshida S, Inoue N. Expression of cys-cys chemokine ligand 21 on human gingival lymphatic vessels. *Tissue Cell* 2004; **36**: 121-127.
7. Kuroshima S, Sawa Y, Kawamoto T, Yamaoka Y, Notani K, Yoshida S, Inoue N. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 on human intestinal lymphatic vessels. *Microvasc Res* 2004; **67**: 90-95.
8. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* 2011; **17**: 1371-1380.
9. Kataru RP, Jung K, Jang C, Yang H, Schwendener RA, Baik JE, Han SH, Alitalo K, Koh GY. Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood* 2009; **113**: 5650-5659.

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

1. 黒嶋伸一郎 : 骨吸収抑制薬がもたらす顎骨壊死 - 最新情報と歯科治療への留意点 - . 長崎県歯科医師会学術誌 . 1(1): 1-6.2015. ( 査読有 )
2. Kuroshima S, Entezami P, McCauley LK, Yamashita J: Early effects of parathyroid hormone on bisphosphonate/Steroid-associated compromised osseous wound healing. *Osteoporos Int*. 25(3): 1141-1150. 2014. ( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 8 件 )

1. Kakehashi S, Ando T, Minamizato T, Kuroshima S, Hayashida S, Yanamoto S, Umeda M, Asahina I. Successful treatment of advanced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, BRONJ, with an adjunctive teriparatide therapy. The XXII Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery congress. PROGRAMME, p110. 09/23/-09/26/2014. Prague. Czech Republic.
2. Kuroshima S, Yamashita J. Anti-RANKL monoclonal antibody therapy suppresses oral wound healing with increased TRAP-positive mononuclear cells in mice. The 9<sup>th</sup> congress of the Asian Academy of Osseointegration. AAO Program P12 p19,2014.07/04-05/2014 (07/05). Sapporo, Japan.
3. Kuroshima S, Yamashita J. Lymphangiogenesis and Osteonecrosis of the Jaw (ONJ)-like Lesions in Mice. 91st General Session & Exhibition of the IADR. 03/23/2013 (Wash, Seattle, USA). Presentation number #3777.
4. Yamashita J, McCauley L.K, Kuroshima S. Parathyroid Hormone Rescues Impaired Tooth Extraction Healing Associated with Bisphosphonates. 2013 ASBMR Annual Meeting. Selected oral presentation, 10/04-07/2013. Baltimore, ML, USA
5. 黒嶋伸一郎, 山下潤朗 . リンパ管形成と顎骨壊死 . 日本補綴歯科学会誌 5・122 回特別号 242 . 平成 25 年 5 月 18 日 19 日 , 福岡国際会議場 ( 福岡県・福岡市 ) .
6. Yamashita J, McCauley L.K, Kuroshima S. Prevention of

Bisphosphonate-Impaired Oral Wound Healing by PTH Therapy. 91st General Session & Exhibition of the IADR. 03/23/2013 (Wash, Seattle, USA). Presentation number #3776.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒嶋 伸一郎 (KUROSHIMA, Shinichiro)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：40443915