

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592386

研究課題名（和文） ビスホスホネートによる顎骨壊死の予測マーカーならびに
発症メカニズムに関する検討研究課題名（英文） Study of mechanism of occurrence and increased risk factor
of BRONJ

研究代表者

領家 和男（RYOKE KAZUO）

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：20093635

研究成果の概要（和文）：BRONJ の発症には抜歯、褥瘡、歯周病が関与し、骨代謝マーカーと BRONJ の予後予測因子との関連では、骨吸収マーカーである NTX と骨形成マーカーである BAP は一定の条件下で有用であることが明らかとなった。BP の骨芽細胞への影響に関し BP が濃度依存的に骨芽細胞の増殖抑制をすることが明らかとなった。BRONJ の発症および予後との関連については骨密度のマーカーであるファントムを併用し CT 撮影した結果、骨密度で 450mg/ml 以上では予後不良であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Occurrence risk factor of BRONJ revealed the operation of extraction of teeth, decubital ulcer and periodontosis. As for the increased risk factor of prognosis of BRONJ, bone absorption marker of NTX and osteoblastic marker of BAP was useful. This research revealed BP inhibit of proliferation of osteoblast, dose dependency. Bone density with use of FANTOM(marker of bone density) showed the prognosis of BRONJ, the bad prognosis of value was over the 450mg/ml.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：骨代謝マーカー・骨密度・BRONJ・骨芽細胞・破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

ビスホスホネート（BP）は、骨粗鬆症、癌の骨転移などの治療に幅広く用いられている。現在、日本で発売されている経口剤の BP は、骨粗鬆症を中心として用いられ、一方、静注剤は、1994 年悪性腫瘍による高カルシウム血症に保健適応となり、2004 年には骨転移に保健適応となった。近年に至り、N 含有 BP や環状構造をもつ骨吸収抑制作用の強い BP 静注剤が開発され、臨床使用されている。その作用メカニズムとして、BP は骨に

選択的に沈着し、破骨細胞にアポトーシスを誘導することにより骨吸収の抑制をすることが Russell (2007 年) により明らかにされた。しかしながら、BP によって誘導される顎骨壊死（BRONJ）の機序は明らかでなく多発する BRONJ が大きな問題となってきた。

BRONJ の危険因子については一部に臨床的な発表はあるものの、その予防法や治療法については未解明のままである。ここで必要となるのは、BRONJ の危険因子を同定してその発症を予防す

ることであり、発症した場合には、その治療と予後推測因子の同定である。これに対し、BRONJの発症危険因子に関しては、義歯による褥瘡、抜歯、慢性歯周炎が挙げられているが、系統的な因子については全く明らかにされていない。さらにBRONJの予後をうらなう因子については、現在のところ、その報告は皆無である。つまり、今日までのBRONJに関する報告のほとんどは症例報告の域を出るものではなく、根本的に骨壊死を誘発する全身的背景ならびに局所因子の同定には至っていない。そこで今回、BP投与患者を対象に以下に示すが如くの研究を計画した。

2. 研究の目的

申請者らのグループは、今までにBRONJ患者12名を対象に直接的発症要因をはじめ、局所的な誘因、治療経過と共に末梢血中のNTX (cross linked N-telopeptide of type 1 collagen) 及びBAP (Bone-Alkaline Phosphatase) を測定して来た。興味あることに、12例中8例にNTXの低下が認められ(表1)、NTXが大きく低下している症例ではBRONJの予後は不良であった。このことはNTXの低下がBRONJ発症の系統的な危険因子であることを想定させるものであり、BP投与患者の中で、BRONJ発症患者と非発症患者に於て、血清NTX値を比較検討することの重要性を示唆しているように思われる。骨壊死の回復には骨吸収のみでなく骨形成も関わっており、骨形成マーカーを含めた骨のリモデリングを検討することが骨壊死の予後の予測に重要と思われる。NTXは破骨細胞によって骨コラーゲンが分解されたときに産生される骨に特異性の高い物質(I型コラーゲン架橋N-テロペプチド)で、骨が分解(骨吸収)されるとNTXが血中に放出し、破骨細胞の機能を反映したマーカーとして役立つ。このようなNTXの生理的作用からしても、NTXがBRONJの発症に関わる可能性が大であると云えるであろう。

表1 骨代謝マーカー、骨密度、病態

症例 No.	骨代謝マーカー		骨代謝	骨密度		発症前の口腔内処置	骨髄炎の病期*と経過
	血清NTX (nmol BCE/l)	BAP (U/l)		疾患因辺 (mg/cm ² HA)	対側		
1	7.3 ↓	27.2	644 ↑	391 ↑	抜歯	II a → 治癒	
2	6.7 ↓	12.3 ↓ 低回転	344 ↓	467 ↑	抜歯・歯周病	III a → III a	
3	8.3 ↓	14.8	437 ↑	321 ↑	抜歯	II a → 治癒	
4	6.2 ↓	20.1	478 ↑	695 ↑	抜歯	II a → 治癒(別部位 I a)	
5*	30.2 ↑	28.4 ↑ 高回転	816 ↑	454 ↑	抜歯・歯周病	III b → III b	
6	8.0 ↓	15.6	472 ↑	733 ↑	義歯性潰瘍	II a → 治癒 ⇄ I a	
7	11.4	14.4	463 ↑	377 ↑	抜歯	II a → 治癒	
8	6.9 ↓	14.0	432 ↑	226 ↑	抜歯	II a → I b	
9	6.2 ↓	12.1 ↓ 低回転	757 ↑	871 ↑	抜歯	I a → 治癒	
10*	33.8 ↑	71.8 ↑ 高回転	363 ↑	287 ↑	抜歯	II a → I a	
11*	15.7	85.6 ↑	368 ↑	338 ↑	食物による褥瘡	I b → II b	
12	13.4	9.6 ↓	436 ↑	374 ↑	歯牙の自然脱落	III a → III a (歯周病)	
基準値		参考値 ^②					
男性	9.5~11.7	13~33.9	245~262				
女性	9.6~25.4	153~208					

*骨折症例

① Marxの分類(2006年)

② 宗像源博ら(2002年・2006年)

一方、BAPは言うまでもなく骨アルカリフォスファターゼで、骨形成マーカーとして骨芽細胞機能を反映しており、その活性をみる指標として役立つものである。従ってBAPは骨の代謝機能・生理的な活動度を示す一つの指標としてとらえるこ

とが出来る。その観点より、今までのBRONJ患者に於て、BAPを測定して来たが、BRONJとの予後との関係は明確ではなかった。しかしながらNTXとBAPの双方が低下していた症例ではBRONJの予後は不良であり、NTXとの組合せによる予後推測因子になり得る可能性が考えられる。その考えより、BP投与患者に於いてBAPについてもBRONJ発症患者と非発症患者との間に差があるか否かを検討すること計画した。

申請者らは表1に示す如く、NTX、BAPのみならず骨密度も測定して来た。骨密度は骨の緻密性を示すものであるが、BPによる顎骨壊死部の骨密度についての詳細は不明である。骨壊死に至ると正常骨に比べ骨密度が低下するのが原則的であるが、腐骨が進むと、硬化することがあり、BPによる骨壊死の場合の骨密度がどのようになるかは興味をもたれるところである。しかもその骨密度は、予後を推測する上での重要な因子となり得る可能性があり、検討項目に加えることとした。ところでBRONJが多発しているにもかかわらず、BRONJの発症機序に関する基礎的研究報告は乏しい。BPの骨壊死の第一の機序として、BPによる破骨細胞のアポトーシス誘導が考えられる。破骨細胞がBPによりアポトーシスをきたすと、破骨細胞からの刺激が消失し、骨芽細胞の分化・増生が阻害される構図が推測される。しかも、一方ではBPによる骨芽細胞への直接的な阻害作用も十分に考えられるところである。そこで申請者らはこれらの点を検証するべくin vitroでの実験を計画した。BRONJに関し、その原因として抜歯をはじめとした骨に対する外科的侵襲が一般に考えられているが、不適合な義歯や歯牙の鋭縁などによる粘膜の褥瘡でも顎骨壊死の原因となっている報告があり、われわれもそのような症例を経験している。そのような経験・報告からするとBPは線維芽細胞の増生をはじめとする創傷治癒経過を阻害することが想定される。つまりBPが軟組織つまりは線維芽細胞に対しても抑制作用をもつ可能性が十分に考えられる。そこで線維芽細胞に対する影響についてもin vitroで検討することとした。

BRONJは、基本的には細菌感染が関わっていると考えられる。なぜならば全身投与されたBPは全身の骨に作用するわけであり、顎骨にのみ作用するわけではない。にもかかわらず、顎骨に圧倒的に多数の骨壊死が生じることは、口腔細菌の関与が深く関わっていると考えられるからである。現在、BPによる顎骨壊死に関しBPはある特定の細菌バイオフィルムを形成しやすいとの報告があり、議論を呼んでいる。顎骨に、骨壊死が多発する要因として、口腔内細菌の存在とともに、細菌の増殖・感染を抑制する生体の防衛システムの抑制が十分に考えられる。そこで本研究の中で好中球の殺菌能とマクロファージの貪食能について、BPの影響について検討することとした。

本研究は、BRONJの発症危険因子と予後推測因子を同定しようとするものである。それと共にBRONJ

の発症機序を BP の生物学的作用より解明しようとするものである。本研究の特徴は、先ず BP 投与患者を BRONJ 発症患者と非発症患者に分けて検討することにある。これにより、NTX、BAP が危険因子マーカーとして役立つかが明瞭にされ得ることになる。さらには、BP が骨芽細胞、マクロファージ、好中球、線維芽細胞への影響を検討することにより BRONJ の機序の一端が明らかにされると期待される。従って本研究は予防、治療にとって有用な情報を提供することが期待でき、有意義なものと思われる。

3. 研究の方法

(1) 患者に於ける検討

BRONJ の危険因子としての歯周病と臨床病態（症状と病期の経過）との関連ならびに BRONJ 患者に対する顎骨壊死の臨床病態と骨代謝マーカー、骨密度との関連に関する研究。
BP 投与患者を BRONJ 発症群と BRONJ 非発症群（コントロール群）の 2 群に分けて以下の検討を行う。コントロール群としては BP 投与期間が、経口投与では 1 年以上、静注投与では 6 か月以上とする。歯周病の検査項目は歯周ポケットの深さ、歯周ポケットからの排膿の有無、歯周炎の程度らの PDI（Periodontal Disease Index）およびレントゲンによる歯槽骨の吸収程度を数値化し評価する。骨壊死の臨床病態は、骨露出の大きさ、感染、疼痛、病的骨折の有無などにより分類した Marx らの症型分類（2006 年）を用い、経時的に評価する。血清 NTX、血清 BAP の測定は（保健の適応は得られており、患者の同意を得て採血し、中検にて行う）、発症時または初診時および治療時の原則 2 回とするが、病変が長く存続する場合は 4 か月毎に測定する。骨密度は顎骨に加え、腰椎および大腿骨頸部をそれぞれ海綿骨、皮質骨のコントロールとして、DXA(dual-energy X-Ray absorptiometry) 法にて測定する（保健適応は得られている）。対照として、BP が投与されているが顎骨壊死非発症例に対しても行う。この非発症例患者に関しては、他科との協力（共同研究者：山本吉藏、萩野浩）を得て行う。BRONJ 症例と非発症例の目標症例数に関し、平成 21 年度はそれぞれ 40 例以上、20 例以上を目指す。顎骨壊死非発症例の検査時期は、経口のアレンドロネートによる BRONJ の発症時期が、投与後 3 か月から 87 か月（中央値 24 か月）後に、静脈投与のゾレドロネートによる発症時期は 4 回投与（4 か月）の報告があり、経口投与では 1 年以上、静脈投与では 6 か月以上とした。

(2) in vitro の検討

BP の骨芽細胞への影響
ゾレドロネートが、骨芽細胞—正常ヒト骨芽細胞（NH0st）の増殖能に与える影響について検討する。コラーゲンゲルコーティング dish 上で培養した骨芽細胞に破骨細胞の存在下、非存在下の 2 系を用い、それぞれゾレドロネートを $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、添加し、一定時間後、細胞数、apoptosis

Alkaline Phosphatase の計測を行う。またゾレドロネートが NH0st の遺伝子発現に与える影響について検討する。具体的には石灰化に関与する COL1- α 1（I 型コラーゲン α 1 鎖）、OC（オステオカルシン）、ALP（アルカリフォファターゼ）の遺伝子発現量に与える影響を検討する。また、NH0st を 10%FBS 下で培養し、それぞれの mRNA 発現量を計測する。

Biochemical and Biophysical Research Communications 338:710-716, 2005

(3) 顎骨骨密度、CT 値、骨梁の割合と BRONJ の発症ならびに予後との関連について検討した。

①測定部位

下顎正中（左右オトガイ孔間）で歯根より 3 mm 下方のスライス面を検討した。

②関心領域（ROI）の設定および測定

皮質骨を含まない海綿領域（CT 値 $\geq 300\text{HU}$ ）
CT 値、骨梁の割合

4. 研究成果

(1) 患者に於ける検討

今回われわれは、BRONJ の発症危険因子ならびに予後推測因子について検討を加えた。

- ①誘発原因としては抜歯が 7 例、歯周病が 4 例、義歯による褥瘡が 1 例であった。
- ②NTX 低値・BAP 正常では治療例と非治療例がみられた。
- ③NTX、BAP ともに低値では、予後不良であった。
- ④骨密度は、非治療例では、非発症例や治療例と比べ高値を示した。
- ⑤骨折症例では NTX・BAP ともに高値を示し予後推測マーカーにはなり得なかった。

(2) in vitro の検討

骨分化関連の遺伝子発現は、BP 製剤 $10\mu\text{M}$ で有意に促進がみられた。また、抑制型 Smad7 も同様に促進がみられたが、これはネガティブフィードバックが働いたためと思われた。
BP が BMP 受容体を介して、骨芽細胞に作用している可能性が示唆された。
骨形成因子の遺伝子発現のアップレギュレートにともない、増殖能は抑制された。
骨芽細胞の石灰化は、細胞増殖の抑制に関連していた。

(3) 顎骨骨密度、CT 値、骨梁の割合と BRONJ の発症ならびに予後との関連について検討

- ①BRONJ 発症例は、非発症例と比較し、CT 値および顎骨骨密度が高い傾向が見られた。
- ②顎骨骨密度は、BRONJ 発症の予測に CT 値や海綿骨の骨梁と比較し、より精度が高く有用と考えられた。
- ③顎骨骨密度は、 450mg/ml 以上で発症の頻度が高くなる傾向が見られた。
- ④顎骨骨密度は BRONJ 治療と非治療の指標にはなりえなかった。

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 1 件)

- ① Takayuki Tamura, Kohei Shomori, Motoki Nakabayashi, Nobuyuki Fujii, Kazuo Ryoike and Hisao Ito
Zoledronic acid, a third-generation bisphosphonate, inhibits cellular growth and induces apoptosis in oral carcinoma cell lines
Oncology Reports, 38, 1139-1143, 2011
査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 田中むつみ、田窪千子、中林基、木谷憲典、土井理恵子、小谷勇、領家和男、顎骨骨密度を指標として顎骨離断・再建を施行したビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死 (1-C-5)、第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2012. 5. 17、広島国際会議場 (広島)
- ② 田中むつみ、中林基、田窪千子、都橋一仁、渡辺聡、谷尾俊輔、小谷勇、領家和男、顎骨骨密度を指標として顎骨離断・再建を施行したビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死の 1 例 (3)、第 17 回山陰口腔疾患研究会、2011. 11. 20、米子ワシントンホテル (鳥取)
- ③ 都橋一仁、中林基、藤井信行、田村隆行、小谷勇、領家和男、ビスフォスフォネートによる顎骨壊死 (BRONJ) の発症ならびに予後予測因子としての骨密度に関する検討 (23)、第 40 回 (社)日本口腔外科学会中・四国地方会、2011.5.28、松江テルサ (島根)
- ④ 中林基、加藤芳明、上山吉哉、山田朋弘、山本哲也、湯浅哲也、宮本洋二、吉野綾、関根浄治、都橋一仁、谷尾和彦、領家和男、ビスフォスフォネートによる顎骨壊死 (BRONJ) の予後予測因子としての骨代謝マーカーに関する検討 (2-C-19)、第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2011. 4. 22、タワーホール船堀 (東京)
- ⑤ 中林基、小笹美保、都橋一仁、木谷憲典、谷尾和彦、領家和男、ビスフォスフォネートによる顎骨壊死予測因子としての骨代謝マーカーに関する検討 (26)、第 58 回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会、2010. 10. 6、広島大学医学部応仁会館 (広島)
- ⑥ 田村隆行、庄盛浩平、井藤久雄、ゾレドロン酸は口腔癌の増殖を抑制しアポトーシスを誘導する (MS1-1)、第 20 回日本消化器癌発生学会、2009. 11. 27、オリエンタルホテル (広島)

- ⑦ 田村隆行、木谷憲典、中林基、田窪千子、小谷勇、谷尾和彦、領家和男、口腔癌に対する第 3 世代ビスフォスフォネートの抗腫瘍効果 (1-P-91)、第 54 回 (社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2009. 10. 9~11、札幌コンベンションセンター (北海道)

- ⑧ 田村隆行、庄盛浩平、尾崎充彦、塩見達志、春木朋広、野坂加苗、領家和男、井藤久雄、ゾレドロン酸は口腔癌細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導する (P-0868)、第 68 回日本癌学会学術総会、2009. 10. 1~3、パシフィコ横浜 (神奈川県)

- ⑨ 中林基、田本綾子、秀衡尚美、岡本充浩、木谷憲典、雨河茂樹、小谷勇、谷尾和彦、領家和男、ビスフォスフォネートによる顎骨壊死予測因子としての顎骨骨密度に関する検討 (9)、第 38 回 (社)日本口腔外科学会中・四国地方会、2009. 5. 30、広島大学医学部応仁会館 (広島)

- ⑩ 中林基、田村隆行、木谷憲典、雨河茂樹、野坂明寛、小谷勇、谷尾和彦、領家和男、ビスフォスフォネートによる顎骨壊死予測因子としての骨代謝マーカーと顎骨骨密度に関する検討 (1-O-D-5)、第 63 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2009. 4. 16~17、アクシティ浜松 (静岡県)

- ⑪ 領家和男、ビスフォスフォネートによる顎骨壊死の臨床病態と予後予測因子、「口腔内科学」出版記念講演会、2009. 1. 24、三翠園 (高知)

[図書] (計 1 件)

- ① 尾崎登喜雄、領家和男、他、株式会社飛鳥出版室、口腔内科学、2008.4、462

6. 研究組織

(1) 研究代表者

領家 和男 (RYOKE KAZAO)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：20093635

(2) 研究分担者

小谷 勇 (KODANI ISAMU)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：10294315

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)
高知大学・歯学系・教授
研究者番号：00200824

上山 吉哉 (UEYAMA YOSHIYA)
山口大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授
研究者番号：00168668

宮本 洋二 (MIYAMOTO YOJI)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・
教授
研究者番号：20200214

関根 浄治 (SEKINE JOJI)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：20236095

木谷 憲典 (KIDANI NORIKAZU)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：60403391

萩野 浩 (HAGINO HIROSHI)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：80208412