

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11364

研究課題名(和文) 骨系統疾患に対する歯科からの基礎的・臨床的アプローチ

研究課題名(英文) Basic and clinical approaches for dental problems associated with skeletal diseases

研究代表者

大川 玲奈 (OKAWA, RENA)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：80437384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯科症状を伴う骨系統疾患に対して臨床的、基礎的アプローチによって歯科的問題点の解決を試みた。骨形成不全症の全国実態調査では、約60%に象牙質形成不全を随伴すること、交換期障害を好発するが、その際の乳歯抜歯はビスホスホネート投与下であっても問題なく抜歯可能であることを明らかにした。低ホスファターゼ症については、乳歯だけではなく、永久歯においてもセメント質形成不全による早期脱落が起こることを報告した。また、生後1日目より酵素補充療法を受けている低ホスファターゼ症患者の脱落乳歯においてセメント質形成を確認した。さらに、モデルマウスへの遺伝子治療は歯科症状の改善に寄与することを示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate dental problems related to skeletal diseases with basic and clinical approaches. A nationwide dental survey revealed that dentinogenesis imperfecta is a major dental problem occurring in 60% of patients affected by osteogenesis imperfecta. In those patients, a permanent successor often emerges into the oral cavity without resorption of the root of the corresponding primary tooth due to dislocation by that successor. However, the present survey found that bisphosphonate treatment does not need to be interrupted in such cases when the primary tooth is extracted. Early exfoliation was recognized in not only primary but also permanent teeth in a patient with hypophosphatasia. In another hypophosphatasia patient who received enzyme replacement therapy 1 day after birth, cementum formation was detected. Furthermore, gene therapy was demonstrated to improve dental manifestations in model mice with hypophosphatasia.

研究分野：小児歯科学

キーワード：骨系統疾患 低ホスファターゼ症 骨形成不全症 酵素補充療法 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

骨系統疾患は骨格に異常をきたす疾患の総称であり、骨や関節だけではなく歯科的症状を呈するものがある。最新版の国際分類では約 456 疾患にも渡っており、その臨床像は様々である。しかし、個々の疾患の頻度は稀であるため、包括的な実態調査やその対策が遅れている現状にある。また近年、新生児医療の発展により、予後不良とされていた重症型骨系統疾患においても救命できる症例が増加し、小児歯科臨床の場合において、歯科的症状を有する骨系統疾患罹患患者の口腔管理の重要性が増しているという実感がある。

大阪大学歯学部附属病院小児歯科では、大阪大学医学部小児科と連携して、平成 24 年 4 月より「骨系統疾患専門外来」を設置し、様々な歯科的症状を有する骨系統疾患罹患患者の口腔管理にあたっている。内訳としては骨形成不全症が最も多く、ついで低ホスファターゼ症となっている。

骨形成不全症は、骨を構成する主要なタンパクである型コラーゲンの異常によって、骨の脆弱性をきたす疾患であるが、型コラーゲンは歯を構成する主要なタンパクでもあるため、象牙質形成不全が歯科的随伴症状として認められる。骨吸収抑制剤であるビスホスホネート製剤の投与を受けていることが多いため、抜歯の際には医科との連携が必要である。本疾患罹患患児において、乳歯の抜歯で骨髄炎を誘発したという報告はないものの、交換期障害が頻発するため乳歯の抜歯に遭遇することが多い。また、低年齢罹患患児における緊急時の抑制下での治療は易骨折性への十分な配慮が必要であるなど、歯科的治療の際には注意すべきポイントが非常に多いため、口腔管理のガイドラインの策定が急がれる。

低ホスファターゼ症は、組織非特異的アルカリホスファターゼ遺伝子の異常によって、骨の石灰化の低下が引き起こされる疾患であり、歯科的症状としてはセメント質形成不全による乳歯の早期脱落が認められる。軽症例では乳歯の早期脱落を機に低ホスファターゼ症の診断に至ることもあるため、歯科における本疾患の臨床研究は、これまで見過ごされていた軽症例の早期発見につながると考えた。また、本疾患による乳歯の早期脱落に対しての対症療法である小児義歯の装着が保険適応となり、口腔機能の改善が可能となったため、本疾患の診査方法や診断基準を明確にし、よりよい歯科的対応法を研究し、公表することが非常に重要であり、患者の QOL 向上にもつながると思われる。さらに、早期脱落は乳歯のみに認め、永久歯の早期脱落は認められないとされてきたが、その詳細なメカニズムは不明である。この特徴的な病態を分析することは、本疾患の治療法の確立に寄与すると考えた。低ホスファターゼ症には根本的な治療法がなかったが、近年新たな治療法の基礎研究や臨床研究が進んでいる。

しかし、これらの治療法が歯科的症状に及ぼす影響についてはほとんど解明されていない。現在、低ホスファターゼ症モデルマウスを用いた遺伝子治療の研究が行われており、モデルマウスの歯科的症状にどのような影響を与えるかを調べることは、ヒトに遺伝子治療が臨床応用される際に非常に重要な基礎研究となると思われた。また、大阪大学医学部附属病院小児科を中心として酵素補充療法が開始されており、酵素補充療法が歯科的症状に及ぼす影響を知ることが治療効果を確認する上で重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 歯科診療ガイドライン策定に向けた骨形成不全症、低ホスファターゼ症の実態把握と歯科データベースの構築

- 骨形成不全症

- 全国歯科調査を行い、実態を明らかにする。

- 低ホスファターゼ症

- 大阪大学歯学部附属病院小児歯科における症例研究によって、診査方法、診断基準、病態に応じた歯科的対応法を解明する。

(2) 低ホスファターゼ症モデルマウスにおける遺伝子治療の基礎研究

- モデルマウスの歯科的症状を分析する。

- 遺伝子治療がモデルマウスの歯に与える影響を解析する。

(3) 低ホスファターゼ症において酵素補充療法がヒトの歯に与える効果の歯科的評価

## 3. 研究の方法

(1) 骨形成不全症、低ホスファターゼ症の全国実態調査と歯科データベースの構築

- 骨形成不全症の全国実態調査

- 日本全国 29 の歯科大学および歯学部小児歯科、日本小児歯科学会専門医研修施設、日本口腔外科学会認定研修施設およびこども病院歯科を対象とし、本疾患罹患患者の有無を問い合わせ、該当者が存在する場合、性別、初診時年齢と最終来院時年齢、病型、遺伝子型、さらに象牙質形成不全の有無、象牙質形成不全への歯科的対応、ビスホスホネート製剤投薬時の乳歯抜歯経験の有無とその際の異常について情報提供を依頼した。

- 低ホスファターゼ症の症例分析

- 大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診している患者を対象とし、歯科的情報と医科的情報を照合し、病型と歯科症状の関連性を調査した。

- また、早期脱落歯を歯軸方向に分割し、半側を浸漬固定し、脱灰後、通法に従ってパラフィン切片を作製し、H-E 染色を行い、歯根の状態を観察した。もう一方の半側は非脱灰切片を作製してマイクロ CT と SEM を用いて硬組織の観察を行った。

## (2)低ホスファターゼ症モデルマウスを用いた動物実験

マウスの下顎骨サンプルは日本医科大学大学院分子遺伝学分野の飯島修助教より供与を受けた。

### • モデルマウスの歯科的症状の解析

乳児型低ホスファターゼ症の9日齢モデルマウス、ヘテロ型マウスおよび野生型マウスに4%抱水クロラルの腹腔内注射により全身麻酔を施し、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、下顎骨を取り出し、浸漬固定後、マイクロCTを用いて第一臼歯近心根周囲の歯槽骨の骨密度を調べた。7.5%EDTAにて脱灰後、エタノール上昇系列で脱水し、通法に従い、5 $\mu$ mの前顎断薄切片(第一臼歯近心根付近)を作製し、シランコートスライドガラスに貼付した。その後、歯の形成に関与する遺伝子の抗体(Osteopontin、DMP1、Runx2、TRAP、Osteorix)を用いて免疫組織化学染色を行い観察した。

### • 新生児遺伝子治療がモデルマウスの歯科的症状に与える影響

TNALP (tissue non-specific alkaline phosphatase) 遺伝子をレンチウイルスベクターで導入した骨髄細胞を生後2日齢の新生児低ホスファターゼ症モデルマウスに移植し、1か月生存したマウスの下顎骨を摘出後にマイクロCTを用いて第一臼歯近心根周囲の歯槽骨の骨密度を算出する。脱灰後、通法に従い、パラフィン切片を作製し、Osteopontin抗体を用いて免疫組織化学染色を行い観察した。コントロールとして、未治療モデルマウス、野生型マウスも同様の実験を行った。

## (3)低ホスファターゼ症における酵素補充療法の歯科的評価

酵素補充療法を受けている患者の口腔内所見、歯周組織検査、エックス線診査を治療前後で比較し、酵素補充療法の歯科的評価を行った。また、早期脱落歯を浸漬固定し、脱灰後、通法に従ってパラフィン切片を作製し、H-E染色を行い、歯根の状態を観察した。非脱灰切片を作製してマイクロCTとSEMを用いて硬組織の観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1)骨形成不全症、低ホスファターゼ症の全国実態調査と歯科データベースの構築

#### • 骨形成不全症

534施設(小児歯科関連69施設、口腔外科関連465施設)に調査票を郵送し、222施設(小児歯科関連42施設、口腔外科関連180施設)より回答を得た。39施設(小児歯科関連14施設、口腔外科関連25施設)から82症例の骨形成不全症の患者の存在が明らか

になった。また大阪大学歯学部附属病院小児歯科の2196名の患者データベースより、28名の骨形成不全症患者を抽出した。Sillenceの分類に基づくI型32名、II型4名、III型19名、IV型14名、V型1名、不明40名の計110名について歯科的分析を行った。

象牙質形成不全は、全体の64%に認められ、特にIII型は84%、IV型は93%と高頻度で骨形成不全症に随伴することが分かった。咬合異常としては、下顎前突または反対咬合、次いで開咬が認められた。

48症例が永久歯(6症例)と乳歯(42症例)の抜歯経験を有し、71症例がビスホスホネート製剤による治療を受けていたが、このうち31症例(44%)が乳歯抜歯の際、特に異常を認めなかった。当科での21症例において、乳前歯40本、乳臼歯27本の計67本の乳歯抜歯は4歳から12歳にかけて、交換期障害を理由として行われていた。

以上から、骨形成不全症においては、特に象牙質形成不全を随伴する患者においては定期的な口腔内管理が重要であること、乳歯の交換期障害を頻発するが、これらの乳歯抜歯の際は、ビスホスホネート投与下であっても特に問題なく抜歯可能であることが明らかになった。

#### • 低ホスファターゼ症

大阪大学歯学部附属病院小児歯科には11名(男児5名、女児6名)の低ホスファターゼ症の患者が通院されており、その病型内訳は周産期重症型が3名、周産期良性型が1名、小児型が2名、歯限局型は5名であった。乳歯の早期脱落は8名において、下顎前歯部に1歳から4歳にかけて好発した。歯限局型はすべての症例において、乳歯の早期脱落をきっかけに当科を受診したことによって、本学医学部小児科での低ホスファターゼ症の診断に至った。乳歯の早期脱落を認めた症例については、積極的に小児義歯の装着を試み、良好な経過を得ている。

永久歯の萌出を認めた5症例において、永久歯の早期脱落を1名(小児型)に認めた。脱落した永久歯を分析したところ、エナメル質と象牙質の石灰化不全とセメント質の形成不全を認めた。

## (2)低ホスファターゼ症モデルマウスを用いた動物実験

### • モデルマウスの歯科的症状

低ホスファターゼ症モデルマウスにおいては、野生型に比べて、下顎骨自体が小さく、下顎切歯象牙質の厚みが薄かった。マイクロCTで下顎骨および切歯の骨密度を調べると、ノックアウトマウスでは野生型に比べて骨密度が低く、ヒトと一致する所見が示された。免疫組織学的分析では、野生型マウスでは、歯槽骨の表層と歯根のセメント質に相当する部分にセメント質/骨関連遺伝子である

オステオポンチンの強い発現を認めるものの、ヘテロ型マウスでは野生型と比較して、発現は弱い。歯槽骨の表層と歯根のセメント質に相当する部分にオステオポンチンの強い発現を認めた。ノックアウトマウスでは野生型およびヘテロ型マウスと比較して、全体的にオステオポンチンの発現が低下しており、セメント質に相当する部分も不明瞭であった。DMP1、Runx2、TRAP、Osteorix については、発現の程度に明らかな差を認めなかった。

- 新生児遺伝子治療がモデルマウスの歯科的症状に与える影響

低ホスファターゼ症モデルマウスに対して遺伝子治療を施すと、オステオポンチンの発現が下顎切歯歯根表面に認められ、セメント質の形成が確認できた。しかし、ヘテロ型マウスと比較すると、オステオポンチンの発現は同程度までに回復していなかった。しかし歯槽骨については、遺伝子治療を施したノックアウトマウスでは、野生型と同程度にまで回復した。以上から、遺伝子治療は、低ホスファターゼ症における歯科症状の改善に寄与することが示唆された。

### (3)低ホスファターゼ症における酵素補充療法の歯科的評価

当科を受診されている 11 名の低ホスファターゼ症患者のうち、周産期重症型 3 名と小児型 1 名は酵素補充療法を受けている。周産期重症型においては、3 歳未満での乳歯の脱落は認めなかった。外傷で脱落した乳前歯を分析したところ、軽度のエナメル質形成不全と象牙質形成不全を認めた。しかし、わずかながらセメント質の形成が確認できた。これらのことから、乳歯萌出開始前の出生時から酵素補充療法を受けた小児において、歯の石灰化の改善が示唆された。

- ### 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 11 件)

Rena Okawa, Taichi Kitaoka, Kanae Saga, Keiichi Ozono, Kazuhiko Nakano, Report of two dental patients diagnosed with hypophosphatasia, Journal of Clinical Case Reports, 査読有, 6 巻, 2016, 704  
DOI: 10.4172/2165-7920.1000704

Rena Okawa, Shuhei Naka, Kanae Saga, Kazuhiko Nakano, Lowe syndrome oral findings: Case report. Pediatric Dental Journal, 査読有, 26 巻, 2016, 34-37  
DOI: 10.1016/j.pdj.2015.10.001

Rena Okawa, Osamu Iijima, Mitsunobu Kishino, Hiroyuki Okawa, Satoru Toyosawa,

Hanako Sugano-Tajima, Takashi Shimada, Takashi Okada, Keiichi Ozono, Takashi Ooshima, Kazuhiko Nakano, Gene therapy improves dental manifestations in hypophosphatasia model mice, Journal of Periodontal Research, 査読有, 52 巻, 2017, 471-478  
DOI: 10.1111/jre.12412.

Rena Okawa, Takuo Kubota, Taichi Kitaoka, Kazuma Kokomoto, Keiichi Ozono, Kazuhiko Nakano, Oral manifestations of Japanese patients with osteogenesis imperfecta, Pediatric Dental Journal 27, 査読有, 2017, 73-78  
DOI: 10.1016/j.pdj.2017.02.001

Rena Okawa, Kazuma Kokomoto, Natsumi Yamamura-Miyazaki, Toshimi Michigami, Kazuhiko Nakano. Oral findings in patient with lethal hypophosphatasia treated with enzyme replacement therapy. Pediatric Dental Journal 27, 査読有, 2017, 153-156  
DOI: 10.1016/j.pdj.2017.04.002

Rena Okawa, Jiro Miura, Kazuma Kokomoto, Takuo Kubota, Taichi Kitaoka, Keiichi Ozono, Kazuhiko Nakano. Early exfoliation of permanent tooth in patient with hypophosphatasia. Pediatric Dental Journal 27, 査読有, 2017, 173-178  
DOI: 10.1016/j.pdj.2017.08.005

大川玲奈、仲野和彦、低ホスファターゼ症に対する医科歯科連携への取り組み、クインテッセンス、査読無、2017、36 巻、138-144

大川玲奈、仲野和彦、骨系統疾患の歯科所見とその対応について -学校歯科医の先生方に知っておいていただきたいこと-、大阪府学校歯科医雑誌、査読無、2017、21 巻、1-5

大川玲奈、仲野和彦、小児の歯周疾患-低ホスファターゼ症を一例とした歯科的対応小児をとりまく最近の臨床トピックス、日本歯科評論、査読無、2017、77 巻、59-64

大川玲奈、骨系統疾患外来の重要性、小児歯科臨床、査読無、2018、23 巻、28-32

大川玲奈、HPP における歯科症状、HPP Frontier、査読無、2018、1 巻、13-16

[学会発表](計 12 件)

大川玲奈、仲野和彦、低ホスファターゼ症罹患患児の口腔管理、第 32 回日本障害

者歯科学会、査読有、2015.11.8.

佐賀佳奈衣、大川玲奈、野村良太、仲野和彦、骨形成不全症患者の歯科所見に関する全国調査、第53回日本小児歯科学会大会、査読有、2015.5.21.

大川玲奈、仲野和彦、医科と歯科が連携して口腔内管理を行った低ホスファターゼ症の3症例、第63回日本小児保健協会学術集会、査読有、2016.6.25.

大川玲奈、吉田良成、阪下 卓、仲 周平、野村良太、仲野和彦、低ホスファターゼ症における永久歯早期脱落の1例、第35回日本小児歯科学会近畿地方会、査読有、2016.10.16.

大川玲奈、北岡太一、窪田拓生、大園恵一、仲野和彦、小児科医と小児歯科医で共観している低ホスファターゼ症の5症例、第34回小児代謝性骨疾患研究会、査読有、2016.12.3.

古々本一馬、大川玲奈、仲野和彦、低ホスファターゼ症患者の乳歯と永久歯および健康者の永久歯との構造の比較、第55回日本小児歯科学会大会、査読有、2017.5.26.

山村なつみ、道上敏美、一木容子、白石淳、北島博之、立川加奈子、大川玲奈、仲野和彦、中野慎也、藤原香緒里、里村憲一、和田和子、大園恵一、山本勝輔、生後1日目よりALP酵素補充を行った周産期重症型低ホスファターゼ症の4年間の経過、第12回ALPS研究会、査読有、2017.7.15.

Rena Okawa, Saga Kanae, Kazuhiko Nakano. Nationwide survey of dentinogenesis imperfecta in patients with osteogenesis imperfecta. The 10th International Dental Collaboration of Mekong River Region Congress. 査読有、2015.6.8.

Saga Kanae, Shuhei Naka, Rena Okawa, Kazuhiko Nakano. Long-term follow-up of patient with dentinogenesis imperfecta complicated with osteogenesis imperfecta. The 10th International Dental Collaboration of Mekong River Region Congress. 査読有、2015.6.8.

Rena Okawa, Saga Kanae, Kazuhiko Nakano. Nationwide survey of dental problems in patients with osteogenesis imperfecta. 25th Congresss of the International Association of Pediatric Dentistry. 査読有、2015.7.5.

Rena Okawa, Dental anomalies and treatment approaches in patients with skeletal diseases, The 4th Asia Pacific Congress & Expo on Dental and Oral Health, 査読有、2015.7.28.

Rena Okawa, Saga Kanae, Kazuhiko Nakano. Nationwide survey of dental problems in patients with osteogenesis imperfecta. 25th Congresss of the International Association of Pediatric Dentistry. 査読有、2015.7.5.

Rena Okawa, Jiro Miura, Hiroko Okawa, Kazuma Kokomoto, Kazuhiko Nakano. Early exfoliation of permanent tooth in hypophosphatasia patient. The 95nd General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. 査読有、2017.3.26.

〔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

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pedo/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大川 玲奈 (OKAWA, Rena)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：80437384

### (2) 研究分担者

仲 周平 (NAKA, Shuhei)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：10589774

### (3) 連携研究者

仲野 和彦 (NAKANO, Kazuhiko)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：00379083

大園 恵一 (OZONO, Keiichi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20270770

北岡 太一 (KITAOKA, Taichi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20599229

仲野 道代 (NAKANO, Michiyo)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：30359848