

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11821

研究課題名(和文) 骨吸収抑制剤の休薬は顎骨壊死発症の予防に有効か？マウスによる検討

研究課題名(英文) Drug holidays of Bone Resorption Inhibitor are Effective in Preventing Jaw Osteonecrosis?

研究代表者

鄭 漢忠 (Tei, Kancho)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：80180066

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)：骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート製剤やヒト型抗RANKLモノクローナル中和抗体製剤は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症、骨転移あるいは骨粗鬆症の治療薬として多くの患者に用いられ、臨床的に有効性の高い薬剤であることは広く知られている。しかし、その副作用として顎骨壊死を発症することが知られている。顎骨壊死は難治性の高い疾患であるため、未然に発症リスクを避けることが重要である。しかし、休薬の有効性については様々な議論が存在している。そこで、骨吸収抑制剤の休薬が顎骨壊死の発症リスクを低減するか、マウスによる動物実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨吸収抑制薬の休薬の是非を明らかにすることは歯科臨床において重要な懸案であることから、本研究では休薬の是非について動物実験によって検討を行った。

実験の結果は休薬の有効性を示すものであり、休薬は発症する顎骨壊死症状を軽減する可能性が高いが、顎骨壊死の発症を抑制するものではなかった。そのため、一般臨床において骨吸収抑制剤を服用している全ての患者に対して休薬が適切な対応法とは言えないが、休薬を検討する価値は十分あることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bisphosphonates and human anti RANKL monoclonal neutralizing antibodies, are widely used in many patients for the treatment of hypercalcemia, bone metastases, or osteoporosis associated with malignancy. And they are widely known to be clinically effective drugs. It is known to develop osteonecrosis of the jaw as its side effect. Osteonecrosis of the jaw is a highly recalcitrant disease; therefore, it is important to avoid the risk of developing it before it occurs. However, various controversies exist regarding the efficacy of drug holidays. Therefore, we conducted animal studies with mice to determine whether drug holidays of antiresorptive agents reduces the risk of developing osteonecrosis of the jaw.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯学 薬剤関連顎骨壊死 休薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨抑制剤であるビスフォスフォネート (BP) に関連した顎骨壊死 (BP-Related Osteonecrosis of the Jaw; BRONJ) は、2003 年の Marx による初発表からすでに 15 年以上が経過した。この 15 年以上にわたって蓄積された多くの症例による疫学的ならびに病理学的な解析により、BRONJ の予防策あるいは対応策が少しずつ明らかになりつつあるが、未だに統一見解のある治療法は確立していない。一方、2010 年、BP 剤とは全く違う薬理機序で作用する新規薬剤であるデノスマブが骨粗鬆症の治療薬として用いられるようになった。デノスマブは、RANKL 分子を標的する完全ヒト型モノクローナル抗体であり BP 剤と比較しても、同等もしくはそれ以上の骨吸収抑制作用を有し、半減期が短く BP のように骨に沈着しないことから、当初、BRONJ のような副作用は起こらないものと期待されていた。しかし、デノスマブ使用者においても、同様の顎骨壊死 (denosumab-related ONJ; DRONJ) が発症することが明らかになっている。

BRONJ および DRONJ は発症すると症状が重篤であることから発症リスクを低減させることが最善の策であり、骨吸収抑制剤開始前に、口腔内衛生状態の改善と感染源の除去を行うことが推奨されている。しかし、すでに骨吸収抑制剤服用中の患者に対する、骨吸収抑制剤の休薬の有効性については様々な議論が存在している。「顎骨壊死検討委員会ポジションペーパー2016」においては、「Evidence-based Medicine の観点に基づいて理論的に判断すると、侵襲的歯科治療前の休薬を積極的に支持する根拠に欠ける。」と、休薬の非有効性について言及している。一方、米国口腔顎顔面外科学会は、4 年以上の骨吸収抑制剤服用と顎骨壊死リスク因子を有する場合は、2 か月前後の休薬について検討することを提唱している。骨吸収抑制剤の休薬は、骨粗鬆症患者にとって QOL にも関わる重要な問題であるが、その是非について明らかになっていない。休薬の是非について明らかにすることは、臨床上において重要な課題であることは明白である。

2. 研究の目的

骨粗鬆症治療薬の副作用で起こる顎骨壊死は、発症すると重篤な症状を起こすため、歯科処置を行う際は、慎重な対応を図らなければならない疾患である。初めての症例報告以来、多くの症例の蓄積とその検討が行われているが、いまだに侵襲的な歯科処置前の休薬の可否に関しては統一した見解が得られていない。そこで本研究では、骨吸収剤の休薬が顎骨壊死の発症リスクを低減するか、我々が作成した顎骨壊死発症モデルマウスを用いて検討した。

3. 研究の方法

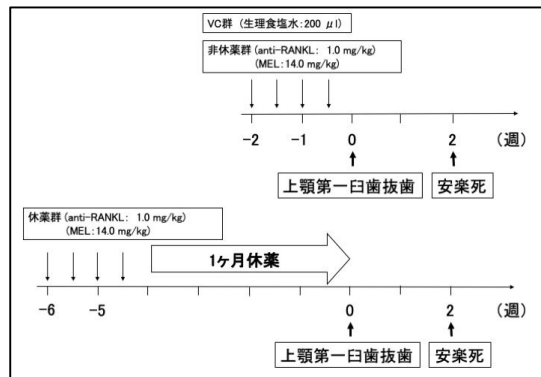
(1) 動物実験モデルの作製および休薬の検討方法

動物実験にあたっては北海道大学動物実験指針を遵守し北海道大学動物実験委員会承認を得て行った。

Vehicle control (VC) 群：生後 8 週齢の C57BL/6J JmsSlc 雌マウスに対し、生理食塩水 400 μ l を週 2 回の頻度で 2 週にわたり腹腔内に投与した。4 回の生理食塩水投与完了後に、ペントバルビタールによる全身麻酔を行い、上顎左側第一臼歯抜歯を行った。抜歯実施 2 週間後に CO₂ ガスを用いて安楽死させた。

非休薬群：生後 8 週齢の C57BL/6J JmsSlc 雌マウスに対し、anti-mouse RANKL 抗体 (Anti-RANKL) (1.0 mg/kg) およびアルケラン (MEL) (14 mg/kg) を週 2 回の頻度で 2 週にわたり腹腔内投与を行った。4 回の薬剤投与完了後に、ペントバルビタールによる全身麻酔を行い、上顎左側第一臼歯抜歯を行った。抜歯実施 2 週間後に CO₂ ガスを用いて安楽死させた。

休薬群： 生後 8 週齢の C57BL/6J JmsSlc 雌マウスに対し，Anti-RANKL (1.0 mg/kg) および MEL (14 mg/kg) を週 2 回の頻度で 2 週にわたり腹腔内投与を行った．4 回の投薬終了後，4 週間休薬を行った後に，ペントバルビタールによる全身麻酔を行い，上顎左側第一臼歯抜歯を行った．抜歯実施 2 週間後に CO₂ ガスを用いて安楽死させた．



(2) 試料の観察

採取した上顎骨の抜歯窩を実体顕微鏡にて観察した．その後，4%パラホルムアルデヒドに 3 日間浸漬固定を行い，実験動物用 X 線 CT 装置 Latheta LCT200 で管電圧：50kV，ピクセルサイズ 24.0 μm の条件で μCT 撮影を行った．3D 画像は Latheta LCT200 標準付属のソフトウェアにて dicom 画像を出力し，OsiriX にて作製した．μCT 撮影後に 5%ギ酸水溶液で 3 日間脱灰し，通法に従ってアルコール脱水・パラフィン包埋を行った．4.5 μm に薄切し連続切片を作製，通法に従って H.E. 染色を行った．作製した切片を光学顕微鏡にて観察し，Image-Pro Premier にて切片画像の取り込みを行った．切片画像の解析は ImageJ で行った．5 個以上隣接して骨小腔内の骨細胞が喪失している範囲を顎骨壊死部と判定し，連続切片上で最大の顎骨壊死面積を認める切片をその試料の最大顎骨壊死面積とし計測した．

(3) FACS 分析

末梢血

眼底静脈叢よりヘパリンコートしたガラス毛细管を用いて採血した．1X RBC Lysis Buffer にて溶血した後，anti-mouse CD3 ,anti-mouse CD4 ,anti-mouse CD8a ,APC anti-mouse/human CD45R/B220 にて細胞表面抗原の多重染色を行った．各サンプルは，FACSVerse を用いて測定を行った．測定結果は，FlowJo にて分析を行った．

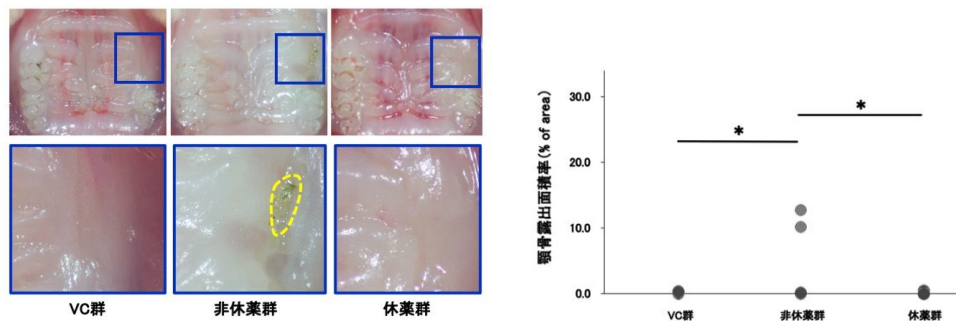
脾臓

脾臓を摘出後に割断し，anti-mouse CD3 , anti-mouse CD4 , anti-mouse CD8a , anti-mouse CD25 で細胞表面抗原の多重染色を行った．その後，FOXP3/Transcription Factor Fixation & Permeabilization Buffer Kit にて細胞膜透過処置を行い，anti-mouse FoxP3 で細胞内染色を行った．

4 . 研究成果

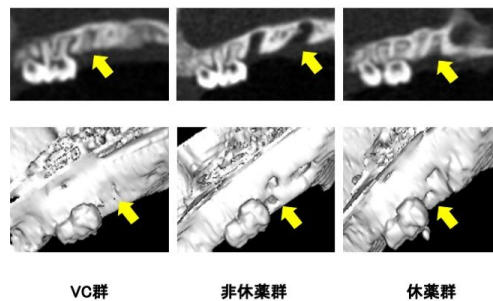
(1) 抜歯窩の肉眼的観察

VC 群では 5 匹中全てのマウスにおいて，抜歯窩は口腔粘膜上皮で閉鎖されていた．一方，非休薬群では，5 匹中 3 匹のマウスで，抜歯窩が口腔粘膜上皮で閉鎖されていたが，5 匹中 2 匹 (40%) のマウスにおいて抜歯窩は閉鎖されず顎骨露出が認められた．休薬群においては 8 匹全てのマウスにおいて，口腔粘膜上皮での抜歯窩の閉鎖を認めた．



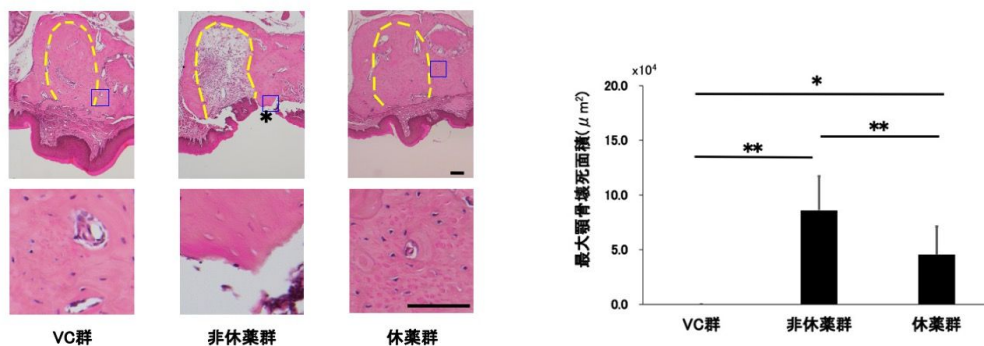
(2) μ CT による抜歯窩の観察

μ CT 撮影にて作成した 3D 画像所見では、VC 群の抜歯窩は新生骨で満たされ、治癒が良好である事が確認された(図 2)。一方、非休薬群では抜歯窩の残存を認め、新生骨の添加を認めなかった。また、休薬群では VC に比べて新生骨の添加が少なく、治癒遅延が生じているが、非休薬群に比べて治癒経過は良好であった。



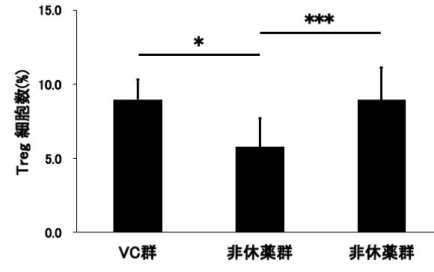
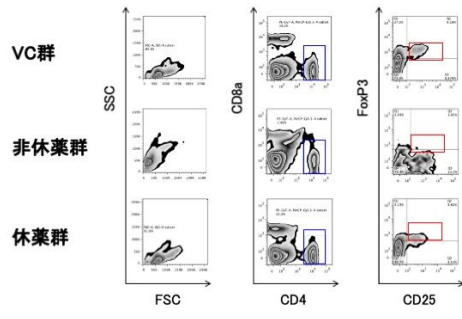
(3) 抜歯窩の組織学的解析

H.E. 染色による組織学的解析の結果、VC 群では、抜歯窩周囲の骨小腔内の骨細胞は残存していたのに対して、非休薬群では、抜歯窩周囲の骨小腔内の骨細胞は一部の範囲で消失していた。休薬群においても、骨壊死の所見が認められたが、非休薬群と比べて、骨細胞が喪失している範囲は少なく、5 個以上隣接して骨小腔内の骨細胞が喪失している部位を顎骨壊死面積として測定した結果、非休薬群では $86161.2 \pm 30704.9 \mu\text{m}^2$ であり、休薬群は $45383.2 \pm 25960.8 \mu\text{m}^2$ と約半分であった。また、非休薬群において、抜歯窩が閉鎖したマウスと閉鎖しなかったマウスについて、骨細胞が喪失している骨小腔の範囲および個数を比較したところ、有意差は確認されなかった。



(4) 脾臓細胞の FACS 分析

脾臓のフローサイトメーター分析では抑制型 T 細胞 (Treg 細胞) の数の変化を各群で比較した。Treg 細胞数は、VC 群と比較し、非休薬群では有意に減少していた。また、休薬群の Treg 細胞数は VC 群との有意差は認めなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	吉村 善隆 (YOSHIMURA Yoshitaka) (30230816)	北海道大学・歯学研究院・准教授 (10101)	