

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17181

研究課題名(和文) 骨吸収抑制薬関連顎骨壊死に対する発症前診断法の開発

研究課題名(英文) Development of presymptomatic diagnosis for anti-resorptive agents-related osteonecrosis of the jaw (ARONJ)

研究代表者

峯 裕一 (Mine, Yuichi)

広島大学・医系科学研究科(歯)・講師

研究者番号：60605989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：補綴歯科治療において顎堤の状態不良は、治療の成功を妨げる大きな要因となる。近年、ビスフォスフォネート(BP)製剤を初めとした骨吸収抑制薬の合併症として、骨吸収薬関連顎骨壊死(ARONJ)の発症が報告されている。関連学会からはポジションペーパーが示され、リスク因子や治療法について述べられているが、これらは医学的エビデンスに裏付けされたものではないことが強調されており、発症や進行と相関するバイオマーカーも明らかになっていない。本研究課題では、BP製剤投与と複合因子によりARONJを発症するモデルマウス作製法を確立するとともに、ARONJの発症前診断法開発のための基礎的検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨吸収薬関連顎骨壊死(ARONJ)は、補綴歯科治療に深く関係するインプラント埋入、不適合義歯や過大な咬合力等もリスク因子として考えられている。一方、骨吸収抑制薬は臨床的に有効性の高い薬剤であり、ARONJ発生のリスクと骨折予防のベネフィット等を正確に理解し、歯科治療を実施する必要がある。本研究では、より安全な骨吸収抑制薬の使用と補綴歯科治療に貢献する基礎的な知見を得ることができたと考える。

研究成果の概要(英文)：Anti-resorptive agents-related osteonecrosis of the jaw (ARONJ) is a rare but potentially severe adverse effect in patients medicating anti-resorptive drugs. In 2017, the Japanese Allied Committee on Osteonecrosis of the Jaw proposed several risk factors related to local, antiresorptive agents, systemic, congenital, lifestyle and co-administered agents. Whereas this position paper mentioned that these risk factors are including hypothesis without robust medical evidence. In fact, the mechanism of occurrence responsible for ARONJ is still not fully understood. Here, we establish the novel experimental ARONJ model mice, and investigate the potential of biomarkers as presymptomatic diagnosis.

研究分野：骨生物学

キーワード：ARONJ 発症前診断 新規マウスモデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

補綴歯科治療において顎堤は、義歯やインプラントを支持する上で重要な役割を果たしており、その状態不良は補綴歯科治療の成功を妨げる大きな要因となる。一方、高齢化社会の進展とともに、ビスフォスフォネートをはじめとした骨吸収抑制薬の使用が急増している。BP はハイドロキシアパタイトに高い親和性を示し、破骨細胞のアポトーシスを誘導することで、骨吸収を阻害する。現在、骨転移を有する癌患者および骨粗鬆症患者の治療に広く用いられており、特に骨粗鬆症に関しては、骨密度上昇効果および骨折抑制効果に関してエビデンスが示された臨床的に有効性の高い薬剤である。しかしながら、2003年にBP治療を受けている癌患者、もしくは骨粗鬆症患者に、侵襲的歯科治療をきっかけに難治性の顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw, BRONJ) が発生することが初めて報告された。当初はBP特異的に引き起こされる顎骨壊死と考えられていたが、ビスフォスフォネートとは異なる作用機序で破骨細胞の活性を抑制し、結果的にBPと同様に骨吸収を抑制するデノスマブ (Denosumab, RANKL に対するヒト型モノクローナル抗体製剤) 治療を受けている患者においても BRONJ と同様の頻度で顎骨壊死が発生することが判明した。作用機序は異なるものの、これらの薬剤がいずれも破骨細胞による骨吸収を治療のターゲットとしており、臨床的に酷似した顎骨壊死を引き起こすことから、現在では骨吸収抑制薬関連顎骨壊死 (Anti-resorptive agents-related ONJ, ARONJ) と呼ばれている。ARONJ は骨吸収抑制薬の合併症であり、抜歯やインプラント埋入、根尖、歯周外科手術などの骨への侵襲的歯科治療のみならず、不適合義歯や過大な咬合力等がリスク因子として考えられており、補綴歯科治療の成功に影響を与える。

2. 研究の目的

上述したように、骨吸収抑制薬は臨床的に有効性の高い薬剤であり、ARONJ 発生のリスクと骨折予防のベネフィット等を正確に理解し、歯科治療を実施する必要がある。そのため、医科と連携しつつ、治療方針を決定するための発症前診断法の開発が求められている。

そこで本課題では、これまでに報告された ARONJ モデルマウスとは異なる因子により発症するモデルマウスの作製を試みるとともに、これらを用いて ARONJ の発症および進行のバイオマーカーを探索することで、ARONJ の発症前診断法を開発するための基礎的検討を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規 ARONJ モデルマウスの確立

本研究は広島大学動物実験委員会の承認を受け実施した (承認番号 A18-106-2)。6 週齢雌の C57BL/6J マウスに対し、週 2 回、ビスフォスフォネートとしてゾレドロン酸 (ZOMETA; ノバルティスファーマ株式会社、東京) を尾静脈から、デキサメタゾン (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) を腹腔から 3 週間投与した。実験開始 1 週間後に実験的過剰咬合の誘導を目的として、マウス上顎左第一大臼歯咬合面にメチルメタクリレートレジン (スーパーボンド; サンメディカル株式会社、滋賀) を使用し、矯正用線 (デンツプライシロナ株式会社、東京) を接着した。ゾレドロン酸/デキサメタゾン投与および生理食塩水/デキサメタゾン投与マウスに対し、矯正用線の接着の有無により計 4 群を設定し、実験条件とした。

実験的過剰咬合状態の評価を目的として、マウス下顎対合歯の舌側歯冠長を計測した。解析にはマイクロ CT (Skyscan1176; BRUKER, MA, US) およびヘマトキシレン・エオジン (HE) 染色を用い歯周組織の形態を評価した。

(2) 顎骨壊死、特に BRONJ 発症におけるビスフォスフォネートの役割の解明に向けた基礎的検討

ビスフォスフォネートであるリセドロン酸のアナログ (以下、RisAnalog) の骨吸収抑制効果を明らかにするため、RAW264.7 細胞を用いた。リセドロン酸もしくは RisAnalog 存在下における RAW264.7 細胞の細胞活性を、AlamarBlue Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, US) を用いて定量した。

可溶性 Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) 刺激により RAW264.7 細胞を、Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 陽性の多核巨細胞へと誘導する過程において、リセドロン酸もしくは RisAnalog を添加し培養した。リセドロン酸および RisAnalog が RAW264.7 細胞の破骨細胞様細胞への分化に与える影響を、real-time RT-PCR を用いて解析した。

また、ビスフォスフォネートが骨分化過程においてどのような役割を果たすかを明らかにするため、ヒト間葉系幹細胞セルライン UE7T-13 細胞において三次元間葉系幹細胞集塊 (Clumps of MSC/ECM complex, C-MSCs) の作製を試みた。C-MSCs は、Kittaka, Kajiya[#]らの方法に従って作製した。

<引用文献>

Kittaka M, Kajiya M, et al., Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration. *Cytotherapy*. 2015 Jul;17(7):860-73.

(3)ARONJ モデルマウスからの顎骨壊死発症前後血清のプール

上記(1)で確立した実験的過剰咬合誘導 ARONJ モデルマウスおよび、これまでに複数報告されている抜歯により発症する ARONJ モデルマウスを作製した。各 ARONJ モデルマウスの顎骨壊死誘導前と安楽死前の2点から採血を行った。

4. 研究成果

(1)新規 ARONJ モデルマウスの確立

マイクロ CT による解析の結果、上顎左第一大臼歯咬合面に矯正用線を接着した実験的過剰咬合状態のマウスでは、矯正用線を接着していない正常咬合マウスと比較して、下顎対合歯の歯冠長は有意に短くなり、明らかな摩耗が認められた。これらの結果より本研究では、実験的過剰咬合状態が誘導されていると判断した。

マイクロ CT による解析の結果、第一大臼歯歯槽骨部の骨量 (bone volume fraction, BV/TV) は、正常咬合状態の生理食塩水投与マウスと比較して、実験的過剰咬合状態の生理食塩水投与マウスでは有意に低い値を示した。一方、実験的過剰咬合状態のゾレドロン酸投与マウスでは BV/TV の低下は認められず、正常咬合の生理食塩水投与マウスと同等の BV/TV の値を示した。

マイクロ CT 解析の結果、第一大臼歯歯槽骨部の歯根膜腔の幅は、正常咬合状態の生理食塩水投与マウスと比較して、実験的過剰咬合状態の生理食塩水投与マウスでは有意に大きい値を示した。一方、実験的過剰咬合状態のゾレドロン酸投与マウスでは、正常咬合の生理食塩水投与マウスと比較して有意に小さい値を示した。

HE 染色の結果、実験的過剰咬合状態のゾレドロン酸投与マウスでは空の骨細胞窩が多数認められたのに対し、実験的過剰咬合状態の生理食塩水投与マウスでは、空の骨細胞窩はほぼ認められなかった。また HE 染色の結果からも上記と同様に、第一大臼歯歯槽骨部の歯根膜腔の幅は、正常咬合状態の生理食塩水投与マウスと比較して、実験的過剰咬合状態の生理食塩水投与マウスでは大きい像を示した。一方、実験的過剰咬合状態のゾレドロン酸投与マウスでは、正常咬合の生理食塩水投与マウスと比較して小さい像を示した。

(2)顎骨壊死、特に BRONJ 発症におけるビスフォスフォネートの役割の解明に向けた基礎的検討 alarBlue Cell Viability Reagent を使用した解析の結果、リセドロン酸と比較して RisAnalog では、高い濃度においても RAW264.7 細胞の細胞活性に影響を与えなかった。

上記の結果より、RAW264.7 細胞の細胞活性に影響を与えない濃度の範囲で、RAW264.7 細胞における破骨細胞分化マーカー関連遺伝子である TRAP、cathepsin K および DC-STAMP mRNA の発現を real-time RT-PCR を用いて検討した。その結果、同濃度のリセドロン酸と比較して RisAnalog では、可溶性 RANKL により誘導された破骨細胞分化マーカー関連遺伝子の発現の抑制率が著しく低いことが明らかとなった。

マイクロ CT の結果、骨分化誘導培地で分化誘導を行った UE7T-13 細胞由来 C-MSCs のみ、顕著な石灰化が確認された。

(3)ARONJ モデルマウスからの顎骨壊死発症前後血清のプール

実験的過剰咬合誘導 ARONJ モデルマウスおよび抜歯により発症する ARONJ モデルマウスのどちらにおいても血清プールをストックすることができた。

本研究における実験的過剰咬合状態は矯正用線により誘導したものであり、実際にどの程度咬合力が付与されたかは定量できていない。そのため限られた条件ではあるものの、実験的過剰咬合とゾレドロン酸を投与することにより、マウスにおいて顎骨壊死様の病態を誘導することが可能であることが明らかとなった。また、本研究で用いた RisAnalog は、リセドロン酸と比較し、破骨細胞の分化を抑制する能力が著しく低いことが明らかとなり、この RisAnalog を用いることで、BRONJ 発症におけるビスフォスフォネートの役割を詳細に明らかにできる可能性が示唆された。今後は本件成果の結果を基に、ARONJ 発症機構の解明とバイオマーカーの決定に向けた研究を推進する。

以上より本研究成果は、補綴学的要因により発症する ARONJ の病態解明・発症前診断法の確立に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mine Y, Suzuki S, Eguchi T, Murayama T	4. 巻 64
2. 論文標題 Applying deep artificial neural network approach to maxillofacial prostheses coloration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 296-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.jpor.2019.08.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mine Y, Iwamoto Y, Nakamura K, Mitsuata C, Kozai K, Murayama T
2. 発表標題 Detection of Dental and Oral Anomalies Using Deep Learning Approach
3. 学会等名 2019 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suehiro T, Nguyen HTD, Mine Y, Fujii M
2. 発表標題 Development of molecular target therapy for malignant mesotheliomas using small molecule inhibitor
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujiyoshi N, Mine Y, Eguchi T, Murayama T
2. 発表標題 Deep learning approach to coloration of maxillofacial prostheses, optimization of hyper parameters
3. 学会等名 5th Annual Meeting of the International Academy for Digital Dental Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okuda K, Mine Y, Nikawa H, Murayama T
2. 発表標題 Evaluation of alveolar bone in bisphosphonate-medicated mice with hyperocclusive state
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research and Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田花鈴, 峯 裕一, 蓑田芽萌理, 吉岡玲奈, 牧平清超, 二川浩樹, 村山 長
2. 発表標題 実験的過剰咬合におけるビスフォスフォネート投与マウスの顎骨解析
3. 学会等名 令和元年度日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡玲奈, 峯 裕一, 蓑田芽萌理, 奥田花鈴, 牧平清超, 二川浩樹, 村山 長
2. 発表標題 プロトンポンプ阻害剤はBRONJモデルマウスにおける抜歯窩治癒を遅延させる
3. 学会等名 日本補綴歯科学会中国・四国支部令和元年度総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡玲奈, 峯 裕一, 二川浩樹, 村山 長
2. 発表標題 ランソプラゾールはBRONJモデルマウスにおける抜歯窩治癒を遅延させる
3. 学会等名 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----