

令和元年6月15日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17285

研究課題名(和文) テリパラチド投与によるBRONJの新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment with teriparatide for BRONJ

研究代表者

坂口 修 (Sakaguchi, Osamu)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00734584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビスホスホネート関連顎骨壊死(BRONJ)モデルラットにおいてテリパラチド(TPTD)の効果および作用機序を調査した。

TPTD投与はBRONJラットモデルにおいて骨壊死範囲を減らし、骨新生を誘導した。さらに、TPTD投与は破骨細胞数を増加させた。TPTD投与によってRANKL蛋白レベルの誘導が示唆され、また血清中の骨代謝マーカーを増加させた。TPTDは骨吸収防止と骨形成促進というポジティブな効果を持ち、BRONJの治癒機転として破骨細胞生成を改善した。われわれはTPTDの間欠投与がBRONJの効果的な治療になる可能性を提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2003年にビスホスホネート(BP)関連顎骨壊死(BRONJ)が報告されて以来、多くの研究機関で発生機序・病態の解明、治療法についての研究が行われている。しかしいずれも確立されておらず、多くの臨床医の頭を悩ませているのが現状である。

われわれは当教室で開発したBRONJラットモデルを用いた研究を行い、テリパラチドの効果を実証した。本研究結果は基礎的データに裏付けされた、エビデンスに基づいた安心安全で患者の負担が少ない画期的な治療法の開発の一助になると考えられ、患者やその家族だけでなく歯科および他の医療従事者にもたらす影響は極めて大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to investigate the effects and mechanism of teriparatide (TPTD) in a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis (BRONJ).

TPTD administration reduced necrotic bone area of the mandibles and femurs in the BRONJ rat model and induced new bone formation. In addition, TPTD injection increased the number of osteoclasts. The suggested underlying mechanism is the induction of protein levels of RANKL by TPTD. Furthermore, the serum levels of bone metabolism biomarkers (OC and CTX) were upregulated in the TPTD injection group. In conclusion, ZOL has negative effects on osteoclasts. TPTD was found to be effective in eliminating the negative effects of ZOL. TPTD had positive effects in preventing bone resorption and promoting osteogenesis. In addition, TPTD improved osteoclastogenesis, which in turn led to the improvement of BRONJ. Taken together, we suggest that intermittent administration of TPTD could be an effective treatment for BRONJ of the jaw (BRONJ).

研究分野：口腔外科

キーワード：顎骨壊死 BRONJ テリパラチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート (BP) は、骨粗鬆症治療の第一選択薬であり、また、悪性腫瘍による高カルシウム血症、固形がんの骨転移や、激しい骨破壊を伴う多発性骨髄腫、その他骨量減少を特徴とする骨疾患や様々な骨の異常に対する治療薬として有用性が証明されており、広く世界中で用いられている。しかしながら、2003年を皮切りに、BP製剤を長期間使用している患者で抜歯等の外科処置後に、重大な副作用としてビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死 (以下 BRONJ) の発生が数多く報告されており、年々増加傾向にある。BRONJ 発生リスクにおいて、BP 自体の要因だけでなく、歯周病などの感染や解剖学的特徴といった歯周組織に関連した局所的要因、また、患者における全体的要因、先天的要因、生活習慣等の要因など様々な要因が挙げられる。このように多くの要因を含む臨床例からの解析では、BRONJ の発生機序や病態は解明できず、適切な予防法や治療法の確立は非常に困難と考えられる。また、BRONJ は一旦発症してしまうと難治性であり、制御できずに病的骨折を引き起こし、大規模な外科的処置が必要となる重症化するケースもみられる。また近年では、RANKL を標的としたヒト型モノクローナル抗体製剤であるデノスマブや血管新生阻害薬といった BP 製剤以外の薬剤による骨壊死 (薬剤関連顎骨壊死) の報告も増加してきており、患者だけでなく、われわれ臨床医も対応に苦慮しているのが現状であり、早期の病態解明や治療法、予防法の確立が強く望まれている。上記より、遺伝的背景や条件の統一できる BRONJ 動物モデルによる研究は必要不可欠と考えられ、世界中で動物モデルの作製が行われている。BP に関しては、臨床での BRONJ の発症頻度の高さ、骨に対する作用の強さから注射用 BP を用いたものが多い。我々も今までに、がん患者を想定したラットにおける注射用 BP を用いた BRONJ 動物モデルの作製 (Tsurushima H, Sakaguchi O et al. Int J Oral Maxillofac surg 2013) に成功し詳細な検討を重ねてきた。このモデルでは、歯周病原菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (以下: *A.a*) の局所投与により顎骨だけでなく、臨床的には BRONJ が起こらない大腿骨にも骨壊死が起ることを確認しており、臨床的に BRONJ が、顎骨にしか発生しない理由として、歯周病原菌に常に曝されている顎骨の特殊環境によるものである事を世界に先駆けて示し報告してきた。その後、われわれは同様の実験系に *A.a* より抽出したリポポリサッカライド (以下: LPS) を用いて、骨壊死の発生・拡大にグラム陰性菌が持つ LPS が関与していることを示した (Sakaguchi O, et al. Int J Oral Maxillofac surg 2015)。また同教室の吉賀らは LPS と BRONJ について *in vitro* で詳細に検討し報告してきた (Muratsu D, Yoshiga D et al, Plos One 2013)。多くの研究機関で発生機序や病態について研究されており、着実にゴールに近づいていると思われるが、実際の臨床の現場では多くの患者が骨壊死を発症している。治療法に関しては、われわれ臨床医の中でも統一されておらず各施設間で異なっていたり、未だに手探りな状況にある。治療法は、保存的治療と外科的治療に分けられるが、基本的にはまず洗浄・抗菌薬投与といった保存的治療が選択される。それから感染を制御し腐骨分離を認めた場合や骨壊死の制御困難により大規模な外科的治療に踏み切るといった流れが多いと思われる。ほとんどの場合、その治療期間は非常に長く、頻回の通院が必要なため患者への負担は違った意味で大きい。そこで治療期間の短縮および侵襲的な外科処置の回避や手術侵襲を最小限にすることが出来れば、われわれだけでなく、患者にも非常に有益であることは間違いない。

2. 研究の目的

ビスフォスフォネート (BP) 関連顎骨壊死 (BRONJ) の発生機序・病態は不明な点が多く、治療法・予防法も未だに確立されていない。過去に我々は、BRONJ 様病変ラットモデルを作製し、歯周病原細菌 { グラム陰性桿菌の持つリポ多糖 (LPS) } による刺激が臨床的 BRONJ の発生およ

び増悪因子の一つである可能性を示してきた(Tsurushima H ,Sakaguchi O, Int Oral and Maxillofac Surg, 2013)。さらに、LPS を中和するカチオン性ペプチド抗菌薬であるポリミキシン B (PMB) の局所投与による骨壊死に対する作用について検討し報告してきた (Sakaguchi O, Int Oral and Maxillofac Surg, 2014)。すでに骨形成作用を持つ副甲状腺ホルモン製剤テリパラチドが臨床の現場に使用され、その効果が報告されているが、その詳細なメカニズムは解明されていない。共同研究者の Yoshiga D.らも、テリパラチドを1週間に1度投与することにより stage3 の重傷症例が治癒したことを報告している(Osteoporos Int. 2013 Jan 31)(図3)。今回、当教室が開発した BRONJ モデルに対してテリパラチドを応用することで、治癒のメカニズムについての解明が可能となり、予防法や治療法の確立に大きく貢献することができると確信している。そこで今回の研究では、既存の BRONJ モデルラットに対し、テリパラチドの治療効果を実証し、新規治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) BRONJ モデルに対するテリパラチドの治療効果の検討

1. ビスフォスフォネート製剤の投与

8週齢 Wistar 系雄ラットを実験に用いた。

温度 22 ± 1 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗 12 時間毎に管理された環境動物舎内で 1 週間の予備飼育を行った。0.1 mg/kg/回のゾレドロン酸水和物(ゾメタ点滴静注用)の皮下注射を 1 週間に 1 回腹部に 4 週間行った。

2. 全身麻酔

実験開始から 4 週間後に、ジエチルエーテルで吸入麻酔を行ない、抱水クロラル 3.5mg/kg の腹腔内注射による全身麻酔を施行した。

3. 固定

ラットの手術台として木製板を改造して作製し、四肢をガーゼにて仰臥位で固定した。開口状態を維持するため、同様にガーゼを用いた。

4. 手術

ラットの下顎骨および大腿骨部にラウンドバーにてドリリングを行い、それぞれのドリル穴に凍結乾燥した A.a 菌の死菌を 40 μ g の充填を行い、ボーンワックスで被覆し、閉創した。4 週間観察期間を設けた。

5. 群分け

テリパラチド投与群、コントロール群の 2 群に分けた。テリパラチド投与群は、3 μ g/kg のテリパラチドを週に 3 回で 4 週間皮下注射した。コントロール群は同量の生理食塩水を投与した。

6. 標本作製・評価

テリパラチド・生理食塩水最終投与から 1 週間後、ラットを安楽死させ、下顎骨と大腿骨の標本を採取した。採取の 10 日前、3 日前にカルセイン投与を行った。10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定を行った。右下顎骨・大腿骨は脱灰標本、左下顎骨・大腿骨は非脱灰標本とした。5

μmで薄切を行った。脱灰標本はヘマトキシリンエオジン(H-E)染色を行い、非脱灰標本はピラヌエバ染色を行った。脱灰標本では、2群を骨壊死範囲と骨新生範囲を、画像解析ソフトを用いて計測した。各群を組織形態学的に比較した。非脱灰標本では、カルセインの二重ラベリングの幅を計測し、破骨細胞数をカウントした。

(2) 血清骨バイオマーカーにおけるELISA分析

実験期間の最後に血液サンプルを採取した。ELISAキットを用いてRANKL蛋白レベルと血清OCと血清CTXレベルを計測した。

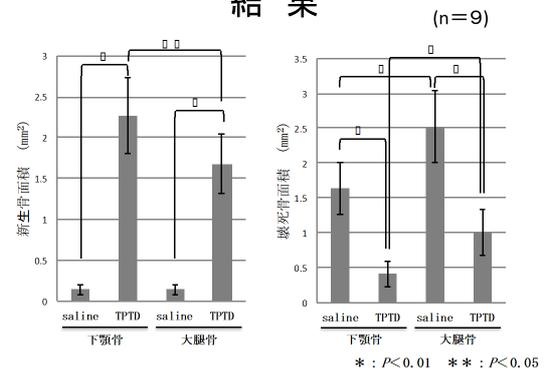
4. 研究成果

(1) BRONJモデルに対するテリパラチドの治療効果の検討

・病理組織学的評価

コントロール群において、下顎骨および大腿骨では、ドリル穴周囲骨に広範囲の骨壊死を認め、骨穿孔部内に骨新生はほとんど認めなかった。TPTD群においては、下顎骨および大腿骨の両方で治癒傾向を認めた。骨穿孔部内で骨新生がみられ、骨壊死範囲はコントロール群と比較して小さかった。いずれも統計学的有意差を認めた。

結果

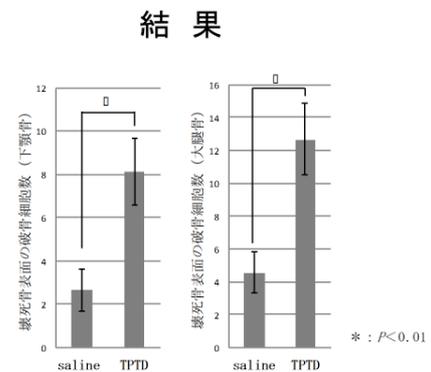
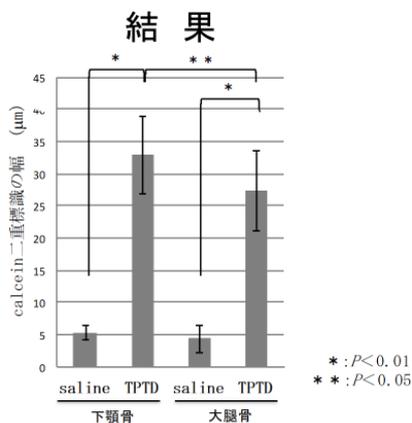


・二重カルセインラベリング幅

TPTD群における下顎骨および大腿骨の二重ラベルラインは、コントロール群と比較して統計学的に有意に広範であった。

・破骨細胞数

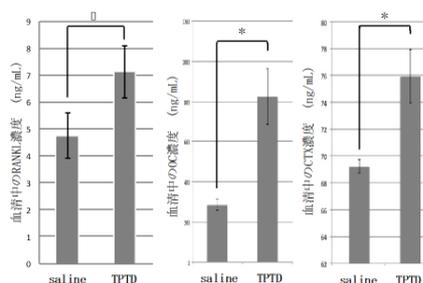
TPTD群の下顎骨および大腿骨における破骨細胞数は、コントロール群と比較して統計学的に有意に増加していた。



(2) 血清骨バイオマーカーにおける ELISA 分析

TPTD 群の RANKL レベルはコントロール群と比較して統計学的に有意に増加していた。さらに、OC と CTX の両方とも TPTD 投与によりコントロール群と比較して統計学的に有意に増加していた。

結果



(3) まとめ

骨粗鬆症モデルラットへの TPTD の間欠的投与により、骨芽細胞が活性化され、新生骨の形成を促進することは、過去にも報告されており、今回の BRONJ モデルラットでも、下顎骨・大腿骨ともに有意な新生骨形成の増加が認められた。

また、TPTD 投与による壊死骨面積の減少および破骨細胞数の増加、RANKL と CTX の上昇から、形成された壊死骨が破骨細胞により吸収されたことが推察された。

TPTD は新生骨形成と壊死骨吸収を促進することで BRONJ 改善に関与していることが示された。また、TPTD 投与による血清 RANKL の発現上昇および、それに伴う破骨細胞の活性化が、BRONJ の改善に関与していることが示唆された。

今後はさらにデータの蓄積を行い、早急な病態解明や治療法・予防法を確立する必要がある。

5. 主な発表論文等

Evaluation of therapeutic effects of teriparatide in a rat model of zoledronic acid-induced bisphosphonate-related osteonecrosis

Ikeda H, Yoshiga D, Kokabu S, Ariyoshi W, Tsurushima H, Sakaguchi O, Tanaka J, Kaneko J, Habu M, Sasaguri M, Jimi E, Nishihara T, Yoshioka I, and Tominaga K

(In press) bisphosphonate-related osteonecrosis Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology

〔雑誌論文〕(計1件)

池田浩之、吉賀大午、鶴島弘基、坂口修、田中純平、梶田倫功、土生学、笹栗正明、吉岡泉、富永和宏：MRONJ モデルラットを用いた MRONJ への Teriparatide の治療効果に関する研究 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2017 年 4 月 26~28 日 松山市(2-E-1)

池田浩之、吉賀大午、鶴島弘基、坂口修、田中純平、梶田倫功、土生学、笹栗正明、吉岡泉、富永和宏：MRONJ モデルラットを用いた MRONJ への Teriparatide の治療効果に関する研究 第 77 回九州歯科学会総会学術大会 2017 年 5 月 20・21 日 北九州市 (11)

吉賀大午、池田浩之、鶴島弘基、田中純平、坂口修、原口和也、土生学、笹栗正明、吉岡泉、富永和宏：ビスホスホネート製剤による骨壊死モデルラットに対する副甲状腺ホルモン製剤(テリパラチド)の治療効果に関する研究 第 72 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2018 年 5 月 12・13 日 名古屋市 (1-P6-6)

吉賀大午、池田浩之、田中純平、坂口修、鶴島弘基、金子純也、富永和宏、吉岡泉：
ビスホスホネート製剤による骨壊死モデルラットに対するテリパラチドの治療効果
第63回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2018年11月2～4日 千葉市(NP2-3)

〔学会発表〕(計4件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。