

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007－2008
 課題番号：19890261
 研究課題名（和文） ビスホスホネート服用患者へのインプラント手術で発症する顎骨特異的
 壊死のメカニズム
 研究課題名（英文） Mechanism of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws
 associated with oral implant operation.
 研究代表者
 片瀨 三千綱（KATAFUCHI MICHITSUNA）
 福岡歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：90454933

研究成果の概要：

ビスホスホネート服用による生じる顎骨壊死の発生メカニズムとして、ビスホスホネート服用後に顎骨を構成するコラーゲンに他骨に比べて特異的な変化が生じている可能性が考えられる。本研究では大腿骨のコラーゲンと比較して、顎骨のコラーゲンに特異的な変化が生じているかを見出そうとしたが、明確な変化を認めることはできなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴理工系歯学

キーワード：ビスホスホネート、インプラント、顎骨特異的壊死、骨コラーゲン、分子間架橋

1. 研究開始当初の背景

歯牙欠損を有する患者へのインプラント治療法は、現在最も予知性の高い歯科補綴治療法の一つである。近年、ビスホスホネート（BP）服用中（特に、静脈内投与中）の患者に対するインプラント治療を含む歯科治療により、顎骨壊死が発生する症例が次々に報告され、bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws（BON）という特別なカテゴリーが設定され、その対策が米国をはじめ欧州・豪州で緊急報告されている。BPは破骨細胞の活性を低下させ骨吸収を抑

制するため、骨吸収抑制の必要な骨粗鬆症、骨量低下を示す疾患（Paget病など）、悪性腫瘍による高カルシウム血症等の患者に対し投与され、臨床効果が報告されている。日本を含め世界各国で過去15年に亘り広範に使用されており、現在、静脈内投与中の患者数だけでも200万人を超えている。BP服用に伴う手術後の骨壊死は顎骨（特に下顎骨）に限られており、整形外科領域では例がない。この骨壊死が顎骨特異的に起こる理由として、被服粘膜が薄いため微小外傷を受けやすい可能性、口腔細菌による感染を受けやすい可能性、四肢骨と異なる骨リモデリングに起

因する可能性などが推測されているが、その原因は未だ明らかでない。

骨は、主要な構造タンパク質である I 型コラーゲンにヒドロキシアパタイトが沈着することにより、石灰化し形成される。骨芽細胞の産生する I 型コラーゲンは、水酸化、糖添加、そして分子間架橋の形成など種々の翻訳後修飾をうけ、機能的線維を形成しその石灰化を制御している。特にコラーゲン分子間架橋は、コラーゲン線維の太さや成熟度、さらに石灰化プロセスに決定的な機能を担うため、骨質を規定する重要な要因の一つと考えられている。骨コラーゲン架橋は他組織とは異なるパターンを有し、その特殊性は lysyl hydroxylases (LHs) と lysyl oxidases (LOXs) という酵素群の活性に大きく依存している。近年、破骨細胞抑制に加え、BP が骨芽細胞の骨形成能を促進する事が示唆された。しかし、BP 服用下で形成される骨が、生理学的に正常な骨質・コラーゲンを維持しているかは不明である。

実験代表者の所属する研究室では、四肢骨に対する顎骨の特異性の有無を模索してきた。大腿骨に比べ下顎骨は、海綿骨量が多くそれに伴い骨芽細胞数も多いこと、破骨細胞数と密度が高いこと、コラーゲン分子間架橋のパターンが異なることなどが判明した。これらの所見から、BP の骨質に対する影響は下顎骨と大腿骨で異なる可能性が十分に考えられる。

そこで実験代表者は、“下顎骨は他骨に比べ、BP 服用中に分子間架橋の異常な骨コラーゲンが蓄積するため骨質が劣化し、その事がインプラント治療時の顎骨特異的壊死の一要因となる”と仮説を立てた。この仮説を検証するための本研究の具体的な目的を次に挙げる。

2. 研究の目的

(1) BP 服用後に下顎骨と大腿骨に同時にインプラント埋入を行い、下顎骨のみに壊死が起こるかを検証する。

BP は服用後その 90%以上がヒドロキシアパタイトと結合し、骨中に蓄積される。BP の蓄積された一般骨に対する外傷そのものが骨壊死を誘導する可能性を否定し、下顎骨に特異的に壊死が起こるかを検証するために行う。

(2) BP 服用・非服用時の下顎骨および大腿骨において、コラーゲンの分子間架橋を分析することにより、その骨質を比較する。

① コラーゲン分子間架橋の種類・数を比較する。

② コラーゲン分子間架橋を決定する酵素 (LHs・LOXs) の発現を比較する。

BP 服用中に形成された骨の骨質をコラーゲンの生化学的性質において比較する。コラーゲン分子はその分子間に架橋構造を形成する。骨コラーゲンの主な未成熟型架橋として、DHLNL と HLNL、その成熟型架橋として pyridinoline と deoxy-pyridinoline がある。これらは骨コラーゲンの生理・病理学的状態を反映しており、骨質を診断する基準となり得る。コラーゲン分子間架橋の種類は細胞内でコラーゲンのリシンを水酸化する酵素群である LHs の活性に依存する。また、架橋形成は細胞外でリシンが酸化的脱アミノされる事により開始するため、その数は LOXs の活性に依存する。よってこれらの酵素群の遺伝子発現を比較することにより、BP 服用中にコラーゲン分子間架橋において変化がある場合、その分子レベルでのメカニズムの一端の解明となり得る。

3. 研究の方法

(1) 実験動物としてラットを用いる。BP は最も顎骨壊死の発症頻度が高いとされる zometa® (zoledronate: ノバルティス ファーマ社) を用いる。服用後 6-8 週後に下顎骨と大腿骨にインプラント埋入を行う。1-2 週後に埋入部位を開放し、壊死骨の有無を確認する。

(2) (1) と同様にラットに BP を服用させ、6-8 週後に以下の実験を行う。

① 下顎骨及び大腿骨を採取し、凍結粉碎・乾燥後、液体クロマトグラフィー (HPLC) にてコラーゲン 1 分子あたりの分子間架橋の種類とその数を計測する。HPLC 以下の実験はノースキャロライナ大学コラーゲン生化学研究室に依頼する。

② 下顎骨及び大腿骨から RNA 抽出・cDNA 作成を行い、リアルタイム PCR により LHs 及び LOXs の遺伝子発現を比較する。

(3) 研究開始当初の計画にはなかったが、コラーゲン分子間架橋の分析の前段階として、zoledronate 投与群と非投与群において、下顎骨と大腿骨におけるコラーゲン量とコラーゲン 1 分子中のリシン残基の水酸化の程度を比較した。

方法として、zoledronate をラットの腹腔内に 6 週間 (1 週間に 1 度、2 μg ずつ) 投与

し、増殺後、下顎骨と大腿骨を採取した。凍結粉碎・乾燥後、3mgの資料を塩酸で加水分解した(110℃、22時間)。塩酸を取り除いた後、HPLCを用いて、資料のアミノ酸分析を行った。コラーゲン量は、資料中の水酸化プロリンの量を基準として、資料の乾燥重量中の量($\mu\text{g}/\text{mg}$)を算出した。リシン残基の水酸化の程度は、コラーゲン1分子中に水酸化プロリンが300残基であることを基準とし、資料中の水酸化リシンの量を標準化し、コラーゲン1モル中の量(mol/mol)を算出した。

4. 研究成果

(1) 最も顎骨壊死の発症頻度の高いとされる zoledronate を用いて、ラットの腹腔内に6週間(1週間に1度、 $2\mu\text{g}$ ずつ)投与したが、インプラント埋入と顎骨壊死の発症を検討するところまでは実験が至らなかった。本実験の条件では、zoledronate 投与群と非投与群において、肉眼的所見としての顕著な身体的特徴の変化、採取骨の性状の変化は認められなかった。

様々な条件下で壊死骨発生に対する適正な条件の模索が必要であるとおもわれる。

(2)

①分子間架橋の種類・数を分析し比較するところまでは実験が至らなかった。

②LHs 及び LOXs の遺伝子発現を比較するところまでは実験が至らなかった。

(3) 研究開始当初の計画にはなかったが、コラーゲン分子間架橋の分析の前段階として、zoledronate 投与群と非投与群において、下顎骨と大腿骨におけるコラーゲン量とコラーゲン1分子中のリシン残基の水酸化の程度を比較した。骨の主要有機成分はI型コラーゲンであり、その量的変化は架橋構造などの質的变化と共に骨の恒常性に寄与すると考えたため、骨コラーゲン量の変化を比較しておく必要があると考えたためである。その結果、下顎骨においては、zoledronate 投与群では $184\mu\text{g}/\text{mg}$ であり、非投与群の $204\mu\text{g}/\text{mg}$ に対し、明確な骨コラーゲン量の変化は認められなかった。また、大腿骨においても、投与群では $131\mu\text{g}/\text{mg}$ であり、非投与群の $134\mu\text{g}/\text{mg}$ に対し、明確な変化は認められなかった。下顎骨と大腿骨のコラーゲン量に差があることは示されたが、それぞれの部位における zoledronate による効果は示されなかった。zoledronate の破骨細胞抑制を考慮すると、投与群での骨コラーゲン量の増加が予測されたが、本実験の条件では示されなかった。

コラーゲン分子間架橋構造に関連し、その

種類を決定する重要な因子として、骨コラーゲン中のリシン残基の水酸化がある。リシン残基の水酸化の程度は lysyl hydroxylases (LHs) の活性に依存する。よって、これを比較することは、zoledronate 投与後に架橋の種類に変化が生じた場合、その一因となりえるため、比較しておく必要があると考えたためである。その結果、下顎骨においては、zoledronate 投与群では $38.8\text{mol}/\text{mol}$ であり、非投与群の $38.7\text{mol}/\text{mol}$ に対し、変化は認められなかった。また、大腿骨においても、投与群では $42.8\text{mol}/\text{mol}$ であり、非投与群の $42.8\text{mol}/\text{mol}$ に対し、変化は認められなかった。コラーゲン量と同様に、下顎骨と大腿骨において、それぞれのコラーゲン中のリシン残基の水酸化の程度に差があることは示されたが、それぞれの部位における zoledronate の影響は示されなかった。本実験の条件では、zoledronate は LHs の活性の変化には寄与しない可能性が示唆された。

本研究では、zoledronate 投与後、コラーゲン量に変化が生じていないことから、実験条件の再考が求められると考えられる。今後の展開として、骨コラーゲン量の変化を目安として、zoledronate が下顎骨と大腿骨の骨コラーゲン量を増加させる条件を模索していく予定である。また、コラーゲンのリシン残基の水酸化の程度に変化ないことから、今後 zoledronate がコラーゲン中の架橋の種類に変化を与えることがあれば、骨の代謝に寄与する影響であることが示唆された。

本研究は、“下顎骨は他骨に比べ、BP 服用中に分子間架橋の異常な骨コラーゲンが蓄積するため骨質が劣化し、その事がインプラント治療時の顎骨特異的壊死の一要因となる”という仮説を証明するには至らなかった。今後の展望として、上記改善点を踏まえての実験条件の再考をする予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

片渕 三千綱 (KATAFUCHI MICHITSUNA)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90454933

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし