

令和 6 年 4 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10286

研究課題名(和文) 分子標的治療薬が関連する顎骨壊死の実験モデルと分子基盤の確立

研究課題名(英文) The study to establish animal models and molecular insight of targeted therapy drugs associated osteonecrosis of the jaw

研究代表者

天野 克比古 (Amano, Katsuhiko)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：20448129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：分子標的治療薬が関連する顎骨壊死の実験モデルとして、C57BL/6マウスにおける抜歯モデルを作成し、Bisphosphonate製剤及びTKIsであるスニチニブを投与し抜歯窩の治癒を評価した。対照群、ゾレドロン酸腹腔内注射群、スニチニプリング酸塩経口投与群、ゾレドロン酸注射+スニチニプリング酸塩経口投与併用群の4グループの作成を行った。抜歯後の上皮化やマイクロCTを用いた骨性治癒の評価を行ったところ、有意な差を認めず、ヒトで観察されるような骨露出という病態は再現されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、高齢化社会を背景に、様々な製剤に起因すると考えられる顎骨壊死の発症のリスクが増えている。進行例に対しては歯科口腔外科的な治療を行っても、予後不良となり治療に難渋する。そのため、本研究のような動物モデルの作成や分子機序の解明はより良い治療法の開発に繋がると考えている。成果としては本研究期間中に行った実験においては有意な差を得られなかったものの、今後さらなる検討を重ねていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish an animal model performing tooth extraction in C57BL/6 mice as an experimental model to study osteonecrosis of the jaw associated with molecular target drug. We evaluated the healing after tooth extraction administering sunitinib malate with or without bisphosphonate. We made these 4 groups; Control, i.p. injection of zoledronic acid, oral intake of sunitinib malate, combined. Significant difference was not observed between 4 groups concerning postoperative epithelization and alveolar bone healing, resulting in the negative data to reproduce human ONJ.

研究分野：外科系歯学

キーワード：分子標的薬 顎骨壊死 動物モデル ビスホスホネート製剤 チロシンキナーゼ阻害剤

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の人口動態統計によると悪性新生物(悪性腫瘍)は日本人の主な死因別死亡数において第1位であり、近年増加傾向にある中、年間約37万人が死亡している(研究計画書申請時)。癌治療では各々の専門領域において従来の外科的切除や放射線化学療法という治療に加え、近年新たな試みがなされてきている。免疫チェックポイント阻害薬や種々の分子標的薬が導入され、より選択的、効果的で副作用の少ない治療法の開発が進んでいる。分子標的薬の一つである血管新生阻害薬、Anti-VEGF抗体やTyrosine kinase inhibitors (TKIs)では抗腫瘍効果を示す一方、口腔副作用として顎骨壊死(Osteonecrosis of the Jaw)が報告されている。我々の歯科口腔外科領域において、顎骨壊死は放射線性骨髄炎に並ぶ難治性の骨疾患であり治療に難渋する。実臨床ではONJステージ1-2に対しては、抗菌薬の投与や洗浄、高圧酸素療法、適応可能な症例に対してはPTH製剤を使用し、臨床所見や画像所見において腐骨分離など治癒傾向が認められる患者に対し病変部の搔爬や下顎辺縁切除といった外科的介入を行う。良好な予後が得られる症例を経験する一方で、保存療法では回復反応が鈍い症例や一時的に治癒は得られるものの継続的な癌治療や透析など複雑な要因を持ち再度骨露出や感染を生じてしまう症例では対応に苦慮している。後者の患者に対してより広範囲な外科的介入が必要と思われるが、QOLの低下は必須であり治療法の確立が望まれる。

### 2. 研究の目的

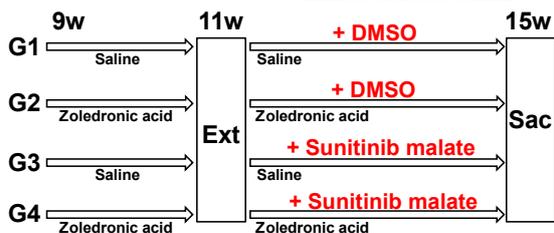
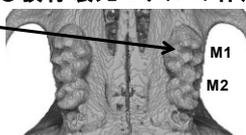
これまで破骨細胞機能を抑制するBisphosphonate製剤や抗RANKL抗体という骨修飾薬が顎骨壊死に関連することが分かっているが、Anti-VEGF抗体やTKIsがそれを発症させる機序は十分に解明されていない。そこで、本研究は、動物モデルを用いてAnti-VEGF抗体やTKIsがどのように顎骨壊死という病態に関与しているか検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では第一に、Cre-LoxPシステムを用いてin vivoでのVEGFシグナルによる破骨細胞制御を仮定し、破骨細胞特異的VEGFシグナル欠損マウス(LysM-Cre;VEGFR2<sup>e3loxp/e3loxp</sup>)を作成し、表現型を解析することを計画した。第二に、TKIs投与マウスを用いた抜歯モデルを作成し、顎骨壊死発症の有無を検索することとした。TKIs投与マウスについてはBisphosphonate製剤との併用群も設定し相乗、相加効果の有無を検討した。前者の計画においては社会的な事情により遺伝子組み換えマウスの発注と輸入が遅れたため、後者で提案した研究に注力を注いだ。

図1 Sunitinib投与による顎骨壊死モデルの作成

- ・上顎M1抜歯
- ・顎骨壊死の評価
- ・BP製剤の併用?



方法としては図1に示すように、まず11週齢のC57BL/6マウスを購入し、エキスプローラを用いて片側上顎第1臼歯(M1)の抜歯を行った。その後、TKIs投与としてスニチニブリンゴ酸塩を採用し、異種移植腫瘍マウスモデルでの抗腫瘍効果が見られたと報告されている40mg/kg/日をカテーテルにて経口投与し、週5日、4週間継続し、15週齢でサンプリングを行った。実態

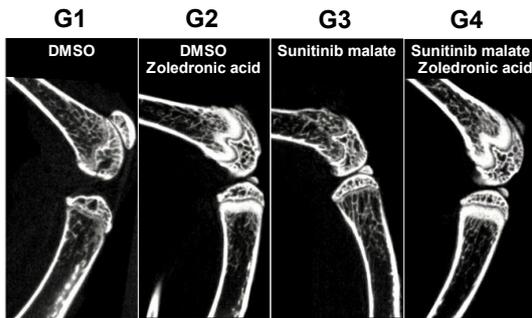
顕微鏡とマイクロCT、組織切片での評価を行い骨露出や顎骨壊死の発症の有無、抜歯窩での骨新生状態を溶媒投与群と比較検討した。

さらに、Bisphosphonate製剤としてゾレドロン酸を採用して、9週齢から抜歯前投与する群も設定した。すなわち、以下の4群を設定し、比較評価を行った。対照群(生理食塩水注射、DMSO溶媒経口投与)(G1)、ゾレドロン酸腹腔内注射(200mg/kg、週2回)群(G2)、スニチニブリ

ンゴ酸塩経口投与群 (G3)、ゾレドロン酸注射+スニチニブリンゴ酸塩経口投与併用群 (G4)。

#### 4. 研究成果

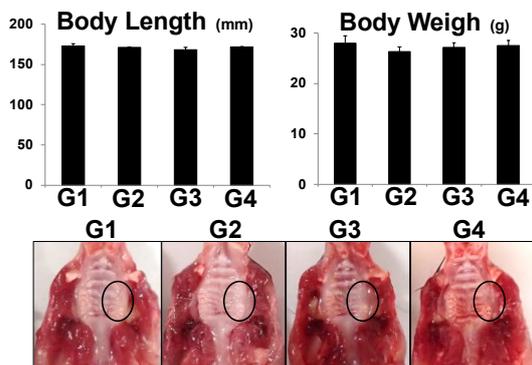
### 図2 マウス膝関節部のCT解析



まずゾレドロン酸投与の効果を確かめるため、骨密度の評価を行った。15週齢のサンプルから下肢を摘出し膝関節部マイクロCTを撮影して、大腿骨遠位端と脛骨近位端を観察した。図2に示すように、G1とG2の比較で明らかな成長板に連続するtrabecular boneの増加を認め、ゾレドロン酸投与の効果が確認された。G1とG3の比較で、スニチニブリンゴ酸塩経口投与群ではtrabecular boneの明らかな変化を認めなかった。

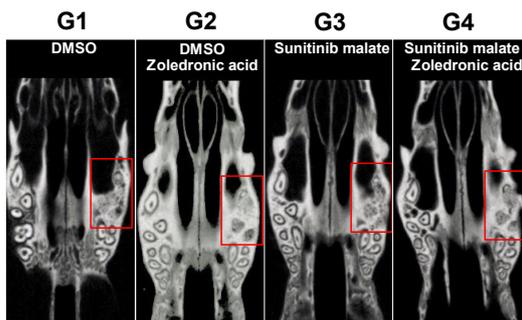
またG2とG4の比較で、ゾレドロン酸投与で生じる骨造成は併用群 (G4)でも同様に認められ、スニチニブリンゴ酸塩経口投与の併用はゾレドロン酸投与に起因する骨密度増加へ影響を与えなかった。次に試料採取時点で動物をSacrificeし、体長と体重を比較したところ、図3上に示すように、4群間では有意な差を認めなかった。

### 図3 体長と体重の推移、口腔内所見



さらに頭蓋顎顔面部を摘出し抜歯後の上皮化やマイクロCTを用いた骨性治癒の評価を行った。図3下に示すように、G1とG2の比較あるいはG1とG3の比較で、各々のグループで上皮化は正常に起こっており、骨露出を認めなかった。さらに併用群 (G4)でも同様に、左側上顎第1臼歯 (M1)の抜歯後4週間で正常な上皮化を認め、顎骨壊死を疑う骨露出は認めなかった。次にマイクロCTを用いて上顎骨部を撮影し抜歯窩の骨再生を評価した (図4)。対照群 (G1)では左側上顎第1臼歯 (M1)の抜歯窩において良好な新生骨を認め、抜歯後の骨性治癒が進んでいることが観察された。G1とG2の比較で、ゾレドロン酸投与による上顎骨のCT値の上昇を認めたが、抜歯窩での骨造成は対照群と同様に進んでいた。G1とG3の比較で、スニチニブリンゴ酸塩経口投与群でも抜歯窩の新生骨を認めた。

### 図4 抜歯窩の骨再生の検討



またG2とG4の比較で、併用群 (G4)でも同様の

所見が観察され、4群間で大きな差を認めなかった。以上のように、本結果から少なくとも設定した投与スケジュールおよびグループにおいて明らかな顎骨壊死疑う所見は得られず、治癒は有意差なく生じることが分かった。当初の研究計画に反して有意差が得られなかった点については、用法や用量の再検討が必要であることやヒトとげっ歯類の差異、顎骨壊死の分子機序の複雑性に起因することが推察される。予期していなかった知見としては、ゾレドロン酸投与が生じる大腿骨遠位端と脛骨近位端における明らかな1次海綿骨形成の促進が、TKIs投与により変化しなかったことである。Bisphosphonate製剤とTKIsが制御する骨代謝機構の違いについては今後検討していきたいと思う。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Katsuhiko Amano, Akinari Sugauchi, Chiaki Yamada, Mikihiro Kogo, Seiji Iida	4. 巻 77(1)
2. 論文標題 Osteonecrosis of the Jaw in Two Rheumatoid Arthritis Patients Not Treated with a Bisphosphonate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 111-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/64371	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 -
1. 著者名 Kasahara Shun, Amano Katsuhiko, Kurioka Kyoko, Minohara Masato, Kogo Mikihiro, Tanaka Susumu	4. 巻 35
2. 論文標題 A sporadic case of Gigantiform Cementoma with mild and atypical clinical manifestation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 233 ~ 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2022.09.006	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 -
1. 著者名 Yasuda Takuji, Amano Katsuhiko, Kawamura Kohei, Cho Jungsoo, Kogo Mikihiro, Tanaka Susumu	4. 巻 35
2. 論文標題 A case of a massive desmoplastic fibroblastoma on the mandibular gingiva	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 172 ~ 177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2022.08.012	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 -
1. 著者名 Kurioka Kyoko, Amano Katsuhiko, Harada Kazuma, Okura Masaya, Kogo Mikihiro, Tanaka Susumu	4. 巻 34
2. 論文標題 The secondary case of melanotic neuroectodermal tumor in the infant maxilla: Long-term observation after the enucleation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 599 ~ 604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2022.02.011	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天野 克比古、須河内 昭成、山田 智明、古郷 幹彦、飯田 征二
2. 発表標題 関節リウマチ患者に生じたMTX 関連顎骨壊死の2 例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会、学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原 駿、天野 克比古、栗岡 恭子、簗原 雅人、古郷 幹彦、田中 晋
2. 発表標題 非典型的な臨床経過を示した孤立性巨大型セメント質腫の1 例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会、学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田 卓司、天野 克比古、趙 正秀、川村 晃平、田中 晋
2. 発表標題 下顎歯肉に生じた巨大な線維形成性線維芽細胞腫の一例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会、学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野克比古、小橋 寛薫、笠原 駿、須河内 昭成、田中 晋、大倉 正也、古郷 幹彦
2. 発表標題 濾胞性リンパ腫と鑑別が必要であった上顎歯肉癌頸部リンパ節転移の1例
3. 学会等名 第74回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------