

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10351

研究課題名（和文）マクロファージ・ポラリゼーションに基づくARONJ新規スクリーニング法の開発

研究課題名（英文）Development of novel screening method for ARONJ based on macrophage polarization

研究代表者

杉山 円（Sugiyama, Madoka）

東京大学・医学部附属病院・客員研究員

研究者番号：90451814

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ビスホスホネート製剤やデノスマブなどの骨吸収抑制薬は、副作用として難治性の顎骨壊死を発生させるリスクがあり、近年の口腔外科領域における重要な課題の1つとなっている。骨吸収薬関連顎骨壊死（ARONJ）の発症は、顎骨が身体他の部位の骨と比べて感染しやすい環境にあることに起因するが、局所的、全身性の要素も関連し、その病態は未だ明らかになっていない。本研究では、ビスホスホネート製剤などを用いてARONJモデルマウスを作製し、単球マクロファージ系細胞に由来する破骨細胞を中心に経時的な病態解析を行った。その結果、ARONJには抜歯窩の血管新生障害および顎骨の骨髓抑制が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARONJは、2003年Marxにより初めて報告されたが、その発生機序や病態は未だ明確にはなっていない。ARONJ患者のバックグラウンドは骨粗鬆症から担がん状態まで様々で、骨吸収抑制剤の種類や服薬期間もばらつきがあり、発症や経過にも一律性は認めない。本研究では、ARONJモデルマウスを複数のプロトコルで作製し、抜歯窩の骨露出面積、および新生骨などの解析を行い、ARONJに特徴的な所見を得る事ができた。ARONJの病態には、骨髓の変化、および骨髓をつなぐ新生血管の障害があることが示唆された。本研究で得られた知見は、ARONJ新規治療法開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Antiresorptive agents such as bisphosphonates and denosumab have a risk of causing refractory osteonecrosis of the jaw, which is one of the most important issues of recent years in the field of oral surgery. The development of antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw (ARONJ) is partially attributed to the anatomical location of jaw bones which are more susceptible to infection than other bones in the body, while local and systemic factors could be also involved. As pathophysiology of ARONJ has yet to be clarified, in this study, we prepared mice ARONJ model using bisphosphonates, and evaluated its pathophysiological changes focusing on osteoclasts derived from monocyte-macrophage lineage. Our results suggested that ARONJ could be caused by impaired angiogenesis around extraction sockets and myelosuppression in jawbone.

研究分野：口腔外科

キーワード：ARONJ

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

ビスホスホネート(bisphosphonate:BP)製剤は骨転移を有するがんや骨粗鬆症の治療において、破骨細胞を抑制し骨吸収を抑制する目的で広く用いられている。また近年では、RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)に対するヒト型 IgG2 モノクローナル抗体製剤で、BP 製剤と同様に破骨細胞の骨吸収に抑制作用を有するデノスマブが、新たな骨病変治療薬として使用されるようになってきた。これらの骨吸収抑制薬は、副作用として難治性の顎骨壊死を発生させるリスクがあり、近年の口腔外科領域における重要な課題の1つとなっている。

ARONJ の発症は、顎骨が身体の他の部位の骨と比べて極めて感染しやすい環境にあることに起因するが、局所的なリスク因子として、抜歯など顎骨への侵襲的歯科治療、根尖性歯周炎などの炎症性疾患などが考えられている。その他、全身性の要素、併用薬、ライフスタイルなどの関与も報告されるが、その病態は未だ明らかになっていない。治療に関しては、洗浄や抗生剤の投与、腐骨除去などの保存的治療法や、顎骨切除といった外科的治療法が選択されるが、治療に対する反応性は患者により異なり、経過の予測や治療法の選択を困難にしている。また、診断や経過の把握には放射線画像による評価もなされるが、頻回に撮影することはできず、詳細な経過の把握には不向きである。

ARONJ のリスク因子としてあげられる抜歯などの外科的処置、根尖性歯周炎などの炎症性疾患には、自然免疫の前線を担う単球マクロファージ系細胞が機能する。また、骨吸収抑制薬が作用する破骨細胞自体も、単球マクロファージ系細胞に由来することから、ARONJ の病態は、多種の免疫細胞の中でも単球マクロファージ系細胞の機能に依存している可能性が考えられる。近年、マクロファージには多様性があり、TNF- α や IL-1 β など炎症性サイトカインを分泌する炎症促進性マクロファージ(M1)と、IL-10 など抗炎症性サイトカインの分泌を介して創傷の治癒に貢献するマクロファージ(M2)のサブクラスに大別されることが報告されている。更に、そのサブクラスの存在比率(マクロファージ・ポラリゼーション)が炎症のみならず、腫瘍や動脈硬化など様々な疾患の発症や経過に深く関与していることが明らかとなりつつある。

2. 研究の目的

ARONJ は、2003 年 Marx により初めて報告されたが、その発生機序や病態は未だ明確にはなっていない。ARONJ 患者のバックグラウンドは骨粗鬆症から担がん状態まで様々で、骨吸収抑制剤の種類や服薬期間もばらつきがあり、発症や経過にも一律性は認めない。本研究では、実験動物モデルや ARONJ 患者の病理組織切片などを用いて、単球マクロファージ系細胞の特性を評価し、病態の解明や新たなスクリーニング法確立の一助とすることを目的としている。

3. 研究の方法

・ 実験動物

動物実験は東京大学動物実験委員会の上承を得て行った(倫理承認番号:H19-198)。日本クレア(東京)より C57BL/6J マウス 6 週齢を購入して実験に使用した。実験群を無作為に振り分け、生理食塩水の皮下注射、ゾレドロン酸の皮下注射(Novartis International AG, Switzerland)、シクロフォスファミド(SHIONOGI & CO., LTD. 大阪)の腹腔内注射を行った。実験群は、抜歯群(Extraction)、BP 投与後抜歯群(Extraction+BP)、BP+CY 投与後抜歯群(Extraction+BP+CY)で比較した。

- ・ ARONJモデルマウス

BP(0.05mg/kg)およびCY(150mg/kg)を週 2 回、3 週間投与した後に、全身麻酔下にて抜歯を行った。全身麻酔には、塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノールの3種薬剤を使用した。抜歯においては実体顕微鏡を用いて周囲組織に損傷がないよう愛護的な操作を心掛けた。抜歯後は上顎骨の回収時点まで、BP(0.05mg/kg)週 2 回、CY のみ(150mg/kg)週 1 回に減量し、投与を行った。上顎骨は抜歯後 1,3,7,14 日後に回収した。

- ・ 解析

抜歯窩の肉眼的観察、マイクロCT(Computed Tomography)解析、組織学的評価を行った。

4. 研究成果

- ・ 抜歯後の経過

Extraction 群では抜歯直後に出血を認め、抜歯後 1 日で肉芽形成、抜歯後 3 および 7 日では上皮組織形成、14 日ではほぼ完全な歯槽骨の上皮被覆が認められた。各群、抜歯直後では大きな変化は認められなかったが、Extraction BP + CY 群では抜歯後 1 日で食物残渣が目立ち、抜歯後 3 日では明らかな歯槽骨の露出が認められた。その後、抜歯後 7 日より徐々に歯槽骨上に上皮化を認め、抜歯後 14 日ではほぼ完全な上皮化が認められた。歯槽骨露出面積は、抜歯後 3,7 日において Extraction + BP 群よりも Extraction + BP + CY 群で有意に大きかった。抜歯後 14 日では 3 群間で歯槽骨露出面積に有意差はなかった。

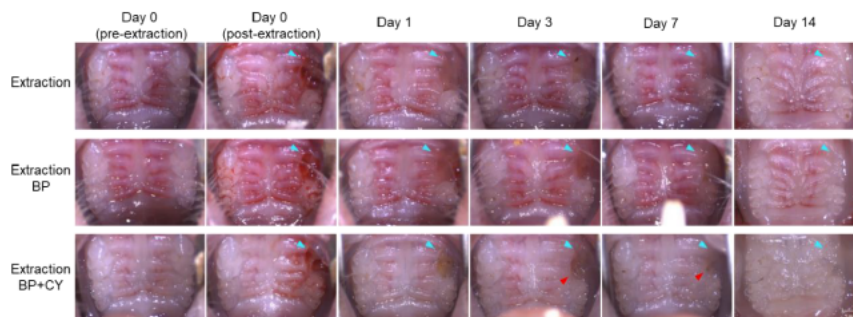


図 1 抜歯窩の肉眼的所見 青矢頭は抜歯窩を、赤矢頭は露出した歯槽骨を示す。

- ・ 抜歯窩の骨治癒の評価

マイクロCTの水平断、冠状断にてExtraction群、Extraction+ BP群では抜歯窩に新生骨を示唆する不透過像を認めた。Extraction + BP + CY群では抜歯窩に明らかな不透過像を認めなかった。Extraction群は抜歯窩周囲の歯槽骨に海綿状の骨髓腔を認めたが、Extraction + BP群およびExtraction + BP + CY群では認めなかった。

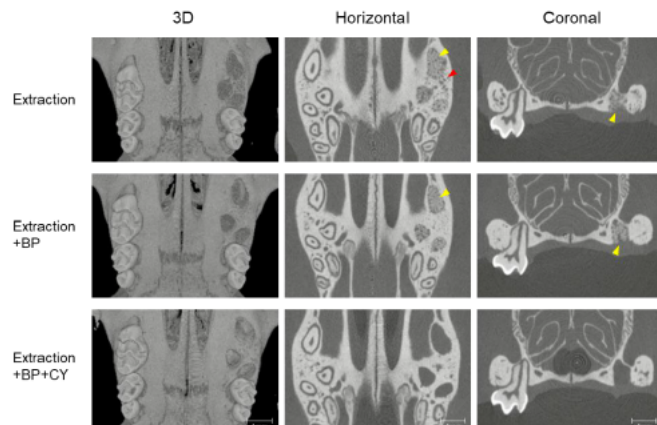


図 2 抜歯後 7 日のマイクロ CT 画像

・組織学的評価

HE染色においては、Extraction群およびExtraction + BP群では抜歯窩に新生骨様組織が確認され、元の抜歯窩と歯槽骨の境界は不明瞭であった。しかし、Extraction+ BP + CY群では抜歯窩と歯槽骨の境界は明瞭であり、歯根の形態がそのまま抜歯窩として認められ、新生骨様組織は認められなかった。

次いで、破骨細胞、骨芽細胞前駆細胞、抜歯窩の新生血管に対する薬物投与の影響を組織学的に評価した。TRAP染色ではExtraction + BP + CY群では他の群に比較してTRAP陽性細胞は少ない傾向にあった。Extraction + BP群および、Extraction + BP + CY群では、骨表面に接着せず剥離したTRAP陽性細胞が散見された。CD31免疫染色では、Extraction + BP + CY群は他の群と比較して陽性細胞が少なかった。血管新生に与える影響を定量的に評価するためにExtraction群とExtraction+ BP + CY群で抜歯窩の新生血管を測定したところ、Extraction+ BP + CY群で脈管構造数が有意に少なかった。抜歯後早期には骨髄と交通した血管新生が生じるが、BP + CY投与がこれを障害している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 安部 貴大, 藤原 タ子, 小関 珠理亜, 川上 大, 小松 紀子, 阿部 雅修, 小笠原 徹, 西條 英人, 星 和人	4. 巻 14
2. 論文標題 当院の骨修飾薬投与患者における医科歯科連携の現状と薬剤関連顎骨壊死発症に関するコホート調査	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔ケア学会雑誌	6. 最初と最後の頁 26-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hisao Igarashi, Satoru Nishizawa, Takeshi Miyamoto, Atsuhiko Hikita, Kazuto Hoshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Involvement of Impaired Angiogenesis and Myelosuppression in Antiresorptive-agent Related Osteonecrosis of the Jaw Mouse Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tokai J Exp Clin Med	6. 最初と最後の頁 22-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fujihara Y, Abe T, Abe M, Ogasawara T, Suenaga H, Saijo H, Mori Y, Hoshi K.
2. 発表標題 Long-term outcomes of tooth extractions in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva: a report of three cases.
3. 学会等名 The 1st Annual Meeting of the International Society of Oral Care and The 18th Annual Meeting of the Japanese Society of Oral Care Joint Congress (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究 分 担 者	安部 貴大 (Abe Takahiro) (20383250)	神奈川歯科大学・歯学部・教授 (32703)	

6. 研究組織（つづき）

	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	星 和人 (Hoshi Kazuto) (30344451)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	藤原 夕子 (Fujiihara Yuko) (50466744)	東京大学・医学部附属病院・客員研究員 (12601)	
研究分担者	石橋 牧子 (Ishibashi Makiko) (60802395)	東京大学・医学部附属病院・客員研究員 (12601)	

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