

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 2 月 28 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390485

研究課題名(和文) ビスフォスフォネートによる顎骨壊死誘発機序の解明と治療法の開発に関する研究

研究課題名(英文) Study for Clarification of Mechanism of Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw and Development of Its Treatment.

研究代表者 石井信之

(TANI-ISHII NOBUYUKI)

神奈川歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20163610

研究成果の概要(和文): Overiectomy(OVX)を行った ICR マウス に対し、BPs(Alendronate) を経口投与し、上顎第一臼歯咬合面を露髄させ経過観察した結果、歯槽骨のマイクロ CT 解析により、根尖性歯周炎の病巣部位においては、OVX+BPs 群は、OVX の群に比べ根尖相当部骨吸収面積の拡大が認められた。よって、顎骨は、骨代謝速度のバランスを考えると、BPs の骨への沈着が高いことから、特異的に病変が発症しうる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文):

Following ovariectomy (OVX) and oral administration of bisphosphonates (BPs: Alendronate), the upper first molars of female ICR mice were drilled to induce the pulpal exposure and subsequently observed. Consequently, CT analysis of apical lesion demonstrated that bone resorption in the periapical lesion increased in area in the group of OVX+BPs compared with the group of OVX. Thus, it is suggested that the occurrence of peculiar lesion in jaws is attributed to the difference of speed in bone metabolism in contrast with general bones and the high deposition of BPs onto bone matrix.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	11,100,000	3,330,000	14,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：Bisphosphonate、顎骨壊死、Alendronate

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート(BPs)は、1980年代に初めて発売され、ハイドロキシアパタイトへの親和性と破骨細胞の機能抑制により骨吸収を抑制することが明らかにされているだけでなく、長期の経口投与により持続的な骨

量増加の報告もあり骨形成促進作用が期待される薬剤である。その基本骨格は、石灰化阻害作用を有するピロリン酸に類似した構造である。ピロリン酸は、生体内で、リン酸カルシウムに強い親和性を有し、骨に

選択的に集積し石灰化阻害作用と同時に骨吸収抑制作用を有している。血清中にカルシウム、リン酸が飽和状態にあるにもかかわらず、石灰化が限られた骨組織などにしか起こらないのはピロリン酸の石灰化（異所性石灰化）阻害作用による。ピロリン酸を経口投与した場合、ピロリン酸水解酵素によって急速に加水分解されるため、ピロリン酸の2個のオルトリン酸が結合したP-O-P構造をP-C-P構造に変換することにより酵素分解を受けないビスフォスフォネート化合物が開発された(清水富永・高岡邦夫：ビスフォスフォネート，薬局 Vol.48 No.11, 49-54, 1997.)。ピロリン酸に類似した構造を持つBP_sは、骨に高い親和性を持ち、体内に取り込まれると海綿骨質化する皮質骨をコーティングすべく長期間骨表面に沈着する。貪食作用により破骨細胞に取り込まれたBP_sはアポトーシスを誘導し結果として骨吸収が抑制される。BP製剤は窒素非含有の第一世代と、窒素を含有するBP製剤である第二、三世代に分類される。

第三世代BP製剤のAlendronate, Risedronateは骨密度の増加、骨折発生抑制とともに現在最も強力な骨吸収抑制剤として臨床で使用されている。Alendronateは投与開始後3年で骨密度は約8%増加し、身体各部の骨折件数を半減させる(新骨の科学 Bone Biology. 東京：医歯薬出版株式会社，2007.)。Alendronate(フォサマック[®])は1990年代半ばに登場し、骨粗鬆症治療薬剤としてもっとも広く使用されている薬剤の一つである。窒素含有BP_sであるフォサマック[®]は長期間の投与により骨内に蓄積され、骨内半減期は10年以上である。本剤2-3年間の投与により、骨密度は、腰椎で7.5%(容量10-40mg)で、5.8%(容量5mg)増加し、大腿骨近位部では4.2%-5.6%(10-40mg) 3.4-4.6%(5

mg)増加すると報告されている(Cranney A, et al, Endocr Rev 23:508-516, 2002.)。

BP製剤は、悪性腫瘍による骨転移防止や高カルシウム血症、およびオステオポロシスによる骨折防止の目的で臨床応用されている。さらに、歯科領域においては歯石沈着防止や、歯周炎に伴う歯槽骨吸収抑制を試みる実験的研究が多くの研究者によって行われている。しかしながら、2002年に米国でMarxとSternによってBP_sと歯科治療による誘発性の顎骨壊死(ONJ)が初めて報告された後、発症患者は毎年増加傾向を示し大きな社会問題となっている。BP製剤関連顎骨壊死は、アメリカ口腔顎顔面外科学会(AAOMS)が提唱した定義では、顎骨への放射線治療歴がなく、BP_s製剤が現在投与されているか、または過去に投与された患者において、下顎あるいは上顎の骨露出が8週間以上持続した状態とされており、2010年、日本国内においても日本骨粗鬆症学会、日本骨代謝学会、日本歯周病学会、日本歯科放射線学会、日本口腔外科学会より構成されるビスフォスフォネート関連顎骨壊死検討委員会より、BRONJに関する正確な科学的情報を収集し、その予防策や対応策について統一見解を提言することを目的としたポジションペーパーが2010年に発表された(J Bone Miner Metab (2010) 28:365-383)。この発症の要因として考えられることに抜歯等の外科治療や歯周炎が挙げられ、BP製剤を投与されている患者に関しては、保存的治療が推奨されているが、その発症メカニズムには諸説あり、詳細は不明である。

上記の内容を踏まえ、現在我々が行っている、骨代謝の緩徐な加齢マウスに歯科疾患を誘導し、経口投与BP_sとONJ発症メカニズムの相関関係の検討についての研究を行うために、BRONJ実験モデルを作成し、その解析を

行うこととする。

2. 研究の目的

BRONJ は、先に示した通り、口腔内の骨露出を主症状とし、歯周炎等の歯科疾患と関連して発症すると考えられているが、その病態発症メカニズムの詳細は不明である。BRONJ の発症報告は、2002 年に初めて症例が報告されてから、現在に至るまで毎年増加傾向を示している。BP 製剤の中長期投与を受けている患者の多くに対し、抜歯、インプラント等の外科的歯科治療を行う場合、BRONJ 発症を誘発する多くの要因があるとされているが、そのメカニズムに未だ明確なものはない。今回我々は、一般的歯科疾患と BRONJ 発症メカニズムを解析することを目的として骨代謝の緩徐な加齢マウスに歯科疾患を誘導し、経口投与 BP s と BRONJ 発症メカニズムの相関関係を検討した。

3. 研究の方法

3、4 週齢 Wistar 系ラットに 4~8 週間経口投与にて通常量の BP 製剤を投与した実験群と、骨代謝性疾患である骨粗鬆症の誘導のため卵巣摘出手術 (Ovariectomy : OVX) 及び偽手術 (Sham) を行ったリタイア ICR 系マウス および Wistar 系ラット に対して、BP 製剤 (Alendronate : フォサマック錠) 2.5mg/kg を絶食下にて経口投与を行った実験群とを作成した。BRONJ 誘導法として上顎第一臼歯咬合面を注水下でターピンを用いて露髄させ、口腔常在菌による歯髄の感染誘導を行った根尖性歯周炎誘発群、および *P. gingivalis* を一定期間内に口腔内に播種することで実験的に辺縁性歯周炎を誘発した群の 2 実験群にさらに分類し、2 週間の経過観察の後、深麻酔下にて 4% paraformaldehyde で灌流固定後顎骨を採取、マイクロ CT 解析を行った後、EDTA にて脱灰し、パラフィン

切片を作製後、HE 染色を行い組織学的解析を行った。なお、未処置群、BP s 非投与群の組織をコントロールとして実験群と比較した。

4. 研究成果

根尖性歯周炎誘発群では、根尖周囲の歯槽骨には、骨吸収部位の破骨細胞は形態が不明瞭であった。根尖孔周囲には多形核白血球を中心とした細胞の集積が見られた。

辺縁性歯周炎誘発群では、歯根部セメント質の外部吸収、歯根膜線維の変性、歯肉上皮の肥厚及び上皮脚の伸長が認められ、その延長は歯肉溝底部に及んでいた。また、歯槽骨頂部は炎症性細胞の集積、及び吸収が認められた。両群共に、歯槽骨内の血管と骨小腔が減少し、骨小腔内に存在する骨細胞が萎縮および欠損が認められた。

マイクロ CT による解析でコントロール群には骨粗鬆症と考えられる骨梁構造の不連続性等の変化が認められたが、BP s 投与群では改善が見られた。また、根尖性歯周炎の病巣部位においては、sham 群、実験群ともに根尖相当部骨吸収面積の拡大が認められたが、実験群においては、骨表面の粗造化が疑われ、これは、歯槽骨に特異的に集積している BP 製剤の作用によるものではないかと考えられる。

さらに、下顎骨骨芽細胞が、頭蓋冠及び下肢骨由来の骨芽細胞と比較して、力学的刺激に対し特異的な応答があるかを検討した結果、下顎骨骨芽細胞に特異的に 5-α-β-インテグリン依存性かつ抑制的に骨の恒常性を保つ機能を獲得した可能性を示唆していた (Experimental Cell Reserch 317(2011)2642-2649.)

骨粗鬆症の発症は、骨吸収速度が上昇することを意味し、その速度をコントロールすることは病態の改善につながる。しかし全身の

あらゆる骨代謝速度は部位により異なっていることや常在菌の存在等によって壊死を誘発しやすい部位が存在すると考えられる。本研究の結果より、骨粗鬆症に対する経口BPs製剤の投与により根尖性および辺縁性歯周炎を発症した歯槽骨には、破骨細胞の変性が誘導されることによる骨代謝停止および、骨髓内の血液循環障害による各種炎症性細胞の循環の遅延による創傷治癒遅延が誘導されていることが示唆された。

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1件)

Watabe H., Furuhashi T., Tani-Ishii N., Mikuni-Takagaki Y.: Mechanotransduction activates 5β1 integrin and PI3K/Akt signaling pathways in mandibular osteoblasts. *Experimental Cell Research*, 317:2642-2649, 2011. (査読有)

[学会発表](計25件)

- 1) 渡部弘隆, 武藤徳子, 千枝桂子, 石井信之: ビスフォスフォネート製剤による顎骨壊死誘導機序解明に関する研究. 日本歯科保存学会. 新潟市. 2008.6.5.
- 2) 渡部弘隆, 武藤徳子, 千枝桂子, 石井信之: ビスフォスフォネートによる顎骨壊死発症メカニズムに関する研究 インカドロンによる ONJ 誘導実験モデルの作製. 日本歯科基礎医学会, 東京江東区有明. 2008.9.25.
- 3) 三壁信洋, 武藤徳子, 渡部弘隆, 佐藤武則, 千枝桂子, 石井信之: ビスフォスフォネート製剤による顎骨壊死誘導機序解明に関する研究 アレンドロネートによる ONJ 誘導実験モデルの開発. 日本歯科基礎医学会, 東京江東区有明. 2008.9.25.
- 4) 三壁信洋, 渡部弘隆, 佐藤武則, 千枝桂子, 武藤徳子, 石井信之: アレンドロネートによる顎骨壊死誘導機序の解明に関する研究. 日本歯科保存学会, 富山市. 2008.11.7.
- 5) 渡部弘隆, 武藤徳子, 千枝桂子, 石井信之: ビスフォスフォネート製剤による顎骨壊死誘導機序解明に関する研究 Incadronate による ONJ 誘導実験モデルの開発. 神奈川歯科大学学会, 横須賀市. 2008.12.6
- 6) 三壁信洋, 武藤徳子, 渡部弘隆, 佐藤武則, 千枝桂子, 石井信之: ビスフォスフォネート製剤による顎骨壊死発症メカニズムに関する研究 Alendronate による ONJ 誘導実験モデルの開発. 神奈川歯科大学学会, 横須賀市, 2008.12.6.
- 7) 渡部弘隆, 武藤徳子, 高垣裕子, 石井信之: ビスフォスフォネート製剤投与ラットにおける顎骨壊死誘導モデルの作成 ラマン分光分析による下顎骨解析. 第130回日本歯科保存学春季学術大会, 札幌市, 2009.6.11.
- 8) 武藤徳子, 千枝桂子, 三壁信洋, 渡部弘隆, 佐藤武則, 石井信之, 川股亮太, 鹿島勇: BPs 誘導顎骨壊死ラットモデルの顎骨形態解析に関する研究. 第130回日本歯科保存学春季学術大会, 札幌市, 2009.6.11.
- 9) 三壁信洋, 武藤徳子, 渡部弘隆, 石井信之: Bisphosphonate 誘導顎骨壊死ラットモデルの病理組織学的検索. 第51回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 新潟, 2009.9.10.
- 10) 渡部弘隆, 武藤徳子, 高垣裕子, 石井信之: Bisphosphonate により誘導される顎骨壊死(BRONJ)のモデルラット作製とラマン分光分析による骨質解析. 第51回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 新潟, 2009.9.10.

- 11) 渡部弘隆, 武藤徳子, 香西雄介, 川股亮太, 高垣裕子, 鹿島勇, 石井信之: Bisphosphonate により誘導される顎骨壊死(BRONJ)のモデルラット作製とラマン分光分析による骨質解析. 神奈川歯科大学学会 第 44 回総会, 横須賀, 2009.12.9.
- 12) 渡部弘隆, 古濱貴美, 石井信之, 高垣裕子: マウス下顎骨骨芽細胞の力学的刺激応答特性. 第 13 回超音波骨折治療研究会, 東京, 2009. 1. 23
- 13) Noriko Mutoh, Nobuyuki Tani-Ishii: Murine Experimental Model on Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw by Alendronate . 第 8 回日韓合同歯内療法学会 釜山, 韓国, March 27-28, 2010
- 14) 武藤徳子, 佐藤武則, 渡部弘隆, 石井信之: アレンドロネートによる顎骨壊死モデルの形態学的解析. 日本歯科保存学会春季学術大会(第 132 回, 崇城大学市民ホール), 熊本, 2010.6.4-5.
- 15) 武藤徳子, 佐藤武則, 渡部弘隆, 鹿島勇, 石井信之: ビスフォスフォネート誘導顎骨壊死発症メカニズムに関する研究. 神奈川歯科大学学会 第 132 回例会, 大阪, 2010.6.19
- 16) Mutoh N, Tani-Ishii N: Relationship between oral administration of bisphosphonate and osteonecrosis in jaws IADR general session, Barcelona, Spain, July 14-17.2010
- 17) 武藤徳子, 渡部弘隆, 佐藤武則, 川股亮太, 鹿島勇, 石井信之: 骨粗鬆症モデルマウスを用いた BRONJ 発症メカニズムの解析 第 28 回日本骨代謝学会, 東京, 2010.7.21-23
- 18) 古濱貴美, 渡部弘隆, 石井信之, 高垣裕子: C57B6J マウス下顎骨骨芽細胞における力学的刺激応答の特異性. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2010.7.23
- 19) 武藤徳子, 佐藤武則, 渡部弘隆, 石井信之: 加齢マウスに対するアレンドロネート誘導性顎骨壊死発症メカニズムの解析. 第 31 回日本歯内療法学会学術大会 東商ホール, 2010.7.25.
- 20) 渡部弘隆, 古濱貴美, 石井信之, 高垣裕子: 下顎骨骨芽細胞による骨代謝の力学的刺激依存性. 第 52 回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 東京, 2010.9.22
- 21) Mutoh N, Tani-Ishii N: Relationship between oral administration of bisphosphonate and osteonecrosis in jaws 8th World Endodontic Congress, International Federation of Endodontic Association October 6-9, 2010, Athens, Greece.
- 22) 渡部弘隆, 武藤徳子, 佐藤武則, 石井信之, 高垣裕子: ビスフォスフォネート製剤投与ラットにおける顎骨壊死誘導モデルの作成 歯周炎誘発モデルにおける下顎骨の形態変化 . 第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 岐阜, 2010.10.28.
- 23) 武藤徳子, 佐藤武則, 渡部弘隆, 鹿島勇, 石井信之: 骨粗鬆症誘導マウスを用いた BRONJ 発症メカニズムの解析. 神奈川歯科大学学会 第 45 回総会, 横須賀, 2010.12.4
- 24) 渡部弘隆, 古濱貴美, 船山祐太, 高垣裕子, 石井信之, : 力学的深応答に対するマウス下顎骨骨芽細胞応答の特異性. 神奈川歯科大学学会 第 45 回総会, 横須賀, 2010.12.4
- 25) 渡部弘隆, 古濱貴美, 船山祐太, 石井信之, 高垣裕子: マウス下顎骨骨芽細胞に

おける LIPUS 刺激依存性の骨代謝 . 第 14
回超音波骨折治療研究会 , 東京 ,
2011.1.22.

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 武藤徳子 : 加齢マウスに対するアレドロ
ネート誘導性顎骨壊死発症メカニズムの
解析.別冊 Quintessence, ENDO で臨床
を大きく変えよう! ,144-149, 2011

6 . 研究組織

- (1)研究代表者 石井信之
(TANI-ISHII NOBUYUKI)
神奈川県立歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 2 0 1 6 3 6 1 0
- (2)研究分担者 高垣裕子
(TAKAGAKI YUKO)
神奈川県立歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 6 0 0 5 0 6 8 9
- (3)研究分担者 櫻井孝
(SAKURAI TAKASHI)
神奈川県立歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号 : 6 0 2 7 7 9 1 0