

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18734

研究課題名（和文）ビスフォスフォネート関連顎骨壊死を予防する塩基性線維芽細胞増殖因子の作用機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect of basic fibroblast growth factor to prevent bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws

研究代表者

今田 光彦（Imada, Mitsuhiro）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：10834054

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：歯周組織再生医薬品として販売されているbFGF製剤と同様の基材であるヒドロキシプロピルセルロースを用いてビスフォスフォネート関連顎骨壊死(BRONJ)発症モデルに適応したところ、有意な発症の抑制を認めた。発症モデルに人工骨(-TCP)を填入しその効果を検証した。抜歯後に遊離したビスフォスフォネートは -TCPに吸着することが確認できた。in vivoにて検証した結果、 -TCPを填入した群で有意に発症を抑制した。そのメカニズムについて、BRONJの発症は抜歯窩局所のオートファジー機構が関与す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

骨粗鬆症などの骨脆弱性疾患に対する治療薬として広く使用されているビスフォスフォネート製剤の使用により、慢性的に顎骨の露出を来すBRONJを発症する可能性がある。自然発症することもあるが、抜歯などの観血的処置で発症することが多く、様々な予防法が提唱されているが現在効果的な方法は確立していない。本研究では歯科臨床でそれほど入手が難しくない製剤・材料を用い、大きな侵襲を与えることなくBRONJの発症予防効果を確認することが出来た。発症メカニズムに関してもオートファジー機構が関与している可能性を見出すことが出来た。本研究でBRONJの予防法や治療法の確立へ大きく前進したものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：When hydroxypropyl cellulose, a base material similar to bFGF preparations in periodontal tissue regenerative medicine, was applied in the bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) model, significant onset suppression was observed. Artificial bone (-TCP) was implanted into the disease model to examine its effect. The results confirmed that the bisphosphonate released after tooth extraction was adsorbed onto the -TCP. In vivo verification demonstrated that the disease onset was significantly suppressed in the group that received -TCP. Regarding the related mechanism, BRONJ onset might involve an autophagic process occurring in the tooth extraction socket.

研究分野：口腔外科

キーワード：ビスフォスフォネート製剤 BRONJ bFGF -TCP オートファジー

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート(BP)製剤は骨に蓄積し、骨ハイドロキシアパタイトと強固に結合することで、破骨細胞に選択的に取り込まれ、アポトーシスを誘導することにより強い骨吸収抑制効果を発揮する。そのため同製剤は、骨粗鬆症、骨関連事象、多発性骨髄腫、骨のパジェット病などといった、骨の脆弱性を来す疾患の治療に対し頻繁に使用されている。特に約 1300 万人もの患者がいるとされる骨粗鬆症の第一選択薬は BP 製剤であり、さらに高齢化が進むわが国においては今後もその使用頻度が増えることが予想される。その反面、BP 製剤の投与により発症するビスフォスフォネート関連顎骨壊死(BRONJ)が大きな問題となっている。2016 年に発行されたポジションペーパーでは、BRONJ は臨床症状及び画像所見で 4 つのステージに分類されており、治療法としては抗菌薬投与、抗菌性洗口剤の使用、疼痛コントロールといった対症療法、その他外科療法のみである。さらに BRONJ は発症すると極めて難治性で増悪しやすい。追跡調査期間の中央値が 1.5 年の、O'Ryan らが行ったコホート研究では、症状に合わせた加療を行っても、改善 25%、不変 48%、増悪 27%であったと報告されている(O'Ryan FS et al., 2009)。BRONJ は重症化すると、病的骨折、鼻・上顎洞口腔瘻孔、口腔外瘻孔などを来し、QOL の著しい低下を招く。また感染の拡大により、敗血症を来し致死的な転機を辿る症例も報告されている(Yamashiro K et al., 2016)。現状では BRONJ に対する標準治療は確立されておらず、BRONJ の発症を未然に防ぐことが重要となる。

2. 研究の目的

これまでの研究(Imada M et al., 2019)で申請者らはゼラチンハイドロゲルに含浸させた bFGF を BRONJ 発症モデルの抜歯窩に作用させて発症予防が出来ることを明らかにした。bFGF は上皮細胞の増殖作用の他に、骨芽細胞の増殖、破骨細胞の分化・遊走、免疫機能、そして血管新生を促進することなどが知られている。これらの作用により、BRONJ を発症させると考えられている BP 製剤の有害作用を相殺することで、BRONJ 発症を抑制出来ることが考えられた。過去の研究では上皮細胞の増殖作用に注目したが、十分に証明するには至らなかった。またその他の作用についても BRONJ 発症抑制に寄与したかどうかは不明瞭のままである。特に BP 製剤による顎骨に対する骨代謝や血管新生の抑制が BRONJ 発症に関与するとの文献は多数存在しており、bFGF がこれらの活性化に関与した可能性は高いものと考えられる。そこで申請者は、bFGF の上皮細胞の増殖作用、骨代謝の活性化、血管増殖作用が BRONJ 発症を抑制した要因と考えた。本研究では、BRONJ 発症を予防するに至ったと考えられる上記の bFGF の作用について解明することを目的とした。

また研究計画当初、ゼラチンハイドロゲルは臨床研究段階であり、すでに歯科口腔外科領域で使用されている製剤を用いた BRONJ の発症予防法について検討した。そこで歯周組織の再生を目的とし販売されている bFGF 製剤と同じ基材であるヒドロキシプロピルセルロース(HPC)を用いて BRONJ 発症モデルラットに適応しその効果を検証することを考えた。また BP の吸着能のある -TCP(Bigi A et al., 2018)を用い、同じく BRONJ 発症モデルラットに適応しその効果を検証することを考えた。

3. 研究の方法

【1. BRONJ 発症を予防する bFGF の作用機序の解明】

in vitro、in vivo にて bFGF による BORNJ 発症予防効果について検証する。

in vitro では単離した歯肉ケラチノサイトを培地に播種し、細胞数を測定した後、ゾレドロン酸(ZA)を加えた培地に bFGF を添加し、細胞減少の抑制となるか確認する。

次に in vivo で実験を行う。先行研究に則り、BRONJ 発症モデルラットの抜歯窩に bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを填入し 5-0 ナイロン糸で縫合し閉鎖創とする。対照群では何も填入せず同様に閉鎖創とする。その後、抜歯 4、8、12 週後に屠殺し下顎を摘出する。ラベリングし、microCT や組織学的評価により bFGF の有無で骨代謝状況を比較する。また血管造影を行い、bFGF による血管増殖作用を比較する。

【2. 基材を HPC に変更し BRONJ 発症モデルに作用させた研究】

先行研究と同様に BRONJ 発症モデルラットを使用する。実験群では抜歯窩に 3%HPC+0.3%bFGF を 12 μ L 投与し、対照群では抜歯窩に 3%HPC のみを投与する。評価法として 肉眼的評価、X 線学的評価、病理組織学的/免疫組織学評価を行い比較した。では抜歯後 2、4、6、8 週の粘膜治癒状況について、score0(抜歯窩が正常粘膜で被覆)、score1(骨露出はないが肉芽組織で被覆)、score2(骨露出を認める)と scoring し評価した。では microCT を用い抜歯後 8 週で撮影し、左側下顎第 2 臼歯近心面より 1mm 近心部分の coronal 像で評価を行った。その画像で score0(新生骨の形成を認め遊離骨は認めない)、score1(新生骨形成と遊離骨の両方を認める)、score2(新生骨形成は存在せず、遊離骨のみ認める)と scoring した。について、抜歯後 8 週の検体で評価した。HE 染色で粘膜上皮の欠落および壊死骨の有無について、また抜

歯窩 6 mm² (2×3mm)における新生骨面積の測定を行った。さらに上皮下固有層 500×300 μm における CD31 陽性細胞数を測定した。

【3. BRONJ 発症モデルの抜歯窩に -TCP を填入した研究】

[1] -TCP 填入による BP の体内動態の検証を行った。抜歯 3 週、2 週前に 1 回 1.2mg/kg のゾレドロン酸(ZA)を投与。抜歯後 1 週で屠殺し、-TCP と周囲肉芽組織を摘出し LC-MS/MS 分析で ZA 濃度を検証した。なお、対照群では -TCP は填入せず、同様の手順で肉芽組織のみ摘出し分析を行った。

[2] 先行研究と同様に -TCP を抜歯窩に填入し、対照群と比較した -TCP の BRONJ 予防効果を検討した。抜歯後 1 週、4 週、8 週で肉眼的評価を実施し、抜歯後 8 週で X 線画像および病理組織学的評価を実施した。では、【2】と同様の scoring で評価した。も【2】と同じ方法で評価した。さらに、新生骨を定量的に評価するために、抜歯後 8 週の検体において、下顎第二大臼歯の近心面から 1.0mm と 1.5mm 近心の間の冠状断面の領域における関心体積 (VOI) 0.125mm³ 内の新生骨の体積を計算し比較した。では上皮の治癒不全と新生骨の形成について比較した。

[3][1] に行った研究の両群肉芽組織からプロテオーム解析を行い、関連タンパク質を検索し、BRONJ 発症に関与する分子機構の検索を行った。

4. 研究成果

【1. BRONJ 発症を予防する bFGF の作用機序の解明】

まず自ら単離したケラチノサイトで予備実験を行い、その後購入したケラチノサイトで本実験を行うこととした。ZA 混和群と非混和群に分け、自ら単離したケラチノサイトの培養を行った。週に 2 回培地交換を行い、2 週間培養し細胞数を計測。約 0.14mM で調整した ZA 混和群で細胞増殖の低下を認めた。次に購入したケラチノサイトで実験を行う予定としたが、COVID-19 の蔓延により入手に時間がかかり、代替研究で以下の研究を中心に行うこととした。

【2. 基材を HPC に変更し BRONJ 発症モデルに作用させた研究】

肉眼的評価

結果を図 1 に示す。抜歯後 2 週において、実験群では 12 例とも骨露出は認めず肉芽組織で満たされていた。一方、対照群では 12 例とも骨露出を認めた。その後時間の経過とともに実験群では score0 の検体が増加し、抜歯後 8 週の実験群では 12 例中 9 例で抜歯窩が正常粘膜で被覆していた。一方、対照群では 12 例とも骨露出を認めた。

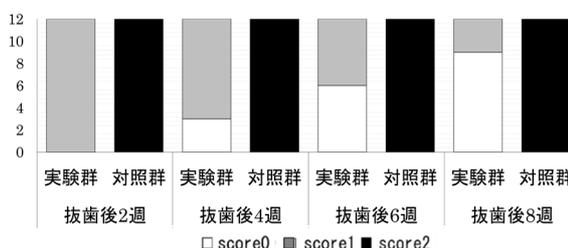


図 1 研究【2】における肉眼的評価

X 線学的評価

結果を表 1 に示す。実験群では約 9 割に抜歯窩の骨増生を認めたが、対照群では骨増生はほぼ認めず、そのほとんどに腐骨と思われる遊離骨片を認めた。

表 1 研究【2】における X 線学的評価

	実験群 (n=12)	対照群 (n=12)
Score0	8 (66.7%)	1 (8.3%)
Score1	3 (25%)	2 (16.7%)
Score2	1 (8.3%)	9 (75%)

病理組織学的/免疫組織学評価

結果を表 2 に示す。実験群では 12 例中 11 例で抜歯窩が完全に上皮化していた。また 4 例に腐骨を認めた。対照群では 12 例全てに粘膜上皮の欠落を認めた。また 12 例全てに壊死骨を認めた。

表 2 研究【2】における組織学的評価

	実験群 (n=12)	対照群 (n=12)
粘膜上皮の欠落あり	1 (8.3%)	12 (100%)
腐骨あり	4 (33.3%)	12 (100%)

また新生骨面積、CD31 陽性細胞数の評価について図 2 に示す。新生骨面積について実験群は対照群と比べて有意に新生骨を認めた (P<0.001)。CD31 陽性細胞数について実験群では対照群と比べて有意に陽性細胞数の増加を認めた。

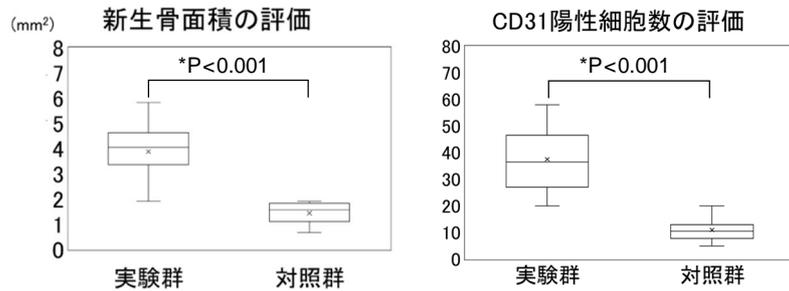


図2 新生骨面積、CD31 陽性細胞数の比較

まとめ：

以上から実験群では対照群と比べて BRONJ の発生率を低減できたと考える。CD31 は血管新生時に血管内皮細胞間の相互作用における重要な役割を担っている。抜歯窩に bFGF を投与することで血管新生が促進され、BP 製剤による血管新生阻害作用を相殺することで創傷治癒に至ったと考えられた。また粘膜の創傷治癒に伴い実験群では骨新生が促進されたと考えられた。基材を HPC としても BRONJ の予防に有用である可能性があると考えた。

【3. BRONJ 発症モデルの抜歯窩に β -TCP を填入した研究】

[1] β -TCP 填入による BP の体内動態の検証

図3に抜歯窩に填入した β -TCP の ZA 定量測定の結果を示す。 β -TCP(+)群では、残留 β -TCP 中に 1.36 $\mu\text{g/g}$ の濃度で ZA が検出され(グラフの ●)、また β -TCP(+)群の抜歯窩内の肉芽組織中に 0.61 $\mu\text{g/g}$ の濃度で ZA が検出された(グラフの ○)。さらに、 β -TCP(-)群の抜歯窩内の肉芽組織では 0.79 $\mu\text{g/g}$ の ZA が検出された(グラフの △)。図4に抜歯窩肉芽組織の ZA 測定量の比較を示す。 β -TCP(+)群の肉芽組織から検出された BP は β -TCP(-)群の 1/2 以下であった。以上から抜歯により BP は歯槽骨から遊離し、抜歯窩内の肉芽組織に分布するが、 β -TCP 填入により β -TCP と結合することでその量は減少したと考えた。

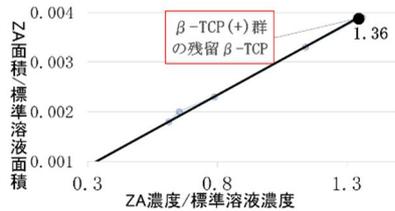


図3 抜歯窩に填入した β -TCP の ZA 定量測定

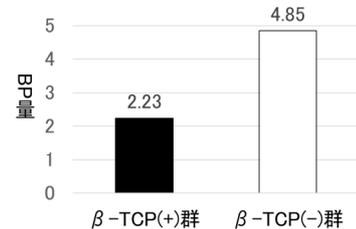


図4 抜歯窩肉芽組織の ZA 測定量の比較

[2] 対照群と比較した β -TCP の BRONJ 予防効果の検証
肉眼的評価

結果を図5に示す。抜歯後1週では群間で有意差はなかった。しかし抜歯後4週では、 β -TCP(+)群の全例で正常な粘膜被覆を示したのに対し、 β -TCP(-)群では8例中7例(87.5%)で骨露出が見られた。抜歯後8週でも β -TCP(+)群では全例で粘膜被覆を認め、抜歯窩の陥凹は浅くなっていた。一方 β -TCP(-)群では同数の8例中7例(87.5%)で範囲の拡大した変色骨の露出を認め、さらに2例で排膿を認めた。

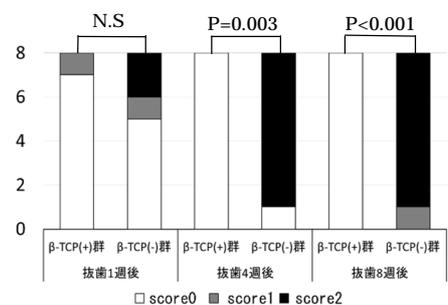


図5 研究【3】における肉眼的評価

X 線学的評価

Scoring 評価の結果について表3に示す。 β -TCP(+)群は β -TCP(-)群よりもスコアが有意に低く (P=0.001)、骨治癒が改善したことを示している。また VOI における新生骨体積の比較について、 β -TCP(+)群で有意に骨形成を認めた(図6)。

表 3 研究【3】における X 線学的評価

score	-TCP(+) 群 (n=8)	-TCP(-) 群 (n=8)	P 値
0	6(75%)	0(0%)	0.001
1	2(25%)	1(12.5%)	
2	0(0%)	7(87.5%)	

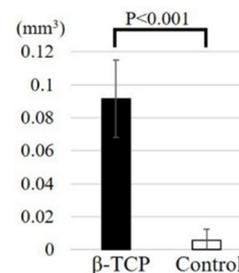


図 6 VOI 内に形成された骨体積の比較

病理組織学的評価

結果を表 4 に示す。-TCP(+)
群では 8 例全例で (100%) 上皮被覆と新生骨形成が観察された。しかし、対照群では上皮被覆が認められたのは 1 例 (12.5%) のみで、8 例中 7 例 (87.5%) は上皮被覆が認めなかった。さらに、対照群では全例 (100%) で新生骨形成が認められず、壊死骨のみ存在した。上皮の治癒不全、新生骨形成ともに両群間で有意差を認めた。

表 4 研究【3】における病理組織学的評価

	β-TCP(+) 群	β-TCP(-) 群	P 値
上皮の治癒不全	0/8 (0%)	6/8 (75%)	0.002
新生骨形成	8/8 (100%)	0/8 (0%)	< 0.001

[3] プロテオーム解析の結果、非特異的な上皮/筋組織関連を除外したオートファジー機構に関連する Atg9a、ULK3 を同定した。そこでオートファジーに関連する Atg9a、LC-3、Rubicon の他、創傷治癒のマーカーとなる CD68、 α -SMA の免疫組織化学染色を行い、発現状況を比較した。Atg9a および LC-3 は上皮細胞では発現されず、上皮下領域の単核炎症細胞 (MIC) では -TCP(+)
群で有意な発現の増強が観察された。Rubicon は、上皮細胞において -TCP(+)
群で発現抑制を認めたが、MIC では両群に有意差はなかった。CD68、 α -SMA では MIC に発現があったものの両群で有意差はなかった。遊離 BP が減少している -TCP(+)
群でオートファジーに必須の因子が発現増強、遊離 BP が増加している -TCP(-)
群でオートファジー抑制因子が発現増強していることから、歯槽骨から遊離した BP は、抜歯窩局所のオートファジー活性を抑制する可能性が示された。

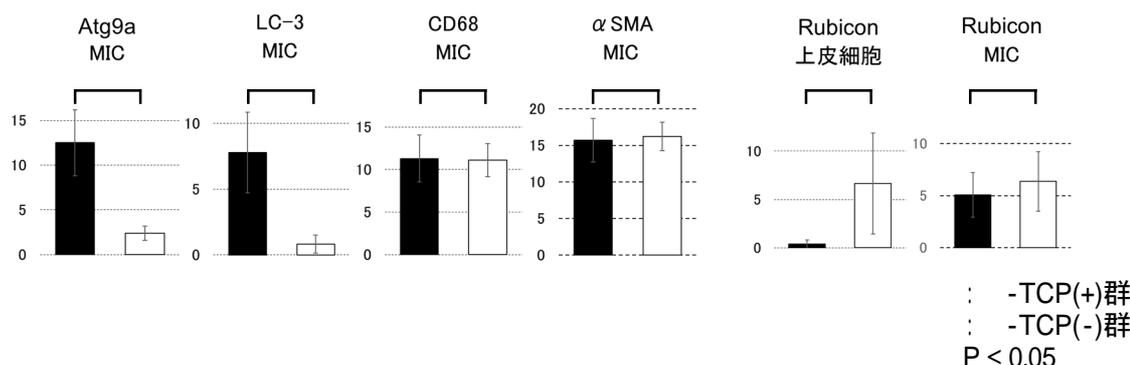


図 6 免疫組織化学染色における各マーカーの比較

まとめ：BP 投与患者に対して、抜歯と同時に抜歯窩に -TCP を填入する方法は、BRONJ 予防法となり得ることが示された。更に、BRONJ の発症には Rubicon を介したオートファジー抑制機構の関与が示唆され、Rubicon は BRONJ 治療/予防薬の標的タンパクとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naoki Funayama, Takahiro Yagyu, Mitsuhiko Imada, Yoshihiro Ueyama, Yosuke Nakagawa, Tadaaki Kirita	4. 巻 13
2. 論文標題 Impact of beta-tricalcium phosphate on preventing tooth extraction-triggered bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-43315-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒川聡司、柳生貴裕、舟山直希、今田光彦、上山善弘、今井裕一郎、桐田忠昭
2. 発表標題 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)による抜歯後に発症するビスフォスフォネート関連顎骨壊死(BRONJ)の予防法についての実験的検討
3. 学会等名 第76回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舟山直希、柳生貴裕、今田光彦、上山善弘、仲川洋介、桐田忠昭
2. 発表標題 -TCPのBP吸着作用と局所のBP濃度の変化によるオートファジー機構の変動に着目した新規BRONJ予防法の検証
3. 学会等名 第47回口腔外科学会中部支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舟山直希、柳生貴裕、今田光彦、上山善弘、仲川洋介、桐田忠昭
2. 発表標題 オートファジーによる組織修復機構に着目した -TCP応用による新規BRONJ予防法の検証
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 舟山直希、柳生貴裕、今田光彦、上山善弘、仲川洋介、桐田忠昭
2. 発表標題 -TCPのBP吸着作用と局所のBP濃度の変化によるオートファジー機構の変動に着目した新規BRONJ予防法の検証
3. 学会等名 第53回 日本口腔外科学会 近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒川聡司、柳生貴裕、舟山直希、今田光彦、上山善弘、桐田忠昭
2. 発表標題 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を用いた抜歯を契機に発症するBRONJの予防法の検討
3. 学会等名 第33回NPO法人日本口腔科学会近畿地方部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 舟山直希、柳生貴裕、今田光彦、上山善弘、仲川洋介、桐田忠昭
2. 発表標題 リン酸カルシウムによる新たなBRONJ予防法の実験的検討
3. 学会等名 第75回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 舟山直希、柳生貴裕、今田光彦、上山善弘、仲川洋介、桐田忠昭
2. 発表標題 オスフェリオンのビスフォスフォネート吸着作用を利用した新規BRONJ予防法の開発
3. 学会等名 第66回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------