

平成 23 年 5 月 19 日現在

機関番号：32710
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21792101
 研究課題名（和文）窒素含有ビスフォスフォネートによる“顎骨壊死”の機序解明と治療・予防を目指して
 研究課題名（英文）Mechanism, prevention, and treatment of the nitrogen-containing bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw.
 研究代表者
 船山 ひろみ（FUNAYAMA HIROMI）
 鶴見大学・歯学部・助教
 研究者番号：00359530

研究成果の概要（和文）：

骨吸収抑制薬 bisphosphonate (BP)による顎骨壊死のリスクは、窒素含有 BPs(NBPs) が窒素非含有 BPs (non-NBP)よりも遥かに高い。マウス耳介への NBPs 投与による局所反応を解析したところ、NBPs 自体の炎症・壊死作用には IL-1 β と IL-18 が関与し、non-NBP では炎症性サイトカインの産生は認められない。この NBPs によるサイトカイン産生を LPS は増強し、non-NBP は抑制する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

Nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs) are powerful anti-bone-resorptive drugs, but they induce unexpected new side effect, osteonecrosis of the jaw (ONJ). Few ONJ cases have been reported in patients treated with non-NBPs. A single subcutaneous injection of an NBP into the ear pinna induced tissue IL-1 β and IL-18 at the injection site, while non-NBP lacked this effect. LPS augments the NBP-induced inflammatory cytokines, co-administration of non-NBP with NBP abolishes these augmentations.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：ビスフォスフォネート

1. 研究開始当初の背景

骨吸収抑制薬 bisphosphonate (BP)の強い骨吸収抑制作用は、骨転移性腫瘍や骨粗鬆症などの骨吸収亢進を伴う疾患に広く応用さ

れ、現在世界中で約2億人の患者に投与されている。しかし、顎骨壊死とそれによる顎骨の露出という予期せぬ副作用が最近続発し、この数年で数千人の発症が確認されるに至

っている。発症患者の大部分は骨転移性腫瘍患者 (BP の点滴投与) であるが、骨粗鬆症 (錠剤服用) の患者でも発症している。発生機序不明だが、口腔細菌、抜歯、ステロイドなどの関与が予想されている。BP は骨ハイドロキシアパタイトに強く結合し、反復投与により“骨に非可逆的に蓄積”するため、現状のまま投与が続けられれば、さらに数十万人、数十万人の発症が起こる可能性を否定できない。

(1) NBP と non-NBP:

顎骨壊死は、窒素を含む BP (以後 NBP と略) により発症し、骨吸収抑制作用が最強の zoledronate (Zol) による発症頻度が最も高い。しかし、pamidronate (Pam), alendronate (Ale), risedronate (Ris) など他の NBP でも発症が確認されている。一方、窒素を含まない BP (以後 non-NBP と略) の clodronate (Clo) と etidronate (Eti) では発症例は無い。

(2) NBP の炎症作用と細菌成分による増強:

研究代表者らは顎骨壊死が問題となる以前から NBP の炎症性副作用について研究してきた。NBP はマウスに炎症を含む様々な反応 (ヒスタミン合成酵素の誘導、胸水貯留、脾臓肥大、腹腔細胞増加、血糖低下など) を誘導する (Endo *et al.*, *Calcif Tissue Int* 1993 等)。顎骨壊死を誘導・促進する要因として口腔細菌が予想されているが、研究代表者らは LPS (グラム陰性菌細菌の細胞壁成分) の炎症作用を解析する過程で、LPS と NBP は炎症を互いに増強し合い、この増強反応は顎骨でも認められる事を見いだした。

(3) Non-NBP による NBP の炎症作用の抑制:

Non-NBP (Clo と Eti) に起炎性はなくむしろ抗炎症性ですらある (Nakamura M *et al.*, *Brit J Pharmacol* 1996)。更に、non-NBP は NBP による種々の炎症反応を顕著に抑制する。特に Clo の抑制作用は強力である。

(4) BP-band:

成長期のマウスに BP を腹腔注射して 1~3 週後、脛骨を摘出して X 線写真を撮影すると、X 線低透過部が一本の線 (帯) として検出されることを見だし、これを BP-band と呼称している。BP-band の強度は、投与したそれぞれの BP の用量に依存し、BP の活性順位は骨吸収抑制作用の順位と一致する。

(5) NBP の骨吸収抑制作用に対する non-NBP の効果:

Clo と Ale の併用については、炎症反応の場合とは異なり、Ale の骨吸収抑制作用は Clo により全く損なわれないが、Eti と Ale との併用では、NBP の強い骨吸収抑制作用も顕著に抑制する。

(6) NBP の炎症作用の機序:

ヒト細胞 *in vitro* の研究から、NBP は、

コレステロール合成経路にある FPP synthase の抑制により蓄積する中間体の IPP を介して、 $V\gamma 2V\delta 2$ T 細胞を刺激し発熱などの炎症反応を誘導すると考えられている。しかしマウスには NBP と反応する $\gamma\delta$ T 細胞は存在しないが、研究代表者は、マウスにおける NBP の炎症反応にも FPP synthase の抑制が関与することを示した。

(7) NBP の壊死作用と non-NBP による抑制:

NBP の壊死作用に関する研究は殆どないが、Schenk ら (1986) は、NBP はラットの皮下注射で局所に壊死を起こすが、Clo は起こさないことを報告している。研究代表者は NBP の壊死作用を解析するモデルとして、マウス耳介への皮下注射を検討したところ、壊死作用は、Zol > Ris \approx Ale > Pam であり、研究代表者らがマウスで調べた骨吸収抑制作用と一致し、また、報告されている骨吸収抑制作用とほぼ一致した。この実験系においても、Clo と Eti は、壊死に対して強い抑制効果を示し、また、LPS は壊死の発症を増強・促進した。

2. 研究の目的

前術の作業仮説を実証して、NBP による顎骨壊死の機序解明を目指す。

(1) マウス耳壊死モデルでの解析:

コレステロール低下薬のスタチンは NBP による炎症を抑制するが、NBP による壊死に対しては抑制効果がなく、むしろ壊死を促進・増悪する。NBP による壊死作用の分子的機序は、骨吸収抑制作用と同様に、コレステロール合成経路の抑制によるものか検討する。

(2) NBP の組織への取り込み:

NBP の細胞内への取り込みを阻害することにより non-NBP は NBP の炎症・壊死作用の発症を抑制する。また LPS は NBP の取り込みを促進する結果を得ている。NBP の細胞内取り込みの機構は不明であるが、なんらかのトランスポーターによるものと推察される。

(3) 顎骨壊死のマウスのモデルの作製:

これまで多くの研究者がモデルマウスの作製に着手しているが、まだ成功に至っていない。研究代表者はこれまで得た NBP の炎症と壊死作用の知見をもとに作製を試みる。

(4) Eti の再評価と顎骨壊死患者への NBP

代用薬としての可能性: NBP 治療患者に Eti を NBP の代用薬として使用すれば、骨吸収抑制を維持しつつ、骨に蓄積している NBP を除去し、顎骨壊死を予防または進行を

止めることが可能かどうか検討する。

(5) 顎骨壊死患者の遺伝子解析:

NBP 投与患者で顎骨壊死を発症する要因として環境因子があげられているが、必ずしも必須ではない。遺伝的要因の関与を検討するため、BP 投与患者を対象に顎骨壊死の有無を表現型に骨代謝関連遺伝子を中心に遺伝子多型解析 (SNPs) を試みる。

3. 研究の方法

研究代表者らは、顎骨に蓄積した NBPs が感染や抜歯等により顎骨から遊離し、遊離 NBPs が顎骨周囲の組織を直接傷害する機序を想定し、マウス耳介への NBPs 投与による局所反応を解析した。NBPs は耳介に炎症・壊死を誘導すること、この反応は LPS で増強され、non-NBP の Clo により抑制されることを明らかにした。本研究では NBP の Zol に対して、non-NBP の Clo および LPS を併用した際の耳介炎症性サイトカインの動向を調べた。

Bisphosphonates (BPs)

-強い骨吸収抑制作用をもつ
-ヒロリン酸の P-O-P を P-C-P に変換、多くの誘導体が合成
-骨 (hydroxyapatite) に強く結合; P-C-P は分解されない → 蓄積
-R1 または R2
-N を持つ誘導体 (NBPs): 作用が極めて強い
-N のない誘導体 (non-NBPs): NBPs に比べ作用が弱い

*ラットでの骨吸収抑制活性
日本 (および 米国) の承認年 # 錠剤 \$ 注射

| | | | |
|---|---|---|--|
| ヒロリン酸 Etidronate (1.0)* 大日本住友 90 (7) ダイロネル® | Clodronate (3.3) 申請前薬 (キッセイ) | Pamidronate (33) ノバルティス 94 (91) アレディア® | Alendronate (1,000) 万有、東大薬 97 (95) オナールス、ライオン フォスマック®, ボナロン® |
| Incadrinate (1,000) 山之内 97 ビスフォスナル® | Risedronate (3,300) 武田、味の素-ユーザイ 02 (98) ベネクト®, アトネル® | Zoledronate (10,000) ノバルティス 04 (01) ゾメタ® | Minidronate (10,000) 小野、アステラス 09 レムルミン®, 希ノテオ® |

ibandronate (10,000): 申請中

NBPs による局所での炎症と壊死反応

マウスの耳への NBPs 注射による炎症・壊死反応
Zol 2 mM

Test samples: 20 μl を皮下注射

0 day (no injection)

3 days

7 days

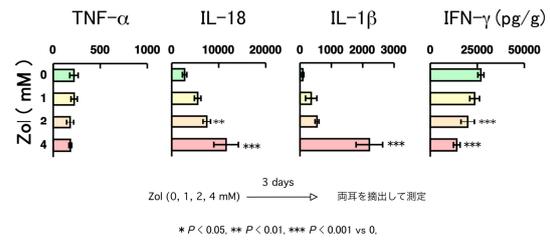
炎症: 発赤部の面積で評価
壊死: 発症頻度で評価

Zol は投与局所 (耳組織) に炎症・壊死を起こす

LPS は、*E. coli* O55:B5 (Westphal による方法) を用い、被検溶液は、すべて生理食塩水 (Saline: S) にて溶解した。実験動物として日本 SLC (静岡) より購入した BALB/c 雌マウス耳介に被検溶液を 20 μl/ear 皮下注射し、耳介を摘出後、ホモジナイズを行い、耳介抽出液中の IL-1β (Endogen), IL-18 (MBL) および TNF-α, IFN-γ (ともに Invitrogen) を ELISA kit で測定した。実験データは、平均値 ± 標準偏差 (SD) で表した。二群間の平均値の差の検定は Bonferroni ' s multiple-comparison test または Student ' s unpaired t test を実施して、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

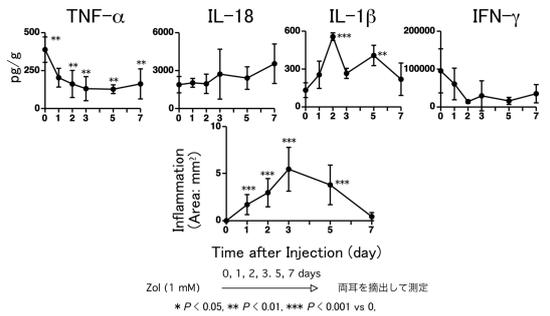
4. 研究成果

(1) Zol 投与による組織炎症性サイトカイン産生の用量依存性



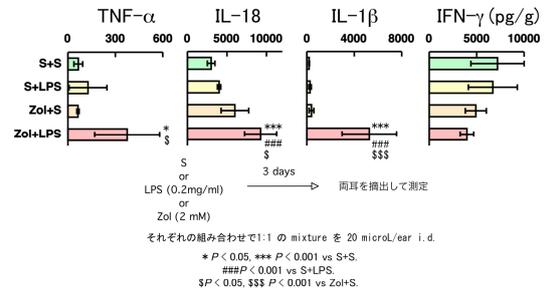
Zol を耳介に投与すると用量依存的に組織内の IL-18 と IL-1β の産生が増加し、IFN-γ の産生は減少した。TNF-α には、変化がみられなかった。

(2) Zol 投与による組織炎症性サイトカイン産生の経時変化



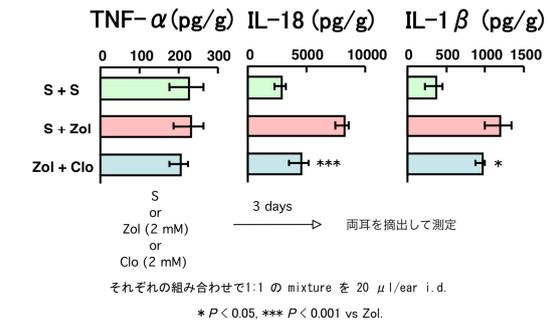
Zol (1mM) 投与 3 日後に耳介の炎症範囲が最も大きくなる。それに先駆けて、IL-1β の産生が認められた。

(3) Zol 投与による組織炎症性サイトカイン産生の LPS による増強

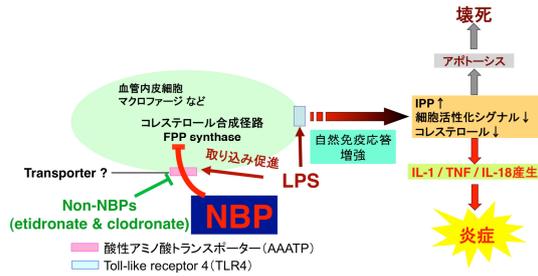


耳介に LPS と Zol を同時投与後すると組織内の IFN-γ 以外の cytokines の産生がいずれも増強した。特に IL-1β に関して、著しい増強が認められた。

(4) Zol 投与による組織炎症性サイトカイン産生の Clo による抑制



耳介に ZoI と等量の Clo を同時投与すると IL-18 と IL-1 β の産生が抑制された。



上記結果は以下より, NBPs 自体の炎症・壊死作用には IL-1 β と IL-18 が関与し, 感染は NBPs によるサイトカイン産生を増強する。また, Clo と NBP の併用は, 骨吸収抑制作用を維持し, 炎症・壊死作用を予防する方法として有効と思われる

研究代表者らのこれまでの研究結果のまとめ

- (1) LPS と NBPs : 炎症・壊死作用を相互に増強する。
- (2) 炎症・壊死作用の LPS による増強は, C3H/HeJ マウスでは認められない, (TLR4 の関与)
- (3) NBPs の炎症・壊死作用 : FPP 合成酵素の抑制による。
- (4) Clodronate : NBPs の炎症・壊死作用を抑制するが, 骨吸収抑制作用は抑制しない。
- (5) Etidronate : NBPs の炎症・壊死作用と骨吸収抑制作用の両方を抑制する。
- (6) Statins : NBPs の炎症作用を抑制するが, 壊死作用は抑制しない。
- (7) NBPs の細胞内取り込みを, non-NBPs は抑制し, LPS は促進する。

NBPs による顎骨壊死の発生機序 (仮説)

感染で集まる顆粒球や M ϕ による骨破壊や抜歯による骨破壊が, 骨に蓄積した NBP を遊離させる。遊離 NBP は LPS による IL-1 産生を増強し, さらに IL-1 や TNF による炎症反応も増強する。一方, NBP はコレステロール合成経路の抑制をもたらす, 細胞死を促進する。骨での炎症は 投与された NBP の蓄積を促進すると共に骨破壊も促進し, 蓄積した NBP の遊離を加速する。この悪循環が顎骨の壊死・露出をもたらすと考えられる。

今後, この研究で得られた知見を元に, さらに詳細な NBPs による顎骨壊死の機序解明と治療・予防についての研究を進める。現在, ステロイドやコレステロール合成阻害薬のスタチンを用いた実験を遂行中である。

[雑誌論文] (計 7 件)

船山ひろみ. Bisphosphonates による

炎症性副作用の機序・予防・治療. *小児歯科学雑誌*. 48(4), 2010, 495-504. 査読無。

Funayama H, Huang L, Asada Y, Endo Y, Takada H. Enhanced induction of a histamine-forming enzyme, histidine decarboxylase, in mice primed with NOD1 or NOD2 ligand in response to various Toll-like receptor agonists. *Innate Immunity*. 16(4), 2010, 265-72. 査読有。

Sato N, Oizumi T, Kinbara M, Sato T, Funayama H, Sato S, Matsuda K, Takada H, Sugawara S, Endo Y. Promotion of arthritis and allergy in mice by aminoglycoglycerophospholipid, a membrane antigen specific to *Mycoplasma fermentans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 59(1), 2010, 33-41. 査読有。

Oizumi T, Funayama H, Yamaguchi K, Yokoyama M, Takahashi H, Yamamoto M, Kuroishi T, Kumamoto H, Sasaki K, Kawamura H, Sugawara S, Endo Y. Inhibition of necrotic actions of nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs) and their elimination from bone by etidronate (a non-NBP): a proposal for possible utilization of etidronate as a substitution drug for NBPs. *J Oral Maxillofac Surg*. 68(5), 2010, 1043-54. 査読有。

Yamaguchi K, Oizumi T, Funayama H, Kawamura H, Sugawara S, Endo Y. Osteonecrosis of the jawbones in 2 osteoporosis patients treated with nitrogen-containing bisphosphonates: osteonecrosis reduction replacing NBP with non-NBP (etidronate) and rationale. *J Oral Maxillofac Surg*. 68(4), 2010, 889-97. 査読有。

Funayama H, Huang L, Sato T, Ohtaki Y, Asada Y, Yokochi T, Takada H, Sugawara S, Endo Y. Pharmacological characterization of anaphylaxis-like shock responses induced in mice by mannan and lipopolysaccharide. *Int Immunopharmacol*. 9(13-14), 2009, 1518-24. 査読有。

Oizumi T, Yamaguchi K, Funayama H, Kuroishi T, Kawamura H, Sugawara S, Endo Y. Necrotic actions of nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs) and their inhibition by clodronate (a non-NBP) in mice: potential for utilization of clodronate as a combination drug with an NBP. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 104(5), 2009, 384-392. 査読有。

[学会発表](計6件)

船山ひろみ, 黄 玲, 朝田芳信, 横地高志, 高田春比古, 遠藤康男. マウスにおける真菌 mannan(MAN)によるアナフィラキシー様急性ショック反応: lipopolysaccharide (LPS) との比較. 第16回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2010年11月12-13日, 奈良.

船山ひろみ, 田島 格, 遠藤康男, 朝田芳信. 窒素含有 bisphosphonates のマウスでの炎症・壊死作用への IL-18 の関与. 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2010年9月20-22日, 東京.

船山ひろみ, 田島 格, 遠藤康男, 朝田芳信. マウス耳介での zoledronate の炎症・壊死作用: 炎症性サイトカインの関与. 第28回日本骨代謝学会 2010年7月21-23日, 東京.

船山ひろみ, 朝田芳信. 口腔細菌由来 LPS の歯肉注射によるマウス Ni アレルギーの増強. 第48回日本小児歯科学会大会 2010年5月19-20日, 名古屋.

船山ひろみ, 田島 格, 遠藤康男, 朝田芳信. 窒素含有 bisphosphonates (NBPs) の壊死作用に対する組織サイトカインの関与: LPS による増強と clodronate (non-NBP) による抑制. 第51回歯科基礎医学会学術大会・総会 2009年9月9-11日, 新潟.

船山ひろみ, 深瀬直子, 井出正道, 朝田芳信. 経口 bisphosphonate 系薬剤投与中の若年性突発性関節炎患児の歯科治療経験. 第47回日本小児歯科学会大会, 2009年5月14-15日, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船山 ひろみ (FUNAYAMA HIROMI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号: 00359530

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し