

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861910

研究課題名(和文) Bisphosphonates関連顎骨壊死：機序解明と有効な予防・治療を目指して

研究課題名(英文) Bisphosphonates related osteonecrosis: Aim to elucidate and treatment mechanism

研究代表者

大泉 丈史(Oizumi, Takefumi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：40547262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：強力な骨吸収抑制作用をもつビスフォスフォネート(BP)剤は様々な骨吸収亢進性疾患に対し用いられているが、2003年にBP関連顎骨壊死(BRONJ)という副作用が報告されて以来増加し続けている。BPは窒素含有BP(NBP)と窒素非含有BP(non-NBP)があり、BRONJを生じるのはNBPである。これまで我々はnon-NBPがNBPの細胞内への取り込みの抑制と骨への結合に拮抗することにより炎症、壊死を抑制することを報告してきた。non-NBPのetidronate代替置換療法を試みたBRONJ患者14例および糖尿病コントロール不良のBRONJ患者1例について各々論文投稿を行った。

研究成果の概要(英文)：Bisphosphonates(BPs) agent with strong bone resorption inhibitory effect have been used for various enhanced bone-resorptive diseases. However, since BP-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ), first reported in 2003, is increasing, with few effective strategies. BRONJ is exclusively associated with the use of nitrogen-containing BPs (NBPs). We previously reported that in mice, the non-NBP etidronate can reduce the inflammatory/necrotic effects of NBPs by inhibiting their intracellular entry and antagonize NBPs' binding to bone hydroxyapatite absorption. We applied papers that the BRONJ 14 patients case and BRONJ patient of diabetes control bad case which tried to etidronate substitute replacement therapy of non-NBP.

研究分野：歯科

キーワード：顎骨壊死 ビスフォスフォネート

1. 研究開始当初の背景

Bisphosphonates 関連顎骨壊死:機序解明と有効な予防・治療を目指して

強力な骨吸収抑制薬であるビスフォスフォネート (BP) はピロリン酸の P-O-P 構造を P-C-P 構造に置換した化合物であり, P-C-P の炭素原子に結合する側鎖に様々な化学的修飾を加えたものである. BP の P-C-P 構造は骨ハイドロキシアパタイトへの親和性に影響し, 側鎖の R₁, R₂ の化学構造は BP の活性に大きく影響する. BP は側鎖にアミノ基を含む窒素含有 BP (NBP) と窒素非含有 BP (non-NBP) の 2 種類が存在する. BPs は骨ハイドロキシアパタイトに強い親和性を持つため選択的に骨に集積する. 種類により異なるが体内に吸収されたうちの約 50% は速やかに選択的に骨に蓄積するが, 残りの 50% は腎を経て尿中に排泄される. 骨に結合した BPs は, 骨吸収の過程で破骨細胞に取り込まれ, アポトーシスを誘導する事により骨吸収抑制作用を示すと言われている. その強い骨吸収抑制作用は, 前立腺癌や乳癌のような骨転移性腫瘍, 骨粗鬆症, 骨ページェット病, 骨形成不全症および多発性骨髄腫などの骨吸収亢進性疾患に広く応用されている. 特に前立腺癌, 乳癌や肺癌などの骨転移を示す悪性腫瘍において BPs を予防的に投与する事により骨転移を抑制すると考えられている. また, 癌性骨痛に対しても抑制効果を示し, 患者の QOL を向上させる. しかしながら, '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頻発し, 数千人の発症が報告されている. 発症患者の大部分は骨転移性腫瘍患者だが, 骨粗鬆症の患者でも発症している. 顎骨壊死は NBP により発症し, 骨吸収抑制作用が最強の zoledronate による頻度が最も高い. しかし pamidronate, alendronate, risedronate など他の NBP でも発症が確認されている. 一方, non-NBP の clodronate と etidronate での発

症例は無い. 上述の様に 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蓄積するため, 現状のまま投与が続けられれば, さらに多くの発症が予想される. この副作用に対する対応および原因解明が急務である.

2. 研究の目的

骨吸収抑制薬 bisphosphonates (BPs) による顎骨の壊死・骨髄炎は, 発症機序不明で, 予防・治療の有効な方法もない. 私達はマウスを用いた実験で, 窒素含有 BPs (NBPs) は炎症壊死作用をもち, 窒素非含有 BPs (non-NBPs) は NBPs の炎症壊死作用を予防・抑制することを発見した. 本研究は NBPs の副作用の機序を解明し, また, non-NBPs を用いた有効な予防・治療の方法を探ることを目的とする.

3. 研究の方法

< マウスを用いた基礎実験 >

(1) NBPs の骨親和性と顎骨壊死作用の関連性.

In vivo 実験:

私達のこれまでの実験結果から, BPs の骨親和性は etidronate > NBPs > clodronate と予想されるが, NBPs それぞれの骨親和性は明確ではなく, これに関する in vivo での研究は皆無である. 私達は, マウスを用いた in vivo での骨親和性を評価できる以下のユニークな方法を持っている. BPs を成長期のマウスに投与すると, 一回だけの投与で, 2-3 週間後, 脛骨成長線に対応する明瞭な骨硬化帯が X 線で検出できる. 私達はこれを BP-band と呼称している. BP-band の画像解析により, BPs の骨吸収抑制作用を簡単・明瞭に評価できる. この方法は私達が考案した方法である. 従って, 一定量のそれぞれの NBP と一定量の etidronate を併用投与し, 出現する BP-band を比較することにより, それぞれの NBP の骨親和性を in vivo で評価できる.

Minodronate は我が国で開発された骨粗鬆症適用の NBP である。その骨吸収抑制作用は zoledronate に匹敵またはそれ以上である。2009 年に認可されたが、興味深いことに、これまで顎骨壊死の報告はない。NBP の副作用として、消化管障害もあるが、この発症事例の報告もない。今後もこれらの副作用の発症がない場合、その理由の解明は顎骨壊死の機序解明と予防に繋がる。従って、本研究ではまず、minodronate と zoledronate の骨への親和性を比較する。もし、骨親和性が zoledronate > minodronate であれば、minodronate は zoledronate に比べ骨への蓄積の程度が低く、顎骨壊死は起こりにくいことが示唆される。また、minodronate の骨への蓄積を、間欠的な etidronate の投与によりで制御できることにも繋がる。この研究ではいかに示す *in vitro* と *in vivo* 実験を組み合わせた実験も検討する。

In vitro と *in vivo* の組み合わせ実験：

ハイドロキシアパタイト粉末に BP 剤を混和し、一定時間置き、遠心分離により上清液を採取する。その上清液を生後 4 週の若いマウスの腹腔内に注射し、2 週間後に顎骨を摘出し、軟エックス線装置にて撮影。上と同様に BP-band を画像解析し、BP とハイドロキシアパタイトの結合力を評価する。また、etidronate を同時に添加し、その効果も評価する。

(2) マウスでの顎骨壊死モデルの作製とその応用。

歯周炎などの顎骨での炎症は NBP の集積を促進すると予想される。NBP の集積にさらに抜歯の刺激を加えることにより、炎症をさらに増幅し、蓄積した NBP の骨破壊や感染による顎骨から遊離を促進することにより、顎骨の壊死を誘導することが予想される。従って、本研究では骨の炎症を伴う次の 3 つのモデルについて、顎骨壊死モデルの作製を検討する。

マウス歯周炎モデルを作成し(診断科・庄司講師との共同研究で行う)、このマウスに口腔を観察しながら zoledronate の繰り返し投与(腹腔注射)を、を行う。静注および外科侵襲による顎骨壊死モデル(zoledronate 静脈注射連続投与後、臼歯の抜歯および歯槽骨の削除を行う)。

との組み合わせ

<臨床研究>

(1) 口腔外科における BP 投与患者の状況：NBP の骨親和性と顎骨壊死・骨髄炎との臨床での関連性。

私たちは現在、2006 年から 2011 年まで東北大学病院、顎口腔外科を受診し、BP 治療を受けた患者の状況を調べている。BP 投与歴のある患者総数は 86 名(男性 12, 女性 74)、内訳は、経口投与 68 名(男性 8, 女性 60)、静脈投与 18 名(男性 9, 女性 9)、このうち、顎骨骨髄炎または BRONJ の発症は 36 名(男性 7, 女性 29)であった。これら 34 名での経口投与薬剤は、Alendronate 15 名、Risedronate 5 名、不明 1 名(合計 21 名)であり、静脈投与薬剤は zoledronate 14 名、Pamidronate 1 名(合計 15 名)で、いずれも窒素含有 BP であった。BRONJ 発症率は、静脈投与患者で 83.3%、経口投与患者で 30.8%であった。経口投与患者(骨粗鬆症)での発症率は報告されている発症率に比べかなり高いと思われる。服用の長期化が発症率を高めると考えられ、今後、発症率はさらに高まると予想される。この調査で、risedronate(zoledronate について強力な骨吸収抑制活性と炎症・壊死作用を持つ)は、BRONJ の発生頻度、重症度、予後において、他の NBP と比べ軽度であった。また、2009 年に我が国で新たに認可となった minodronate は、zoledronate と同程度またはそれ以上の骨吸収抑制活性、炎症・壊死作用を有するが、顎骨壊死の報告は見られない。

そこで、私達は risedronate, minodronate に顎骨壊死の頻度が少ない理由として骨親和性の低さを想定している。この調査を今後継続し、私たちの予想を検証する。

(2) 顎骨壊死の予防・治療を目的とした etidronate の応用例を増やし、上述提案1の有効性の実証する。

上述の様に 私達は (i) etidronate を NBP の代用薬、(ii) clodronate を NBP の併用薬とすることを提案している。残念ながら、clodronate は日本では承認されておらず、(ii) の臨床応用を試みることができない。

Etidronate は骨粗鬆症治療薬として、我が国では最も早い1990年に承認され、その有効性が確認され、また、炎症・壊死作用も見られないことから、私達はインフォームドコンセントのもとで、これまで10例に (i) の臨床応用を試みた。結果はいずれの場合も良好であり、抗生剤によるコントロールが不良であったいずれの症例においても etidronate への切り換えにより、約3週間程度で痛みと排膿が消え、炎症も次第におさまる。その後ほぼ同時期に腐骨分離が確認され、腐骨除去術を施行した後も骨露出の拡大等なく良好な経過を示す。また、数ヶ月後の骨シンチ像では、炎症部位の減少が確認された。以下が今後の方針である。

“NBP 代用薬としての etidronate” の症例数を増やす: BRONJ 症例に対し、etidronate を通常の投与方法に従って、NBP 代用薬として投与する。症例20例での成績を論文としてまとめる。

4. 研究成果

(1) 骨転移性腫瘍細胞に対する NBP と non-NBP 併用時の抗腫瘍作用。

ヒト培養歯根膜 HPDL, 扁平上皮癌細胞 HSC-2 や前立腺癌細胞 Pc-3 等の細胞において骨吸収抑制作用が最強である NBP の zoledronate と non-NBP の etidronate の

併用投与により zoledronate の抗腫瘍作用を etidronate が軽度抑制したことを明らかにした。

(2) NBP の細胞内取り込みにおけるリン酸トランスポータの役割。

マウスでの薬理学的実験で、NBP はリン酸トランスポータを介して軟組織細胞に取り込まれることを示唆した。これらの結果は、リン酸トランスポータを介して顎骨周囲の軟組織細胞内に取り込まれた NBP は、コレステロール合成経路に存在する酵素である FPPS の阻害により炎症・細胞死をもたらす、これが顎骨壊死につながることを示唆した。

(3) NBP の炎症、壊死に対するリン酸トランスポータ阻害剤の phosphonoacrylates の効果。

上述の(2)の結果をもとにマウス実験においてリン酸トランスポータ阻害剤の phosphonoacrylates の投与により NBP の炎症、壊死を阻害した。この結果はリン酸トランスポータを阻害することにより NBP の副作用を予防する有効な治療法であることを示唆した。

(4) 口腔外科における BP 投与患者の状況と etidronate 置換療法の統計学的調査。

東北大学病院顎口腔外科を受診した BRONJ 患者に対し etidronate 置換療法を行ったステージ2以上の症例に関してその効果をまとめた。NBP の経口薬、静注薬ともに、コントロール群と比較して etidronate 置換療法を行った群は炎症の抑制と早期の腐骨分離を示した。

(5) 糖尿病コントロール不良の BRONJ への etidronate 置換療法の効果

糖尿病によるコントロール不良の骨粗鬆症

患者に発症した BRONJ に対し、エチドロネートへの切り換え治療が、良好な結果をもたらした。alendronate (NBP) 治療の再開も可能になった 1 例を報告した。

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 3 件)

(1) Tomomi Kiyama, Masahiro Tsuchiya, Satoru Okada, Takefumi Oizumi, Kouji Yamaguchi, Keiichi Sasaki, Shunji Sugawara, and Yasuo Endo: Phosphonocarboxylates Can Protect Mice against the Inflammatory and Necrotic Side Effects of Nitrogen-Containing Bisphosphonates by Inhibiting Their Entry into Cells via Phosphate Transporters. *Biol. Pharm. Bull.* 39, 712–720, 2016. doi: 10.1248/bpb.b15-00770. (査読あり)

(2) Tanaka Y, Nagai Y, Dohdoh M, Oizumi T, Ohki A, Kuroishi T, Sugawara S, Endo Y: In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. *Arch Oral Biol*; 58(6):628-37, 2013. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.11.010. (査読あり)

(3) Okada S, Kiyama T, Sato E, Tanaka Y, Oizumi T, Kuroishi T, Takahashi T, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y: Inhibition of phosphate transporters ameliorates the inflammatory and necrotic side effects of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronate in mice. *Tohoku J Exp Med*; 231(2):145-58, 2013. Doi:

<http://doi.org/10.1620/tjem.231.145> (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

大泉丈史: BRONJ に対するガイドロネールへの置換療法(Eti-RT). 第 3 回宮城県口腔外科学会, 2015 年 2 月 28 日, 仙台

大泉丈史, 山口晃史, 鈴木飛佳理, 土谷昌広, 菅原俊二, 高橋 哲, 遠藤康男: BRONJ (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw) の治療: etidronate (nitrogen-non-containing bisphosphonate) 置換療法の試み. 第 36 回東北骨代謝研究会, 2015 年 2 月 7 日, 仙台

大泉丈史, 山口晃史, 鈴木飛佳理, 土谷昌広, 菅原俊二, 高橋 哲, 遠藤康男: 窒素含有 bisphosphonates (N-BPs) 治療患者での顎骨壊死: N-BPs の etidronate (non-N-BP) への置換の試み. 第 56 回歯科基礎医学会, 2014 年 9 月 25 日, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大泉 丈史 (OIZUMI TAKEFUMI)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号: 40547262

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

