

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861744

研究課題名(和文)ビスフォスフォネート関連骨壊死モデルの確立とテリパラチドを用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Establishing of the a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis and development of novel treatment with teriparatide.

研究代表者

鶴島 弘基 (Tsurushima, Hiroki)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30725198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ビスフォスフォネート製剤(BP)を中心とした、薬剤を服用中の患者の顎骨壊死(MRONJ)の原因として、口腔内細菌の関与が示されてきたが、今回の研究でグラム陰性桿菌のリポ多糖(LPS)がその原因である可能性が示された。また、以前は注射用BP使用患者を想定した動物モデルのみであったが、内服BP使用患者を想定したモデルラットの作製にも成功した。また、MRONJモデルラットにテリパラチドを使用することで、骨壊死面積の減少と、新生骨の増加が認められ、MRONJの治療に対するテリパラチドの有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：As a cause of the medication related osteonecrosis of the jaw bone (MRONJ), the participation of oral bacteria had been shown, but the possibility that the Lipopolysaccharide (LPS) of the gram-negative bacillus was the causes was shown in this study. In addition, it was only the animal model which assumed injectable BP patient, but succeeded in the development of the model rat which assumed internal use BP patient. In addition, the decrease in osteonecrosis area and the induced new bone formation were recognized by using teriparatide for MRONJ model rat. Usefulness of teriparatide for the treatment of MRONJ was shown.

研究分野：歯科

キーワード：MRONJ テリパラチド 顎骨壊死 LPS

1. 研究開始当初の背景

BRONJ の発生頻度は、経口薬では 0.07 人/100,00 人とされており、注射薬では 1 ~ 12% と推定されている。BRONJ の発生頻度は前述のように低い、予防治療法が見つかっておらず、広範囲な骨壊死・骨露出や感染を引き起こすものもあり、疼痛・排膿や咀嚼障害などが生じ、患者の QOL に与える影響は極めて大きい。また、BRONJ は難治性であり保存的治療だけでは症状が増悪し、広範囲な外科的治療が必要となることも多い。BRONJ の明らかな治療法が見つけられていないため、多くの歯科医師が治療に難渋しているのが現状である。さらに、抜歯を含む顎骨に対する外科的侵襲が BRONJ の原因の一つとも言われており、歯科医師が BP 服用患者の治療に消極的であったり、治療を敬遠することもあり問題となっている。

本疾患の予防治療法の開発が進んでいない理由としては、前述の様な発生頻度の低さが挙げられる。低い発生頻度の疾患を臨床的に研究し、原因や治療方法を見出すことは困難で、適切な病態モデルを作製し、そこから病態解明と治療法開発のカギを得ることが有効な方法であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者らは、BP 注射患者を想定した MRON(J)モデルの作製に成功している。しかしながら、MRONJ の原因についてはいまだ未解明な部分も多く、原因究明が急務である。先述のモデルでは、下顎骨と大腿骨に *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(A.a) の死菌を填入することで、骨壊死範囲の拡大を認めしたが、A.a の主たる抗原性はリポ多糖

(Lipopolysaccharide ; LPS) であるため、LPS 局所刺激の影響を検討することが目的である。

また、本邦で増加している骨粗鬆症患者における内服 BP 患者を想定したモデルの作製を目標とする。

さらに、近年、BRONJ の治療にテリパラチドを用いることで良好な結果を得たとの臨床報告が散見されるため、BRONJ に対するテリパラチドの効果を、モデルラットを用いて検証する。

3. 研究の方法

BRONJ モデルラットを用いた、LPS の作用についての検討。

8 週齢 Wistar 系雄ラットに 0.1mg/kg/ 回のゾレドロン酸水和物(ゾメタ点滴静注用:ノバルティス ファーマ株式会社。以下:ZOL)を 4 週間皮下注射する。最終投与から 1 週間後に、全身麻酔を施した後、下顎骨ならびに大腿骨を穿孔し、骨内に LPS を充填する。コントロールとして、A.a の死菌を充填した群と生理食塩水充填群を用いる。また、LPS を中和するポリミキシン B (PMB) を同時に局所投与するポリミキシン群を作製する。4 週間の待機期間の後に サンプルングを行い、組織標本を作製し、組織学的に骨壊死の範囲を画像解析ソフトを用いて測定する。

内服 BP 製剤使用患者を想定したモデルラットの作製。

8 週齢 Wistar 系雌ラットにジエチルエーテルで吸入麻酔を行ない、抱水クロラール 3.5mg/kg の腹腔内注射による全身麻酔を施した後、卵巣摘出手術(以下:OVX)を施行し実験的骨粗鬆症モデルラットを作製する。OVX 後 8 週間の待機期間の後に、4 週間フォサマック[®]を 1.0mg/kg/week で経口投与する。また、BP 製剤の腸管からの吸収阻害を避けるため、投与 4 時間前から投与後 2 時間は絶食とする。BP 製剤の最終投与から 1 週間後に下顎骨ならびに大腿骨に前述の処置を施行する。4 週間の待機期間の後に サンプルングを行い、組織標本を作製し、組織学的に骨壊死の範囲を画像解析ソフトを用いて測定し、統計学的に検討を行う。

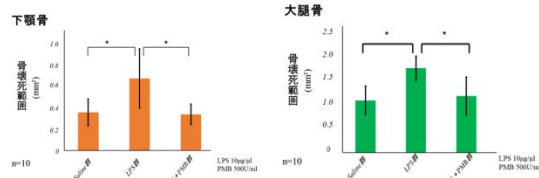
BRONJ モデルラットに対するテリパラチドの効果の検討。

まず、Tsurushima らのモデルラットを作製後より週に 3 回、800µg/kg のテリパラチドを腹部皮下注射する。群分けは、投与期間の差異ならびに、非投与群によっての 4 群に分けて行う(図 6 参照)。摘出した標本は HE 染色を行い、画像解析ソフトを用いて骨壊死面積を測定し統計処理を行う。

実験期間中、各群において BP 製剤投与前、投与後、テリパラチド投与前、標本採取時に採血を施行し、骨代謝マーカーの測定を行い、薬剤使用による骨代謝マーカーの変化、ならびに BRONJ の状態による骨代謝マーカーの変化について検討を行う。

4. 研究成果

BRONJ モデルラットを用いた, LPS の作用についての検討.

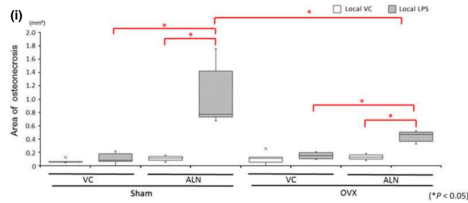


- LPS を局所投与することにより、骨壊死面積が拡大する。
- LPS を中和する PMB を LPS と同時に局所投与することでは、壊死骨面積は生食充填と変化しない。
- LPS が骨壊死面積を拡大させる要因。
- 大腿骨にも、LPS 局所投与にて同様の骨壊死が生じる。

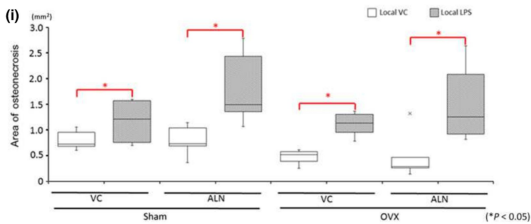
ビスフォスフォネート製剤関連骨壊死には、ビスフォスフォネート製剤と、局所の炎症が影響。

内服 BP 製剤使用患者を想定したモデルラットの作製.

下顎骨骨壊死面積



大腿骨骨壊死面積



- 卵巣摘出ラットに内服 BP を投与し、LPS を局所投与することで、骨壊死範囲の拡大を認めた。
- 同様の所見は、下顎骨だけでなく、大腿骨においても認められた。
- 非卵巣摘出群において、卵巣摘出群と比較して、骨壊死面積が大きくなった。

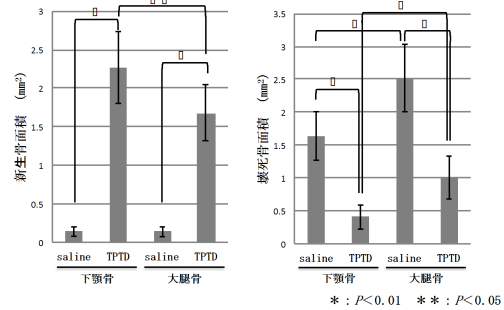
閉経後骨粗鬆症モデルラットに対して経口 BP を用いた骨壊死モデルを作製することに成功した。

顎骨は細菌感染に晒されているという環境要因だけでなく、骨代謝回転が早いために、BP が取り込まれやすく、大腿骨を含む他の長管骨に比べて BRONJ が生じやすいのではない

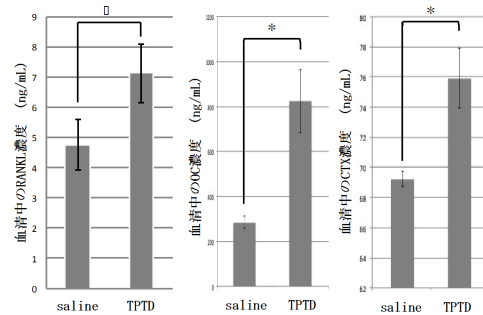
かということを示唆した。

閉経後骨粗鬆症患者への早すぎる BP 治療の介入が BRONJ のリスクとなる可能性を示唆した。

BRONJ モデルラットに対するテリパラチドの効果の検討.



TPD 投与により下顎骨・大腿骨ともに新生骨の増加と壊死骨の減少が認められた。



血清中の RANKL, OC, CTX の濃度は、いずれも TPTD 投与によって有意に増加した。

今回の BRONJ モデルラットにおいて、下顎骨・大腿骨ともに有意な新生骨形成の増加が認められた。

TPTD は新生骨形成と壊死骨吸収を促進することで BRONJ 改善に関与していることが示された。

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 2 件)

Sakaguchi, O., Kokuryo, S., Tsurushima, H., Tanaka, J., Habu, M., Uehara, M.,

Nishihara, T., Tominaga, K.

LIPOPOLYSACCHARIDE AGGRAVATES BISPHOSPHONATE- INDUCED OSTEONECROSIS IN RATS.

International Journal of Oral and

Maxillofacial Surgery 2015 Apr;44 (4) :
528-34.

Tanaka,J.,Kokuryo,S.,Yoshiga,D.,Tsurushima,H.,Sakaguchi,o.,Habu,M.,Nishihara,T.,Yoshioka,I.and Tominaga,K. : An osteonecrosis model induced by oral bisphosphonate in ovariectomised rats. Oral Dis 2015 21, 969-976
doi:10.1111/odi.12368

〔学会発表〕(計 7件)

Sakaguchi,O.,Kokuryo,S.,Tsurushima,H.,Tanaka,J.,Habu,M.,Uehara,M., Nishihara,T and Tominaga,K:LIPOPOLYSACCHARIDE AGGRAVATES BIPHOSPHONATE-RELATED OSTEONECROSIS IN RATS. Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2014, Jan. 2014 北九州市

田中純平 國領真也 吉賀大午 鶴島弘基 坂口修 富永和宏:閉経後骨粗鬆症モデルラットの経口ビスフォスフォネートによる骨壊死誘発モデルの開発. 第59回日本口腔外科学会総会 10月幕張 2014.

Shinya Kokuryo, Hiroki Tsurushima, Osamu Sakaguchi, Jumpei Tanaka, Daigo Yoshiga, Izumi Yoshioka, Kazuhiro Tominaga : Novel induction of oral bisphosphonate-induced osteonecrosis in ovariectomized rats 2015.4.18-24, American Academy of Oral Medicine and the American Academy of Oral Maxillofacial Pathology Annual Meeting San Diego,CA

Tanaka,J.,Kokuryo,S.,Yoshiga,D.,Tsurushima,H.,Sakaguchi,O.,Nishihara,T.,Yoshioka,I.and Tominaga,K. : Novel induction of oral bisphosphonate-induced osteonecrosis in

ovariectomized rats.Asia-Pacific Conference in Fukuoka jun Kitakyusyu 2015

池田浩之、吉賀大午、鶴島弘基、坂口修、田中純平、梶田倫功、笹栗正明、吉岡泉、富永和宏 : BRONJ モデルラットにおける Teriparatide を用いた治療効果に関する研究 第61回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2016年11月 東京都(033-3)

池田浩之、吉賀大午、鶴島弘基、坂口修、田中純平、梶田倫功、土生学、笹栗正明、吉岡泉、富永和宏 : MRONJ モデルラットを用いた MRONJ への Teriparatide の治療効果に関する研究 第71回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2017年4月26~28日松山市(2-E-1)

池田浩之、吉賀大午、鶴島弘基、坂口修、田中純平、梶田倫功、土生学、笹栗正明、吉岡泉、富永和宏 : MRONJ モデルラットを用いた MRONJ への Teriparatide の治療効果に関する研究 第77回九州歯科学会総会学術大会 2017年5月20・21日北九州市 (11)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴島弘基 (TSURUSHIMA Hiroki)

九州歯科大学・口腔内科学分野・助教

鶴島弘基

研究者番号：30725198

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()