

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 秋谷 勇介(千葉県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第 514 号
学位授与年月日 令和3年3月31日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 薬剤関連顎骨壊死発症モデルマウスの作製と組織学的観察
鶴見歯学 第47巻 2号 53頁~65頁掲載 令和3年9月10日発行
論文審査委員 主査 教授 里村 一人
副査 教授 二藤 彰 副査 教授 濱田 良樹

内容の要旨

【序 文】

ビスフォスフォネート (BP) 製剤は骨吸収抑制作用を有することが報告されて以来、骨粗鬆症の治療以外にも乳がんなどの悪性腫瘍の骨転移に関連した骨関連事象や、多発性骨髄腫における溶解性病変の治療に使用されている。一方、BP 製剤投与中の患者において、抜歯などの外科的侵襲を契機に BP 関連顎骨壊死 (BRONJ) を発症することが報告されている。現在では、BP とは作用機序の異なる骨吸収阻害薬においても同様の顎骨壊死を生じることから BRONJ を含めて薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) と総称されるようになった。MRONJ は一旦発症すると極めて難治性であり、患者の QOL を著しく低下させることから、発症機序の解明と予防策の確立が求められている。MRONJ 発症の主なりリスク因子としては、侵襲的な歯科治療による感染、歯周病などの口腔内炎症性病変などが挙げられているが、発症機序や原因薬剤による病態の特徴については解明されていない。これまでの MRONJ 発症モデル実験動物の研究において、抗悪性腫瘍薬のアルキル化剤を BP と併用することで MRONJ 発症率が上昇することが報告されている。その要因としては、アルキル化剤による免疫応答の抑制やマクロファージの集簇による創傷治癒の遷延化が要因とされているが、詳細な発症機序については解明されていない。

本研究では、ゾレドロン酸およびデキサメタゾン、メルファランを併用した MRONJ 発症モデルマウスを作製し、抜歯窩およびその周囲粘膜での免疫動態について、投与した薬剤間で比較検討することで MRONJ の発症および病態メカニズムを免疫学的に解明することを目的とした。

【材料および方法】

C57BL/6J マウス (8 週齢, 雌) を投与薬剤によって 5 群に分けた。Vehicle control (VC) 群 (n=8) には生理食塩水を週 2 回、静脈内投与した。Zoledronic acid (ZA) 群 (n=8) には ZA 125 μ g/kg を週 2 回、静脈内投与した。ZA/Dexamethasone (DEX) 群 (n=11) には ZA 125 μ g/kg と DEX 5 mg/kg を週 2 回、静脈内投与した。Melphalan (MEL) 群 (n=9) には MEL 7 mg/kg を週 1 回、腹腔内投与した。ZA/DEX/MEL 群 (n=12) には ZA 125 μ g/kg, DEX 5 mg/kg を静脈内投与、MEL 7 mg/kg を腹腔内投与した。投与開始から 4 週間後に各群マウスの上顎右側第一臼歯を抜去した。その後も 4 週間の薬剤投与後に屠殺した。なお、MRONJ の発症基準は、抜歯後の骨露出を 4 週間以上認めることとした。各群の抜歯後 4 週目の抜歯窩において、抜歯窩粘膜の肉眼的評価、 μ -CT による形態計測学的評価、HE 染色による組織学的評価、免疫染色による免疫組織化学的評価を行った。抜歯窩の肉眼的評価では骨露出の頻度を算出した。形態計測学的評価では、撮影した抜歯窩の三次元画像を再構築し、抜歯窩の容積に占める骨容積の割合 (BV/TV) を算出した。組織学的評価では、HE 染色後に抜歯窩周囲での骨壊死の有無、抜歯窩新生骨での骨芽細胞数の測定を行った。免疫組織学的評価では、成熟マ

クロファージの細胞表面マーカーである F4/80, M1 マクロファージの細胞表面マーカーである CD11c, M2 マクロファージの細胞表面マーカーである CD163 を用いて免疫染色を行い, 抜歯窩周囲粘膜に設定した関心領域 (ROI: 200×500 μm) に占める F4/80, CD11c, CD163 陽性領域の割合を算出した。

【結 果】

抜歯後 4 週目における抜歯部位の骨露出頻度は ZA/DEX/MEL 群で 58.3%, ZA/DEX 群で 9.1% であった。三次元再構成画像を用いて算出した BV/TV は, 他の群と比較し, ZA/DEX/MEL 群で低かった。HE 染色による組織学的所見では, 骨露出を認めた ZA/DEX/MEL 群および ZA/DEX 群のマウスで骨壊死領域を広範囲に認めた。骨露出を認めない ZA 群, ZA/DEX 群, MEL 群, ZA/DEX/MEL 群のマウスの抜歯窩周囲骨においては, 粘膜下に限局的な骨壊死領域を認めた。抜歯窩の新生骨表面における骨芽細胞数は VC 群, ZA/DEX 群と比較し, ZA/DEX/MEL で有意に少なかった。抜歯窩周囲粘膜に設定した ROI に占める F4/80, CD11c, CD163 陽性領域の割合を免疫組織化学的に測定したところ, F4/80 陽性領域の割合は VC 群, ZA/DEX 群と比較し, ZA/DEX/MEL 群で有意に高かった。CD11c 陽性領域の割合は, VC 群, ZA/DEX 群と比較し, ZA/DEX/MEL 群において有意に高かった。CD163 陽性領域の割合に有意な差は見られなかった。

【考 察】

本研究では, ZA/DEX/MEL 群 MRONJ 発症モデルマウスにおいて, 抜歯後 4 週間にわたる骨露出を高頻度に認めた。これまでの MRONJ 発症モデルマウスに関する報告においては, ZA と MEL の同時投与で 81% の MRONJ 発症率であったと報告されている。本研究における MRONJ 発症率は, 先行研究と同様に MEL の併用により MRONJ 発症率が増加することが示された。臨床においても MEL と同じアルキル化剤の抗がん薬であるシクロフォスファミドの投与を受けている多発性骨髄腫患者では顎骨壊死の発症率が増加し, その要因として抗がん剤による全身の免疫力の低下が示唆されている。MRONJ の臨床例の stage 分類では, 骨露出を認めないが粘膜下で顎骨壊死が生じている stage 0 を設けている。本研究における骨露出を認めない ZA 群, ZA/DEX 群, MEL 群, ZA/DEX/MEL 群で観察された粘膜下で限局的な骨壊死を呈していた病態は, stage 0 に相当するものと考えられ, 抜歯後に骨露出を生じていない患者においても粘膜下で骨壊死を生じている可能性があることが示唆された。本研究における ZA/DEX/MEL 群の抜歯窩では新生骨量の減少を認めたが, ZA は骨芽細胞を減少させ, MEL は前骨芽細胞の成熟を遅延させ, 骨基質産生阻害を生じさせることが報告されており, 本研究の ZA/DEX/MEL 群でも ZA と MEL の投与により, 骨芽細胞数の減少と骨基質産生阻害が生じ, 新生骨量が減少したと考えられた。免疫染色では ZA/DEX/MEL 群の抜歯窩周囲粘膜において M1 マクロファージが集積していることが明らかとなった。M1 マクロファージは, LPS やインターフェロン γ により活性化され, 炎症性サイトカインを産生し, 炎症を誘発する。ZA を投与したマウスや MEL と同じアルキル化剤の抗がん薬であるメクロレタミンを投与したラットにおいて, M1 マクロファージの発現が増加することが報告されており, 本研究で生じた ZA/DEX/MEL 群の骨露出も ZA と MEL により M1 マクロファージの高発現に起因する可能性が示唆された。

【結 論】

本研究では, ZA/DEX/MEL 投与群が骨露出と骨壊死を伴う MRONJ と考えられる病態を高頻度に呈した。また, 抜歯窩周囲粘膜への M1 マクロファージの集積が, 抜歯窩の創傷治癒を遅延させることで MRONJ の病態形成に関与している可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

各種骨吸収阻害薬が薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) の誘因となることが知られているが, 薬物間での病態の相違や発症メカニズムについては十分に解明されていない。本研究では, BP 製剤, 副腎皮質ステロイド薬および免疫抑制薬の併用投与による MRONJ 発症モデルマウスの作製を試みるとともに, MRONJ 発症時の病態を組織学的および形態計測学的に評価することにより, その発症メカニズムの一端を解明することを目的とした。

C57BL6/J マウス (8 週齢, 雌) を用いて, MRONJ 発症モデルマウスを作製した。投与薬剤によって Vehicle control (VC) 群 (n=8), 125 μg/kg Zoledronic acid 投与 (ZA) 群 (n=8), 125 μg/kg ZA+5 mg/kg Dexamethasone 投与 (ZA/DEX) 群 (n=11), 7 mg/kg Melphalan 投与 (MEL) 群 (n=9) および 125 μg/kg ZA+5 mg/kg DEX+7 mg/kg MEL 投与 (ZA/DEX/MEL) 群 (n=12) の 5 群を設定し, 投与開始から 4 週後に各群マウスの右側上顎前臼歯を抜歯, さらに 4 週間の薬剤投与後に屠殺し上顎骨を摘出した。抜歯後 4 週目の抜歯部位における肉眼的な骨露出頻度の評価, μ -CT による骨形態変化の解析および組織学的評価を行った。また F4/80, CD11c, CD163 の発現を指標として各種マクロファージの局在につき

検討した。

その結果、骨露出を伴う顎骨壊死の発症率は ZA/DEX/MEL 群で 58.3%、ZA/DEX 群で 9.1% であり、いずれにおいても空胞化した骨小腔を伴う骨壊死を広く認めた。ZA 群、MEL 群、骨露出を伴わない ZA/DEX 群および ZA/DEX/MEL 群では粘膜下に一部骨壊死が認められた。また ZA/DEX/MEL 投与群では VC 群、ZA/DEX 群と比較し、抜歯窩周囲粘膜に F4/80 陽性細胞と CD11c 陽性細胞の集積を認めた。このことから、M1 マクロファージの過剰集積による治癒機転の遅延が MRONJ の病態形成に関与している可能性が示唆された。

本研究は、MRONJ の発生機序の解明に有用な *in vivo* モデルの確立を行ったものであり、今後の歯科・口腔外科臨床において、MRONJ の予防や制御に繋がることが期待される。よって本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。