



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	薬剤関連顎骨壊死の発症における骨吸収抑制薬の休薬効果についてマウスを用いた検討
Author(s)	八幡, 大悟
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13879号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13879
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94485
Type	doctoral thesis
File Information	Daigo_Yahata.pdf



博士論文

薬剤関連顎骨壊死の発症における骨吸収抑制薬の 休薬効果についてマウスを用いた検討

令和2年3月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

八幡大悟

博士論文

薬剤関連顎骨壊死の発症における骨吸収抑制薬の 休薬効果についてマウスを用いた検討

令和2年3月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

八幡大悟

目 次

抄録	1 頁
緒言	2 頁
材料と方法	4 頁
結果	10 頁
考察	30 頁
まとめ	37 頁
謝辞	38 頁
利益相反	39 頁
引用文献	40 頁

抄 録

骨吸収抑制薬の副作用によって引き起こされる薬剤関連顎骨壊死（Medication-related Osteonecrosis of the Jaw: MRONJ）は、一旦発症すると重篤な症状を呈する疾患にも関わらず、その病態生理は不明なままであり、適切な対応法は確立されていない。特に、骨吸収抑制薬使用者に対する侵襲的歯科処置前の休薬についてはいまだにさまざまな議論が存在している。

本研究では、C57BL/6J 雌マウスに対して、ゾレドロン酸（Zoledronic Acid Hydrate: ZOL）およびメルファラン（Melphalan: MEL）を投与し、抜歯した。その結果、抑制性 T 細胞（Treg 細胞）が抑制され、 $\delta\gamma$ T 細胞が活性化されることで、顎骨露出を伴う MRONJ 様症状が引き起こされた。一方、1 ヶ月の休薬は、ZOL および MEL の薬理作用の減弱によって Treg 細胞と $\delta\gamma$ T 細胞の均衡状態を改善させ、MRONJ 様症状を軽減した。これらの知見は、MRONJ 様症状が免疫細胞の不均衡に基づく機序で発症する可能性を支持している。

以上の結果から、骨吸収抑制薬の休薬は、発症する MRONJ 様症状の軽減に一定の効果があることが示唆された。

緒 言

骨粗鬆症をはじめ、骨パジェット病、癌の骨転移、多発性骨髄腫、骨形成不全症などの骨疾患に広く用いられているビスフォスフォネート（Bisphosphonate: BP）製剤を使用している患者に特異的に発症する顎骨壊死（Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: BRONJ）は、2003 年に Marx によって報告された極めて難治性の疾患である¹⁾。さらに、BP 製剤とは全く違う薬理機序で作用するヒト型モノクローナル抗体製剤であるデノスマブ²⁾や、さらに血管新生阻害薬、あるいはチロシンキナーゼ阻害薬などの分子標的治療薬³⁾の投与を受けている症例においても ONJ が発生することが報告されるようになり、薬剤関連顎骨壊死（Medication-related ONJ: MRONJ）の名称を用いることが提唱されるに至っている⁴⁾。MRONJ は、一旦発症すると重篤な症状を呈するため、骨吸収抑制薬を使用している患者への対応は慎重を要する。現在、MRONJ に対する予防策と対応策は、少しずつ明らかになりつつあるが、いまだに統一された見解は確立していない。特に、骨吸収抑制薬使用者に対する侵襲的歯科処置前の休薬の是非についてはさまざまな議論が存在している。骨吸収抑制薬の休薬は、骨吸収抑制薬使用患者にとって QOL にも関わる重要な問題であるため、休薬の是非について明らかにすることは、臨床上の重要な課題である。

本研究では，MRONJ 様症状を発症するマウスを作製し，休薬の是非について検討を行った．

材料と方法

1. 動物実験モデルの作製および休薬の検討方法（図 1）

動物実験にあたっては北海道大学動物実験指針を遵守し北海道大学動物実験委員会承認（15-0015）を得て行った。

- (1) Vehicle control (VC) 群: 生後 8 週齢の C57BL/6J Jms Slc 雌マウス (Sankyo Labo Service Corporation, Tokyo, Japan) に対し, 生理食塩水 (Otsuka Pharmaceutical Co, Ltd, Tokyo, Japan) 200 μ l を週 2 回の頻度で 2 週にわたり腹腔内に投与した。4 回の生理食塩水投与完了後に, ペントバルビタール (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) による全身麻酔を行い, 上顎左側第一臼歯抜歯を行った。抜歯実施 2 週後に CO₂ ガスを用いて安楽死させた。
- (2) 非休薬群: 生後 8 週齢の C57BL/6J Jms Slc 雌マウスに対し, ゾメタ[®] (ZOL, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ, USA) (0.6 mg/kg) およびアルケラン[®] (MEL, Aspen, Durban, KZN, South Africa) (14.0 mg/kg) を週 2 回の頻度で 2 週にわたり腹腔内投与を行った。4 回の薬剤投与完了後に, ペントバルビタールによる全身麻酔を行い, 上顎左側第

一臼歯抜歯を行った。抜歯実施 2 週後に CO₂ ガスを用いて安楽死させた。

(3) 休薬群: 生後 8 週齢の C57BL/6J Jms Slc 雌マウスに対し, ZOL (0.6 mg/kg)

および MEL (14.0 mg/kg) を週 2 回の頻度で 2 週にわたり腹腔内投与を行った。4 回の薬剤投与完了後, 4 週間休薬を行ったのちに, ペントバルビタールによる全身麻酔を行い, 上顎左側第一臼歯抜歯を行った。抜歯実施 2 週後に CO₂ ガスを用いて安楽死させた。

2. 試料の観察

採取した上顎骨の抜歯窩を実体顕微鏡にて観察した。そのうち, 4%パラホルムアルデヒドに 3 日間浸漬固定を行い, 実験動物用 X 線 CT 装置 Latheta LCT200 (Hitachi, Ltd, Tokyo, Japan) で管電圧: 50 kV, ピクセルサイズ 24.0 μ m の条件で μ CT 撮影を行った。断層画像および 3D 画像は Latheta LCT200 標準付属のソフトウェアにて dicom 画像を出力し, OsiriX (Pixmeo SARL, Bernex, GE, Switzerland) にて作製した。 μ CT 撮影後に 5%ギ酸水溶液で 3 日間脱灰し, 通法に従ってアルコール脱水・パラフィン包埋を行った。4.5 μ m に薄切し連続切片を作製, 通法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E.染色) を行った。作製した切片を光学顕微鏡にて観察し, Image-Pro Premier (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) にて切片画像の取り込みを行った。切片画像の解析は

ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で行った. 5 個以上隣接して骨小腔内の骨細胞が喪失している範囲を顎骨壊死部と判定し, 連続切片上で最大の顎骨壊死面積を認める切片をその試料の最大顎骨壊死面積とし計測した.

3. FACS 分析

(1) 末梢血

眼底静脈叢よりヘパリンコートしたガラス毛细管を用いて採血した. 1X RBC Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にて溶血したのち, FITC anti-mouse CD3 (Biolegend, San Diego, CA, USA), PE/Cy7 anti-mouse CD4 (Biolegend), PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD8a (Biolegend), PE anti-mouse TCR γ/δ (Biolegend), APC anti-mouse/human CD45R/B220 (Biolegend) にて細胞表面抗原の多重染色を行った. Isotype Control として FITC Rat IgG2b, κ (Biolegend), PE/Cy7 Rat IgG2b, κ (Biolegend), Per/Cy5.5 Rat IgG2a, κ (Biolegend), PE Armenian Hamster IgG (Biolegend), APC Rat IgG2a, κ (Biolegend) を使用した. 染色した各サンプルは, FACSVerse™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて測定を行った. 測定結果は, FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA) にて分析を行った.

(2) 脾臓

脾臓を摘出後に切断し、直径 70 μm のセルストレーナー (Falcon, Corning, NY, USA) を使用してシングルセルサスペンションとした。1X RBC Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific) にて溶血したのち、FITC anti-mouse CD3 (Biolegend) , PE/Cy7 anti-mouse CD4 (Biolegend) , PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD8a (Biolegend) , APC anti-mouse CD25 (Biolegend) で細胞表面抗原の多重染色を行った。そののち、FOXP3/Transcription Factor Fixation & Permeabilization Buffer Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) にて細胞膜透過処置を行い、PE Rat anti-mouse FoxP3 (BD Biosciences) で細胞内染色を行った。Isotype Control として FITC Rat IgG2b, κ (Biolegend) , PE/Cy7 Rat IgG2b, κ (Biolegend) , Per/Cy5.5 Rat IgG2a, κ (Biolegend) , PE Rat IgG2b, κ (Biolegend) , APC Rat IgG1, λ (Biolegend) を使用した。染色した各サンプルは、FACSVerse™ (BD Biosciences) を用いて測定を行った。測定結果は、FlowJo (FlowJo, LLC) にて分析を行った。

4. 統計分析

各群間は、Statview (SAS Institute, Cray, NC, USA) を用いて多重比較検定による有意差検定を行った。

図1

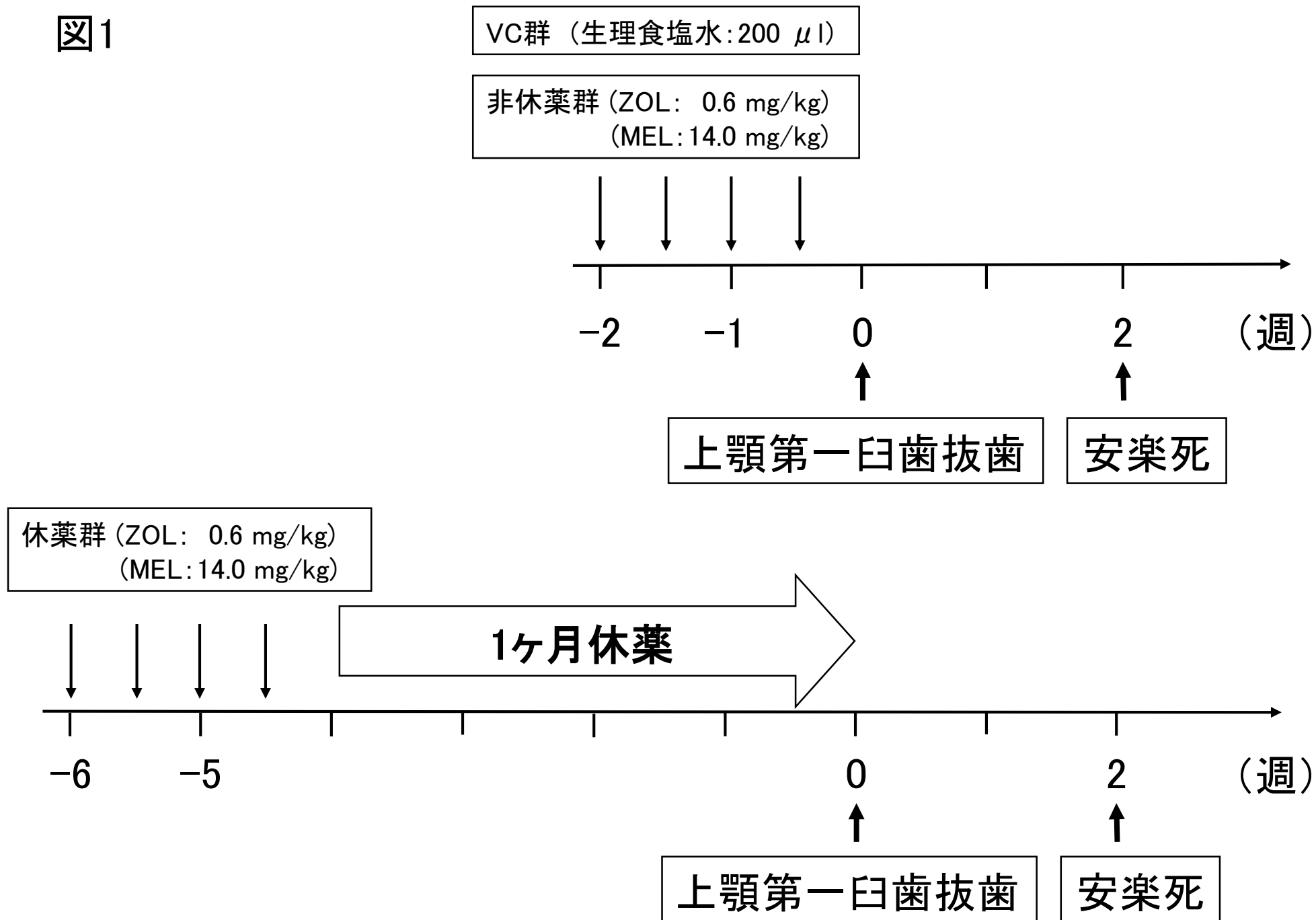


図1 実験プロトコール

マウスに，生理食塩水，ZOL・MEL を週 2 回の頻度で，2 週にわたり計 4 回腹腔内投与を行った．そののち，上顎左側第一臼歯を抜歯し，抜歯後 2 週に安楽死させ，各種分析を行った．休薬群は最終投与から 1 ヶ月の休薬期間を設けたのちに抜歯した．

結 果

1. 抜歯窩の肉眼的観察

VC 群では 5 匹中すべてのマウスにおいて、抜歯窩は口腔粘膜上皮で閉鎖されていた（図 2）。一方、非休薬群では、5 匹中 3 匹のマウスで、抜歯窩が口腔粘膜上皮で閉鎖されていたが、5 匹中 2 匹（40%）のマウスにおいて抜歯窩は閉鎖されず顎骨露出が認められた（図 2）。休薬群では 8 匹全てのマウスにおいて、口腔粘膜上皮での抜歯窩の閉鎖を認めた。また、顎骨露出面積を計測し、上顎右側第一臼歯咬合面観面積を 100%として顎骨露出面積率を計測した（図 3）。

2. μ CT による抜歯窩の観察

μ CT 撮影にて作成した断層画像および 3D 画像所見では、VC 群の抜歯窩は新生骨で満たされ、治癒経過が良好である事が確認された（図 4）。一方、非休薬群では抜歯窩の残存を認め、新生骨の添加を認めなかった。また、休薬群では VC 群に比べて新生骨の添加が少なく、治癒遅延が生じているが、非休薬群に比べて治癒経過は良好であった。

3. 抜歯窩の組織学的解析

H.E.染色による組織学的解析の結果、VC 群では、抜歯窩周囲の骨小腔内の骨細胞は残存していたのに対して、非休薬群では、抜歯窩周囲の骨小腔内の骨細胞は一部の範囲で消失していた（図 5）。休薬群においても、骨壊死の所見が認め

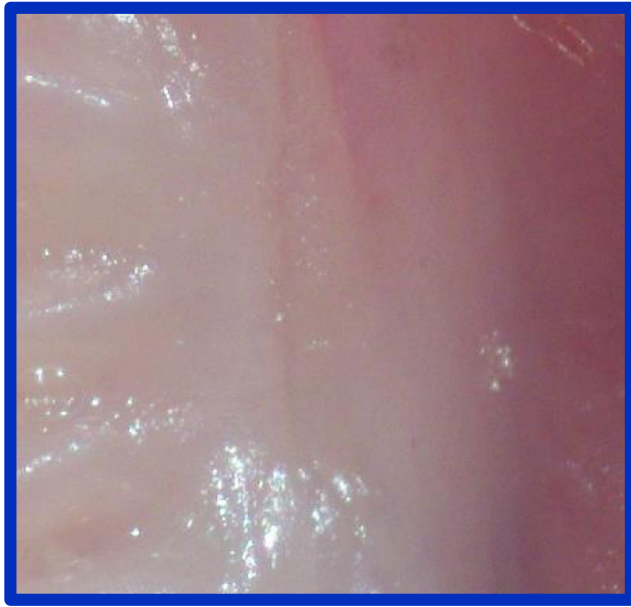
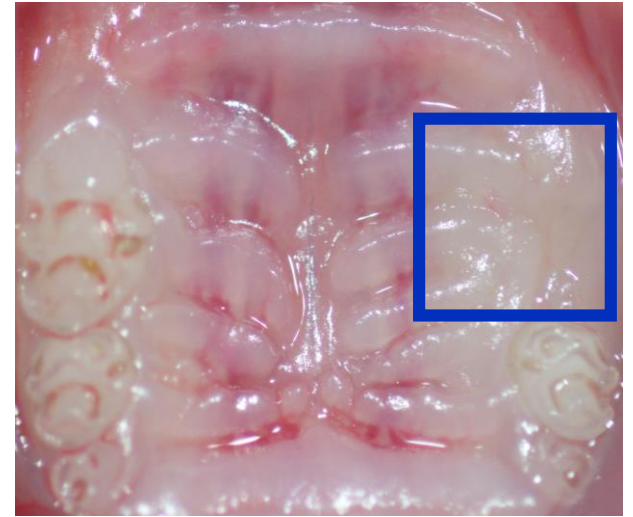
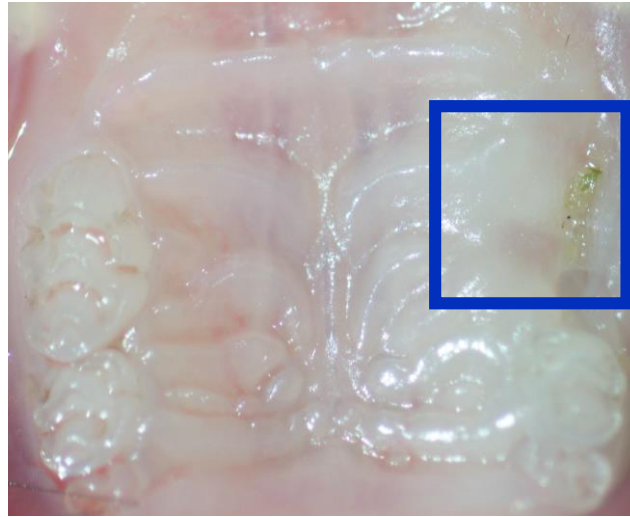
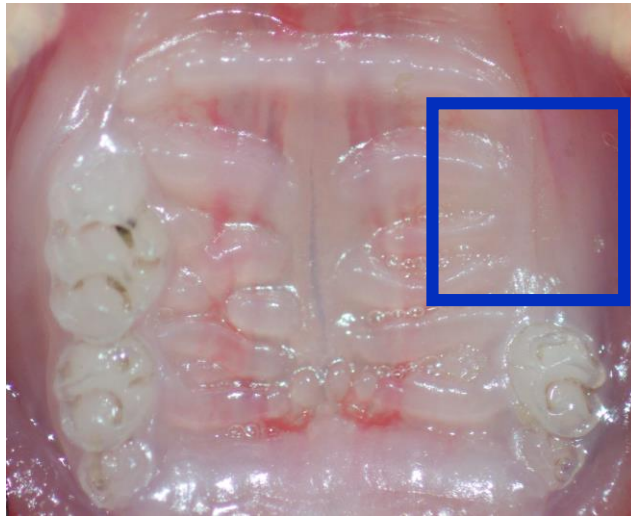
られたが、非休薬群と比べて、骨細胞が喪失している範囲は少なかった。さらに、最大顎骨壊死面積は、非休薬群では $(8.6 \pm 3.1) \times 10^4 \mu\text{m}^2$ であり、休薬群は $(4.5 \pm 2.5) \times 10^4 \mu\text{m}^2$ と約半分であった（図 6）。また、非休薬群において、抜歯窩が閉鎖したマウスと閉鎖しなかったマウスについて、最大顎骨壊死面積を比較したところ、有意差は確認されなかった。

4. 末梢血および脾臓の FACS 分析

末梢血の FACS 分析では $\gamma\delta\text{T}$ 細胞の数の変化を各群で比較した。 $\gamma\delta\text{T}$ 細胞数は VC 群では $0.4 \pm 0.2\%$ であったのに対し、非休薬群では $2.7 \pm 0.7\%$ と上昇を認め、休薬群では $1.0 \pm 0.7\%$ とわずかな上昇を認めた（図 7, 8）。

脾臓の FACS 分析では抑制性 T 細胞（Treg 細胞）の数の変化を各群で比較した。Treg 細胞数は、VC 群では $9.0 \pm 1.4\%$ であり、非休薬群では $5.8 \pm 1.9\%$ と有意に減少していた。また、休薬群は $9.0 \pm 2.2\%$ であり、VC 群との有意差は認めなかった（図 9, 10）。

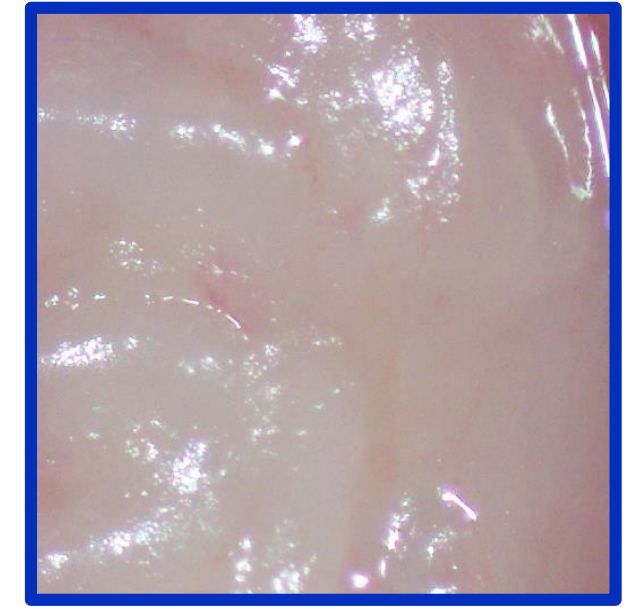
图2



VC群



非休薬群



休薬群

図 2 抜歯 2 週後の抜歯窩の状態

上段は弱拡大画像。

下段は強拡大画像。黄色破線は顎骨露出部を示す。

非休薬群において、5 匹中 2 匹で図のような顎骨露出を認めた。

図3

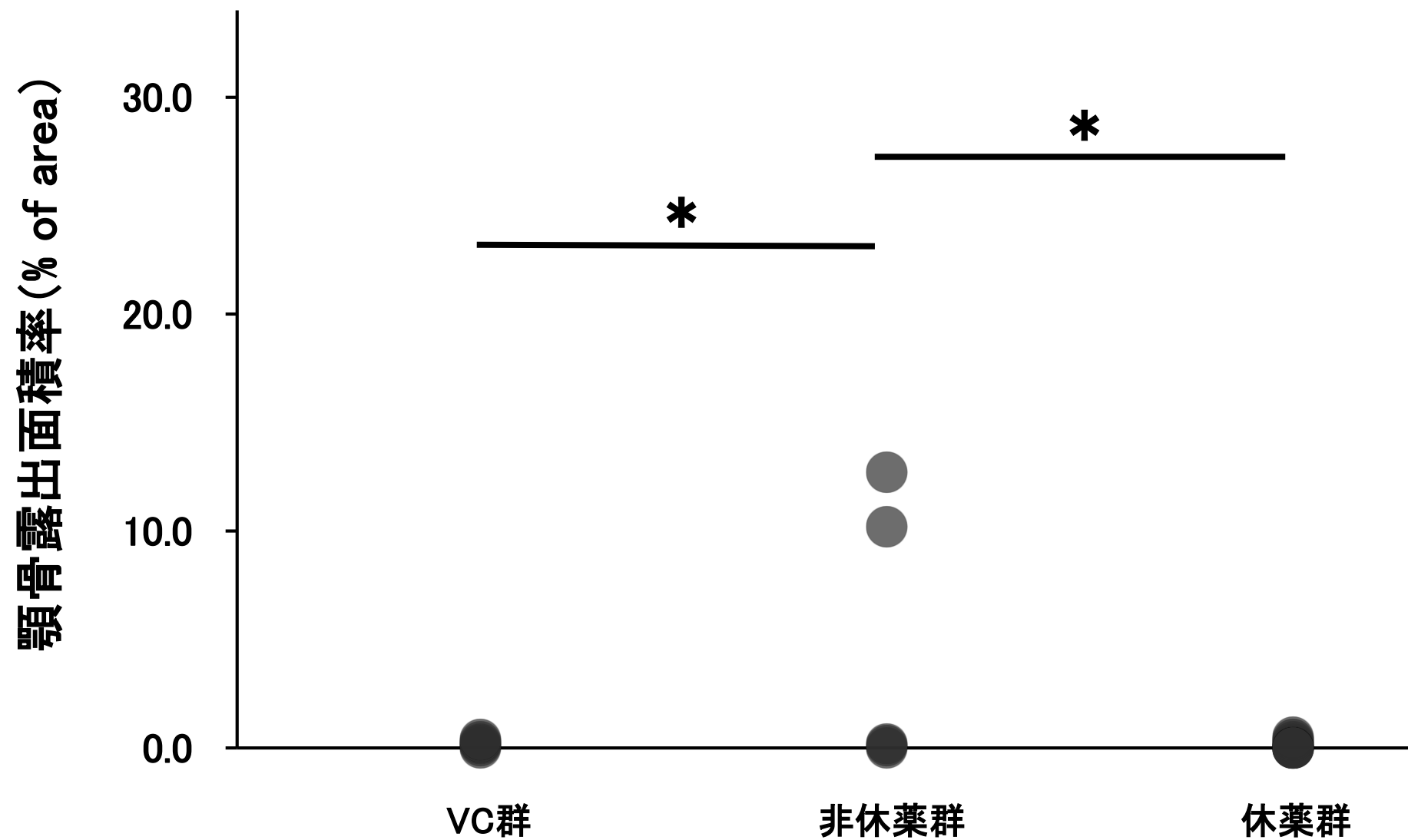
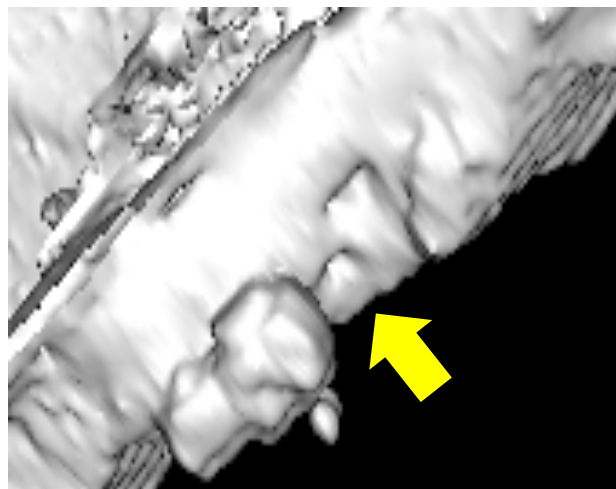
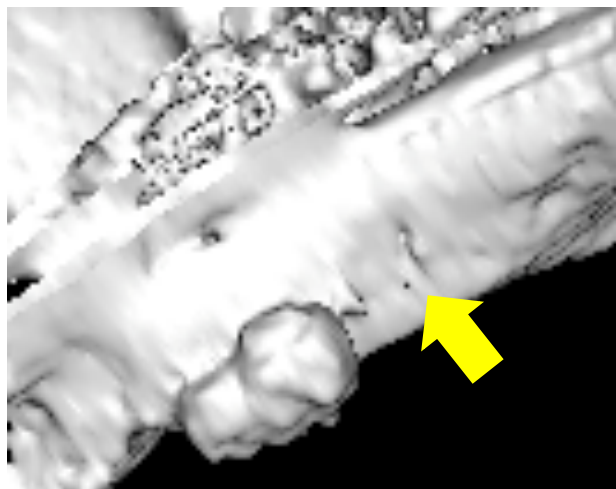
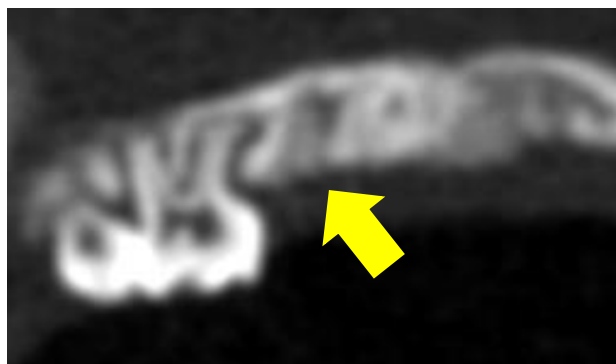


図 3 顎骨露出面積率

顎骨露出面積を計測し，上顎右側第一臼歯咬合面観面積を 100%として顎骨露出面積率を計測した．

有意差検定： $*P < 0.05$

图4



VC群

非休薬群

休薬群

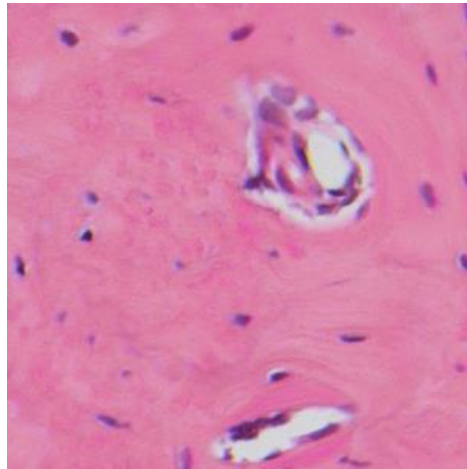
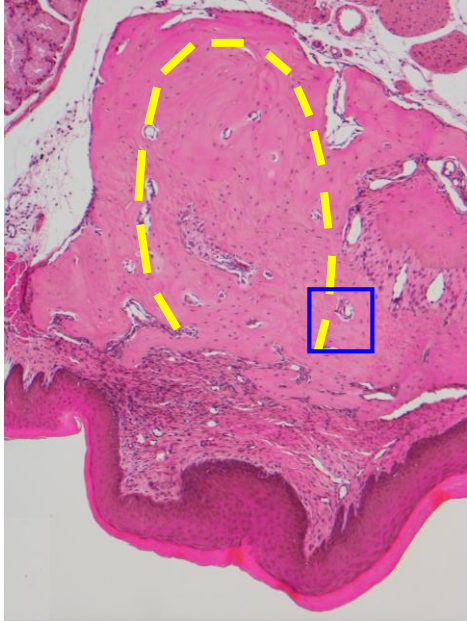
図 4 抜歯 2 週後の μ CT 画像

上段は断層画像.

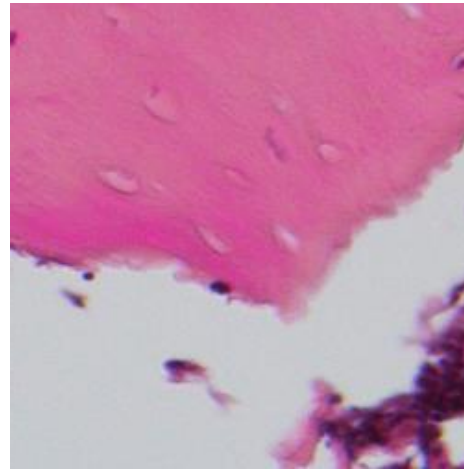
下段は 3DCT 画像.

黄色矢印は抜歯窩を示す.

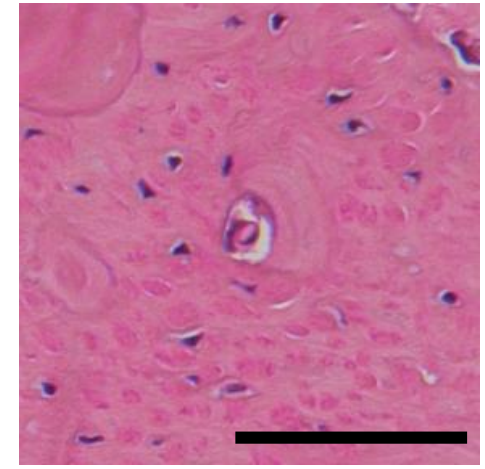
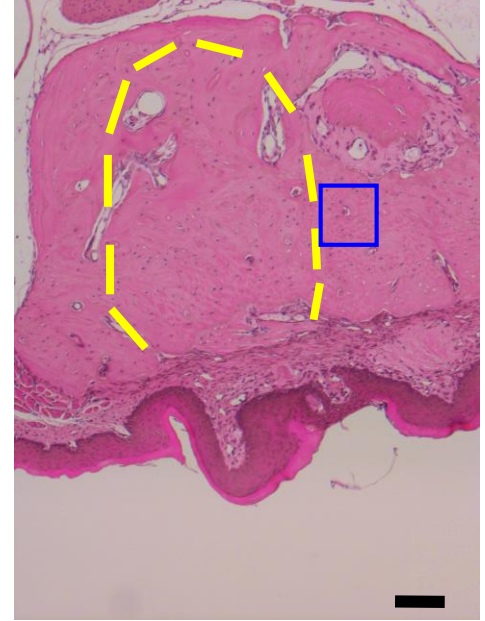
図5



VC群



非休薬群



休薬群

図 5 抜歯 2 週後の組織像 (H.E 染色)

上段は弱拡大. バー, 100 μm .

下段は強拡大. バー, 100 μm .

黄色破線は抜歯窩を示す. *は上皮の閉鎖不全を示す.

図6

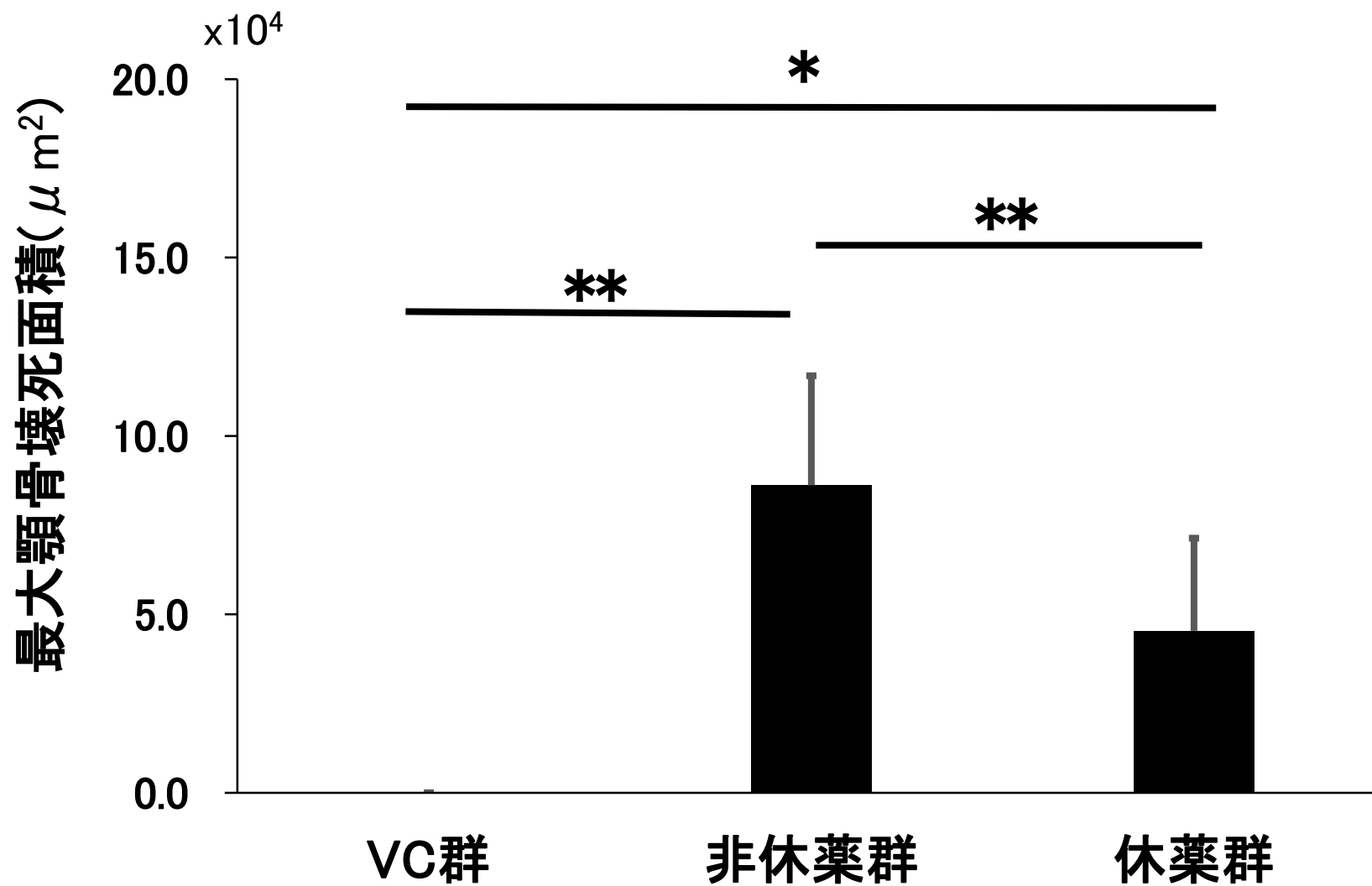


図 6 最大顎骨壊死面積

骨小腔内の骨細胞が喪失している範囲.

有意差検定： $*P < 0.05$, $**P < 0.001$

図7

ISO type

VC群

非休薬群

休薬群

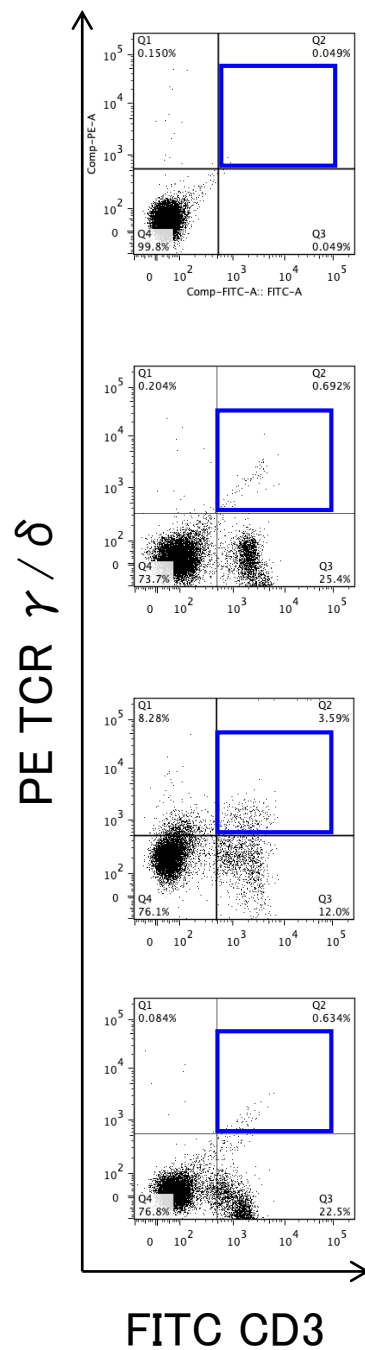
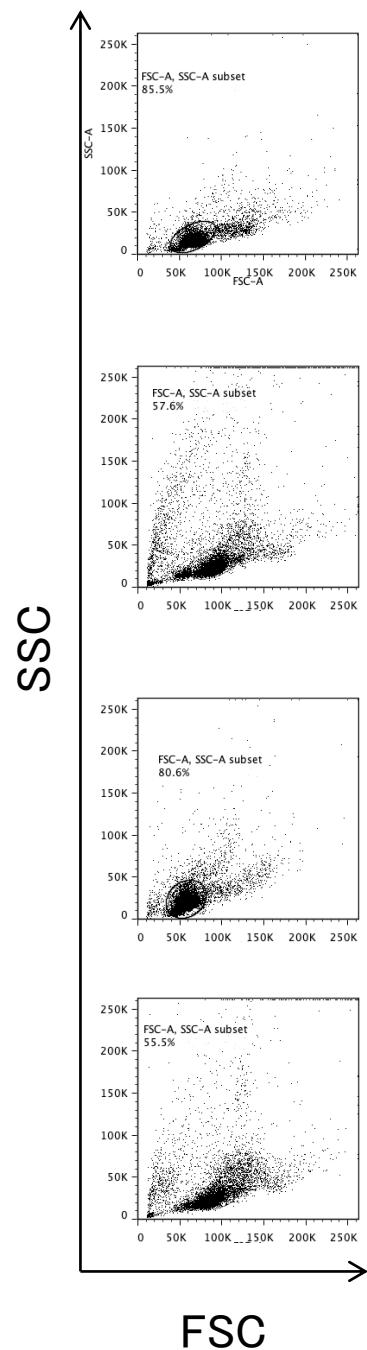


図 7 末梢血中の $\gamma\delta$ T 細胞の FACS 解析

図8

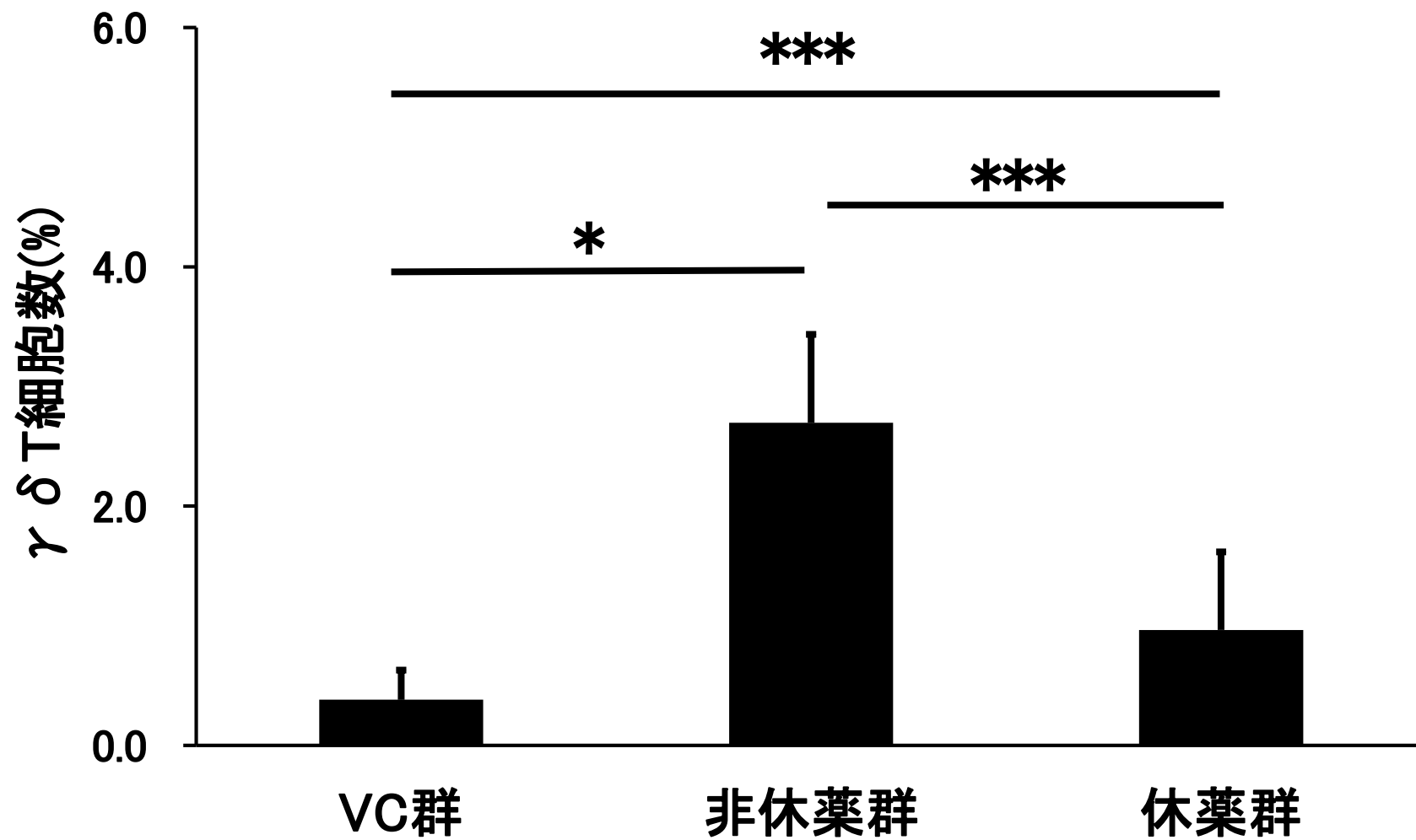


図 8 末梢血中の $\gamma\delta$ T 細胞数

有意差検定： $*P < 0.05$, $***P < 0.0005$

図9

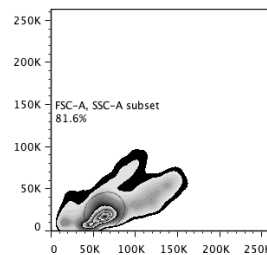
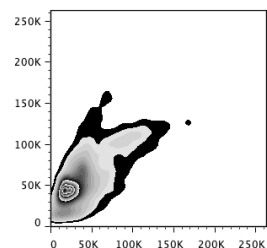
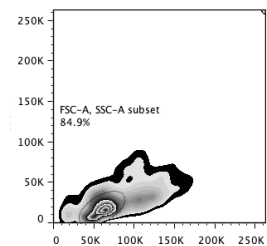
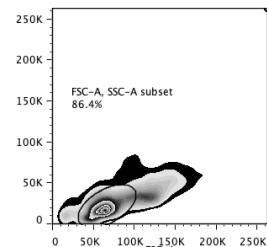
ISO type

VC群

非休薬群

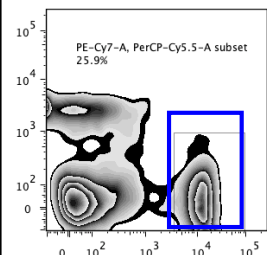
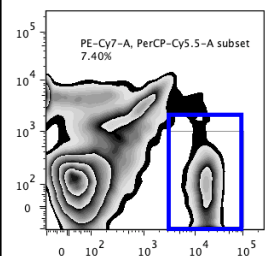
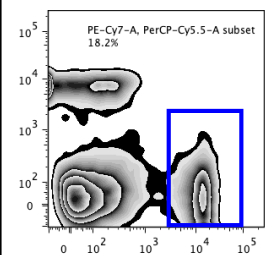
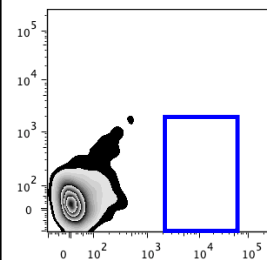
休薬群

SSC



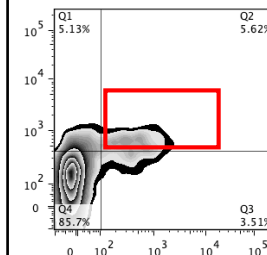
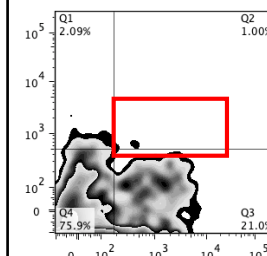
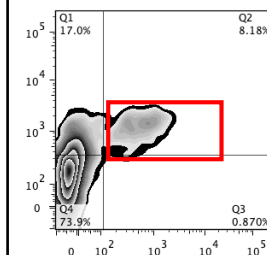
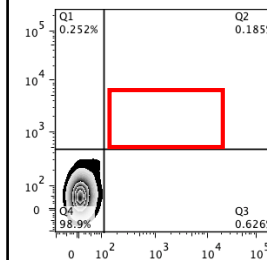
FSC

PerCP/Cy5.5 CD8a



PE/Cy7 CD4

PE FoxP3



APC CD25

図 9 脾臓中の Treg 細胞の FACS 解析

図10

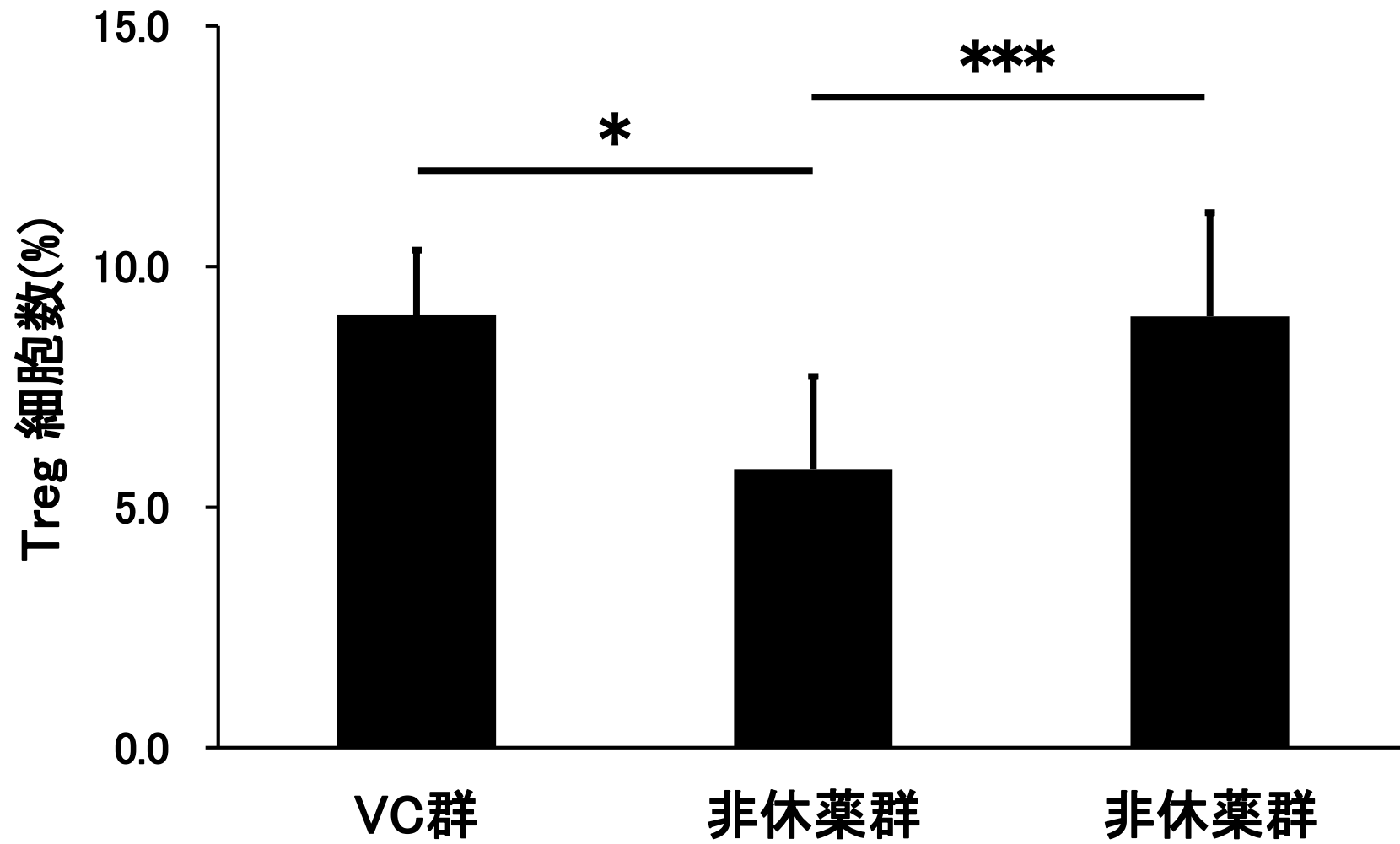


図 10 脾臓中の Treg 細胞数

有意差検定： $*P < 0.05$, $***P < 0.0005$

考 察

骨壊死は、何らかの原因により血液供給が途絶えたため骨に栄養が届かず、骨組織が局所的に壊死した状態を言う。その原因により外傷性骨壊死と非外傷性骨壊死に分けられ、一般には股関節における外傷性骨壊死が最も多く 60 歳以上の中高年の女性に多く発症している⁵⁾。また、股関節以外の部位で起こることはまれであるため⁵⁾、骨吸収抑制薬の副作用によって顎骨に引き起こされる MRONJ は、きわめて特異的な疾患と言える。MRONJ の患者数は、日本口腔外科学会の報告によると、2006～2008 年の全国調査で 263 例、2011～2013 年の全国調査で 4797 例と大幅に増加しており、今後さらに患者数の増加が予想される⁶⁾。また、MRONJ は、ステージによってその重症度は推移するが、疼痛や歯肉腫脹などから始まり、口腔粘膜の潰瘍、膿瘍または瘻孔の形成、顎骨の露出など極めて重篤な症状を呈する⁴⁾。これらの症状は一般的な菌性感染症においても観察されるが、MRONJ の場合は、治療に対して抵抗性であり、治癒が容易でないことが多い。そのため、歯科臨床において MRONJ の発症を未然に予防することは極めて重要である。MRONJ が報告された当初は、MRONJ 発症予防には、骨吸収抑制薬の使用開始前に抜歯などの外科処置を完了することや抜歯前の骨吸収抑制薬の休薬といった対応が推奨されていた。骨吸収抑制薬の使用予定の患

者に対して、事前に外科処置を完了することは重要であるが、すでに骨吸収抑制薬を使用している患者に対する休薬についてはさまざまな議論が存在している。本邦における5学会合同による顎骨壊死検討委員会が作成している2010年度版のポジションペーパー⁷⁾では、骨のリモデリングを考慮し3ヶ月間の休薬の必要性を推奨していた。しかし、2016年度の改定版⁴⁾では、侵襲的歯科治療前の休薬は積極的に支持する根拠に欠けるとし、休薬に対して否定的な見解を示しているが、休薬に対する明確な治療方針の言及は避けている。米国口腔顔面外科学会（American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons: AAOMS）の2007年版⁸⁾および2014年版⁹⁾のポジションペーパーでは、BP製剤の休薬期間は3ヶ月間から2ヶ月間と短縮された。これらの休薬についての指針の変遷は、長年にわたって蓄積された症例の解析によるものである。しかしながら、骨吸収抑制薬は骨折リスクを回避するために投与されている薬剤であり、骨吸収抑制薬の休薬は生命予後にも大きく影響を及ぼす骨折のリスク増加に繋がるため、骨吸収抑制薬使用患者に対する侵襲的外科処置前の休薬は必要ないと結論付けている症例報告が多く見受けられる。Hasegawaらは1175例のBP製剤投与患者の抜歯(2458歯)について調査したところ、3ヶ月休薬して抜歯した群でMRONJを発症した歯牙が25歯(25/2458=1.01%)、休薬せずに抜歯した群でMRONJを発症した歯牙が16歯(16/2458=0.65%)と、抜歯前のBP休薬はMRONJの発症率を低下さ

せなかったと報告している¹⁰⁾。しかし、これらの症例報告はいずれも後ろ向き研究の結果であり、休薬後に MRONJ を発症した症例においても、休薬によって MRONJ の症状が軽減されていた可能性も否定出来ない。そのため、休薬に関する症例報告の解釈については慎重に判断しなければならない。エビデンスに基づいた疾患の治療効果の確認には、疾患モデル動物を用いた検証法が有効であるため、われわれは、休薬の是非について MRONJ 様症状を発症するマウスを用いて検討を行った。

本研究では、野生型マウスに対して、MRONJ の原因となる代表的な薬剤である第3世代のBP製剤のZOLと化学療法薬であるMELを投与することでMRONJ様症状を発現させた。その結果、ZOLとMELを併用投与することで、約半数のマウスにおいて、MRONJの特徴的症状である、抜歯窩における顎骨露出が認められた(図2)。さらに、H.E.染色による組織学的観察では、上皮が閉鎖していたマウスも含めてすべてのマウスにおいて、抜歯窩周囲の歯槽骨で骨小腔内の骨細胞の消失という典型的なMRONJ様所見が確認された(図5)。ZOL単独投与群あるいはMEL単独投与群では、すべてのマウスの抜歯窩は閉鎖し、組織標本においてもMRONJの所見は認められなかった。今回、ZOLとMELを併用投与することで発症させたMRONJ様症状は、休薬の是非について検討するに適切なモデルであると思われる。

非休薬群では、約半数のマウスで顎骨が露出していたのに対し、休薬群では顎骨が露出したマウスはいなかった(図 3)。しかし、組織標本において、休薬群では、すべてのマウスで骨小腔内の骨細胞の消失という MRONJ 様所見が観察された。休薬群と非休薬群の最大顎骨壊死面積を比較すると、休薬群の方が有意に小さかった(図 6)。休薬群において、全てのマウスで上皮が閉鎖していた理由については、発症している骨壊死の範囲に起因している可能性が高いと思われるが、マウスでは上皮の治癒速度がヒトより迅速であり、さらに今回の実験では創傷治癒の速い 8 週齢以内の若齢マウスを実験対象に用いたことが影響していた可能性が考えられる。本研究のマウスにおける実験結果は、休薬の有効性を示すものであり、ヒトにおいても休薬によって発症する MRONJ 症状が緩和される可能性は否定出来ないと思われる。Kim らは、MRONJ 発症者に対して治療のために外科的処置前の休薬を行った患者の予後について調べたところ、12 名が良好な予後を示し、9 名の患者が MRONJ を再発したと報告している¹¹⁾。MRONJ 再発における危険因子との相関関係を調べたところ、唯一の危険因子は休薬期間であり、予後良好グループの患者の休薬期間が 8~12 ヶ月であったのに対し、予後不良グループの患者の休薬期間が 1.5~4 ヶ月であった¹¹⁾。彼らの報告は、すでに MORNJ を発症しているという high risk 患者を研究対象としているが、休薬期間が長い程 MRONJ の再発症率が低くなることを示している。

AAOMS は、顎骨露出は認めないが、歯牙動揺、麻痺、違和感や疼痛などを主症状とする状態をステージ 0 と定義している。Fedele らは、ステージ 0 は MRONJ 症例全体の 25~30% の割合で見られ、そのうち約半分の症例では顎骨露出を伴う状態に進展する可能性が高いと報告している¹²⁾。AAOMS のステージ分類は、あくまでも MRONJ の臨床症状を発症した症例を対象としているため、臨床症状を発症していないが組織学的には MRONJ の所見を有している症例が多数潜在的に存在している可能性は否定出来ないと思われる。ステージ 0 の患者では MRONJ の症状が進行する可能性が高いことを考えると、ステージ 0 における病理動体を明らかにすることの臨床的意義は大きいと考えられる。今回の実験において観察された、上皮が閉鎖しているにも関わらず組織学的には骨壊死を含有しているマウスは、AAOMS の定義でステージ 0 の症例に相当する可能性が高いと思われる。

MRONJ の発症機序については、いまだに不明であり、破骨細胞抑制による骨組織リモデリングの異常¹³⁾、血管新生の抑制による血流低下¹⁴⁾、免疫機能の低下¹⁵⁾、上皮細胞の増殖・遊走阻害¹⁶⁾、口腔内細菌による持続的な感染¹⁷⁾などのさまざまな仮説があげられている。本研究で MRONJ 様症状を発症しているマウスを解析したところ、末梢血においてリンパ球全体に対する $\gamma\delta$ T 細胞の比率が有意に高くなっていた (図 8)。さらに、脾臓における Treg 細胞数が有意に減

少していた (図 10). 成熟 T 細胞は, T 細胞受容体が α 鎖と β 鎖で構成される $\alpha\beta$ T 細胞と γ 鎖と δ 鎖で構成される $\gamma\delta$ T 細胞の 2 群に分けられ, 末梢血中では $\alpha\beta$ T 細胞が大多数を占めるのに対し, $\gamma\delta$ T 細胞は, 全 T 細胞の 1~5%と割合はわずかであるが, 感染早期の防御機構に関わり, 活性化した $\gamma\delta$ T 細胞は細胞傷害性を示すことが知られている¹⁸⁾. また, $\gamma\delta$ T 細胞は, ZOL によって増殖, 活性化することが報告されている¹⁹⁾. 一方, Treg 細胞は, 過剰な免疫反応を抑制し, 免疫応答の恒常性維持の役割を果たしている²⁰⁾. 本実験において MRONJ 様症状の発現は, MEL の骨髄抑制によって Treg 細胞が減少し, さらに ZOL によって $\gamma\delta$ T 細胞が活性化したことの双方の作用が強く関わっているものと推測される. つまり, ZOL の影響で $\gamma\delta$ T 細胞が活性化した状況で抜歯を行ったことで, $\gamma\delta$ T 細胞による過剰な免疫反応が亢進, 活性化した $\gamma\delta$ T 細胞を抑制する Treg 細胞が MEL の影響で減弱しているため, 制御を失った $\gamma\delta$ T 細胞による過剰な免疫反応を引き起こし, 抜歯窩周囲の骨組織が傷害を受けることによって MRONJ 様症状が引き起こされたものと推測される. 実際に, 休薬群において, 骨細胞の喪失範囲が小さいマウスでは, Treg 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞との比率が正常のマウスに近い状態であった. 本研究結果から導き出した MRONJ 発症の仮説から, 休薬群における MRONJ 様症状の軽減は, 休薬によって ZOL と MEL の薬理的作用が緩和したことにより起因したものと推測される. また, 休薬は MRONJ 様症状に対して

軽減効果を示すが、発症そのものは抑制できなかった。そのため、骨吸収抑制薬を使用しているすべての患者に対して休薬が適切な対応法とは言えないが、MRONJ 発症リスクと骨折予防のベネフィットを正確に評価し、休薬を検討する価値はあると思われる。また、ヒトにおける MRONJ の発症機序が、本研究におけるマウスと同様の機序によって引き起こされている可能性があり、骨吸収抑制薬使用者に対して Treg 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞との均衡性を評価することで、MRONJ の発症リスクを事前に評価することが可能と思われる。

ま と め

C57BL/6J Jms SIc 雌マウスに ZOL および MEL を投与し，抜歯したところ，Treg 細胞の機能抑制と $\gamma\delta$ T 細胞の活性化を引き起し，顎骨の露出を伴う MRONJ 様症状が発症した．一方，休薬による ZOL および MEL の薬理作用の減弱は，Treg 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞の均衡状態を改善し，MRONJ 様症状を軽減した．

骨吸収抑制薬の休薬は，MRONJ 様症状の軽減に一定の効果があることが示唆された．

謝 辞

本稿を終えるにあたり数々のご援助，ご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究院口腔顎顔面外科学教室，薬理学教室および学術支援部の教室員各位に厚く御礼申し上げます．

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

参考文献

- 1) Marx RE: Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg. 2003 Sep;61(9):1115-1117.
- 2) Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, Diel IJ, Takahashi S, Shore N, Henry DH, Barrios CH, Facon T, Senecal F, Fizazi K, Zhou L: Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. Ann Oncol. 2012 May;23(5):1341-1347.
- 3) Hellstein JW, Adler RA, Edwards B, Jacobsen PL, Kalmar JR, Koka S, Migliorati CA, Ristic H: American Dental Association Council on Scientific Affairs ExpertPanel on Antiresorptive Agents: Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. J Am Dent Assoc. 2011 Nov;142(11):1243-1251.
- 4) 米田俊之，萩野浩，杉本利嗣，太田博明，高橋俊二，宗圓聰，田口明，永田俊彦，浦出雅裕，柴原孝彦，豊澤悟：骨吸収抑制薬剤関連顎骨壊死の病態

と管理：顎骨壊死検討委員会ポジションペーパー 2016：2016.

http://www.perio.jp/file/news/info_160926.pdf. (2019.11.26 アクセス).

5) 中村利孝，松野丈夫，井樋栄二，吉川秀樹，津村弘：標準整形外科学. 286-287，医学書院，東京，2017.

6) 日本口腔外科学会：BRONJ 治療に関する実態調査.

[https://www.jsoms.or.jp/medical/wp-](https://www.jsoms.or.jp/medical/wp-content/uploads/2016/06/bronj_jsoms_201512.pdf)

[content/uploads/2016/06/bronj_jsoms_201512.pdf](https://www.jsoms.or.jp/medical/wp-content/uploads/2016/06/bronj_jsoms_201512.pdf). (2019.11.26 アクセス)

7) 米田俊之，萩野浩，杉本利嗣，太田博明，高橋俊二，宗圓聰，田口明，豊澤悟，永田俊彦，浦出雅裕：ビスフォスフォネート関連顎骨壊死に対するポジションペーパー（改定追補 2012 年版）：2012.

<http://jsbmr.umin.jp/guide/pdf/bronjpositionpaper2012.pdf>. (2019.11.26 アクセス)

8) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. J Oral Maxillofac Surg. 2007 Mar;65(3):369-376.

9) Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O'Ryan F: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. J Oral Maxillofac Surg. 2014 Oct;72(10):1938-1956.

- 10) Hasegawa T, Kawakita A, Ueda N: A multicenter retrospective study of the risk factors associated with medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients receiving oral bisphosphonate therapy: can primary wound closure and a drug holiday really prevent MRONJ? *Osteoporos Int.* 2017 Aug;28(8):2465-2473.
- 11) Kim YH, Lee HK, Song SI, Lee JK: Drug holiday as a prognostic factor of medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2014 Oct;40(5):206-210.
- 12) Fedele S, Porter SR, D'Aiuto F, Aljohani S, Vescovi P, Manfredi M, Arduino PG, Broccoletti R, Musciotto A, Di Fede O, Lazarovici TS, Campisi G, Yarom N: Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *Am J Med.* 2010 Nov;123(11):1060-1064.
- 13) Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, Li Y: Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006 Dec;288(12):1243-1249.
- 14) Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Shimizu S, Ogata S, Sakata M, Tasaka K, Kimura T: Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007

Mar;354(2):478-484.

- 15) Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, Chen C, Chen W, Wang S, Le AD, Shi S: Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1668-1679.
- 16) Reid IR, Bolland MJ, Grey AB: Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone.* 2007 Sep;41(3):318-320.
- 17) Allen MR: Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: Basic and Translational Science Updates. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2015 Nov;27(4):497-508.
- 18) Akitsu A, Ishigame H, Kakuta S, Chung SH, Ikeda S, Shimizu K, Kubo S, Liu Y, Umemura M, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Saijo S, Iwakura Y: IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2(+)V γ 6(+) $\gamma\delta$ T cells. *Nat Commun.* 2015 Jun;6:7464.
- 19) Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Roberts A, Buccheri S, D'Asaro M, Gebbia N, Salerno A, Eberl M, Hayday AC: Targeting human $\gamma\delta$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007 Aug;67(15):7450-7457.
- 20) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance

maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).

Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug;155(3):1151-1164.