

原著論文 サリドマイドとボルテゾミブの投与は腫瘍の
血管新生を抑制するが抜歯窩治癒には影響しない

福岡歯科大学咬合修復学講座冠橋義歯学分野

藤 本 啓 貴

Combined administration of thalidomide and
bortezomib suppresses angiogenesis in tumors but
has no negative impact on tooth extraction socket healing

Hiroki FUJIMOTO

Division of Fixed prosthodontics, Department of Oral Rehabilitation, Fukuoka Dental College

Key words : Antiangiogenesis, Thalidomide, Osteonecrosis of the jaw

Abstract : It has been hypothesized that the use of antiangiogenic agents increases the risk of MRONJ (medication-related osteonecrosis of the jaws). However, impact of antiangiogenic medications on the development and pathogenesis of MRONJ is unclear. The purpose of this study was to determine the effect of antiangiogenic medications on tooth extraction wound healing. B16F10 melanoma cells were inoculated into mice to induce solid tumors. These mice received the combination therapy of thalidomide/bortezomib/zoledronate. The anti-tumor effect of the medications was evaluated by tumor growth. The antiangiogenic property of the medications was assessed by the flow cytometric analysis of circulating endothelial progenitors and the immunohistochemical staining of blood vessels in tumors. The effects of the medications in healing of tooth extraction sockets were assessed by the histologic, microcomputed tomographic, and immunohistochemical analyses of tooth extraction wounds. It was found that the combination therapy significantly suppressed the numbers of circulating endothelial progenitors, blood vessels in tumors, and overall tumor growth. However, those medications had no effect on tooth extraction wound healing. No differences were found in bone fill in the sockets and blood vessel numbers in tooth extraction wounds between control and the experimental groups at week-4. Thus, the combination therapy of thalidomide/bortezomib/zoledronate suppressed tumor growth by restraining angiogenesis but no negative effects on angiogenesis during tooth extraction socket healing. The findings of this study suggest that antiangiogenesis may not play a critical role in the development and pathogenesis of MRONJ.

緒 言

近年、ボルテゾミブ (Velcade, 富士フイルム和光純薬株式会社), サリドマイド (Thalidomide, 富士フイルム和光純薬株式会社), ゴレドロネート (Zometa, ノバルティスファーマ株式会社) の併用が骨髄形質細胞の癌である多発性骨髄腫の治療に使用され成果をあげている¹⁾。一方, 多発性骨髄腫で加療中のコホートでは顎骨壊死を起こすリスクが高いこともわかっている。ボルテゾミブはプロテアソーム阻害因子で細胞死を誘導, サリドマイドは血管新生を抑制, ゴレドロネートは骨吸収を強く抑制する。このように, 抗癌剤の多くは血管新生抑制作用や細胞増殖阻害作用を持ち, 薬剤は腫瘍だけでなく健常組織にも少なからず影響を与えられられる。血管新生は創傷治癒に不可欠なイベントであり, 腫瘍の成長と転移においても大きな役割を果たすので²⁾, 血管新生の選択的阻害は腫瘍の増殖を抑制すると考えられる。実際, 血管内皮増殖因子 (VEGF: vascular endothelial growth factor) を標的とする抗血管新生薬 (ベバシズマブまたはチロシンキナーゼ阻害剤) は悪性腫瘍の治療に応用されている。

サリドマイドは, VEGF と塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF: basic fibroblast growth factor) 経路を阻害し強力に血管新生を抑制する³⁾。このため, サリドマイドを妊婦に使用すると重度の新生児四肢先天性欠損症を引き起こす。サリドマイドを多発性骨髄腫患者に投与すると血管内皮前駆細胞 (EPCs: endothelial progenitor cells) は減少し, 骨髄内微小血管の密度が低下する⁴⁾。その強力な血管新生抑制作用により, サリドマイドは, ボルテゾミブまたはデキサメサゾンと併用することで, 多発性骨髄腫の新規治療薬として近年注目を集めている。

薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ: medication-related osteonecrosis of the jaws) は稀な歯槽堤壊死症であるが, ヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体 (デノスマブ) や窒素含有ビスフォスフォネート (N-BP: nitrogen-containing bisphosphonate) の使用に関連して発症することが判明している⁵⁾。MRONJ が発症すると難治性であり, 骨壊死が広範囲にわたる場合は骨切除術が必要になる。MRONJ の詳しい発症メカニズムはいまだ解明されていないが, 一つの仮説として, 薬剤による血管新生抑制が創傷治癒不全を引き起こし顎骨壊死に至るといえるものがある⁶⁾。この仮説は, N-BP 自体が血管新生抑制作用を有すること^{7,8)}, 血管新生抑制剤と N-BP を併用

して投与すると, N-BP 単体の投与を受けている患者よりも MRONJ の発生率が高くなること, さらには, N-BP 治療を受けず血管新生抑制剤の投与のみを受けている患者に顎骨壊死が発症したという報告を根拠としている^{9,10)}。しかしながら, MRONJ 発症と強い関連があると判明しているデノスマブは血管新生抑制作用を有していない^{11,12)}。このことは, 血管新生抑制が MRONJ 発症に必要な不可欠なものではないことを示している。創傷治癒において血管新生は不可欠なものである。しかし, 線維性癒痕 (ケロイド) の形成が活発な血管新生と関連しているという報告もある^{13,14)}。動物を用いた創傷治癒の実験では, 血管新生を減少させることによってケロイド形成を抑制し, 理想的な組織再生治癒が達成できたとの報告もある¹⁵⁾。これらのことは, 健常体の創傷治癒時血管新生は, 理想的な組織再生にはむしろ強すぎ, 血管新生を適度にコントロールすることで理想的な組織再生・修復が達成できる可能性があることを示している。悪性腫瘍の治療に承認されている血管新生抑制剤は腫瘍をターゲットにしており, 通常の創傷治癒においては最小限の影響, あるいは, 影響を全く与えないのが理想である。しかしながら, 抗癌剤である血管新生抑制剤が, 通常の創傷治癒, とくに抜歯窩の治癒に与える影響についてはよくわかっていない。そこで本研究では, プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ, 血管新生抑制剤サリドマイド, 骨吸収抑制剤ゴレドロネートが, 腫瘍組織と健常な抜歯窩治癒に与える影響を検討した。

材料と方法

実験計画承認

本動物実験は, 福岡歯科大学動物実験委員会の承認を受け (#17015), ARRIVE ガイドラインに準拠し実施された。

動物

42匹の雌性 C57BL/6 Njcl マウス (6~7 週齢) を九動株式会社 (福岡) より購入し実験に使用した。マウスは12時間毎の明/暗サイクルをもち室温 23 ± 1 °C に制御した動物部屋で飼育し, 標準マウス餌と水に自由にアクセスできるようにした。

腫瘍細胞皮下接種

B16F10メラノーマ細胞 (JCRB1465) を 5% CO₂ 下, 37°C で培養した。培養液には10%牛胎児血清 (GIBCO),

1%ペニシリン、1%ストレプトマイシン含有のRPMI 1640 (GIBCO) を用いた。3日培養後、 1.0×10^5 のメラノーマ細胞を50 μ Lの生理食塩水に混ぜ、マウスの背皮下にゆっくりと接種した。全部で21匹のマウスに接種した。

ボルテゾミブ、サリドマイド、ゾレドロネート

腫瘍細胞接種を受けた21匹のマウスを、ボルテゾミブとサリドマイドの組み合わせ (VT投与群)、ボルテゾミブとサリドマイドとゾレドロネート3つの組み合わせ (VTZ投与群)、生理食塩水 (CL投与群) の3グループに均等・無作為に分けた。サリドマイド (富士フィルム和光純薬株式会社) は200mg/kgを週5回強制経口投与し¹⁶⁾、ボルテゾミブ (富士フィルム和光純薬株式会社) は毎週0.7mg/kgで腹腔内投与¹⁷⁾、ゾレドロネート (ノバルティスファーマ株式会社) は0.05mg/kgで週2回皮下投与を行った¹⁸⁾。薬剤の投与は腫瘍細胞皮下接種と同時に開始し15日間行った。

フローサイトメトリー

15日後にイソフルラン吸入麻酔下で、心臓穿刺により血液を採取することによってマウスを安楽死させ腫瘍を取り出した。血液サンプルは、ACKバッファー (155 mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 0.1mM EDTA, pH 7.2) で赤血球溶解を行い、有核細胞を分離した。血管内皮前駆細胞 (EPC) の染色には抗マウス CD31-FITC (11031185, クローン390, eBioscience) と CD309-APC (17582181, クローン Avas12a1, eBioscience) の組み合わせを用い、 1×10^6 の細胞を染色した。アイソタイプコントロールには FITC, APC 結合 IgG を使用した。細胞分析は、BD FACSVerser (BD Biosciences) で行った。

抜 歯

残り21匹のマウスを無作為に3グループにわけ、VT, VTZ, CLの投与を開始した。3週後、イソフルラン吸入麻酔下で両側上顎第一大臼歯を歯科用エクスポローラーで抜歯し、7週後に炭酸ガス過剰投与によってマウスを安楽死させた。解剖後、上顎骨と脛骨を4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した。

抜歯窩粘膜上皮の治癒観察

上顎第一大臼歯の抜歯後、粘膜上皮の治癒状態を毎週写真撮影し観察した。写真撮影はイソフルランチャン

バー内で全身麻酔下において行われた。写真上で抜歯窩粘膜上皮組織が治癒していない部分の範囲を Image-Pro Premier (Media Cybernetics, Inc.) で組織形態計測学的に分析し、粘膜上皮治癒不全面積 (mm^2) を定量した。

マイクロコンピューター断層撮影 (μ CT)

抜歯後、抜歯窩の骨治癒を *in vivo* μ CT システム (SkyScan 1176, Bruker Corp.) で毎週断層撮影を行い評価した。スキャンはイソフルラン吸入麻酔下で、エネルギーレベル45kV, 18 μ m ボクセル分解能でおこなった。安楽死後に固定した脛骨と上顎骨は9 μ m のボクセル分解能でスキャンした。脛骨の測定部位 (ROI: region of interest) は、近位部の成長板から90 μ m 遠位で始まり遠位方向に2.7mmにわたる領域で、皮質骨は除外した。上顎骨では、抜歯窩ソケットを手動輪郭法で抽出し、CTAn ソフトウェア (Bruker Corp.) を用いて分析した。

染 色

上顎骨と脛骨は14%エチレンジアミン四酢酸で脱灰後、パラフィン包埋し組織切片を作製した。4%PFAで固定した腫瘍もパラフィン包埋し組織切片を作製した。これらの切片をヘマトキシリンエオジン (HE: hematoxylin eosin) 染色および酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase) で染色した。TRAP染色には、50mM 酒石酸ナトリウム二水和物, 100mM 酢酸ナトリウム, 0.05%ナフトール ASMX リン酸二ナトリウム, 0.05%Fast Red Violet (すべてSigma-Aldrich) を用い、HEで対比染色した。血管の検出にはフォン・ヴィレブランド因子 (vWF: von Willebrand factor) の免疫染色を間接法で行った。組織切片を再水和後、vWF抗体 (ab6994, Abcam) で抗原抗体反応を行い、リンス後、西洋ワサビペロキシダーゼ (HRP) 酵素標識二次抗体 (ab6721, Abcam) を用い、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) を使用してvWF (+) 細胞を発色させた。染色切片は光学顕微鏡で観察し、Image-Pro Premier (Media Cybernetics, Inc.) で組織形態計測学的に分析した。破骨細胞数 (#/mm), vWF (+) 血管密度 (#/mm²) を定量した。

統計

すべてのデータはシャピロ-ウィルク正規性検定を行い分散の同等性を調べた。データがパラメトリック分布の場合、複数グループの一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、事後検定にテューキーテストを用いた。データがノンパラメトリック分布の場合、クラスカル・ウォリス検定を行った。統計分析には SYSTAT12 (Systat Software, Inc.) を使用した。結果の図では平均値±標準偏差を用い、 p 値 <0.05 で統計的有意差があると考えた。

結果

1) ボルテゾミブとサリドマイドの混合投与で血中血管内皮前駆細胞数は減少した

血中の有核細胞をフローサイトメーターで分析した結果 (Fig. 1A), サリドマイドとボルテゾミブの混合投与 (VT) グループでは CD31 (+) CD309 (+) EPC の数がコントロール (CL) に比べて有意に減少した (Fig. 1B)。VT にゾレドロネート (ZA) を追加投与しても EPC 数には影響を与えなかった (Fig. 1B)。

2) ボルテゾミブとサリドマイドの混合投与は腫瘍の成長を抑制した

B16F10細胞の皮下接種から15日後の腫瘍の組織切片の HE 染色では、VT や VTZ グループに比べて、CL グループに顕著なメラニン顆粒を有する腫瘍細胞を認めた

(Fig. 2A 上段)。vWF の免疫染色の結果を Fig. 2A 中段と下段、Fig. 2B に示す。vWF (+) の環状構造を組織形態学的に定量したところ、vWF (+) 血管密度は VT と VTZ グループで、コントロールに比べて有意に小さな値を示した (Fig. 2B)。腫瘍の大きさはコントロールに比べて VT グループでは有意に小さく、腫瘍の成長抑制が認められた (Figs. 2C, 2D)。VT にゾレドロネート (ZA) を追加投与しても腫瘍の成長には影響を与えなかった。

3) ボルテゾミブとサリドマイドの混合投与は長管骨の代謝には影響を与えない

薬剤の長期投与が長管骨の海綿骨に与える影響を近位脛骨で評価した。Fig. 3A は近位脛骨組織切片の HE 染色顕微鏡写真である。組織形態計測法を用いて骨面積を分析すると、VT グループとコントロールでは二次的な海綿骨量に差は認められなかったが、VTZ グループの海綿骨量はコントロールに比べて有意に大きかった (Fig. 3D)。破骨細胞数もコントロールと VT グループで大きな差は認められなかった (Figs. 3B, 3E)。しかしながら、VTZ グループの破骨細胞数はコントロールに比べて有意に少なかった (Figs. 3B, 3E)。薬剤が近位脛骨の骨量に与える影響を μ CT を用いて3次的に定量した (Fig. 3C)。コントロールと VT グループで骨量に差は認められなかったが、VTZ グループは有意に大きい骨量値を示した (Fig. 3F)。

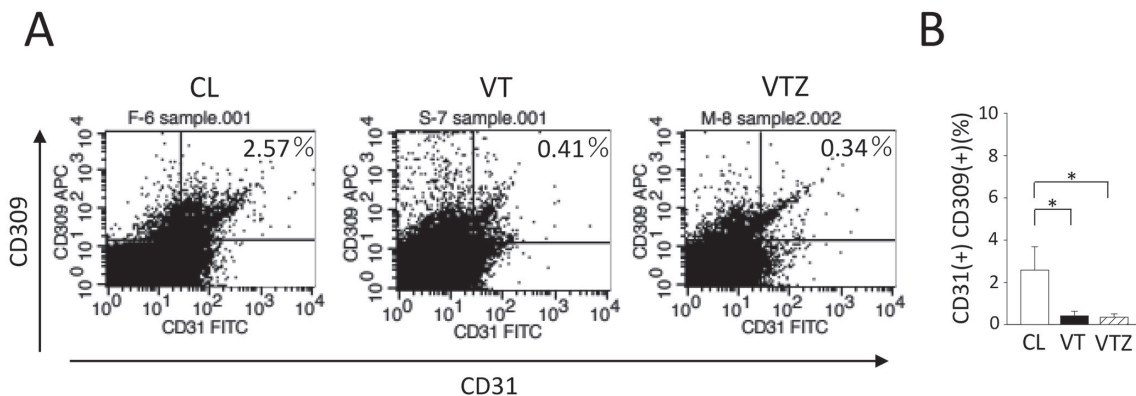


Fig. 1 薬剤が血管内皮前駆細胞数に与える影響

血中の血管内皮前駆細胞の CD309 と CD31 に標識をつけ、フローサイトメーターで細胞分析を行った。CL: コントロール群, VT: ボルテゾミブとサリドマイド投与群, VTZ: ボルテゾミブとサリドマイドとゾレドロネート投与群。A: フローサイトメーターによる血管内皮前駆細胞の代表的な分布。右上コーナーの分画が CD31 (+) CD309 (+) 血管内皮前駆細胞。B: 各グループの血中 CD31 (+) CD309 (+) 血管内皮前駆細胞比率を棒グラフで示した。平均値±標準偏差。1元配置の分散分析をおこなった。*: $p < 0.05$ 。

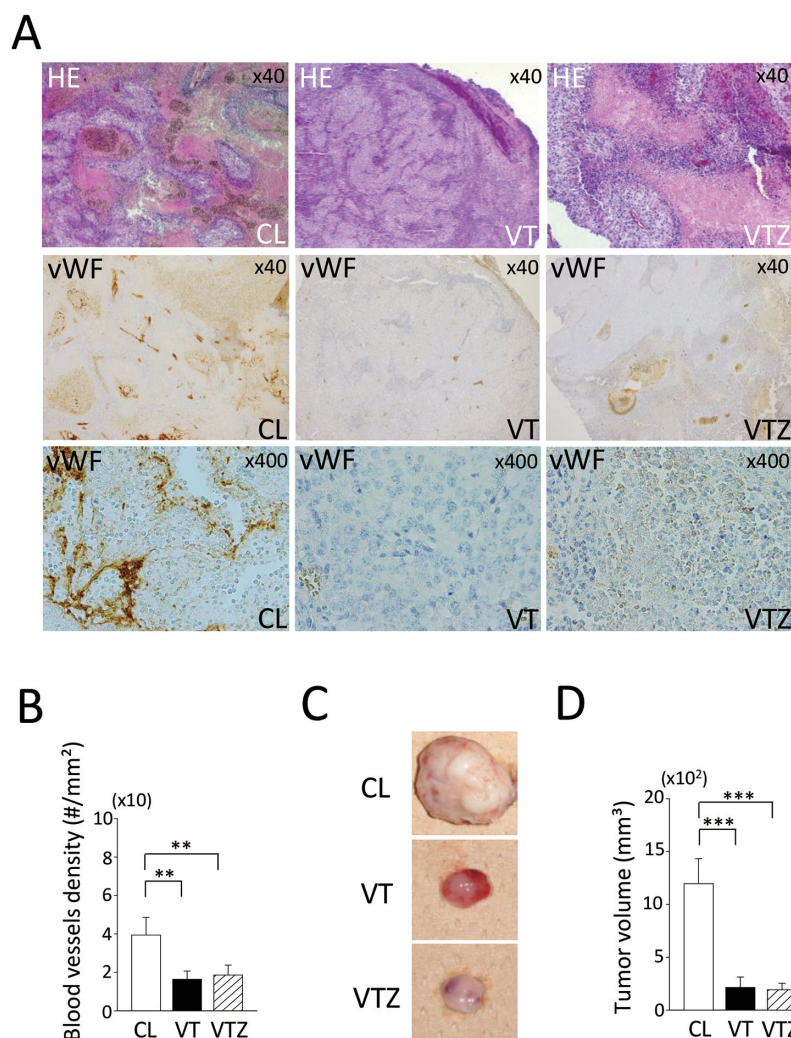


Fig. 2 薬剤が腫瘍内血管と腫瘍増殖に与える影響

CL：コントロール群，VT：ボルテゾミブとサリドマイド投与群，VTZ：ボルテゾミブとサリドマイドとゾレドロネート投与群。A：各グループの腫瘍組織切片のHE染色像（上段），フォンウィレブランド因子（vWF）の免疫染色像（×40，中段），VWFの免疫染色像（×400，下段）。B：vWF（+）血管を組織形態計測法で定量し血管密度を表示したグラフ。C：腫瘍細胞の皮下接種より15日後に採取した腫瘍の写真。D：各グループの腫瘍細胞の平均的な大きさを棒グラフで示す。平均値±標準偏差。1元配置の分散分析をおこなった。**： $p < 0.01$ ；***： $p < 0.001$ 。

4) 抜歯窩の治癒

抜歯窩粘膜上皮を毎週観察した結果，粘膜上皮は薬剤投与の有無に関わらず，コントロールと同じように治癒した（Figs. 4A, 4C）。上顎骨の μ CTデータを再構成して得られた3次元画像と2次元画像をFig. 4Aに示す。また， μ CTで得られた抜歯窩内の骨形成量をFig. 4Bに週ごとにグラフで示した。抜歯後1週では抜歯窩の骨形成は最大10%程度であったが，VTとVTZグループ

はコントロールに比べて骨形成量は有意に少なかった（Fig. 4B）。抜歯後2週目以降，抜歯窩の骨形成にグループ間で差は認められず，すべてのグループで骨形成は進行した。4週後の抜歯窩を含む上顎骨の矢状面組織切片のHE染色画像をFig. 5Aに示す。組織形態計測法で抜歯窩の新生骨を定量した結果，グループ間に差は認められず，すべてのグループで抜歯窩の80%程度は新生骨が形成されていることがわかった。一方，破骨細胞を

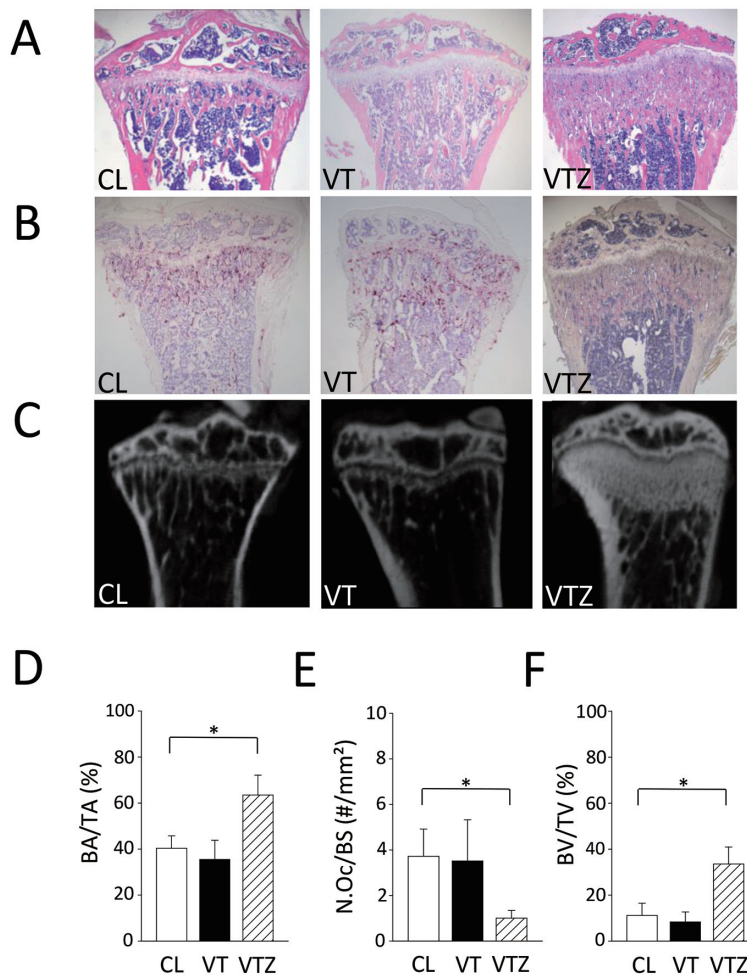


Fig. 3 薬剤が長管骨に与える影響

CL: コントロール群, VT: ボルテゾミブとサリドマイド投与群, VTZ: ボルテゾミブとサリドマイドとゾレドネート投与群。A: 薬剤を7週間投与し、近位脛骨の組織脱灰切片をHE染色した写真。B: 近位脛骨の組織脱灰切片を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色し破骨細胞を視覚化した写真。C: 近位脛骨のマイクロコンピュータ断層撮影(μ CT)データを再構築して2次元で表示した写真。D: 近位脛骨部の海綿骨面積を組織形態計測法で定量したグラフ (BA/TA: Bone area/Tissue area)。E: 破骨細胞の密度を組織形態計測法で定量しグラフで表示 (N. Oc/BS: Osteoclast number/Bone surface)。F: μ CT分析による海綿骨量を表示したグラフ。平均値 \pm 標準偏差。1元配置の分散分析をおこなった (BV/TV: Bone volume/Tissue volume)。*: $p < 0.05$ 。

定量すると、コントロールとVTグループで差は認められなかったが、VTZグループではコントロールに比べて有意に破骨細胞数が抑制されていた (Fig. 5B)。抜歯窩のvWF (+) 新生血管を染色し組織形態計測法を用いて評価した (Fig. 5C)。抜歯後4週の抜歯窩ではvWF (+) 血管密度にグループ間で差は認められなかった。Table 1に抜歯窩新生骨の骨梁幅、骨梁数、骨梁間距離、骨組織密度を示す。抜歯後1週のVTグループでは、コントロールに比べて骨梁幅と骨梁数が有意に

小さくなっていたが、抜歯後2週目以降ではグループ間に差は認められなかった。骨梁間距離と骨組織密度は抜歯後1週目からグループ間に差は認められなかった。

考 察

MRONJ発症のメカニズムははまだ解明されていない。最初の症例報告は2003年にMarxがLetter to Editorセクションに発表した¹⁹⁾。難治性の顎骨壊死症状を呈する多く患者が癌の骨転移の治療のための窒素含有ビスフォ

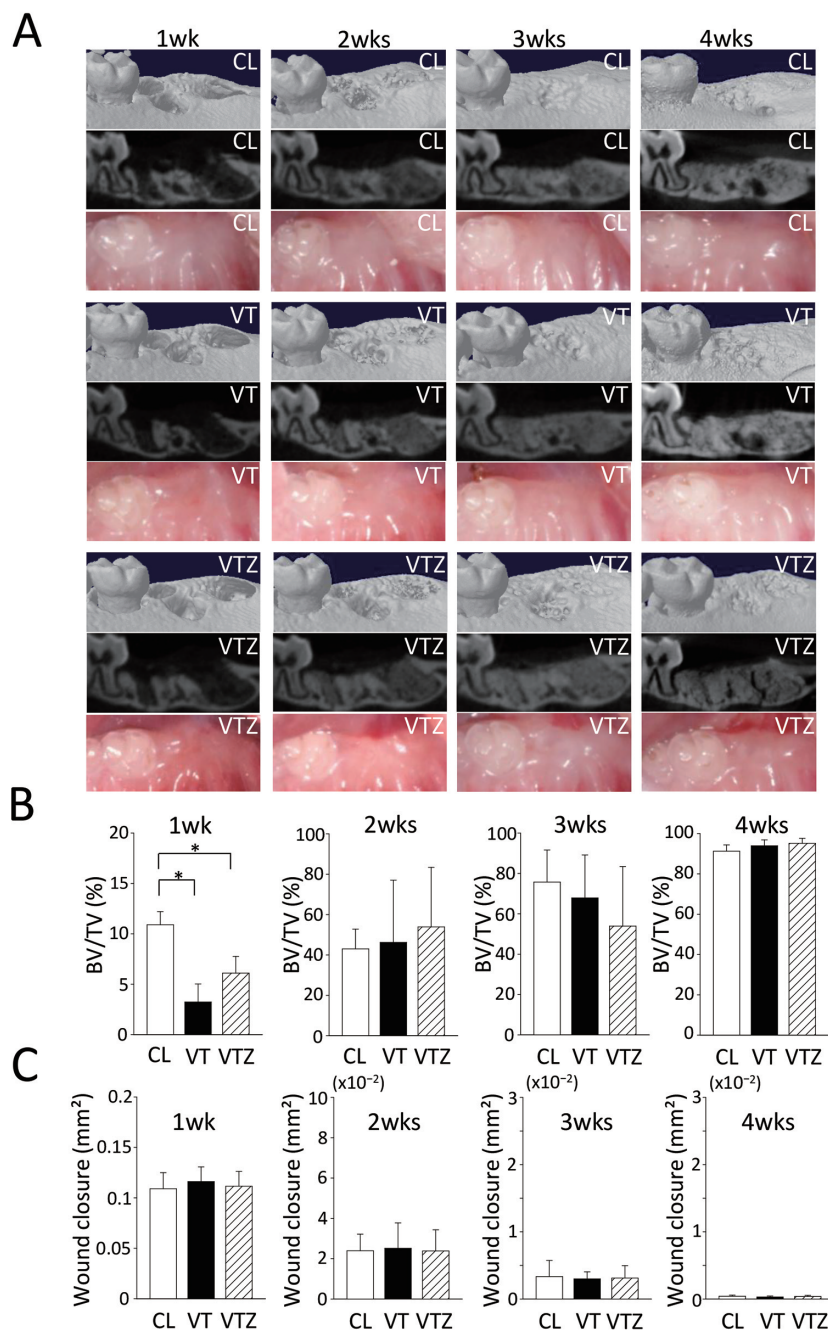


Fig. 4 薬剤が抜歯窩の治癒に与える影響

CL: コントロール群, VT: ボルテゾミブとサリドマイド投与群, VTZ: ボルテゾミブとサリドマイドとゾレドロネート投与群。A: 抜歯後1週おきに撮影した μ CTデータの矢状面再構築画像(3次元: 上段, 2次元: 中段)と口腔内写真(下段)。B: 抜歯窩の骨形成量を μ CTデータで定量し, グラフに表示。平均値 \pm 標準偏差。1元配置の分散分析をおこなった(BV/TV: Bone volume/Tissue volume)。*: $p < 0.05$ C: 抜歯部の口腔粘膜の創の大きさを組織形態計測法で定量化したグラフ。

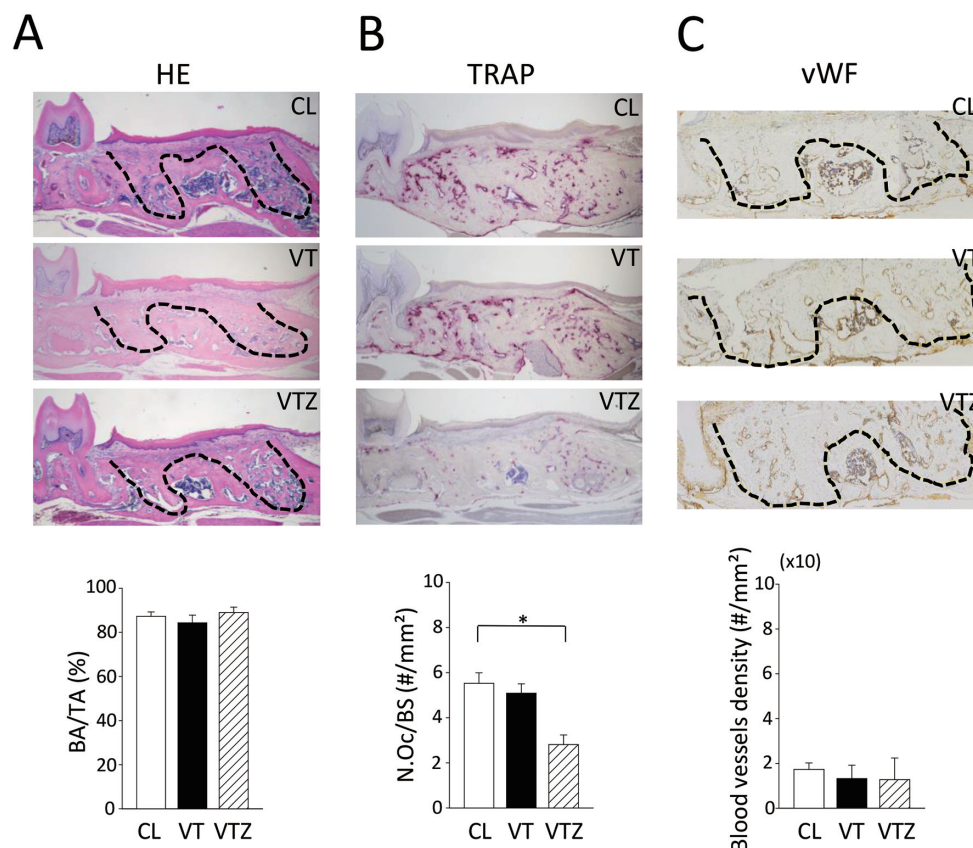


Fig. 5 薬剤が抜歯窩の破骨細胞と血管に与える影響

CL：コントロール群，VT：ボルテゾミブとサリドマイド投与群，VTZ：ボルテゾミブとサリドマイドとゾレドロン酸投与群。A：抜歯窩を含む上顎骨矢状断脱灰組織切片のHE染色写真。破線は抜歯窩を示す。組織形態計測法で新生骨面積を定量したグラフ（BA/TA：Bone area/Tissue area）。B：酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色。破骨細胞数を定量したグラフ（N. Oc/BS：Osteoclast number/Bone surface）。C：抜歯窩脱灰組織切片のフォンウィレブランド因子（vWF）の免疫染色写真。vWF（+）血管を組織形態計測法で定量しグラフに示す。平均値±標準偏差。1元配置の分散分析をおこなった。*： $p < 0.05$ 。

Table 1 抜歯窩治癒時の新生骨の μ CTパラメータ。Tb. Th：骨梁幅，Tb. N：骨梁数，Tb. Sp：骨梁間距離，TMD（Tissue mineral density）：骨組織密度

| | Tb. Th (μ m) | Tb. N (1/ μ m) | Tb. Sp (μ m) | TMD (μ g/cc) | |
|------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------|
| 1wk | CL | 52.8±3.9 | 0.002±0.0002 | 356.2±32.7 | 0.71±0.05 |
| | VT | 38.8±3.1* | 0.0007±0.0004* | 366.1±20.9 | 0.74±0.07 |
| | VTZ | 45.4±6.3 | 0.001±0.0004 | 384.4±17.9 | 0.71±0.04 |
| 2wks | CL | 86.2±13.7 | 0.005±0.0005 | 124.2±18.1 | 0.7±0.04 |
| | VT | 103.2±61.5 | 0.004±0.001 | 117.5±51.2 | 0.68±0.07 |
| | VTZ | 133.8±95.6 | 0.004±0.001 | 108.9±23.7 | 0.65±0.09 |
| 3wks | CL | 163.7±45.4 | 0.005±0.0005 | 92.4±40.6 | 0.76±0.01 |
| | VT | 143.9±50 | 0.005±0.0005 | 87.2±24.1 | 0.76±0.06 |
| | VTZ | 172.8±89.7 | 0.005±0.001 | 82.5±20.2 | 0.77±0.02 |
| 4wks | CL | 185±32.2 | 0.005±0.0006 | 51.4±7.7 | 0.88±0.09 |
| | VT | 220.5±33.5 | 0.005±0.0006 | 56.1±12.7 | 1.04±0.09 |
| | VTZ | 214±30.2 | 0.005±0.0005 | 53.1±9.3 | 0.99±0.04 |

スフォネート（パミドロネート、ゾレドロネート、アレンドロネート）を服用していたので、Marxは報告の中で、難治性顎骨壊死とビスフォスフォネート製剤の相関を示唆した。また、これらの顎骨壊死の臨床症状と放射線性顎骨壊死（Osteoradionecrosis of the jaw: ORNJ）の臨床症状が酷似していたことから、ビスフォスフォネートに関連しておこる顎骨壊死の病理メカニズムも血管障害に起因すると考えた。MarxはORNJの病理・臨床で成果を上げており²⁰⁾、ORNJ発症と血管障害の関連においては深い洞察を持っている。しかしながら、2003年の症例報告では血管障害への病理組織学的検索を行わずに、臨床症状からの推察で、症例報告のタイトルを「Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic」とした。ここにある「avascular」は血管欠如を意味している。この報告以来、血管障害・血管新生抑制はMRONJの主要な発症メカニズムという仮説が受け入れられることになる。実際、血管新生阻害剤スニチニブの投与を受けている癌患者にMRONJの発症があることが報告され、骨吸収抑制剤単独投与を受けている患者よりも血管新生阻害剤と骨吸収抑制剤の混合投与を受けている患者のほうがMRONJの発症リスクが高いことも報告されている²¹⁻²⁴⁾。さらに、MRONJ患者の血管内皮前駆細胞は健常人よりも低い値を示すという報告もあり²⁵⁾、血管障害・血管新生抑制がMRONJの発症メカニズムであるという仮説を支持する報告は多い。しかしながら、MRONJ発症との関連がすでに確立されている骨吸収抑制剤デノスマブ（抗RANKL抗体）は、血管新生抑制作用や血管障害作用を持たない^{11,12)}。このことは、血管障害がMRONJの発症に必要な不可欠なメカニズムではないことを示している。

腫瘍増殖には活発な血管新生が必要なので、薬剤による血管新生抑制は有効な癌の治療方法と考えられている。化学療法剤は癌細胞の代謝を抑制するが、その多くは血管新生阻害作用と免疫抑制作用を有する。サリドマイドとボルテゾミブはそれぞれ強力な血管新生抑制作用とプロテアソーム阻害作用をもち²⁶⁾、多発性骨髄腫の治療に使われている²⁷⁾。本研究では、このサリドマイドとボルテゾミブを使って、これら薬剤が腫瘍増殖に与える影響と腫瘍のない健常な上顎の抜歯窩治癒に与える影響を明らかにした。その結果、サリドマイドとボルテゾミブを併用投与すると、血管内皮前駆細胞は減少し、腫瘍内の血管密度も減少した。それに伴い、腫瘍の増殖も有意に

抑制された。このことは、サリドマイドとボルテゾミブの併用投与が血管新生を抑制することによって抗癌効果を発揮したと考えられる。しかしながら、その血管新生抑制作用は抜歯窩の治癒には大きな影響を与えなかった。抜歯後1週、薬剤投与グループの抜歯窩では骨形成遅延が認められたが、2週目以降では差は認められず、コントロールと変わらなかった。また、薬剤投与グループの4週後抜歯窩治癒部血管密度もコントロールと変わらなかった。これらの結果は、抗癌剤が有する血管新生抑制作用が腫瘍増殖と抜歯窩治癒で異なることを示している。サリドマイドとボルテゾミブの併用投与は抜歯窩の骨形成を強く抑制したが、同時期の上皮形成には影響を与えなかった。組織治癒は出血後、血液凝固を経て、炎症期、増殖期、成熟（リモデリング）期と続く。この治癒過程は軟組織でも硬組織でも基本的に同じであるが、増殖期と成熟期を担う主要な細胞は組織ごとで異なる。軟組織においては線維芽細胞が、硬組織においては骨芽細胞と破骨細胞が治癒において重要な役割を果たす。本研究ではゾレドロネートの有無に関わらず、薬剤投与グループで抜歯窩骨形成に有意な抑制が認められた。このことより、薬剤は破骨細胞よりもむしろ骨芽細胞により強く作用したものと考えられる。そして、抜歯後2週以降の抜歯窩骨形成量は薬剤投与グループもコントロールと同じであったことから、サリドマイドとボルテゾミブの併用は骨形成の初期、つまり骨芽細胞の分化を遅延させる働きがあったと考えられる。薬剤が、骨芽前駆細胞に直接作用したのか、骨芽細胞分化のための環境整備を遅延させたのかは本研究からはわからない。しかしながら、抜歯窩部軟組織ではそのような初期治癒の遅延は認められなかった。硬組織の治癒に特異的なものなのかもしれない。今後、明らかにしていく必要がある。

健常組織の創傷治癒における血管新生は生体によって細かく制御されている。すなわち、血管新生、不要血管の除去、そして血管過多を防ぐための血管新生抑制、これらが時間的にも空間的にも繊細に制御されて組織の治癒・修復は進行していく。このような微細な調節メカニズムは腫瘍増殖中の血管新生には存在しない²⁸⁾。腫瘍の血管は、正常な創傷の血管とは構造および機能が異なる²⁹⁾。漏洩が起こり易く、不均一に分布し、同一の血管内でさえ血流方向が変わることが知られている³⁰⁾。また、腫瘍増殖が血液供給を上回ると壊死が起こり虚血ゾーンが腫瘍内部に形成される³¹⁾。これらは正常な創傷治癒では起こらない。したがって、腫瘍組織での血管形成と正

常組織創傷治癒部での血管形成は大きく異なる。本実験で薬剤が腫瘍と抜歯窩で異なる作用を示したのは、この違いに起因するかもしれない。

ゾレドロネートには血管新生抑制作用と抗腫瘍作用があると報告されており^{32,33)}、ゾレドロネートの血管新生抑制作用がMRONJの発症に関与しているとも考えられている^{34,35)}。そこで、ゾレドロネートをサリドマイドとボルテゾミブと共に投与すると、血管新生抑制作用が増幅され、腫瘍増殖が強く抑制され、抜歯窩治癒不全が起これると仮説をたて検証を行った。その結果、ゾレドロネートの添加は、長管骨の骨量を有意に増加させたが、腫瘍の増殖や抜歯窩の治癒に影響は与えなかった。腫瘍の増殖、腫瘍の血管密度、血管内皮前駆細胞レベルに変化は認められなかった。したがって、本研究においては、ゾレドロネートの抗腫瘍作用と血管新生抑制効果は認められなかった。

本研究の抜歯窩治癒評価は腫瘍をもたない健常なマウスで行った。これは、腫瘍細胞接種後の腫瘍増殖が早く、4週間の抜歯窩治癒期間にマウスが耐えられないからである。しかし、MRONJを発症する患者の多くは癌治療を受けているため、よりヒトの臨床環境に近づけるためには、腫瘍をもったマウスで抜歯窩治癒を評価するべきであろう。腫瘍は増殖時に多くのサイトカインや成長因子を持続的に発現するので、それらが正常な組織の創傷治癒に影響する可能性は否定できない。本研究から、癌治療に用いる強力な血管新生抑制剤は、腫瘍に血管障害を誘導し抗癌作用を発揮するが、健常な口腔内の抜歯窩治癒には影響を与えない可能性が示唆された。

謝 辞

本研究に関して多角的な指導と助言をいただきました。本学咬合修復学講座冠橋義歯学分野松浦尚志博士、ならびに本学生体構造学講座病態構造学分野岡村和彦博士に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) Remes K, Anttila P, Silvennoinen R, Putkonen M, Ollikainen H, Terava V, et al.: Real-world treatment outcomes in multiple myeloma: Multicenter registry results from Finland 2009-2013. *PLoS One*. 2018 ; 13(12) : e0208507.
- 2) Li T, Kang G, Wang T, Huang H: Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncol Lett*. Jul 2018 ; 16(1) : 687-702.
- 3) Yabu T, Tomimoto H, Taguchi Y, Yamaoka S, Igarashi Y, Okazaki T: Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood*. Jul 1 2005 ; 106(1) : 125-134.
- 4) Zhang H, Vakili V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, et al.: Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood*. Apr 15 2005 ; 105(8) : 3286-3294.
- 5) Yamashita J, McCauley LK: Antiresorptives and osteonecrosis of the jaw. *J Evid Based Dent Pract*. Sep 2012 ; 12(3 Suppl) : 233-247.
- 6) Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al.: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*. Oct 2014 ; 72(10) : 1938-1956.
- 7) Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, et al.: Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. Sep 2002 ; 302(3) : 1055-1061.
- 8) Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F, et al.: Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res*. Aug 1 2003 ; 9(8) : 2893-2897.
- 9) Guarneri V, Miles D, Robert N, Dieras V, Glaspy J, Smith I, et al.: Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Jul 2010 ; 122(1) : 181-188.
- 10) Estilo CL, Fournier M, Farooki A, Carlson D, Bohle G, 3rd, Huryn JM: Osteonecrosis of the jaw related to bevacizumab. *J Clin Oncol*. Aug 20 2008 ; 26(24) : 4037-4038.
- 11) Raje N, Terpos E, Willenbacher W, Shimizu K, Garcia-Sanz R, Durie B, et al.: Denosumab versus zoledronic acid in bone disease treatment of newly diagnosed multiple myeloma: an international, double-blind, double-dummy, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. Mar 2018 ; 19(3) : 370-381.
- 12) Misso G, Porru M, Stoppacciaro A, Castellano M, De Cicco F, Leonetti C, et al.: Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biol Ther*. Dec 2012 ; 13(14) : 1491-1500.
- 13) van der Veer WM, Niessen FB, Ferreira JA, Zwiers PJ, de Jong EH, Middelkoop E, et al.: Time course of the angiogenic response during normotrophic and hypertrophic scar formation in humans. *Wound Repair Regen*. May-Jun 2011 ; 19(3) : 292-301.
- 14) Farkas L, Gaudie J, Voelkel NF, Kolb M: Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a tale of angiogene-

- sis, apoptosis, and growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Jul 2011 ; 45(1) : 1-15.
- 15) Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyszyn TM, Bergdall VK, DiPietro LA: Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Lab Invest.* Jun 2008 ; 88(6) : 579-590.
- 16) Kinuya S, Kawashima A, Yokoyama K, Koshida K, Konishi S, Watanabe N, et al.: Cooperative effect of radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy with thalidomide in human cancer xenografts. *J Nucl Med.* 2002 Aug ; 43(8) : 1084-1089.
- 17) Wang H, Xiao L, Tao J, Srinivasan V, Boyce B, Ebetino F, et al.: Synthesis of a bone-targeted bortezomib with in vivo anti-myeloma effects in mice. *Pharmaceutics.* 2018 Sep 10 ; 10(3) : 154.
- 18) Yamashita J, Sawa N, Sawa Y, Miyazono S: Effect of bisphosphonates on healing of tooth extraction wounds in infectious osteomyelitis of the jaw. *Bone.* 2021 Feb ; 143 : 115611.
- 19) Marx RE: Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* Sep 2003 ; 61(9) : 1115-1117.
- 20) Marx RE: Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg.* May 1983 ; 41(5) : 283-288.
- 21) Koch FP, Walter C, Hansen T, Jager E, Wagner W: Osteonecrosis of the jaw related to sunitinib. *Oral Maxillofac Surg.* Mar 2011 ; 15(1) : 63-66.
- 22) Fleissig Y, Regev E, Lehman H: Sunitinib related osteonecrosis of jaw: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* Mar 2012 ; 113(3) : e1-3.
- 23) Christodoulou C, Pervena A, Klouvas G, Galani E, Falagas ME, Tsakalos G, et al.: Combination of bisphosphonates and antiangiogenic factors induces osteonecrosis of the jaw more frequently than bisphosphonates alone. *Oncology.* 2009 ; 76(3) : 209-211.
- 24) Fusco V, Porta C, Saia G, Paglino C, Bettini G, Scoletta M, et al.: Osteonecrosis of the Jaw in Patients With Metastatic Renal Cell Cancer Treated With Bisphosphonates and Targeted Agents: Results of an Italian Multicenter Study and Review of the Literature. *Clin Genitourin Cancer.* Aug 2015 ; 13(4) : 287-294.
- 25) Allegra A, Oteri G, Nastro E, Alonci A, Bellomo G, Del Fabro V, et al.: Patients with bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw have reduced circulating endothelial cells. *Hematol Oncol.* Dec 2007 ; 25(4) : 164-169.
- 26) Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H, et al.: Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res.* Jan 1 2006 ; 66(1) : 184-191.
- 27) Dy GK, Thomas JP, Wilding G, Bruzek L, Mandrekar S, Erlichman C, et al.: A phase I and pharmacologic trial of two schedules of the proteasome inhibitor, PS-341 (bortezomib, velcade), in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* May 1 2005 ; 11(9) : 3410-3416.
- 28) DiPietro LA: Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol.* Nov 2016 ; 100(5) : 979-984.
- 29) Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ: Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* Feb 2000 ; 156(2) : 361-381.
- 30) Peterson H-I: The microcirculation of tumors. In: F.W. O, Buchanan MR, Weiss L, editors. *Microcirculation in Cancer Metastasis.* 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 1991. p.277-298.
- 31) Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE: Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer Res.* Jan 15 1987 ; 47(2) : 597-601.
- 32) Scavelli C, Di Pietro G, Cirulli T, Coluccia M, Boccarelli A, Giannini T, et al.: Zoledronic acid affects over-angiogenic phenotype of endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Mol Cancer Ther.* Dec 2007 ; 6(12 Pt 1) : 3256-3262.
- 33) Croucher PI, De Hendrik R, Perry MJ, Hijzen A, Shipman CM, Lippitt J, et al.: Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *J Bone Miner Res.* Mar 2003 ; 18(3) : 482-492.
- 34) Gao SY, Zheng GS, Wang L, Liang YJ, Zhang SE, Lao XM, et al.: Zoledronate suppressed angiogenesis and osteogenesis by inhibiting osteoclasts formation and secretion of PDGF-BB. *PLoS One.* 2017 ; 12(6) : e0179248.
- 35) Smidt-Hansen T, Folkmar TB, Fode K, Agerbaek M, Donсков F: Combination of zoledronic Acid and targeted therapy is active but may induce osteonecrosis of the jaw in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* Sep 2013 ; 71(9) : 1532-1540.

(令和3年2月24日受付)