

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10365

研究課題名(和文)炎症性サイトカイン制御による骨破壊性疾患の解明および治療法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of bone destroying diseases and establishment of therapy by regulation of inflammatory cytokines

研究代表者

岩崎 良太郎 (Ryotaro, Iwasaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：30365390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨吸収薬剤関連顎骨壊死動物モデルの報告は以前から行われているが、投与薬剤に注目したものが多く、顎骨のみで起こる特異性から、口腔内常在菌を骨壊死に至る要因と考えた。そこで、ヒトに類似した骨吸収薬剤関連顎骨壊死マウスモデルを新たに樹立し、我々が樹立したモデルを用いて解析を行った。その結果、細菌感染によってマクロファージから産生される炎症性サイトカインが骨壊死を代表とする骨破壊性疾患を惹起する可能性が示唆された。このことから、炎症性サイトカイン制御による口腔外科領域における抗炎症作用の機序を解明することができれば、その適応を広げ、口腔領域の炎症性疾患においても、新たな治療の可能性を導けると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内の炎症を伴う骨破壊性疾患である骨吸収薬剤関連顎骨壊死のヒトに近似した動物モデルの確立は、発症機序の解明や治療法の開発には欠かすことのできないものである。要因は、未だはっきりとは解明されておらず、歯科医師は治療前の休薬の必要性の判断を含めた方針の決定に難渋している現状である。また、ビスフォスフォネート製剤が、骨粗鬆症の治療以外に、がん治療など様々な病態に使用されていることから、顎骨壊死の患者数は多い。現在、主たる治療法として行われている、外科的治療アプローチに代わる新しい治療戦略が求められており、新たな治療戦略の可能性を見出す可能性のある本研究の結果は極めて重要なものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：Animal models for anti resorptive agents related osteonecrosis of the jaw have been reported; however, most of them have focused on the administered anti-resorptive agents. We considered that oral bacteria may cause osteonecrosis based on its specific occurrence in the jaw. Thus, we established a our mouse model for anti-resorptive agents-related osteonecrosis of the jaw similar to its human counterpart, and conducted analyses using the model. Results suggested that inflammatory cytokines produced in macrophages due to bacterial infection can cause bone destroying disease typified by osteonecrosis. These results led us to consider that the elucidation of the mechanism of cytokine-regulated anti-inflammatory actions in the field of oral surgery would allow us to lead to potential new treatments for inflammatory diseases in the field of oral and maxillofacial surgery.

研究分野：骨代謝

キーワード：破骨細胞 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート製剤をはじめとする骨吸収抑制剤は、顎骨壊死や耳鼻咽喉科領域での外耳道骨壊死など、限定的な部位で骨壊死を起こすことが分かっているが、発症メカニズムは解明されておらず、確立された治療法も未だないため、治療は症状に合わせた対症療法が主となっている。近年では、骨吸収抑制剤が顎骨壊死発症のリスクとなると考えられており、投与前および投与中に歯科受診することも少なくない。現在のところ口腔内衛生状態を良くすることがガイドラインに定められているが、口腔内衛生状態が良好な場合でも骨壊死が生じることもあり、完全な予防はできていないのが現状である。また、骨吸収製剤は全身投与にも関わらず、骨壊死が限定的な部位にしか起こらないという特異性はなぜか、また、その骨壊死に陥るメカニズムはどのようなものか、ということを解明するために、申請者は新たに確立した動物モデルを用いて解析を進めることとした。

2. 研究の目的

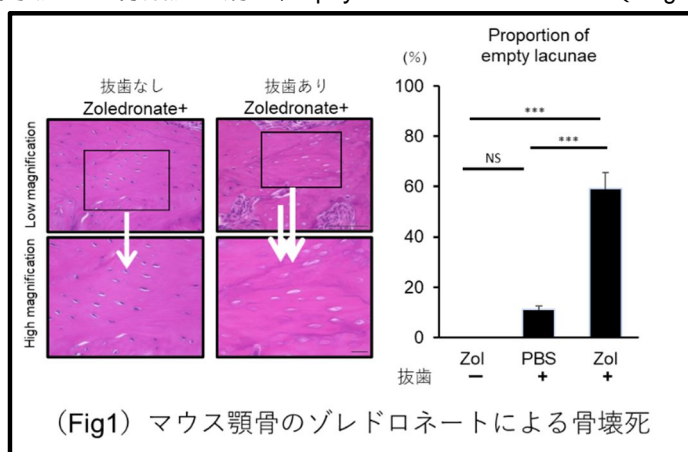
以前から、疾患動物モデルの報告は行われているが、その多くは骨吸収抑制薬などの薬剤投与に注目したものである。この疾患は上下顎骨と耳鼻咽喉科領域での外耳道にしか起こらないという特異性から、申請者は口腔内常在菌が骨壊死に陥る作用点となっているのではないかと考えた。そのことから、骨吸収薬剤関連顎骨壊死マウスモデルを新たに樹立し、実際の病態により近似したマウスモデルを用いて常在菌による骨破壊性疾患のメカニズムを解明し、新たな治療方法の確立を目指したいと考えている。

3. 研究の方法

In vivo においては、申請者らは蛍光光子によって定量化できるメチシリン感受性黄色ブドウ球菌を用いて、菌による骨壊死に着目した動物モデルを作製した。このモデルでは、蛍光光子により菌が大腿骨内に投与されていることを定量化し、術後の経過を追ってその増減を確認することができる。上記のモデルでは、細菌感染を人為的に引き起こすことで empty lacunae を観察したが、より病態生理に近似したモデルを作成するため、骨吸収抑制薬のビスフォスフォネート製剤として薬理活性および骨吸収抑制活性が他剤に比べて強力であるゾレドロネートを用いたマウスの口腔内細菌により誘発される顎骨壊死モデルを新たに樹立した。このモデルにおいては、ビスフォスフォネート製剤投与下に顎骨に抜歯等の侵襲的処置を加えることで骨壊死を高頻度に引き起こすことが可能であり、このマウスモデルを用いて解析を行った。*In vitro* においては、野生型マウス由来の骨髄細胞の破骨細胞培養系にゾレドロネートの添加実験を行った。TRAP 陽性の破骨細胞はゾレドロネートの濃度に依存し破骨細胞を抑制していることを確認し、採取した RNA から Quantitative real-time PCR で破骨細胞分化マーカーと炎症性サイトカインの発現を評価した。また、確立したマウスモデルへある種の薬剤投与を行うことにより骨壊死の発症の抑制効果があるかを比較検討した。

4. 研究成果

申請者らは、抜歯処置とマウス口腔内常在菌による骨吸収薬関連顎骨壊死動物モデルを確立した。ビスフォスフォネート製剤として薬理活性および骨吸収抑制活性が他剤に比べて強力であるゾレドロネート(以下;Zol)を週1回2週間投与したのちに、マウスの下顎骨の臼歯を抜歯し、評価した。抜歯後の顎骨を病理組織学的に評価したところ健側は骨小腔内に骨細胞が残っているのに対し、抜歯を行った群では骨小腔から骨細胞が消え、empty lacunaeとなっていた(Fig1)。Zolの投与のみでは骨壊死は発生せず、口腔内常在菌の感染が発症に寄与している可能性が示唆された。これらの結果は、骨吸収抑制薬と感染の併存により、破骨細胞前駆細胞におけるTNFの発現を促進することで、骨吸収抑制薬が、RANKLの存在下であっても、破骨細胞前駆細胞をTNF発現マクロファージに分化転換することが示唆される。マウス口腔内での顎骨壊死モデルを確立したことで、より病態生理に近似したモデルで解析が可能となっている。また *In vitro* で、破骨細胞の培養系にZol



(Fig1) マウス顎骨のゾレドロネートによる骨壊死

の添加実験を行った。TRAP 陽性の破骨細胞は Zol の濃度に依存し破骨細胞を抑制していることを確認した。Ctsk や NFATc1 などの破骨細胞分化マーカーの、mRNA の発現量の低下を確認した。細胞のアポトーシスを誘導する TNF を含めた、炎症性サイトカインに着目した。TNF、IL-6 等の発現は、Zol の濃度依存的に発現上昇がみられ、骨壊死は細菌だけの作用だけでなく Zol の投与により炎症作用を高めると推測された。TNF、IL-6 等のノックアウトマウス(以下;KOマ

ウス)を用いて、検証したところ、野生型マウスで起きていた骨壊死が KO マウスでは起きにくいことを実証した。炎症性サイトカインが骨細胞のアポトーシスを起こし、骨壊死を引き起こしている原因と推定し、我々が確立したモデルに、MR16-1 (抗マウス IL-6 レセプター抗体)を投与したところ、投与群では骨壊死発生率が有意に抑制された。以上の結果から、細菌感染によってマクロファージから産生される炎症性サイトカインが骨壊死を代表とする骨破壊性疾患を惹起する可能性が示唆された。これらの炎症は、Zol をはじめとする骨吸収抑制薬を投与することで、破骨細胞の機能を抑制することで、その前駆細胞であるマクロファージへの分化転換することにより、その下流で引き起こされる炎症が強く引き起こされると考えられる。このことから、炎症性サイトカイン制御による口腔外科領域における抗炎症作用の機序を解明することができれば、その適応を広げ、口腔外科領域の炎症性疾患においても、新たな治療の可能性を導けると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Soma Tomoya, Iwasaki Ryotaro, Sato Yuiko, Kobayashi Tami, Nakamura Satoshi, Kaneko Yosuke, Ito Eri, Okada Hiroyuki, Watanabe Hisato, Miyamoto Kana, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Asoda Seiji, Kawana Hiromasa, Nakagawa Taneaki, Miyamoto Takeshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Tooth extraction in mice administered zoledronate increases inflammatory cytokine levels and promotes osteonecrosis of the jaw	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 372 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01174-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 相馬智也, 森田麻友, 岩崎良太郎, 筋生田整治, 中川種昭, 宮本健史
2. 発表標題 骨吸収抑制薬関連顎骨壊死モデルにおける炎症性サイトカイン制御による抑制効果の検証
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相馬智也, 森田麻友, 岩崎良太郎, 筋生田整治, 河奈裕正, 中川種昭, 宮本健史
2. 発表標題 ゾレドロンート投与と侵襲的歯科処置は、炎症性サイトカインを上昇させ、骨吸収薬関連顎骨壊死を誘発する
3. 学会等名 第75回NPO法人日本口腔科学学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相馬智也, 森田麻友, 岩崎良太郎, 筋生田整治, 河奈裕正, 中川種昭, 宮本健史
2. 発表標題 炎症性サイトカイン制御による骨吸収抑制薬関連顎骨壊死の抑制効果
3. 学会等名 第65回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相馬智也, 森田麻友, 岩崎良太郎, 筋生田整治, 河奈裕正, 中川種昭, 宮本健史
2. 発表標題 炎症性サイトカイン制御による骨吸収抑制薬関連顎骨壊死の抑制
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoya Soma, Mayu Morita, Ryotaro Iwasaki, Seiji Asoda, Hiromasa Kawana, Taneaki Nakagawa, Takeshi Miyamoto
2. 発表標題 Elevated levels of pro-inflammatory cytokines are required for anti-resorptive agent-related osteonecrosis of the Jaw development in mice
3. 学会等名 ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬智也, 森田麻友, 岩崎良太郎, 筋生田整治, 河奈裕正, 中川種昭, 宮本健史
2. 発表標題 骨吸収抑制薬による薬剤関連顎骨壊死には炎症性サイトカインの上昇が必須である
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------