

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19180

研究課題名（和文）細胞ストレス可視化マウスを用いた骨吸収抑制薬関連顎骨壊死発症機序の探求

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of Medication-related ONJ (MRONJ) using cell stress visualization mouse

研究代表者

定岡 直 (Sadaoka, Sunao)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80549395

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨粗鬆症治療薬を経時投与したマウスにおいてMRONJ発症に際し酸化ストレスがどのように関与するが機序を解明する上で生体内での可視化に利用されているNrf2タンパク質に着目し、酸化ストレスの指標として同じく利用されているクロモグラニンA(ChgA)同様に指標としてマウスの酸化ストレスの発現、細菌因子等により、増強されるのかを解明することを目的とした。以前の研究で破骨細胞に対し骨粗鬆症治療薬を作用させた結果ChgA遺伝子の増強が確認されていることからNrf2タンパクが関与するKeap1-Nrf2システム抑制時のChgA遺伝子発現への影響を探索することにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRONJ発症に関わるNf- $\kappa$ Bを制御する酸化ストレス発現の分子基盤として核内における酸化ストレス発症因子であるChgAとNrf2の相互関係が細胞実験により明らかになった。Nrf2タンパクを利用した酸化ストレス可視化マウスを用いた骨粗鬆症薬による顎骨壊死の今後の研究に繋がると考える。

研究成果の概要（英文）：This study aims to explore the mechanism by which oxidative stress is involved in the development of MRONJ in mice treated with osteoporosis drugs over time, we focused on the Nrf2 protein, which is used for visualization in vivo, as well as chromogranin A (ChgA), which is also used as an indicator of oxidative stress, and used it as an indicator of MRONJ in the study. The purpose of this study was to elucidate the expression of oxidative stress in mice and whether it is enhanced by bacterial factors or other factors. Since we have previously shown that ChgA gene was enhanced by osteoporosis drugs on osteoclasts, we decided to explore the effect of suppression of the Nrf2-keap1 system, which involves the Nrf2 protein, on ChgA gene expression.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：MRONJ クロモグラニンA

## 1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート製剤(BPs)は骨を吸収する役目を持つ破骨細胞の機能抑制により骨吸収を抑制する。BPs はページェット病や高カルシウム血症、悪性腫瘍の骨転移防止および骨粗鬆症による骨折予防の目的で使用される。近年 BPs 服用患者が歯科治療後に発症する BPs 関連顎骨壊死 (Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw、BRONJ) が臨床的に注目されている。BPs の一種である窒素含有 BPs 製剤(NBP)は、破骨細胞に取り込まれることでアポトーシスを誘導する。古くなった骨細胞の吸収を阻害することで発生する過剰骨の増大は感染リスクを高めるとされる。さらに NBP は骨芽細胞や骨細胞にも直接取り込まれることが重要であると報告された。骨芽細胞に対して新骨形成能の促進、骨細胞に対してアポトーシス抑制に働くが、破骨細胞の活動を抑制することは寧ろ感染リスクを高める。その破骨細胞の分化は前駆細胞に発現する NF- $\kappa$ B 活性化受容体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ; RANK)と骨芽細胞に発現する NF- $\kappa$ B 活性化受容体リガンド(receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand ; RANKL)の関係の維持が必要である。2013年に RANKL を標的とするヒト型モノクローナル抗体製剤骨粗鬆症薬(Denosumab)が認可されたことで改めて RANK-RANKL 機構が着目されている。注目すべきは Denosumab 投与患者でも顎骨壊死が誘導されることが報告された。現在は NBP 起因を含め薬剤関連顎骨壊死(MRONJ, Medication-related ONJ)と総称される。MRONJ の発症に口腔内細菌感染による顎骨局所の炎症発症が指摘されている。口腔内細菌由来の LPS の影響を抑えるために口腔清掃指導は大変重要ではあるが、万人が完璧にブラークコントロールを行うことは不可能に近い。そこで重要になるのは前述した破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞に発現する NF- $\kappa$ B の発現量を調節することである。顎骨壊死の発症予防において NF- $\kappa$ B を介して新生骨の形成促進と過剰骨の吸収を両立させる精密なコントロールが必要不可欠である。NF- $\kappa$ B は酸化ストレスにより活性化され細胞傷害性を持つフリーラジカルを産生する iNOS (inducible nitric oxide synthase)の発現亢進に関与することが数多くの疾患研究で明らかにされており、NF- $\kappa$ B を調節する因子を同定することが重要となる。そこで NF- $\kappa$ B の活動を調整し、酸化ストレスの生体マーカーであるクロモグラニン A(Chromogranin A:ChgA)に着目した。NF- $\kappa$ B の活動を調整し、酸化ストレスの生体マーカーである ChgA が歯周組織を構成するヒト歯根膜線維芽細胞の ChgA を産生することや、P.gingivalis 由来の LPS 添加時に増強することを確認した上で酸化ストレスの顎骨壊死発症への関与調査を行なった骨芽細胞ならびに破骨細胞前駆細胞(Raw264.7)上で、骨粗鬆症治療薬と LPS の複合投与時に ChgA 発現の亢進や SiRNA を用いた ChgA 遺伝子発現抑制処理を施すとリン酸化 NF- $\kappa$ B の発現が明確に阻害されたことから、細胞レベルの解析では細菌感染と酸化ストレスによる複合因子が顎骨壊死の発症に関与することが示唆された。

## 2. 研究の目的

骨粗鬆症治療薬を経時投与したマウスにおいて MRONJ 発症に際し酸化ストレスがどのように関与するのかその機序を解明する。そこで酸化ストレス可視化マウス(Tg 型 OKD-Luc マウス、Trans Genic Inc.)に利用されている Nrf 2 タンパク質に着目した。Nrf 2 タンパク質は ChgA と同じく酸化ストレス下で安定的に核内に移行することが報告されており酸化ストレスを定量する指標になると考えた。骨粗鬆症治療薬を全身/局所投与したマウスの酸化ストレスの発現、細菌因子や ChgA により増強されるのかを解明することを目的とし上記の酸化ストレス可視化マウスを用いた研究計画を立案したが細胞実験に切り替え、破骨細胞細胞に対し抗 RANKL 抗体製剤のデノスマブ・窒素含有ビスホスフォネート製剤のアレンドロネートを作用させた結果、ChgA 遺伝子の増強が確認されていることから Nrf2 タンパクが関与する Keap1-Nrf2 システム抑制時の ChgA 遺伝子発現への影響を探索することにした。

## 3. 研究の方法

破骨細胞を用いた骨粗鬆症治療薬による酸化ストレス抑制機構の探索

(1)マウス由来マクロファージ様細胞 : RAW264.7 細胞 (DS Pharma Biomedical)を用いた。RAW264.7 細胞は D-MEM 培養液で Hydrocell 10cm dish(cellseed)を使用し 48h 培養、回収後 1000cells/96well-plate になるようにまき直し一昼夜培養した。

(2)RAW264.7 細胞は 24 時間 P.gingivalis 由来 Lipopolysaccharide 処理、骨吸収抑制剤処理、LPS+骨吸収抑制剤複合処理 24h。骨吸収抑制剤として Pralidoxime(Denosumab; Daiichisankyo)と Bonalon(Alendronate; TEIJINPharma), Bonviva(Ibandronic acid; Chugai)を使用した。LPS は P.gingivalis 由来(LPS-PG; INVIVOGEN)を使用した。

(2)それらの細胞群の一方にはその後酸化ストレスの抑制機構として注目されている Nrf2 (NF-E2-related factor2)・Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)の SiRNA(On-Target plus Smart pool; GE healthcare Japan)を 25nmol で 48h トランスフェクションを行った。RAW264.7 に対し上記の骨粗鬆症治療薬を作用させ ChgA 遺伝子の発現量を Cells-to-CT 1-Step

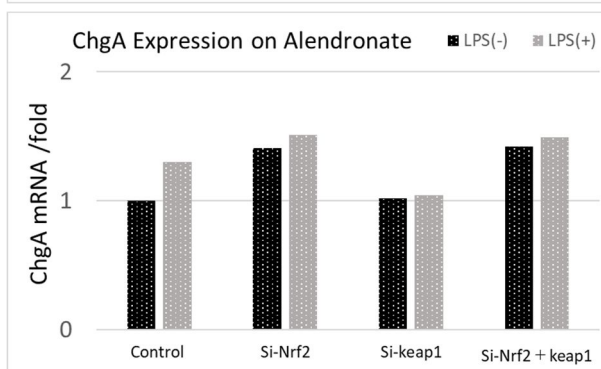
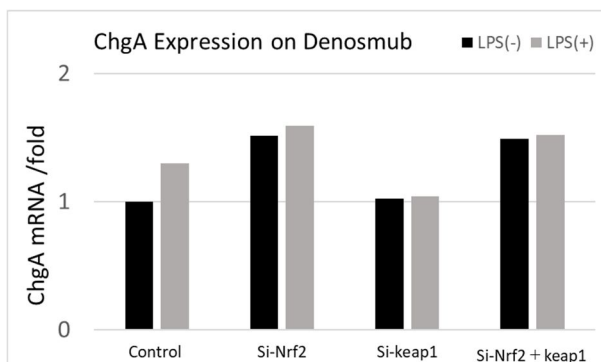
TaqMan Kit;ThermoFischer を用いて測定し比較した。

(3) ChgA 遺伝子抑制時の Nrf2・Si 遺伝子発現量を測定する為に RAW264.7 細胞を用い、ChgA による Nrf2/keap1 シグナル機構を明らかにする。ChgA siRNA(On-Target plus Smart pool;GE healthcare Japan)を 25nmol で 48h トランスフェクトした細胞を準備し Cells-to-CT 1-Step TaqMan Kit;ThermoFischer を用いて測定し比較した。

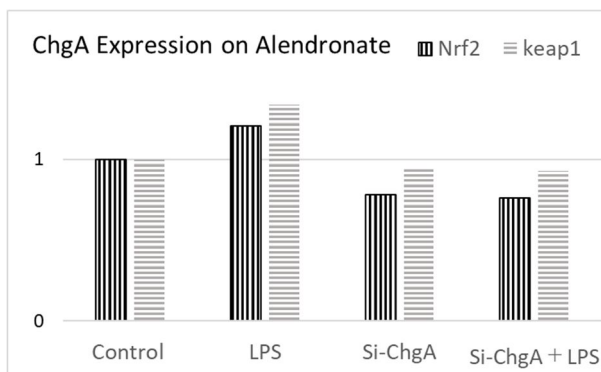
#### 4. 研究成果

(1) デノスマブ・アレンドロネートを作用した破骨細胞では Nrf2・Nrf2+Keap1 の SiRNA 導入時に ChgA 遺伝子の発現量が増強することが確認され、S.mutans 由来 LPS を滴下した環境で同様の実験を行った結果同様の傾向が確認された。

Keap1 単独導入時には前者と比較し有意な変化は確認されなかった。また S.mutans 由来 LPS を滴下した環境で同様の実験を行った結果同様の傾向が確認された。



(2) ChgA の SiRNA を導入した破骨細胞では Nrf2 と Keap1 の遺伝子発現は抑制され、LPS 作用時にも同様の傾向が見られた。酸化ストレス因子として Nrf2/Keap1 シグナルと相互関係を持つ可能性が示唆された。



MRONJ 発症に関わる Nf- B を制御する酸化ストレス発現の分子基盤として核内における酸化ストレス発症因子である ChgA と Nrf2 の相互関係が細胞実験により明らかになり、酸化ストレス可視化マウスを用いた骨粗鬆症薬による顎骨壊死の今後の研究に繋がると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------