

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19188

研究課題名(和文)顎骨壊死に対するアドレナリン受容体アゴニスト投与による治療効果の検討

研究課題名(英文) Administration of adrenergic receptor agonist effect for Osteonecrosis of the Jaw

研究代表者

山田 峻之 (Yamada, Takayuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：10826829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト副甲状腺ホルモン(PTH)が顎骨壊死を改善した報告もあるが、適応制限があり、代替薬開発が望ましい。PTH同様のシグナル伝達経路を持つアドレナリン 2受容体作動薬イソプロテレノール(ISO)も、*in vitro*で同様の動態を認めた。ISOとPTHが骨形成時に関与するオステオポンチン(OPN)の動態を大腿神経切除マウス(Nx)にPTH投与で検討した。PTHはNxによる骨量減少を予防した。NxによりWnt3aやFndc5の発現抑制を認め、Wnt3a経路やOPNを介したirisin分泌などの骨量減少経路の存在を示唆した。今後はPTHがその経路を抑制するか、ISOも同様の経路かの検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2003年にビスホスホネート系製剤による有害事象で「顎骨壊死」が報告され、骨代謝に関与する様々な薬剤からも顎骨壊死が発症する報告が散見されるようになった。顎骨壊死の治療は、手術で良好な結果を認めた報告が散見されるが、顎骨壊死患者の多くが高齢者であり、手術範囲や適応基準など課題がある。ヒト副甲状腺ホルモン(PTH)が顎骨壊死を改善させた報告もあるが、使用の適応・制限のため、代替薬開発が待たれる。本研究で骨量減少経路の存在が示唆され、今後はPTHがその経路を抑制するのか、PTH同様のシグナル伝達経路を持つイソプロテレノールも同様の効果があるかを検討することにより、新たな局面に進める可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Although there are reports that human parathyroid hormone (PTH) improves osteonecrosis of the jaw, there are limitations in its application, and it is desirable to develop alternative drugs. Isoproterenol (ISO), an adrenergic 2 receptor agonist that has a similar signal transduction pathway to PTH, exhibited similar kinetics *in vitro*. The dynamics of osteopontin (OPN), which is involved in bone formation by ISO and PTH, was investigated by administering PTH to femoral nerve-resected mice (Nx).

PTH prevented Nx-induced bone loss. Nx suppressed the expression of Wnt3a and Fndc5, suggesting the existence of bone loss pathways such as the Wnt3a pathway and OPN-mediated irisin secretion. In the future, it will be necessary to consider whether PTH suppresses this route or whether ISO is a similar route.

研究分野：口腔外科学

キーワード：osteonecrosis of the jaw PTH 2 Adrenergic Receptor alkaline phosphatase

### 1. 研究開始当初の背景

2003年にビスホスホネート系薬剤(BPs)の注射薬剤の重大な有害事象の一つとしてBP製剤関連顎骨壊死(BRONJ)をMarxが報告された。以降、他の骨代謝に影響する薬剤も顎骨壊死を発症する報告が認められ、薬剤の多様化とともに、顎骨壊死への対応も年々変化が認められる。中でも顎骨壊死に対する治療方針は、対症療法から根治を目指す考えが多くなり、手術療法に良好な結果を認める報告が以前より目にする機会が増えている。しかし、手術範囲や適応基準など課題が残っているのが現状である。

ヒト副甲状腺ホルモン(PTH)が骨粗鬆症治療薬として使用されており、PTH使用者の顎骨壊死が改善されたという報告も散見される。PTHの適応・使用にも制限があり、万人に使用できる薬剤ではない。またPTHによる改善例は症例報告が中心で、統計的に評価した報告が乏し得る限りではないため、PTHに代わる新たな代替薬の開発が望ましい。

PTHは持続投与で骨吸収が、間欠的投与で骨造成が引き起こされる特徴を持つ。PTHと同様のシグナル伝達経路を持つアドレナリン 2 受容体アゴニストであるイソプロテレノール(ISO)も、マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞への ISO 単回投与では骨芽細胞のAlp(アルカリホスファターゼ)活性は変わらず、間欠的投与ではAlpの発現が増加した。in vivoにおけるISOの間欠的投与の骨組織に対する作用はまだ知られていない。そこで、ISOがPTHに代わる薬剤になり得る可能性があるかに着目した。

本来ならマウス顎骨壊死モデルを作成し、ISOを直接投与することを検討していたが、ISOによるマウスへの循環器系の影響、顎骨壊死モデル作成に対し、技術的にも倫理的にも困難が生じた。そこで顎骨壊死を罹患している患者の多くが骨粗鬆症を患っているため、骨量減少モデルを作成し、薬剤のシグナル伝達経路を探る方針とした。

### 2. 研究の目的

ISOの投与は生体への循環器系の影響が懸念されたため、ISOとPTHが骨形成においても関与していると考えられるオステオポンチン(OPN)の動態を、マウス大腿神経切除モデル(Nx)にPTH投与することで検討することとした。

OPNは骨代謝に必須の非コラーゲンタンパク質と知られ、PTH投与による骨量増加はOPNを介した経路の活性化により引き起こされる。OPNノックアウトマウスを用いて様々な研究がなされてきた。OPN非存在下では、尾部懸垂モデルなどの骨量減少につながる環境下でも、骨量変化は引き起こされないことも知られている。

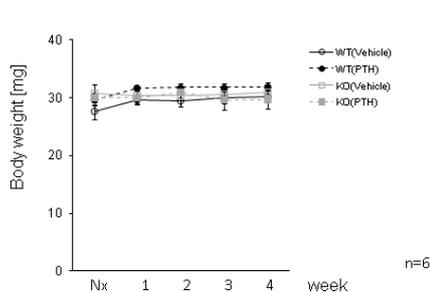
PTHを間欠的投与することで、OPN非存在下での骨量増加が可能かどうかを検討する。PTH間欠的投与下でのシグナル伝達の動向を確認することで、OPNの動向とISOによる代替作用の比較検討を行う。

### 3. 研究の方法

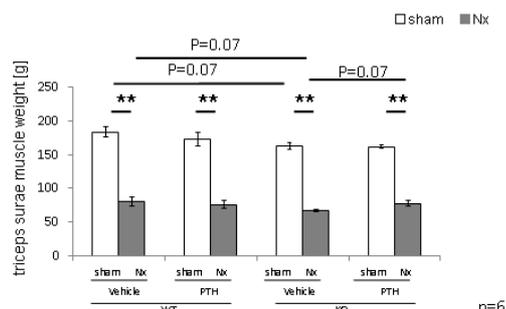
- (1) マウス大腿神経切除モデルを作成し、全身への影響、筋肉量の低下、骨量減少などをマイクロCT、DXA法による骨量計測して評価した。
- (2) PTHによるマウス大腿神経切除モデルの全身への影響、筋肉量の低下、骨量減少などへの影響を確認した。(1)と同様の方法で評価した。
- (3) シグナル経路の関与をリアルタイム RT-PCR法を用いて、遺伝子発現解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 神経切断は体重変化を起こさず、下腿三頭筋の重さを減少させた。右側の坐骨神経、大腿神経を切除し、左側はsham surgeryを行い、右側の非負荷状態モデルを作成した。そのモデルマウスに、PTHを週5日間、皮下注射にて投与した。マウスは4週後にsacrificeを行った。体重はVehicle投与群、PTH投与群共に変化は認められず、WT、KOによる違いも認められなかった(図1)。下腿三頭筋をSacrifice時に重量の測定をした。Vehicle投与群、PTH投与群共に、Nxにより下腿三頭筋の重さが有意に減少した(図2)。神経切断では、尾部懸垂のような体重変化の原因になるような全身性的変化を引き起こさず、右脚の下腿のみ非負荷状態にすると考えた。

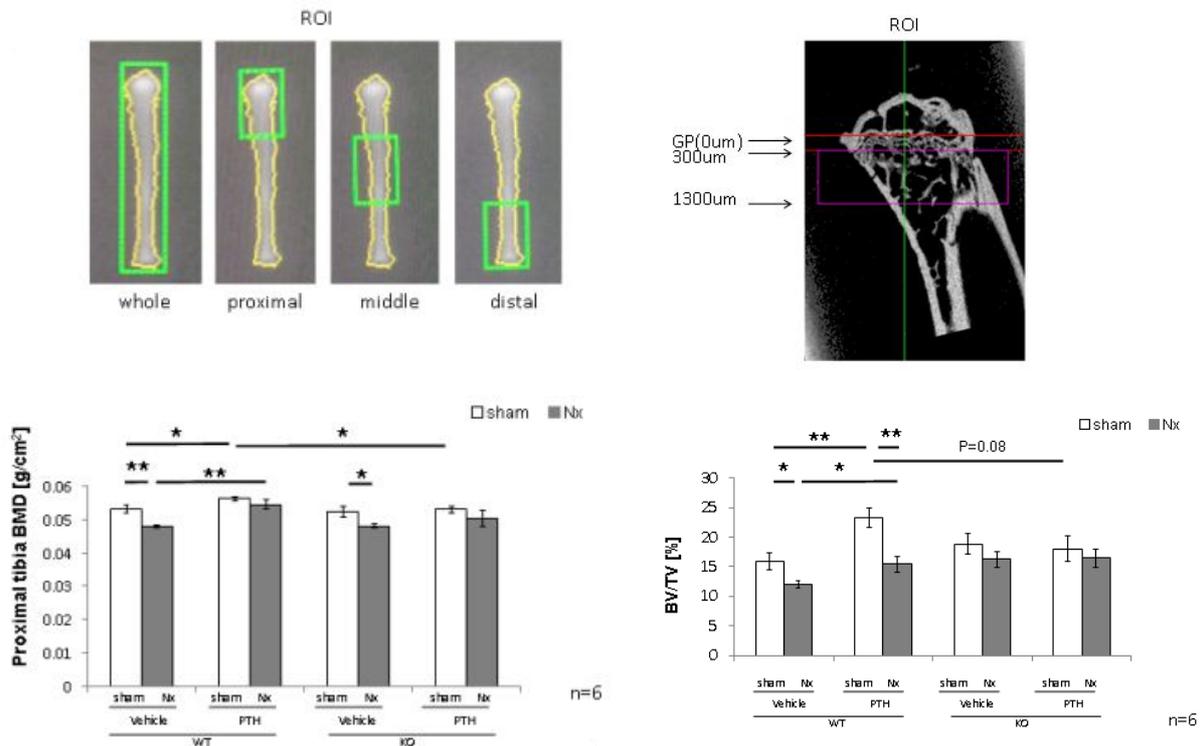


(図 1)



(図 2)

(2) OPN 欠損は Nx による海面骨骨量減少、PTH による骨量増加を共に抑制する。  
 Nx を行い、PTH を投与し 4 週後に Sacrifice を行い、脛骨を採取した。DXA 法を用いて areal-BMD を Piximus で計測した結果、野生型マウスの脛骨近位端（全長における近位端 1/3）に、Sham 側、Nx 側ともに Neurectomy (Nx) により有意な骨密度低下の生じることが示された。また PTH 投与は Nx による骨密度低下を抑えた（図 3）。そこで、脛骨近位端同等の部位を「成長板より 300  $\mu$ m 離し、1000  $\mu$ m 幅」と定め、海綿骨の  $\mu$ CT の撮影と計測を行った。WT で Nx により BV/TV は有意に減少したが、PTH 投与群では、Sham 側、Nx 側共に増加が認められた。しかし、KO マウスでは変化が認められなかった（図 4）。 $\mu$ CT による海綿骨を BV/TV で評価すると Nx による骨量低下は著明であり、PTH 投与は Nx による骨密度低下をさらに大きくする傾向が見られた。

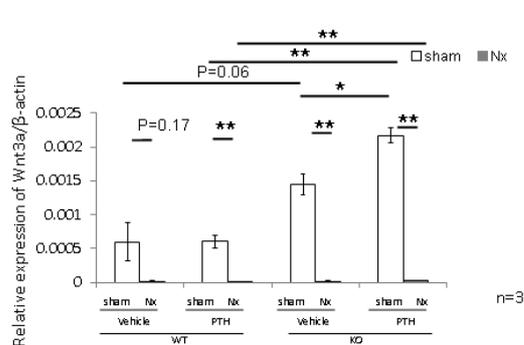


(図 3)

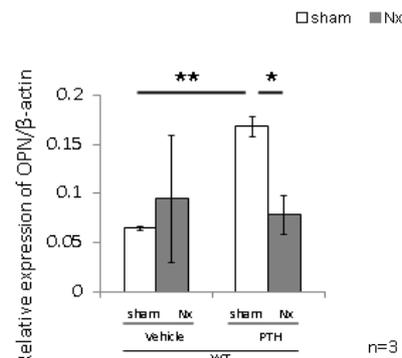
(図 4)

(3) Nx により WNT 経路が抑制される可能性を示唆した。

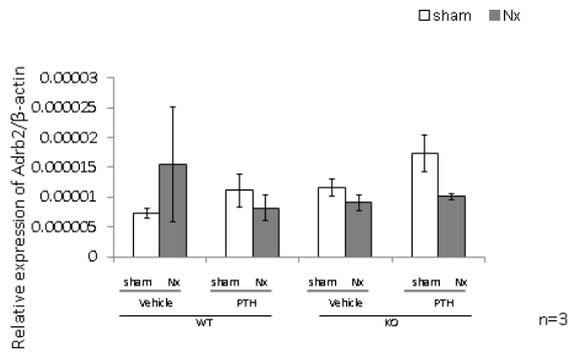
これまでの結果から、OPN 存在下でのみ PTH 間欠的投与による骨密度の増加や Nx による骨密度の減少を引き起こした。OPN 非存在下では、PTH 間欠的投与による骨密度の増加は認められず、概ね Nx で骨密度は減少傾向になった。マイクロ CT での結果も同程度となった。OPN 存在下での骨芽細胞系マーカーは、ALP、Runx2 などで PTH 投与により増加が認められた。骨細胞マーカーの BSP も同様に増加した。破骨細胞マーカーの TRAP なども PTH 投与により増加が認められた。PTH 存在下で、Nx により抑制されたのは、ALP、PTHr1、OPN などであった。最も顕著だったのは Wnt3a であった（図 5）。Wnt3a は OPN の存在に関わらず、PTH 投与にも影響されず、Nx にて強く発現が抑制した。通常、OPN 発現は Nx で活性化し骨吸収を促すと考えられ、PTH 投与下で OPN 発現が抑制され骨造成が引き起こされると推測していた（図 6）。なおアドレナリン 2 受容体 (Adrb2) はいずれも有意差が認められなかった（図 7）。以上から、Nx が Wnt3a の経路を阻害で、骨吸収を引き起こしている可能性も示唆する。しかし、OPN 欠損時にも同様な動向のため、そのメカニズムの解明はまだ不明である。



(図 5)



(図 6)



(図 7)

PTHはNxによる骨量減少を予防できるが、骨量増加までは至らなかった。Nxによって、Wnt3aの発現が抑制されたことから、Nxによる骨量減少はWnt3a経路などの抑制経路を示唆した。いずれもサンプル数が少なく、他のシグナル伝達経路の動向の確認も必要であり、今後も更なる検討が必要である。

< 引用文献 >

Ryo Hanyu et al. Anabolic action of parathyroid hormone regulated by the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. PNAS, May 8, 2012 vol.109 no.19

Masashi Nagao et al. Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin. PNAS, October 25, 2011 vol.108 no.43

Shuichi Moriya et al. JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, August 28, 2014

Takayuki Yamada et al. JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, December 23, 2014

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
---------	---------