

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06283・19K21372

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

研究課題名（英文）Elucidation of bone-destroying diseases by controlling inflammatory cytokine

研究代表者

森田 麻友（MORITA, Mayu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30624639

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 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、その多くは投与薬剤に注目したものである。顎骨のみで起こる特異性から、口腔内常在菌が骨壊死に陥る原因と考えた。そこで、ヒトに類似した薬剤関連顎骨壊死マウスモデルを新たに樹立し、その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顎骨壊死のヒトに近似した動物モデルの確立は、メカニズムの研究や治療法の開発には欠かせない。原因は、未だ解明されておらず、臨床医は治療方針の決定に難渋している。また、ビスフォスフォネート製剤が、骨粗鬆症の治療にとどまらず、様々な病態に広く使用されていることから、顎骨壊死の患者数は多い。現在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内容は極めて重要であると考えている。

研究成果の概要（英文）：Animal models for osteonecrosis of the jaw have been reported; however, most of them have focused on the administered anti-bone resorptive drugs. We considered that oral bacteria may cause osteonecrosis based on its specific occurrence in the jawbone. Therefore, we established a new mouse model of osteonecrosis of the jaw associated with drug administration similar to that in human, and analyzed by using the model. The results suggested that inflammatory cytokines produced in macrophages due to bacterial infection may cause osteoclastic diseases, as typified by osteonecrosis. These results suggest that if the mechanism of anti-inflammatory action by cytokine regulation in the field of oral and maxillofacial surgery can be clarified, it may lead to new treatment methods 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

口腔顎顔面外科領域では口腔内疾患の多くに骨吸収や骨破壊、骨欠損の合併症が認められる。ビスフォスフォネート製剤などによる骨吸収製剤の副作用である顎骨壊死もそのひとつである。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、顎骨壊死を起こすことが分かっているが、その原因や治療法は未だ解明されていない。そのため、臨床医の行う治療は顎骨壊死が起きた後の症状に合わせた対症療法となることから、予防を含めた疾患メカニズムの解明と新たな治療方法の確立が求められている。

### 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、その多くはビスフォスフォネート製剤などの薬剤に注目したものである。この疾患は顎骨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トリガーとなっているのではないかと考えた。そのことから、薬剤関連顎骨壊死マウスモデルを新たに樹立し、実際の病態に近いモデルを用いて常在菌による骨破壊性疾患の分子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。

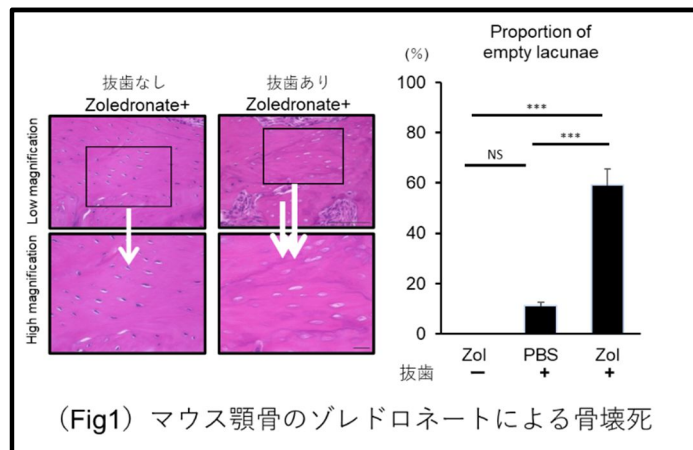
### 3. 研究の方法

*In vivo*において、申請者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、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ンートを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となっており、この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ンートの添加実験を行った。TRAP 陽性の破骨細胞はゾレドロン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 Ctsk 等の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。

### 4. 研究成果

申請者らは、侵襲的な歯科処置である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ンート(以下;Zol)を週1回2週間投与したのちに、マウスの下顎骨の第1・2臼歯を抜歯し行い、下顎臼歯を抜歯し下顎骨を評価した。抜歯5週間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

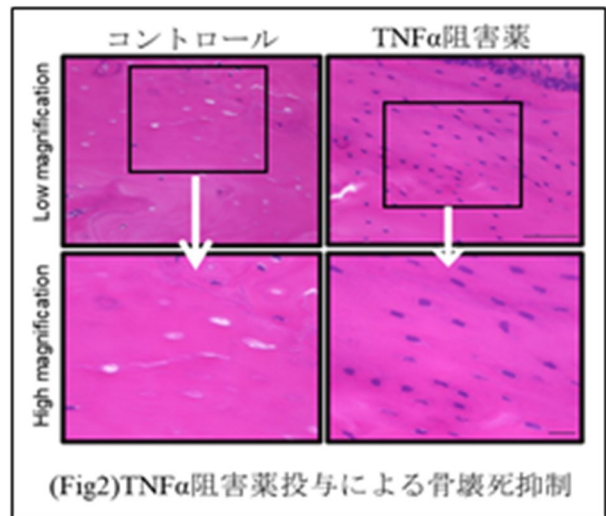
(Fig1)。Zol の投与のみでは骨壊死は発生せず、口腔内常在菌の感染が発症に寄与している可能性が示唆された。これらの結果は、骨吸収抑制薬と感染の併存により、破骨細胞前駆細胞における TNF の発現を促進することで、骨吸収抑制薬が、RANKL の存在下であっても、破骨細胞前駆細胞を TNF 発現マクロファージに分化転換することが示唆される。マウス口腔内での顎骨壊死モデルを確立したことで、より病態生理に近似したモデルで解析が可能となっている。また *In vitro* で、破骨細胞の培養系に Zol の添加実験を行った。TRAP 陽性の破骨細胞は Zol の濃度に依存し破骨細胞を抑制していることを確認した。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である TNF 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、TNF 阻害薬(Fig2)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



(Fig1) マウス顎骨のゾレドロンートによる骨壊死

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る。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

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5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019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関与している
3. 学会等名 第23回(公社)日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryutaro Iwasaki, Mayu Morita, Tomoya Soma, Seiji Asoda, Taneaki Nakagawa, Hiromasa Kawana
2. 発表標題 Osteonecrosis due to bacterial infection following bisphosphonate treatment is required an elevation of pro-inflammatory cytokine levels
3. 学会等名 13th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------