

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23037

研究課題名(和文)炎症性細胞死Pyroptosisを介した顎骨壊死の発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation the pathogenic mechanism of osteonecrosis of the jaw via inflammatory cell death 'Pyroptosis'

研究代表者

相澤 恵美(Aizawa, Emi)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：80877621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、マウスにBP製剤を投与後、抜歯を行うことにより顎骨壊死を誘導する動物モデルがいくつか確立されている。しかし臨床的には顎骨壊死が自然発症する場合もあることから、抜歯による顎骨壊死誘導動物モデルを用いた研究だけでは解明しきれない機序が存在することが推測される。BP製剤が破骨細胞にアポトーシスを誘導するとの報告はあるが、破骨細胞や顎骨壊死とパイロトーシスとの関連はこれまで報告されておらず、自然発症する顎骨壊死の発症要因についても不明である。従って、パイロトーシスにより誘発される炎症と顎骨壊死に着目した本研究の新規性や独自性は非常に高いと位置づけられ、新たな知見が得られる可能性も高いと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、マウスやラットなどにBP製剤を投与後、抜歯を行うことにより顎骨壊死を誘導する動物モデルはいくつか開発されている。しかしながら、臨床的には、顎骨壊死が自然発症する場合もあることから、抜歯による顎骨壊死誘導動物モデルを用いた研究だけでは解明しきれない機序が存在することが推測される。BP製剤が破骨細胞にアポトーシスを誘導するとの報告はあるが、破骨細胞や顎骨壊死とパイロトーシスとの関連はこれまで報告されておらず、自然発症する顎骨壊死の発症要因についても不明である。従って、パイロトーシスにより誘発される炎症と顎骨壊死に着目した本研究の学術的意義は非常に高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, several animal models have been established that induce osteonecrosis of the jaw by performing tooth extraction after administration of BP preparations to mice. However, since osteonecrosis of the jaw may occur spontaneously clinically, it is presumed that there is a mechanism that cannot be fully elucidated only by research using a jaw bone necrosis inducer model by tooth extraction. Although there have been reports that BP preparations induce apoptosis in osteoclasts, the association between osteoclasts and osteonecrosis of the jaw and pyroptosis has not been reported so far, and the causes of spontaneous osteonecrosis of the jaw are unknown. Therefore, the novelty and uniqueness of this study, which focuses on inflammation and osteonecrosis of the jaw induced by pyroptosis, is considered to be very high, and the possibility of obtaining new knowledge is also high.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎骨壊死 パイロトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

BP (Bisphosphonate) 製剤の投与中に抜歯などの外科処置を契機に発症する顎骨壊死は、現在でも有効な治療法がないことから、その病態の解明と治療法の開発は重要な課題となっている。BP 製剤による顎骨壊死が初めて報告されて以降、顎骨壊死の研究報告は増えているが、その発症メカニズムはいまだ十分には解明されていない。顎骨壊死患者の約 60%が抜歯などの侵襲的歯科治療を契機に発症するが、約 15%の患者では歯周病など慢性的な炎症状態を有する不衛生な口腔環境において自然発症することも報告されている。これまで、破骨細胞におけるアポトーシスがその病態に関与することが示されているが、歯周病などの慢性炎症を原因として自然発症してくる場合もあることから、炎症の関与も示唆されている。

NLRP3 インフラマソームは Caspase-1 の活性化を介して GSDMD (Gasdermin D) の切断を誘導し、強力な炎症性サイトカインである IL-1 分泌を伴ったパイロトーシス (Pyroptosis) と呼ばれる炎症性細胞死を惹起する。申請者は、アポトーシスに関連する Caspase-8 がインフラマソームを活性化してパイロトーシスを惹起する新たな細胞死経路を明らかにした。そこで、申請者は炎症と顎骨壊死について注目し、インフラマソーム活性化により生じる炎症性細胞死であるパイロトーシスが顎骨壊死の発症に関与しているのではないかと考えた。申請者は、すでにアポトーシスに関連する Caspase-8 が GSDME を介してパイロトーシスを誘導することを報告し、マウス骨髄細胞から分化させたマクロファージや破骨細胞では、パイロトーシスの実行因子である GSDMD/GSDME の発現が優位に上昇しているという予備的結果を得ている。このことより、BP 製剤がインフラマソーム活性化による GSDMD および GSDME を介したパイロトーシスを誘導し、これにより惹起される炎症が顎骨壊死の発症に寄与しているとの仮説に至った。

## 2. 研究の目的

2003 年に BP 製剤による顎骨壊死が初めて報告された。顎骨壊死は BP 製剤内服患者において抜歯などの外科処置を契機に発症する確率が高く、糖尿病などの基礎疾患が危険因子となることも知られている。さらに近年、歯周病などの慢性炎症を原因として自然発症してくることも報告されている。しかし、現在、顎骨壊死に対する有効な治療法がないことから、その病態の解明と治療法の開発は急務となっている。これまで、BP 製剤が破骨細胞にアポトーシスを誘導することで骨代謝を停止させ、顎骨壊死が引き起こされることが報告されているが、その分子機序については未だ不明な点が多い。また、なぜ他部位には発症せずに顎骨だけに発症するのかなど、その発症機構についても明らかになっていない。

NLRP3 インフラマソームは、病原体や生体内の危険シグナルを認識するパターン認識受容体の一つである NLRP3 とアダプター分子の ASC、プロテアーゼである Caspase-1 からなる細胞内タンパク複合体である。NLRP3 インフラマソームの活性化は、アポトーシスとネクローシスの両方の特徴を持つ、パイロトーシスと呼ばれる炎症性細胞死を惹起する。2015 年にパイロトーシスの実行分子として GSDMD が同定された。GSDMD は活性化した Caspase-1 によりプロセシングされ、GSDMD の N 末端領域 (GSDMD-NT) が細胞膜に孔形成し、パイロトーシスが惹起される。また、活性化 Caspase-1 は IL-1 前駆体 (pro-IL-1) をプロセシングし、成熟型 IL-1 が GSDMD により形成された細胞膜孔から分泌されることで炎症を惹起する。一方、アポトーシスは Caspase-3/8 を介して惹起されることが知られているが、申請者は Caspase-8 が GSDMD と同じ Gasdermin family に属する GSDME (Gasdermin E) をプロセシングすることでパイロトーシスを惹起することを明らかにした。このことから、GSDMD/GSDME を介したパイロトーシスにより惹起される炎症が顎骨壊死の発症にも関与しているのではないかと仮説に至った。実際、予備的検討により、マウス骨髄細胞から分化したマクロファージや破骨細胞では、GSDMD/GSDME の発現が有意に上昇するとの知見を得ている。以上より、本研究では、破骨細胞における GSDMD/GSDME の役割の解明と顎骨壊死病態モデルにおけるパイロトーシスの役割の検証を目的として行い、これらを標的とした新たな治療戦略の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の 2 点を達成目標として設定し、in vitro/in vivo の両面から研究を行う。

【目標 1】破骨細胞における BP 製剤による GSDMD/GSDME を介したパイロトーシス惹起機構の解明

野生型および、NLRP3・ASC・Caspase-1・GSDMD 欠損マウスの骨髄細胞を破骨細胞に分化させた後、BP 製剤 (ゾレンドロン酸、ゾメタ) によって誘導される細胞死や炎症反応を評価する。具体的には、パイロトーシス評価は、LDH や SYOX アッセイ、GSDMD/GSDME のプロセシング、IL-1 /IL-1 のプロセシングと産生を評価するとともに、細胞死形態をライブセルイメージングにより観察する。RAW264 細胞 (マウスマクロファージ) を破骨細胞に分化させ、CRISPR/Cas9 シ

ステムによりインフラマソーム/パイロトーシス関連分子欠損細胞を作成して、細胞死とそのメカニズムを詳細に検討する。

【目標2】マウス顎骨壊死モデルを用いた NLRP3 インフラマソームとパイロトーシスの役割の検証

野生型および、NLRP3・ASC・Caspase-1・GSDMD 欠損マウスを用いて、BP 製剤腹腔内投与/抜歯による顎骨壊死マウスモデルを作成し、 $\mu$ CT を用いて顎骨壊死部の画像や組織評価を行い、これら関連分子の病態における役割を検証する。また、実際にインフラマソーム活性化やパイロトーシスが誘導されているかを、免疫染色や組織抽出物を用いたウェスタンブロット法等で評価する。

#### 4. 研究成果

申請者は、マウス骨髄細胞から分化させたマクロファージや破骨細胞では、パイロトーシスの実行因子である GSDMD/GSDME の発現が有意に上昇しているという予備的結果を得ている。これらのことより、マウス骨髄細胞を破骨細胞に分化させ BP 製剤による刺激を行う予定であったが、まずはヒト単球由来マクロファージ細胞株である THP-1 細胞を用いて実験を行った。実験方法は上記実験方法 1 と同様の方法で行った。BP 製剤により惹起される細胞死を評価するため LDH の評価を行ったところ、BP 製剤投与群では LDH の上昇を認める結果を得ている。また、inhibitor ではこれらの細胞死が抑制されている結果を得ている。今後は引き続き、GSDMD/GSDME のプロセッシング、IL-1 /IL-1 のプロセッシングと産生を評価するとともに、細胞死形態をライブセルイメージングにより観察する予定である。また、マウス顎骨壊死も出るを用いた実験については、現在病態モデルの作成を行っており、評価を継続する予定である。

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