

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592511

研究課題名（和文）ビスホスホネートによる顎骨壊死発症機構に対する免疫学的アプローチ

研究課題名（英文）Immunological approaches to the mechanisms of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw

研究代表者

出山 義昭（DEYAMA YOSHIAKI）

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：80271667

研究成果の概要（和文）：ビスホスホネートによる顎骨壊死発症機構の一端を明らかにするために、ビスホスホネートの破骨細胞やその前駆細胞であるマクロファージに対する作用について検討した。その結果、顎骨壊死発症が報告されているタイプのビスホスホネートは破骨細胞の分化ならびに骨吸収活性を強力に抑制するが、一方ではマクロファージの細胞死を誘導するとともに感染による細胞障害に対しても促進的に作用することが明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of bisphosphonate on osteoclasts and their precursor cells to clarify one of the mechanisms of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). BRONJ-related bisphosphonates strongly inhibited osteoclastogenesis and bone resorption activity. On the other hand, they showed cytotoxicity and enhanced microbial pathogens-induced cell death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	105,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ビスホスホネート、顎骨壊死、免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) ビスホスホネート (BP) は骨粗鬆症、悪性腫瘍による高カルシウム血症、乳癌や前立腺癌などの骨転移、多発性骨髄腫、骨 Paget 病、小児骨系不全など様々な骨代謝疾患においてその有用性が報告されている。また、BP は国内外のガイドラインにより骨粗鬆症治療薬の第一選択薬となっており、BP

系薬剤は骨代謝異常疾患の治療には不可欠な存在といえる。

(2) BP 系薬剤投与との関連性が疑われる重篤な顎骨壊死・顎骨骨髄炎が報告されている。これらの副作用症例の多くは、抜歯などの侵襲的歯科処置や局所感染に関連して発現しており、抜歯した場合にはその部位の付

近で発現することが明らかになっている。

(3) 顎骨は口腔と隣接しており、抜歯などの観血的処置や何らかの障害により口腔内常在菌やウイルスなどの病原微生物に暴露される可能性は非常に高い。BPsは投与後、骨に高濃度に分布しており、周辺組織に存在する細胞の免疫機構に影響を与えていることが推測される。

(4) BPのうちアミノ基を含有する化学構造を有するもの(N-BPs)が含有しないもの(nonN-BPs)よりも骨吸収抑制活性が強いとされる一方で、顎骨壊死の発症も報告されている。

2. 研究の目的

(1) N-BPsはnonN-BPsよりも破骨細胞の分化・活性化を抑制するかを明らかにする。

(2) N-BPsはnonN-BPsよりも破骨細胞の細胞死を誘導するかを明らかにする。

(3) 免疫細胞にN-BPsを作用させるとnonN-BPsを作用させた場合よりも細菌性抗原による細胞死の誘導が促進されるかを明らかにする。

3. 研究の方法

細胞はマクロファージ様Raw264.3細胞を用いた。BPsはnonN-BPsとしてetidronateならびにTRK-530、N-BPsとしてalendronate、risedronateおよびzoledronateを用いた。

(1) 50ng/ml RANKL存在下でBPsを作用させて破骨細胞誘導に対する作用濃度ならびに作用時間依存性を検討した。

(2) Raw細胞ならびにRANKL存在下で分化させた破骨細胞に対してBPsを作用させ、細胞毒性を検討した。

(3) TRK-530あるいはzoledronate存在下でRaw細胞にRANKLを作用して骨吸収活性を検討した。

(4) TRK-530あるいはzoledronate存在下でRaw細胞にRANKLを作用して破骨細胞分化・活性化に関する遺伝子ならびにアポトーシス関連遺伝子のmRNA発現に関してReal-time PCR法を用いて検討した。

(5) TRK-530あるいはzoledronate存在下でRaw細胞にRANKLを作用してDNA断片化やcaspase3/7活性に対する影響について検討した。

(6) BPs存在下でRaw細胞にLPSやpoly I:C

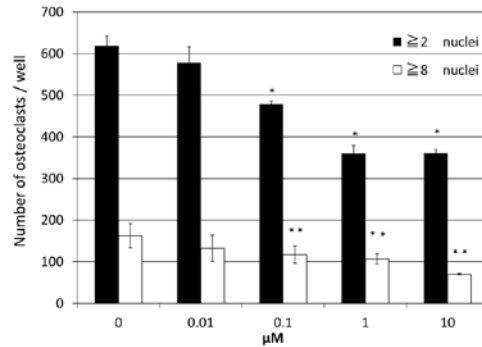
などの細菌性抗原を作用して細胞死に対する影響を検討した。

4. 研究成果

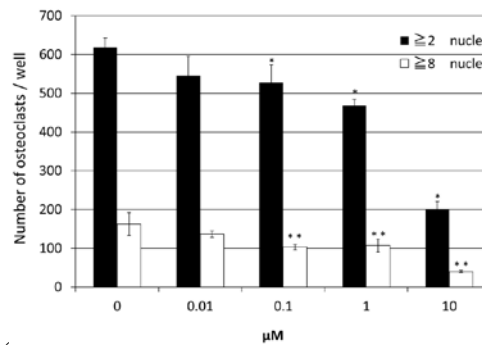
(1) すべてのBPsにより破骨細胞の誘導が抑制された。

<濃度依存性>

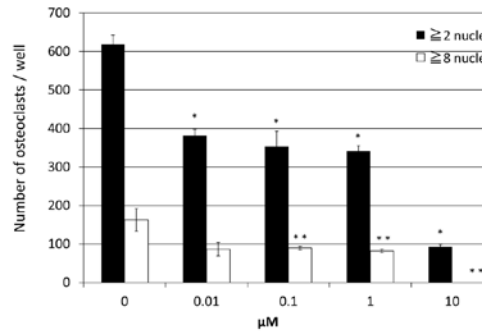
①etidronate



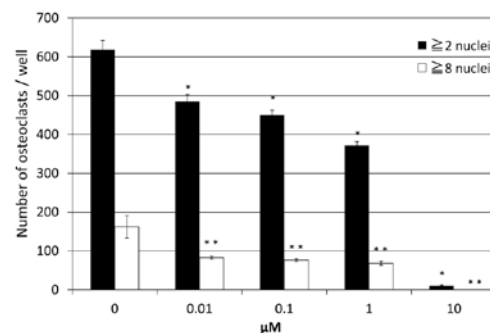
②TRK-530



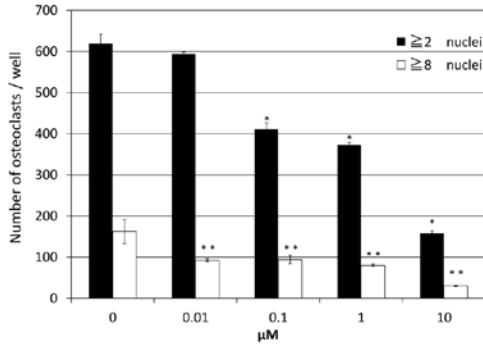
③alendronate



④risedronate

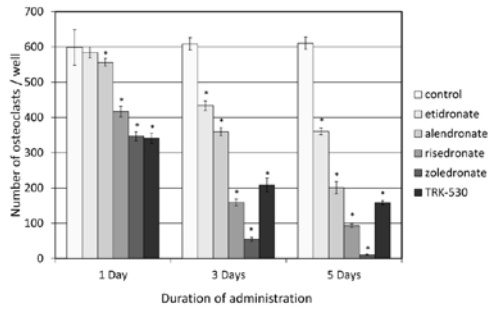


⑤ zoledronate

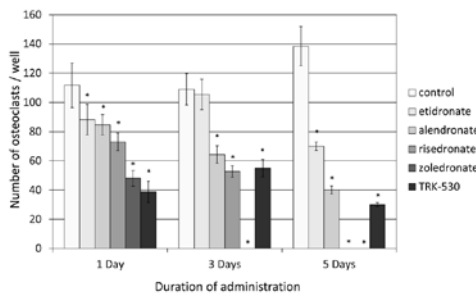


<作用時間依存性>

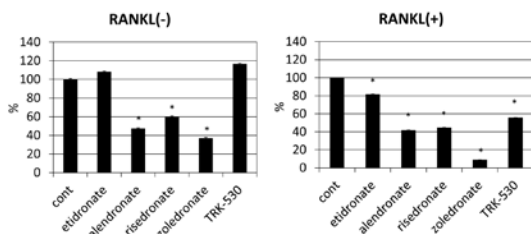
① 2核以下の細胞



② 8核以上の細胞

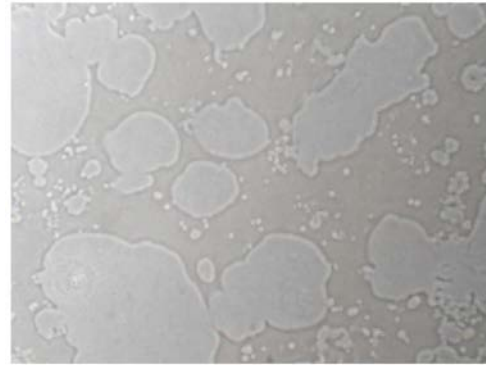


(2) BPs の細胞毒性はマクロファージよりも破骨細胞に対してより認められた

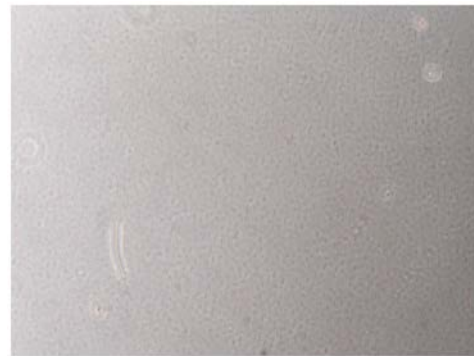


(3) N-BPs である zoledronate は 10μM で完全に骨吸収活性が抑制されたが、nonN-BPs である TRK-530 においても 10μM でほぼ完全に骨吸収活性は抑制された。

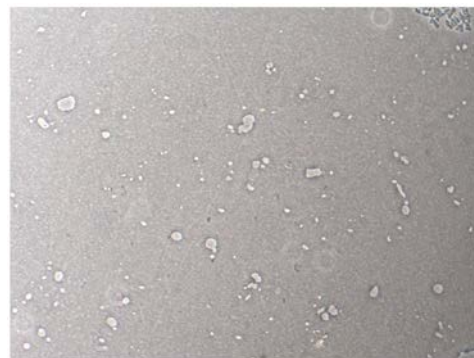
① 対照群



② zoledronate

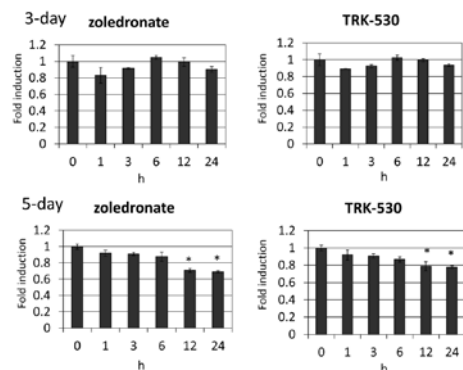


③ TRK-530

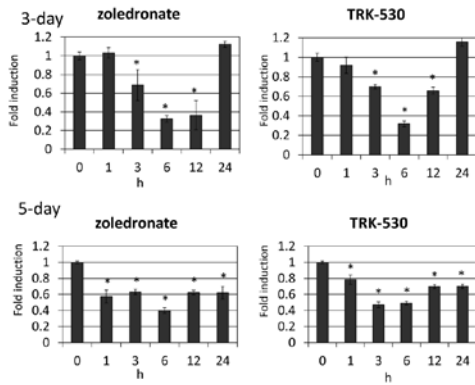


(4) いずれの BPs を作用させても破骨細胞分化、融合および活性化に関する遺伝子の mRNA は減少し、アポトーシスを誘導する遺伝子の mRNA の発現が増加した。

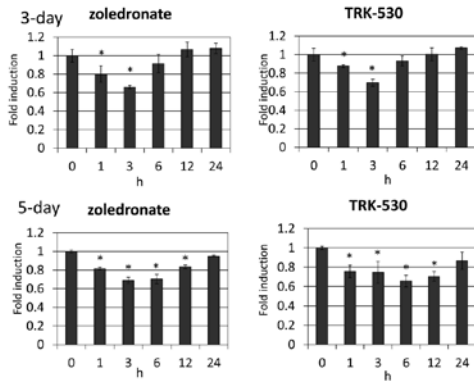
① NFATc1



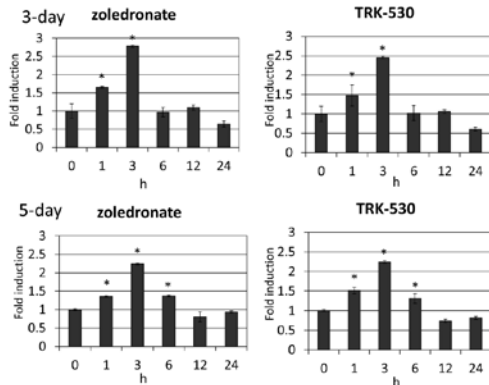
②DC-STAMP



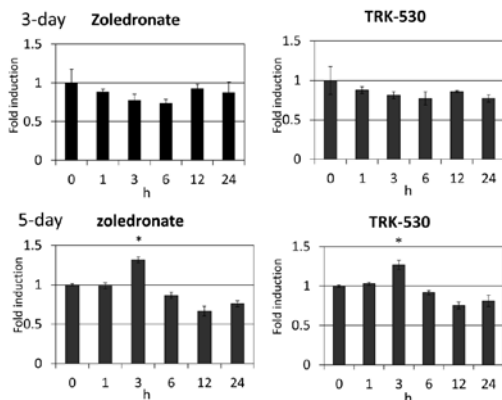
③TRAP



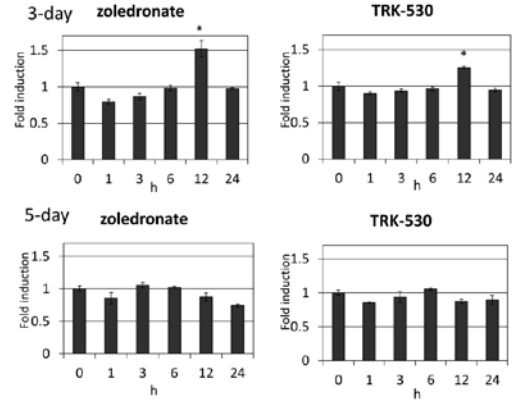
④Fas



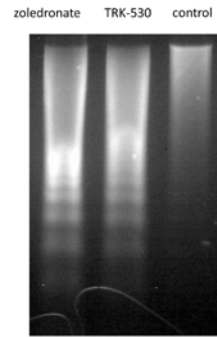
⑤Caspase3



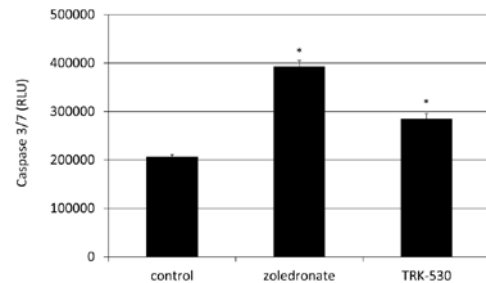
⑥Caspase8



(5) nonN-BPs ならびに N-BPs はともに破骨細胞のアポトーシス誘導した
①DNA の断片化が認められた

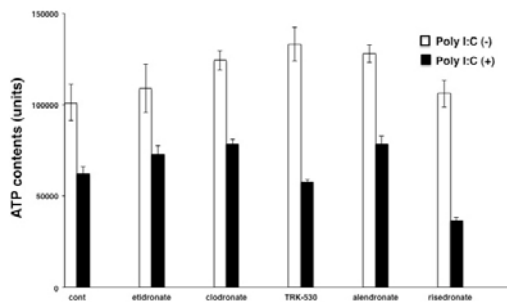


②Caspase3/7 活性の増加が認められた

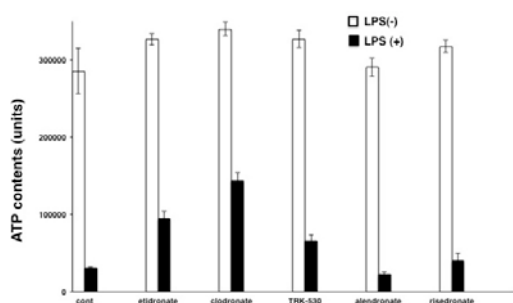


(6) N-BPs は nonN-BPs よりも細菌性抗原による細胞毒性を増強させた。

①resedronate はマクロファージに対する poly I:C による細胞死誘導作用を増強した



②nonN-BPs はマクロファージに対する LPS による細胞死を回復させた。



これまでに骨粗鬆症や骨に転移した癌の治療には骨吸収活性が高いN-BPsが盛んに用いられてきた。本研究においてこれらのN-BPsはマクロファージなどの免疫細胞に対してアポトーシスなどの細胞障害を生じさせ、顎骨における免疫状態が悪化し、口腔内感染などにより、顎骨壊死を生じさせる可能性が示唆された。一方で、nonN-BPsはN-BPsよりも骨吸収活性が低いとされてきたが、本研究で用いたTRK-530はin vitroにおいてN-BPsと勝るとも劣らない骨吸収活性を示すとともに細胞毒性はより軽減されていた。さらに、TRK-530を始めとしたnonN-BPsはLPSにより誘導される細胞死を抑制した。以上の結果から、TRK-530などのnonN-BPsは顎骨壊死などの副作用を生じさせる可能性が低い、骨粗鬆症や骨転移癌の治療薬として応用できる可能性が考えられた。これらの結果は国内外においてこれまでに明らかにされていない事項である。

今後はOVXマウスを用いた骨訴訟症モデルや発癌実験などのin vitroの実験系においてTRK-530の有用性を確認することにより、実際の臨床応用への足がかりが得られるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Nakamura K, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Morita M. Toll like receptor 5 ligand induces monocyte chemoattractant protein-1 in mouse osteoblastic cells., *Biomed Res*, 査読有, 33, 2012, 39-44, DOI: 10.2220/biomedres.33.39
- ② Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, Kikuri T, Hasegawa T, Tei K, Shinoda H, Suzuki K, Kitagawa Y. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells, *Int J Mol Med.*, 査読有, 29, 2011, 1007-1015, DOI: 10.3892/ijmm2012.952
- ③ Nomura M, Yoshimura Y, Kikuri T,

Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Koshiro K, Sano H, Suzuki K, Inoue N, Platinum nanoparticles suppress osteoclastogenesis through scavenging of reactive oxygen species produced in RAW264.7 cells., *J Pharmacol Sci.*, 査読有, 117, 2011, 243-252, DOI: 10.1254/jphs.11099FP

- ④ Nakamura K, Deyama Y, Yoshimura Y, Hashimoto M, Kaga M, Suzuki K, Yawaka Y., Tannin-fluoride preparation attenuates prostaglandin E2 production by dental pulp cells., *Mol Med Report*, 査読有, 4, 2011, 641-644, DOI: 10.3892/mmr.2011.476
- ⑤ Minamikawa H, Yamada M, Deyama Y, Suzuki K, Kaga M, Yawaka Y, Ogawa T, Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate, *J Endod.*, 査読有, 37, 2011, 637-641, DOI:10.1016/j.joen.2011.02.012
- ⑥ Shibata K, Yoshimura Y, Kikuri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Suzuki K, Iida J, Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells, *Int J Mol Med.*, 査読有, 28, 2011, 73-79, DOI: 10.3892/ijmm.2011.675
- ⑦ Minamikawa H, Yamada M, Iwasa F, Ueno T, Deyama Y, Suzuki K, Yawaka Y, Ogawa T, Amino acid derivative-mediated detoxification and functionalization of dual cure dental restorative material for dental pulp cell mineralization, *Biomaterials*, 査読有, 31, 2010, 7213-7225, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.018
- ⑧ El-Beialy W, Galal N, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Tei K, Totsuka Y, Regulation of human and pig renal Na⁺,K⁺-ATPase activity by tyrosine phosphorylation of their α 1-subunits, *J Membr Biol.*, 査読有, 233, 2010, 119-126, DOI: 10.1007/s00232-010-9231-z
- ⑨ Galal N, El-Beialy W, Deyama Y, Yoshimura Y, Tei K, Suzuki K, Totsuka Y, Up-regulation of the G3PDH 'housekeeping' gene by estrogen, *Mol Med Report*, 査読有, 2010, 111-113, DOI: 10.3892/mmr_00000226
- ⑩ El-Beialy W, Galal N, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Tei K, Totsuka Y, Effects of estrogen on PMCA 2 and 4 in human fibroblast-like synovial cells and mouse macrophage-like cells, *Endocr J.*, 査読有, 57, 2010, 93-97, DOI: 10.1507/endocrj.K09E-247

〔学会発表〕(計7件)

- ① 出山義昭、Effect of bisphosphonates on osteoclasts and their precursor cells、第85回日本薬理学会年会、平成24年3月15日、国立京都国際会館(京都府)
- ② 出山義昭、二本鎖RNAは骨芽細胞の石灰化を促進する、第34回日本分子生物学会年会、平成23年12月16日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ③ 出山義昭、Flagellinに反応してマウス骨芽細胞はMCP-1を放出する、第84回日本薬理学会年会、平成23年3月24日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ④ 出山義昭、骨芽細胞におけるMCP-1産生に対するFlagellinの作用、第52回歯科基礎医学会学術大会・総会、平成22年9月22日、タワーホール船堀(東京都)
- ⑤ 出山義昭、 $\alpha 1$ サブユニットのチロシンリン酸化による Na^+ 、 K^+ -ATPase活性の制御、第61回日本薬理学会北部会、平成22年9月10日、札幌コンベンションセンター(北海道)
- ⑥ 出山義昭、Fluoride irreversibly inhibits Na,K-ATPase activity with aluminum and divalent cations, the IADR General Session、平成22年7月16日、Barcelona (Spain)
- ⑦ 出山義昭、関節滑膜細胞のPMCAに対するエストロゲンの作用、第83回日本薬理学会年会、2010年3月17日、大阪市、大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出山 義昭 (DEYAMA YOSHIAKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：80271667

(2) 研究分担者

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：00109456
安田 元昭 (YASUDA MOTOAKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：90239765
飯塚 正 (IIZUKA TADASHI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：80168062
吉村 善隆 (YOSHIMURA YOSHITAKA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30230816

(3) 連携研究者

なし