

## 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25年4月20日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592059

研究課題名（和文） 著明な骨形成促進作用を持つ新規ビスホスホネートの歯周疾患治療医学への応用

研究課題名（英文） A novel bisphosphonate with potent anabolic action for periodontitis

研究代表者

篠田 壽 (SHINODA HISASHI)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：80014025

研究成果の概要（和文）：抗酸化性の側鎖を持ち骨形成促進作用を有する新規ビスホスホネート [4-(methylthio)phenylthio]methanebisphosphonate (MPMBP) の歯周疾患治療医学への応用を目指し、その作用メカニズムと動物実験モデルでの有効性を検討した。その結果、MPMBP は、検討したすべての骨形成促進関連遺伝子の発現を促進し、またラットやイヌの実験的歯周炎を有意に抑制したことから、歯周疾患治療薬として高い可能性を持つ薬物であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The current study was carried out to investigate by what mechanism a novel bisphosphonate, [4-(methylthio) phenylthio] methanebisphosphonate (MPMBP), can promote bone formation, and whether this compound can be effective on the periodontitis. Our results show that MPMBP promotes the expression of mRNA that relates osteogenesis, and that this compound was effective on the experimental periodontitis in rats and dogs. MPMBP may be used not only for the treatment of periodontitis, but also for various conditions that require the regeneration of bone tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：ビスホスホネート、歯周病、骨形成、骨吸収、NF- $\kappa$ B

### 1. 研究開始当初の背景

歯科領域では歯周疾患による骨の吸収・破壊、移植骨やインプラント材の維持、抜歯窩や嚢胞摘出後の修復など、骨形成を促進する必要のある病態が多い。中でも歯周病は歯の喪失をもたらす最大要因であり、これを如何に抑制するかは、歯科領域における緊急の課題である。

### 2. 研究の目的

我々は、ビスホスホネート化合物 (BPs) の構造活性相関に関する基礎研究から、抗酸化性の側鎖を持つ [4-(methylthio)phenylthio] methanebisphosphonate (MPMBP) が、骨吸収の抑制のみならず著明な骨形成促進作用を持つことを見出している。本研究は、この MPMBP の骨形成促進機序を明らかに

し、動物実験において歯周病に対する有効性を検討することである。

### 3. 研究の方法

(1)、MPMBP の骨形成促進機序について、骨器官培養系および骨芽細胞様細胞培養系を用いて明らかにするための実験を行った。

具体的な実験系としては、マウス骨器官培養系および MC3T3-E1 細胞を用いた。これらの実験系を用い、MPMBP が転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を阻害し、この抑制が骨形成促進作用に関与するのではないかとの作業仮説に基づき、実験を進めた。我々が、この転写因子に着目した根拠には幾つかあるが、その一つは、最近 nature medicine 誌に発表された Chang 等による論文 (Vol. 15, 682-689, 2009) (I- $\kappa$ B や NF- $\kappa$ B のリン酸化の阻害が、骨基質形成促進に関与する転写因子 Fra-1 の発現を促進し、骨形成を促進するとの報告) である。また、別の根拠として、MPMBP がマウスカルバリア細胞において COX-2 や iNOS mRNA 発現を抑制し、PGE2 や NO の産生抑制を介して抗炎症作用を発現することを我々は見ているが (J Pharmacol Sci 2008, 日本骨代謝学会 2009)、この現象は NF- $\kappa$ B の活性化の抑制を介して起こる現象であることを示唆しているからである。また、多くの抗酸化剤は、NF- $\kappa$ B 経路を不活化することが知られているが、MPMBP は、抗酸化性の側鎖を持ち、活性酸素をスカベンジする作用を有していることもあげられる。本実験では、MPMBP が骨器官培養、細胞培養系において、I- $\kappa$ B や NF- $\kappa$ B のリン酸化、NF- $\kappa$ B の核内への移行、Fra-1 の発現、BMP シグナリング、骨基質の産生等にどのような影響を与えるかを中心に、PCR による遺伝子発現、western blot による目的タンパク・リン酸化タンパクの検出、免疫組織化学的染色を施した細胞標本・組織標本の共焦点レーザー顕微鏡による観察、等の実験方法を適宜組み合わせで検討した。また、これらの実験は、MPMBP の特性を明らかにするため、他の BPs を適宜用いながら、構造活性相関の観点から実施・考察した。

(2) ラットおよびイヌに惹起した実験的歯周炎に対して MPMBP の局所投与が歯槽骨の減少を抑制し、骨形成を促進するか否かについてその有効性を検討した。具体的には次のような実験系を用いた。

- ① ビーグル犬 5 頭を用いた。左右の下顎小白歯各々 3 本の歯頸部に絹糸リガチャーを装着させ、実験的な歯周炎を惹起させた。片側の歯槽骨骨膜下に MPMBP 溶液 (10mM) を 2 週間おきに 0.1ml づつ 4 回注射し、反対側の歯槽骨部には 0.9%NaCl

溶液を同様に注射した。また、実験開始時と 4 週目にテトラサイクリンとアリザリンレッドによる骨標識を行った。実験期間は 2 か月とした。実験終了後、顎骨を摘出し、軟 X 線撮影を行い、PQCT と  $\mu$ CT による、骨形態計測と骨塩量の測定を行った。さらに、研磨標本や脱灰組織標本作製し、組織学的検索を行った。

- ② Wistar 系ラット 40 匹に実験的歯周炎を惹起させ、4 群に分けた。ゴム製リガチャーを下顎第一大臼歯の歯頸部に装着させ、各群のラットには 0.9%NaCl (コントロール)、5、10、20 mM の MPMBP 溶液を当該臼歯周辺の歯槽骨骨膜下に 3 日おきに 5 回注射した。実験終了後、顎骨を摘出、イヌと同様な検索を行った。
- ③ Wistar 系ラット 30 匹を用いた。MPMBP の局所投与が歯槽骨の骨形成にどのような影響を与えるかについて検討した。20mM の MPMBP 溶液 15  $\mu$ l を右側上顎第一大臼歯の近心歯槽骨部に 4 日おき 6 回局所注射した。左側の同部位には 0.9%NaCl を同様に注射した。また、実験開始時と終了時にテトラサイクリンとカルセインを用い硬組織内時刻描記を施した。実験終了後顎骨の研磨標本作製し、実験期間中に骨形成量を測定し、また骨芽細胞を中心に組織学的な検索を行った。

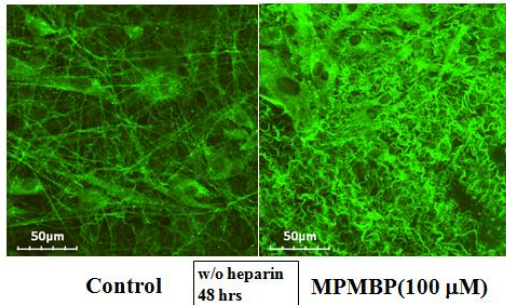
### 4. 研究成果

#### (1) MPMBP の骨形成促進作用機序の検討

BPs の薬理活性や作用機序は、P-C-P 結合の炭素原子に付加される側鎖の違いにより異なることが知られている。本研究では、薬理的な構造活性相関の観点から、MPMBP も含め、種々な BPs が骨の形成系に対してどのような作用を持つかについて広範な検討を加えた。その結果、以下のような結果が得られた。

- ① etidronate、clodronate などの窒素非含有 BPs (nonN-BPs) は、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞の 3 週間培養系において用量依存的にアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を上昇させたのに対して、窒素含有 BPs (N-BPs)、特に高濃度の incadronate や zoledronate は ALP 活性を著明に抑制した。
- ② MPMBP は 24-72 時間のマウス骨器官培養系において、他の BPs には見られない著明な collagen (Type-1) 基質合成促進作用を示した (免疫組織化学、共焦点レーザー顕微鏡による観察) (図 1)。さらに、MPMBP は ALP、type-I collagen、osteocalcin、bone sialoprotein などの

骨形成関連遺伝子の発現を促進した。一方、zoledronate にはこのような作用は見られなかった (RT-PCR による解析)。



[図 1] 器官培養したマウス頭蓋冠の type 1 コラーゲン免疫組織化学染色像 (緑色が type 1 コラーゲン線維)。48 時間の培養により、MPMBP 100  $\mu$ M を培養液に加えた骨ではコントロールの骨に比べて、コラーゲン線維が多量に形成されている。

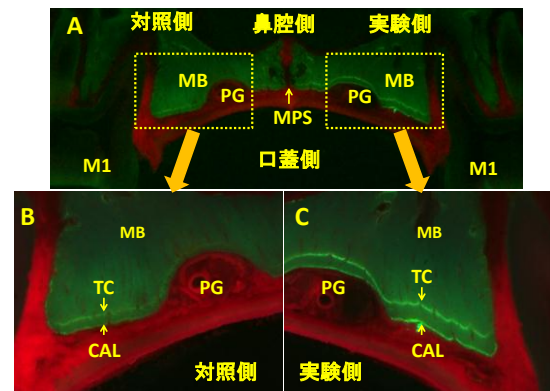
- ③ MPMBP を含む clodronate、etidronate 等の nonN-BPs は、24-72 時間のマウス骨器官培養系において、LPS によって誘起されるプロスタグランジン ( $PGE_2$ ) や一酸化窒素 (NO) の産生促進を用量依存的に抑制したのに対して、zoledronate や alendronate などの N-BPs は、用量依存的にこれらを促進した。また、western blot 解析から、これらの結果は NF- $\kappa$ B 経路の抑制と促進を介して起こることが示された。
- ④ 免疫組織学的な手法と western blot 解析によって、MPMBP の NF- $\kappa$ B 経路への作用を zoledronate の効果と比較検討した。その結果、zoledronate が NF- $\kappa$ B の核内への移行を促進するのに対して、MPMBP は抑制することが明らかとなった。また、マウス頭蓋冠培養系の骨芽細胞系細胞において骨基質形成促進に関与する転写因子 Fra-1 の発現に及ぼす zoledronate と MPMBP の作用を検討したところ、zoledronate は Fra-1 の発現を抑制したのに対して MPMBP はその発現を著しく促進した。

これらの結果から、BPs の骨形成系に与える効果は一樣ではなく、側鎖の違いに依存すること、また、多くの BPs のなかで、MPMBP は特に著明な骨形成促進作用を持つことが示された。さらに MPMBP は LPS によって誘導される  $PGE_2$  や NO の産生を抑えることから細菌性炎症に対して抑制的に作用する可能性が示され、歯周病治療薬として好ましい性質を併せ持つことが示された。NF- $\kappa$ B 経路の抑制

は骨形成を促進するとの報告があり、この点も MPMBP の骨形成促進機序に関連すると考えられる。

## (2) MPMBP が歯周病に及ぼす作用に関する動物実験での検討

- ① ビーグル犬 5 頭を用い実験的歯周炎に及ぼす、MPMBP の効果を検討した。その結果、MPMBP は局所投与は投与部位周辺部の歯槽骨骨密度を著明に増加させ、歯槽骨頂の低下を有意に抑制することが明らかになった。また、その効果は経時的に大となった。
- ② Wistar 系ラットに実験的歯周炎を惹起させて MPMBP 局所投与の効果を検証した。その結果、MPMBP は用量依的に歯槽骨骨密度を増加させ、歯周病による歯槽骨頂の低下を抑制した。
- ③ Wistar 系ラット 30 匹を用い、MPMBP の上顎骨歯槽骨部への局所投与がどのような効果を及ぼすかについて検討した。その結果、MPMBP の局所投与は、投与部位周辺の上顎骨、歯槽骨の骨量、骨塩量、骨密度を有意に増加させた。また、実験期間中に形成された口蓋側の新生骨量は、実験側では対照側の 1.6 倍強に達することが明らかとなり (図 2)、MPMBP が *in vivo* において骨形成促進作用を持つことが示唆された。



[図 2] ラット上顎骨研磨標本。上顎左右第一大臼歯を結んだ前頭断標本。蛍光顕微鏡写真。B、C の図は A 図の左側顎骨 (実験側: MPMBP (20mM) を 3 日おき 6 回局所投与した側) と右側顎骨 (対照側: 0.9%NaCl 投与側) の各々拡大図。MB: 上顎骨 (緑の部分)、PG: 口蓋溝、M1: 第一大臼歯、MPS: 正中口蓋縫合、TC: テトラサイクリンによる時刻描記線、CAL: カルセインによる時刻描記線。赤色部分は口腔粘膜組織。MPMBP を投与した実験側では、実験期

間中に形成された骨量(テトラサイクリンとカルセインの時刻域描記線で囲われた領域)が対照側に比べて著明に多い。

以上のような *in viro*, *in vivo* における実験結果は、MPMBP の歯周病治療薬としての高い可能性を示すものであり、さらに、抜歯窩の修復、インプラントの維持、骨折治癒の促進など、骨欠損を伴う病態の治療や、骨再生が必要となる様々な病態に対する適用も可能と考えられた。

#### 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 3 件)

- ① Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, Kikuri T, Hasegawa T, Tei K, Shinoda H, Suzuki K, Kitagawa Y: Effect of bisphosphonate on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. International Journal of Molecular Medicine 査読有、2012、29 巻、1007-1015  
DOI:10.3892/ijmm2012.952
- ② 鳴澤祐香、千葉美麗、鈴木恵子、村上忍、竹山禎章、山田章司、五十嵐薫、篠田壽：新規ビスフォスホネート [4-(methylthio) phenylthio] methane-bisphosphonate の anabolic な作用 Clinical Calcium 査読無、21 巻 2011、116-117.
- ③ Sugazaki M, Hirotsu S, Takeyama S, Shinoda H: Effects of mevastatin on grafted bone in MRL/MpJ mice. Connective Tissue Research, 査読有、51 巻、2010、105-112  
DOI:10.3109/03008200903105098

[学会発表] (計 7 件)

- ① Suzuki K, Arimoto T, Morohashi T, Sakai N, Karakawa A, Shinoda H, Yamada S: Pam3CSK4, a TLR2 agonist, induces *in vitro* osteoclastogenesis RANKL-independently and resorbs calvarial and alveolar bone *in vivo*. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2013 August 23, Milan (Italy)
- ② Yano A, Suzuki K, Morohashi T, Arimoto T, Karakawa A, Igarashi T, Shinoda H, Yamamoto M, Yamada S: Pam3CSK4, a TLR2 agonist, induces *in vitro* osteoclastogenesis RANKL-independently and resorbs alveolar bone in rats. Annual Meeting for the

American Society for Bone and Mineral Research 2011 September 17, San Diego (U.S.A)

- ③ 鳴澤祐香、千葉美麗、鈴木恵子、村上忍、竹山禎章、山田章司、五十嵐薫、篠田壽：新規ビスフォスホネート [4-(methylthio) phenylthio] methane-bisphosphonate] の anabolic な作用 第 32 回東北骨代謝研究会、平成 23 年 2 月 5 日 仙台
- ④ 鳴澤祐香、千葉美麗、鈴木恵子、村上忍、竹山禎章、山田章司、五十嵐薫、篠田壽:Anabolic な作用をもつ新規ビスホスホネート [4-(methylthio) phenylthio] methanebisphosphonate] の作用機序. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010 年 9 月 20-22 日 東京
- ⑤ Suzuki K, Takeshita F, Yamamoto K, Yamada S, Shinoda H, Ochiya T: *In vivo* imaging of osteoclast precursor recruitment to the inflammatory site where extensive bone destruction occurs. Annual Meeting for the American Society for Bone and Mineral Research, 2010 Sep 17, Toronto (Canada)
- ⑥ Shinoda H, Suzuki K, Chiba M, Murakami S, Takeyama S, Narusawa Y, Hirotsu H, Yamada S, Igarashi K, Stern PH: A novel bisphosphonate with potent anabolic action. Annual Meeting for the American Society for Bone and Mineral Research, 2010 Sep 15, Toronto (Canada)
- ⑦ Shinoda H, Murakami S, Suzuki K, Chiba M, Takeyama S, Narusawa Y, Hirotsu H, Yamada S, Igarashi K, Stern PH: Structure-activity relationships of bisphosphonates with respect to their effect on the LPS-induced increase in the synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub> and nitric oxide. Annual Meeting for the American Society for Bone and Mineral Research, 2010 Sep 16, Toronto (Canada)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠田 壽 (SHINODA HISASHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常  
勤講師  
研究者番号：80014025

### (2) 研究分担者

五十嵐 薫 (IGARASHI KAORU)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：70202851

村上 忍 (MURAKAMI SHINOBU)  
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常  
勤講師  
研究者番号：40436093

千葉 美麗 (CHIBA MIREI)  
東北大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：10236820

鈴木 恵子 (SUZUKI KEIKO)  
昭和大学・歯学部・講師  
研究者番号：50119187

### (3) 連携研究者

なし