

## 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 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791963

研究課題名（和文）ビスフォスフォネートによる顎骨壊死のメカニズム解明のための細胞培養モデルの開発

研究課題名（英文）Development of an invitro keratinocyte cell culture model for analysis of mechanisms of Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ)

研究代表者

寺田 典子 (TERADA MICHIKO)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：60374550

研究成果の概要（和文）：ビスフォスフォネート製剤(BP)は、顎骨壊死(BRONJ)を引き起こす。BRONJ 発症の病因は明らかでないが、口腔粘膜の創傷治癒遅延が関連すると言われている。本研究はこれをもとにBPの口腔粘膜上皮細胞への影響を2次元および3次元培養にて検討を行った。その結果、BPが口腔粘膜上皮細胞にDNAに損傷を与えることで細胞周期をS期で停止させ、細胞増殖を抑制し、口腔粘膜の創傷治癒遅延を引き起こしてBRONJ発症に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Bisphosphonates (BP) causes bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). While the etiology of BRONJ has not been clarified, it would appear that the compromised oral mucosa wound healing is associated with the onset of BRONJ. The effects of BPs on the oral mucosa keratinocytes were examined by 2D as well as 3D oral keratinocyte culture system. In consequence, we found BP induced DNA damage response in the oral mucosa keratinocytes and caused cell cycle arrest in S-phase, indication the inhibitors of the cell proliferation. Thus, it is suggested that BPs are related to the onset of BRONJ by a loss of oral mucosa tissue integrity.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：ビスフォスフォネート(BP)、BP関連顎骨壊死、病因、口腔粘膜上皮、細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート(BP)製剤は、骨関連事象、骨粗鬆症に対して治療効果の高い薬剤として使用されている。特に窒素含有BP

の処方が多く、必然的に顎骨壊死を起こす頻度も高い。しかしながら、その発症機序についてはほとんど解明されていない。

BP服用中の患者の口腔内観血的処置後に

生ずる、顎骨の“細菌感染”が発症契機となるという説から、BPを投与された顎骨に細菌が及ぼす影響についての研究は行われている。しかし、この仮説では無菌顎患者に発生する顎骨壊死を説明できない。一方、BP服用中の患者に食道・胃潰瘍病変が多発していることも報告されている。これは、骨の有無に関わらず、上皮を含む軟組織がBP傷害のプライマリーターゲットとなっている可能性が強く示唆される(Graham, 2002)。しかし、BPの口腔軟組織に対する影響についての報告はほとんどない。

本申請者は予備実験にて、窒素含有BPのゾレドロン酸が口腔粘膜上皮細胞の増殖を抑制し、アポトーシス(細胞死)を誘導している可能性を発見した。

この結果から、本申請者はBPによる顎骨壊死の機序として、BPは(1)顎骨に蓄積し、傷害を与えると同時に、軟組織にも傷害を与え、(2)その後高濃度に蓄積したBPが顎骨から放出され、まず粘膜組織の統合性/連続性が破綻し(潰瘍形成)、観血処置を経ずとも口腔内と顎骨が交通して細菌感染が顎骨に及ぶ。(3)そして最終的にすでにBPにより治療能力の衰えた骨が壊死に陥るといった仮説を立てるに至った。すなわち、BPの口腔粘膜への作用を明らかにすることが、顎骨壊死の機序解明のための近道であり、急務であると考へた。

## 2. 研究の目的

近年、BP製剤は多発性骨髄腫、転移性悪性腫瘍、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症や骨粗鬆症の治療薬として幅広く使用されているが、BP服用者に顎骨壊死が高率で発生することが大きな問題となっている。現在、顎骨壊死と抜歯との因果関係が強く示唆されているが、発症メカニズムに関する研究はほとんどなく、治療法も確立されていない。本研究の目的は、口腔軟組織の病的変化が顎骨壊死の発症に先行する病態であるという仮説に基づき、ヒト口腔粘膜組織由来の上皮細胞を培養し、生体に類似した3次元組織を構築、in vitroモデルを確立し窒素含有BPのゾレドロン酸(ZOL)が口腔粘膜組織に与える影響を分析し、疾患発生機序の解明を行うことである。

## 3. 研究の方法

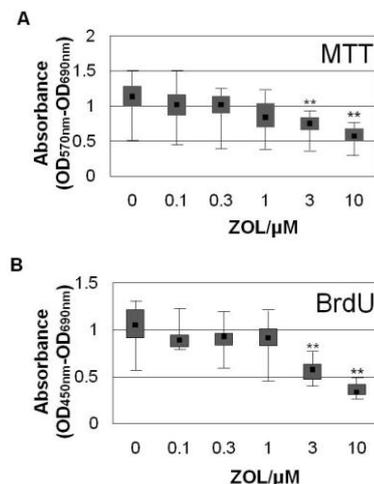
インフォームドコンセントを得た患者の第三大臼歯抜歯時の余剰歯肉より口腔粘膜上皮細胞を単離し、無血清培地中で培養を行った。MTT法によりcell viability測定、BrdU法と生細胞数測定法でcell proliferationを検討した。MTT法とBrdU法は培地中にZOL(0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10  $\mu$ M)を添加し2日間培養後に測定、生細胞数はZOL(0, 3, 10

$\mu$ M)添加し6日間培養後計測した。細胞周期とアポトーシス解析は、ZOL(0, 10  $\mu$ M)を添加48, 72, 96, 120時間後にフローサイトメーターで解析した。また、同時間処理後の細胞周期関連タンパク質(phospho-Chk1, phospho-Chk2, cyclinA, cyclinB1, p27KIP1, Rb, phospho-Rb)の発現についてウェスタンブロット法により検討した。さらに、プロテアソーム阻害剤であるMG132を添加することにより細胞周期調節タンパク質の発現の変化について検討を行った。また、3次元培養による培養口腔粘膜(EVEPOME)を作製し、培養口腔粘膜上皮に対するZOLの影響に関する組織学的観察を行った。すなわち上皮細胞播種後11日目にAlloDerm®上に重層扁平上皮を形成した後、ZOL(0, 10  $\mu$ M)を添加しさらに7日間培養を行い、切片を作製した。HE染色を行い、EVPOMEの形態観察およびKi-67, Geminin, phospho-H2A, X免疫染色を行った。さらに、全基底細胞数に対する各免疫染色陽性細胞を計数することでLabeling indexを算出した。統計学的手法はrepeated one-way ANOVAおよびpaired t-testを用いた。

## 4. 研究成果

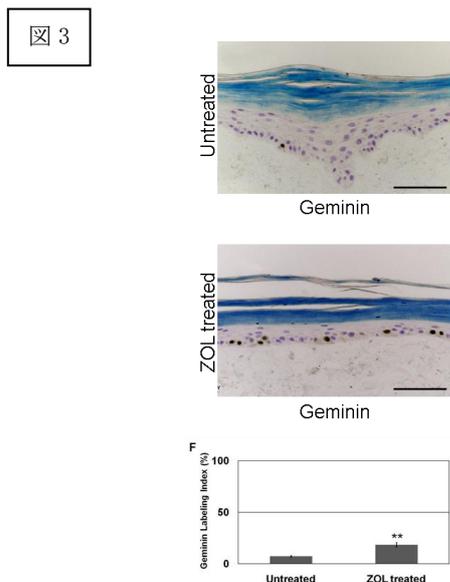
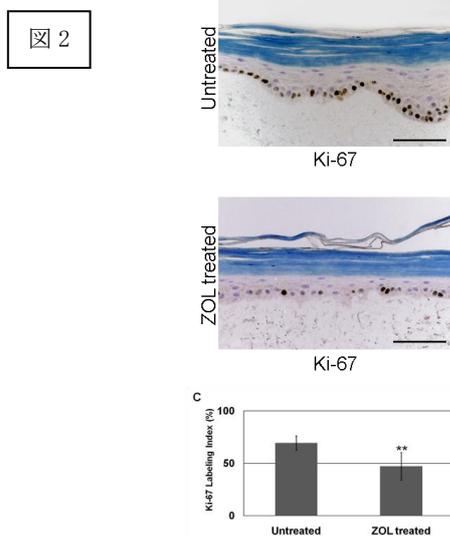
MTT法によりZOLは濃度依存的に培養口腔粘膜上皮細胞のcell viabilityを低下させること、BrdU法と生細胞数測定法においても濃度依存的にZOLは培養口腔粘膜上皮細胞のcell proliferationを抑制することが観察された(図1)。また、ZOLによる培養口腔粘膜上皮細胞のアポトーシス誘導は認められなかったが、細胞周期はS期で停止した。この結果は、cyclinA, cyclinB1, p27KIP1, phospho-Rbの発現の経時的な減少あるいは消失と一致する所見だった。さらに、ZOLを添加した細胞にMG132を添加すると、cyclinA, cyclinB1, p27KIP1の発現の回復が確認された。これは、cyclinA, cyclinB1, p27KIP1の発現低下がユビキチンプロテアソームシステムの活性化により分解が起こることが示唆された。

図1



ベースラインの3次元培養口腔粘膜でみられた表層角化を伴う重層扁平上皮は、さらに7日間培養後のZOL未添加のEVPOMEでは上皮層の角化が進行し、上皮全体の厚さが増加したのに対し、ZOLを添加したものでは、基底層細胞の配列に乱れが生じ、上基底細胞層の数の減少も認められた。これは、免疫染色によって確認される基底細胞層のKi-67陽性細胞の顕著な減少と一致するものであった(図2)。

一方、ZOL未添加に比べ、ZOLを添加したEVPOMEは、基底細胞層におけるGeminin陽性細胞が有意に増加していることが確認された(図3)。またウェスタンブロット法ではZOL添加によりphospho-Chk1の発現が48時間以内に確認され、ZOL添加のEVPOMEにおいても基底細胞層におけるphospho-H2A.X陽性細胞の有意な増加が確認された。



以上の結果から、ZOLにより口腔粘膜上皮細胞にDNA損傷が起こることで、ユビキチンプロテアソームシステムが活性化され、細胞周期関連タンパク質分解によって細胞周期がS期に停止した結果、口腔粘膜上皮細胞の増殖に抑制が起こることが示された。従ってZOLは口腔粘膜上皮の増殖能に障害を加えることでBRONJ発症に関与することが示唆された。

申請者が示した結果は、当初の研究目的で掲げたヒト口腔粘膜組織由来の線維芽細胞と上皮細胞を培養し、生体に類似した3次元組織を構築、in vitroモデルを確立したことに関しては完全に達成できた。上皮細胞に限定した場合は、新たな視点からほぼ徹底的な解明がなされ、線維芽細胞の場合も3次元での分析を行うこともできた。これらは、国内外において初めてBPの口腔粘膜組織に与える影響の分析実験系を確立し、その結果を示したことになる。また、今後は、この病態を改善するための薬理的アプローチを行っていく。

## 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1件)

- ① Hisashi Ohnuki, Kenji Izumi, Michiko Terada, Taro Saito, Hiroko Kato, Akiko Suzuki, Yoshiro Kawano, Kayoko Nozawa-Inoue, Ritsuo Takagi, Takeyasu Maeda, Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes, Arch. Oral Biol., 査読有、in press、2012

[学会発表] (計7件)

- ① Ohnuki H, Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes, International Symposium on Oral Health Education and Research, 2011年12月10-11日、Indonesia (Blue Sky Hotel)
- ② 大貫尚志、ゾレドロン酸がヒト口腔粘膜上皮細胞に及ぼす影響に関する研究、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、2011年10月21-23日、大阪府(大阪国際会議場)
- ③ Ohnuki H, Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes, 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2011年10月9-10日、広島県(広島国際会議場)

- ④ 大貫尚志、ゾレドロン酸がヒト口腔粘膜上皮細胞に及ぼす影響に関する研究、平成 23 年度新潟歯学会第 1 回例会、2011 年 7 月 9 日、新潟県(新潟大学)
- ⑤ Michiko T、Effects of Zoledronic Acid on Primary Human Oral Mucosa Keratinocytes and Fibroblasts 、International Joint Symposium: The University of Tokushima, Universitas Gadjah Mada, Niigata University、2010 年 12 月 17 日、Bali (The Patra Bali)
- ⑥ 大貫尚志、口腔粘膜上皮細胞に対するゾメタ(ゾレドロネート)の影響、平成 22 年度 先端歯学スクール 2010、2010 年 9 月 10 日、神奈川県(マホロバマインズ三浦)
- ⑦ 大貫尚志、Effect of Zoledronic Acid on Primary Human Oral Mucosa Keratinocytes 、 International Association for Dental Research (IADR)、2010 年 7 月 14 日、Spain(The Center Convencions Internacional Barcelona)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺田 典子 (TERADA MICHIKO)  
新潟大学・医歯学系・特任助教  
研究者番号：60374550

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし