

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792347

研究課題名（和文）ビスフォスフォネート関連顎骨壊死に関与する分子の網羅的探索

研究課題名（英文）Genome-wide screening of target genes of BRONJ

研究代表者 中川 貴之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：30456230

研究成果の概要（和文）：RANKL による破骨細胞の生存・分化誘導機構に対するビスフォスフォネート(BP)の影響を検討した。その結果、RANKL 投与群は破骨細胞の特徴である多核巨細胞への変化がみられたが、RANKL と BP を同時に添加した群では破骨細胞への分化は見られなかった。さらに BP 製剤投与下と非投与下で培養した破骨前駆細胞に RANKL による分化誘導を加え、cDNA マイクロアレイ解析で遺伝子発現解析を行った。その結果 BP 非投与群に比べ、BP 投与群において 1/2 以下の発現低下を示す Nfatc1 と Car2 を同定した。mRNA, タンパク発現レベルの検証を行ったところ、BP 非投与群に対し BP 投与群の有意な発現低下を認めた。

研究成果の概要（英文）：Objective. RANKL inhibitors, denosmab is recently available for use replace to bisphosphonates (BPs). However, the appearance frequency of osteonecrosis of jaw (ONJ) in denosmab treated patients is about the same as BPs. This evidence suggests that the inhibition of RANKL-mediated osteoclastogenesis may have close relationship with the outbreak of ONJ. According to this hypothesis, this study was designed to evaluate the effect of zoledronate on RANKL-mediated osteoclastogenesis and to investigate the molecular targets of zoledronate in RANKL-inducible genes. Methods. The direct effect of zoledronate on osteoclast differentiation was investigated using an in vitro culture system of osteoclast precursor cells stimulated with RANKL and M-CSF. The molecular targets of zoledronate in RANKL signal pathway and additional factors associated with osteoclastogenesis were analyzed by genome-wide screening. Results. Zoledronate reduced the formation of TRAP-positive multi-nucleated cells induced by RANKL treatment. Microarray analysis identified that 2 genes, nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) and carbonic anhydrase 2 (Car2), were silenced in zoledronate treated cells among RANKL-inducible genes and additional factors. Two genes, NFATc1 and Car2 were significantly silenced by zoledronate treatment. Conclusion. Zoledronate inhibited RANKL-mediated osteoclastogenesis. In addition, the expression of NFATc1 and Car2 is strongly suppressed by zoledronate. Our result suggests that these genes are possible targets of zoledronate in RANKL-mediated osteoclastogenesis,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

BP 製剤は骨粗鬆症や悪性腫瘍の骨転移における高 Ca 血症や疼痛の緩和に有用であり、現在広く臨床で使用されている。一方で BP 製剤の投与患者の侵襲的歯科治療後に発生する顎骨壊死 (BRONJ) が問題になっている。BP 製剤に関する骨壊死は顎骨にしか発生せず、長管骨や頭蓋骨の報告はない。これは顎骨が種々の歯周疾患により直接的に口腔内細菌に曝露される機会が多いことが原因の一つとして考えられる。また、BP 製剤内服患者は膠原病、臓器移植によるステロイド投与から生じる二次的なステロイド性骨粗鬆症や悪性腫瘍患者など、免疫機能の低下している場合が多い。ビスフォスフォネート関連顎骨壊死に対するガイドラインにおいても BRONJ のリスクファクターとして、糖尿病や高齢者、透析患者などが挙げられ、BRONJ の発症要因として免疫機能の低下が重要な要因であると考えられる。BRONJ は発生頻度や病態が明らかになっていないことから一般に対処療法が治療の主体となる。難治例や進行例の報告もあり、顎骨切除などの外科的な加療が必要となる場合は術後の QOL が著しく損なわれる。このため BRONJ の病態解明は効果的な治療方針や予防策の立案のために急務であると考えられる。

一方、骨破壊を伴う炎症性疾患や免疫系遺伝子欠損マウスの骨異常などから骨と免疫の関係を明らかにする骨免疫学の分野が近年急速に発展している。特に関節リウマチ (RA) をモデルとした研究から、免疫系細胞により誘導される炎症性サイトカインである RANKL が炎症性骨破壊に重要であることが明らかとなった。RANKL 遺伝子欠損マウスは大理石骨病を呈することが報告され、破骨細胞の分化誘導に必須であることが示唆された。RANKL による破骨細胞分化誘導は、まず単球/マクロファージ系前駆細胞が骨芽細胞などの分化支持細胞からの M-CSF の刺激により、細胞表面上に RANK を発現する。さらに分化支持細胞上に発現する RANKL が破骨前駆細胞上の RANK と結合して破骨細胞の分化誘導シグナルを伝達する。

一方 2012 年 1 月 18 日、本邦にて骨病変治療薬のデノスマブが製造承認を取得した。デノスマブは、ヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体であり、BP 製剤と同様固形癌の骨転移や

多発性骨髄腫などによる骨病変に対する骨吸収抑制や高 Ca 血症に対し適応されるが、すでに治験の段階で BP の注射剤であるゾレドロン酸と、顎骨壊死の出現率について比較したところ、同頻度であったことが報告された。つまり BP による破骨細胞への影響以外にも、RANKL を介した破骨細胞の生存・分化誘導機構の障害が ONJ 発症に関与していることが示唆されている。BP による薬理作用は破骨細胞内でファルネシルピロリン酸 (FPP) 合成酵素を阻害し、細胞内情報伝達系を阻害する結果、破骨細胞のアポトーシスを誘導し骨吸収機能を抑制すると考えられる。しかしながら RANKL シグナル経路に対する影響について検討された報告はわずかである。

歯科領域では歯周病による炎症性骨吸収をしばしば経験するが、骨髄炎や顎骨壊死を生じる様な重篤な症例は稀である。BRONJ の病理組織所見からは骨小腔内に骨細胞を含む生きた骨組織内にモザイク状に壊死骨が存在しており、壊死骨に接して *Actinomyces* 菌塊が検出されることが多い。一方で最新の研究では BP には血管新生阻害の作用が報告され、新規抗がん剤としての利用も検討されている。しかしながら血管新生阻害作用は局所での免疫細胞遊走が困難になり、口腔内細菌感染への抵抗力の低下につながる。このため、BP 製剤の直接的な破骨細胞への影響以外にも、BRONJ の発症要因となるメカニズムが存在すると考えられる。そのため BP 製剤による種々の細胞の遺伝子発現変化を、特に RANKL により誘導される破骨細胞の生存、分化に対する影響を捉えることが重要である。

2. 研究の目的

本研究では BP が RANKL によって誘導される破骨細胞の生存・分化へ及ぼす影響を検討し、RANKL シグナル伝達経路を中心とした BP の標的遺伝子を同定することにより、破骨細胞分化抑制と顎骨壊死の原因となる分子機構の解明を目的とした。本研究で同定された候補遺伝子は RANKL 依存的な破骨細胞分化に重要な遺伝子として考えられ、臨床的に BP 製剤投与患者への侵襲的歯科治療を行う際の休薬、再開の指標としての有用性が示されること、またさらに BRONJ の発症にクリティカルと考えられる分子として検証され、特異的な分子標的薬により BP 製剤を中止することな

く侵襲的歯科治療が可能とする礎を築くことになると考えられた。

3. 研究の方法

以下の順序で研究を行った。

①マウス破骨前駆細胞の分化誘導に対する BP の影響: マウス破骨前駆細胞の分化誘導に対する BP の影響を TRAP assay で検討した。24well プレートに 8.0×10^4 ずつ播種し M-CSF 存在下、BP 投与群と非投与群に分け RANKL による破骨細胞分化誘導群と被誘導群の 4 つのグループに分け 5 日間培養を行い、TRAP 陽性多核細胞の顕微鏡像を確認し、その数のカウントを行った。カウントは 3 個の well で行い、平均値をとって比較した。また TRAP 陽性細胞の観察は BZ-9000 microscope (KEYENCE 社製) を用いて行った。

②BP 存在下と非存在下で培養した破骨前駆細胞の網羅的な遺伝子発現解析: BP 存在下と非存在下で培養した破骨前駆細胞の RANKL 分化誘導前後それぞれの細胞の total RNA の抽出を行った。抽出した RNA を用いて Sureprint G3 Mouse GE マイクロアレイキット 8x60k <G4851A> (Agilent Technologies 社) を用いて網羅的な遺伝子の発現解析を行い、各サンプル間で RANKL シグナル経路において著明な発現変動のある標的遺伝子の同定した。

③RANKL シグナル経路におけるビスフォスフォネートの標的遺伝子発現解析: 同定した標的遺伝子の mRNA, タンパク発現解析を行うため、BP の投与、非投与下での RANKL 分化誘導前と誘導後 48h の細胞を回収し、cDNA の作製およびタンパク抽出を行った。トランスクリプトーム解析を real-time PCR 法で、タンパク発現解析を western blotting 法でそれぞれ行った。

4. 研究成果

①TRAP assay 後の顕微鏡像において RANKL 単独投与群のみで破骨細胞の特徴である TRAP 陽性多核巨細胞が観察されたが、コントロール群、BP 単独投与群、RANKL と BP を同時に添加した群では TRAP 陽性多核巨細胞は見られなかった。カウントを行うと BP 非投与群では約 400/well の TRAP 陽性多核巨細胞が観察されたのに対し、BP 添加群では 20/well 程度しか観察されなかった。このため破骨前駆細胞は BP により破骨細胞への分化が阻害されている可能性が示唆された。

②BP 製剤投与下と非投与下で培養した破骨前駆細胞に RANKL による分化誘導を加え、cDNA マイクロアレイ解析によって両者の間で mRNA 発現レベルが異なる遺伝子の網羅的解析を行った。主に RANKL シグナル関連分子を中心に 44entities, 30 遺伝子に絞って解析を行った。BP 非投与群(RANKL)に比べ、BP 投与群(BP+RANKL)において 1/2 以下の発現低下を示すものを候補遺伝子として抽出した結果、Nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) と Carbonic anhydrase 2 (Car2) を同定した。

③これらの遺伝子に関して real-time PCR を行い、トランスクリプトーム発現解析を行ったところ、NFATc1 では BP 投与群はコントロール群に対し約 1.8 倍の発現増強を認めたとにも関わらず、BP 投与群ではコントロール群と同程度の発現にとどまった。また Car2 においてはコントロール群に対し、BP 非投与群では約 30 倍の発現増強を認めたとのに対し、BP 投与群では約 10 倍にとどまった。さらに Western blotting でタンパクレベルの発現の検討を行ったところ、BP 非投与群ではいずれの標的遺伝子のタンパクが検出されたのに対して BP 投与群では発現が認められなかった。

今回同定された 2 つの候補遺伝子のうち、NFATc1 は骨免疫学の分野では破骨細胞分化に必須の転写因子であり、RANKL シグナル伝達の中心的な役割を担う分子であることが証明されている。(cf. Takayanagi H, et al. Dev Cell. 2002 Dec;3(6):889-901) さらに抗リウマチ薬である leflunomide の骨破壊抑制効果についても、破骨前駆細胞の NFATc1 の発現が抑制されることにより生じることが示されている。(cf. Urushibara M, et al. Arthritis Rheum. 2004 Mar;50(3):794-804.) 以上の結果から BP による NFATc1 の発現制御を通じて RANKL シグナル経路により誘導される破骨細胞分化が抑制されている可能性が示唆された。

現在は引き続き BP による FPP 合成酵素阻害の影響を排除した上での RANKL による破骨分化誘導の検討、候補遺伝子の発現の変化について検討を続けている。

さらに長期的な展望として今後は、現在明らかになっている BP の薬理的機序と RANKL シグナル経路を結ぶ関連分子の同定、NFATc1 の RANKL シグナル経路における機能解析を進

めることで、骨免疫学的アプローチから
BRONJ の発症メカニズムの解明を進める予定
である。

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 0 件)

(現在投稿準備中)

[学会発表] (計 0 件)

(第 58 回 日本口腔外科学会学術大会
(2013. 10 月 福岡)で研究成果を発表予定。)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 貴之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：30456230

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：