

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 5月 21日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890241

研究課題名（和文）メバロン酸代謝物による顎骨壊死の予防効果の検討

研究課題名（英文）Analysis of acid extrusion mechanism through new regulatory protein during bone resorption

研究代表者

来海 慶一郎 (KIMACHIKEIICHIRO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30610977

研究成果の概要（和文）：

窒素含有ビスホスホネート製剤(NBP)関連顎骨壊死(BRONJ)の発症にNBPによる破骨細胞分化や生存の抑制作用が一要因になっているのではないかと推測し、マウス破骨細胞分化過程に対するゾレドロン酸とプレニル化促進物質GGOHの効果を検討した。ゾレドロン酸は分化関連分子TRAP、細胞融合分子DC-STAMP及びOC-STAMPの発現を抑制し、破骨細胞分化を阻害し、この作用はGGOHの存在下で回復した。以上より、NBPは破骨細胞の融合・形成を抑制し、プレニル化促進物質はNBPによる分化阻害を部分的に回復させると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

The nitrogen-including bisphosphonates(NBP)-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) were suggested to be caused by the decrease in the substrates of prenylation including geranylgeranyl acid (GGOH) after treatment of NBPs. Then, in the present study, we examined the effects of NBP zoledronic acid in presence or absence of the prenylation substrate GGOH on mouse osteoclast differentiation. The mouse bone marrow macrophages was cultivated with or without GGOH in the presence of RANKL (80 micro M) and zoledronic acid (7 micro M). To clarify the expression of target molecules and osteoclast differentiation we performed these methods of TRAP staining, RT-PCR and real time-PCR and Western blot analysis in the treated cells. The zoledronic acid suppressed the expression of TRAP the differentiation-related molecule, DC-STAMP and OC-STAMP the cell fusion-related molecules in bone marrow macrophages with RANKL treatment on dose-dependent manner. Furthermore, the zoledronic acid inhibited TRAP-positive multinuclear osteoclast differentiation. However, the incubation of zoledronic acid in the presence of GGOH restored the number of TRAP-positive osteoclasts together with the recovery of the expression of TRAP, DC-STAMP and OC-STAMP. These results are suggested that NBPs may be suppressed the multi-nucleation in stage of osteoclast fusion. Furthermore, the prenylation substrates partially restored the suppression of osteoclast differentiation, suggesting in the prevention of BRONJ in the patients with treatment of NBPs.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成24年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・口腔外科学

キーワード：骨代謝、ビスホスホネート、顎骨壊死、破骨細胞、メバロン酸経路

1. 研究開始当初の背景

今日口腔外科領域において抜歯後、治癒不全が生じ、抜歯部位から歯槽骨が露出し顎骨壊死 (ONJ) となる。このような病状は骨吸収抑制剤ビスホスホネート (BP) 系薬剤を注射された多発性骨髄腫や乳癌の患者に多発することより 2003 年に初めて報告された。以来同様の報告が続き、BP と顎骨壊死と歯科治療との三者の因果関係が強く示唆された (ビスホスホネート関連顎骨壊死 (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws; BRONJ)。BP は骨粗鬆症や高カルシウム血症、骨転移、Paget's 病といった骨病変の治療薬として用いられている。現在、頻用されている窒素含有ビスフォスフォネート (NBP) で、この薬剤は成熟破骨細胞に直接作用し、骨吸収細胞骨格の抑制とアポトーシスを誘発することで骨吸収能を抑制することが知られている。この NBP による骨吸収抑制機序については多くの報告が存在し、NBP の主作用はメバロン酸代謝経路のファーンシル 2 リン酸合成酵素 (FDPS) を抑制した結果、破骨細胞の吸収状態の細胞骨格形成に関与する低分子 G タンパク質のプレニル化が抑制され、骨吸収活性の抑制やアポトーシスが誘発されると考えられている。この破骨細胞の骨吸収活性の抑制が BRONJ の誘発

に関与することは明確であるが、この発生の機序としては骨リモデリングの低下、血管内皮細胞による新生、細菌感染など様々な見解がある。しかしながら未だ統一された見解はなく、何故破骨細胞を抑制すると骨壊死が起こるのか全く分かっていない。

2. 研究の目的

私は、大学院時代に破骨細胞の分化・誘導に対する NBP 製剤の作用について研究を続けてきた。この結果、破骨細胞前駆細胞 (骨髄マクロファージや RAW264.7 細胞) に NBP 製剤のゾレドロン酸を投与すると分化に必須な受容体 RANK の発現が抑制され、成熟破骨細胞への分化が抑制された。さらにゾレドロン酸は破骨細胞前駆細胞の炎症部位へ遊走能も抑制し、この抑制作用は GGOH の投与で回復した。従って、NBP のゾレドロン酸は破骨細胞形成における細胞の遊走・分化を抑制し、この結果正常骨リモデリングの低下を及ぼすと考えられる。さらに、*in vitro* の実験でゾレドロン酸による破骨細胞形成の抑制は GGOH の同時投与で部分的に回復することを明らかにした (学会発表)。そこで、本研究は、マウスを用いて BRONJ モデルを確立し、プレニル化促進メバロン酸経路代謝物、特にゲラニルゲラニル酸 (GGOH) の NBP 発症の予防及び抑制効果について検討する

ことを目的とした。

3. 研究の方法

①骨リモデリングには破骨細胞と骨芽細胞のカップリングが必須である。BRONJの発症に関しても破骨細胞と骨芽細胞の機能バランスが関与し、破骨細胞による吸収活性の抑制によって骨芽細胞による骨添加も不活発になり最終的に腐骨形成、骨膜反応などを伴う骨壊死に至る。これら細胞以外にも口腔内線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、細菌なども関与するという報告もある。そこで、*in vitro* で破骨細胞における分化、遊走、増殖及び骨機能へのプレニル化促進物質(ゲラニルゲラニル酸、ファーネシル酸)の効果について検討した。さらに、NBPであるゾレドロン酸で誘発される効果に対する細胞骨格のプレニル化の促進物質の効果について検討した。

②*in vivo* で、マウスを用いて BRONJ モデル動物を確立する。

1)ビスホスホネート剤であるゾレドロン酸をマウス腹腔内に3週間注射する。

2)臼歯歯牙にワイヤー結紮し、歯周病を誘発させる。

3)BRONJの発症に関与する骨壊死(腐骨形成、骨膜反応など)に関して経時的な骨密度変化や骨形態計測の観察を行う。

3)マイクロCTスキャン(SkyScan-1176)を用いて行うと同時に骨組織の脱灰標本作製し骨形態計測を行う。

4. 研究の成果

In vivo 顎骨壊死モデル：4から8週齢のマウスを用いゾレドロン酸を2週間投与した後第一大白歯抜歯後の顎骨の変化を1,2,4,8及び10週間観察した。この結果、炎症性の顎骨吸収や腐骨などの著明な変化は認められなかった。さらに、組織像でも骨細胞の壊死に伴う骨小腔の増加も確認できな

かった。しかしながら、同時にLPSを腹腔内投与すると低頻度ながら抜歯後の顎骨再石灰化遅延や骨剥離が認められるものがあった。今後は、高回転型の骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスを用いてさらに検討を続けることを検討している。

In vitro 細胞モデル：ゾレドロン酸は破骨細胞の分化・過程におけるTRAP陽性多核細胞である破骨細胞の形成を抑制した。さらに、FOHの同時投与した場合、全くTRAP陽性多核細胞形成が認められなかった。しかしながら、GGOHの同時投与は破骨細胞の出現は認められないものの、ゾレドロン酸単独に比較してTRAP陽性単核細胞数が増加し、ゾレドロン酸の効果を部分的に抑制する作と考えられた。さらに、ゾレドロン酸はRANKL誘導性の分化関連分子であるTRAP、細胞融合分子であるDC-STAMP及びOC-STAMPの発現を抑制すると同時にTRAP陽性多核の破骨細胞分化を濃度依存的に阻害した。しかし、GGOH共存下ではTRAP、DC-STAMPおよびOC-STAMPの発現の回復と同時にTRAP陽性破骨細胞の出現を認めた。以上の結果より、NBPは破骨細胞の細胞融合および多核化の抑制に関与していることが示唆され、プレニル化促進物質はNBPによる破骨細胞分化阻害を部分的に回復させると考えられた。この作用はBRONJ発症の予防作用の一助となる可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1 長岡良礼、鍛冶屋 浩、府川晃久、佐々木三奈、来海慶一郎、山下善弘、大関悟、池邊哲郎、岡本富士雄、岡部幸司：窒素含有ビスホスホネート製剤(NBP)による破骨細胞形成阻害とプレニル化促進物質による回復。第 39 回福岡歯科大学学会総会 (2012 年 11 月)

2) 長岡良礼、府川晃久、佐々木三奈、永沼香織、太田信敬、来海慶一郎、山下善弘、大関悟、池邊哲郎：窒素含有ビスホスホネート製剤(NBP)の融合抑制を介した破骨細胞の分化阻害作用。第 67 回口腔科学会 (2013 年 5 月)

[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：

国内外の別：

○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

6. 研究組織

研究代表者

来海 慶一郎 (KIMACHI KEIICHIRO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30610977

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：