

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592983

研究課題名(和文)ビスホスホネート性顎骨壊死におけるカルシウム作用の解明とその制御に基づく予防戦略

研究課題名(英文)An in vitro study on the role of calcium in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw.

研究代表者

新井 直也 (ARAI, Naoya)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80323723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨吸収抑制薬であるビスフォスフォネート(BP)は粘膜毒性を有することが知られている。本研究では、注射用BPであるゾレドロン酸(ZA)を用いて、BPの上皮細胞毒性がカルシウムにより増強されることをin vitroで示してきた。単独では作用を有さない低濃度のZAが、培地中のカルシウム濃度の上昇に伴い増殖抑制やアポトーシス誘導を發揮するようになることは、BPの粘膜毒性を解明する上で重要な知見であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bisphosphonate (BP) is known to possess cytotoxicity in mucosal tissues. In this study, we demonstrated that calcium enhances the cytotoxic effects of BP on cultured epithelial cells, using one of the popular intravenous BPs, zoledronate (ZA). It is of note that low concentrations of ZA, which alone had little effects, could be toxic to the epithelial cells depending on the conditions of extracellular calcium. We think that the present results will be an important knowledge to elucidate the cytotoxic mechanism of BP to mucosal tissues.

研究分野：口腔外科学

キーワード：ビスフォスフォネート カルシウム 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート(BP)製剤は、癌の骨転移や骨粗鬆症に対する優れた治療効果から、今や世界で最もよく使われる薬の1つとなっている。こうした中、抜歯などを契機に投与患者の顎骨に生じる“ビスフォスフォネート関連顎骨壊死(BRONJ)”が難治性の副作用として報告されてきたが、いまだ確立した対処法はなく、治療法や予防法の開発が喫緊の課題となっている。

BRONJ 発症のメカニズムは、骨代謝回転の過剰な抑制が主病因であるとする『骨犯人説』と、粘膜に対する細胞毒性が問題であるとする『粘膜犯人説』の2つの説に大別される。BP の高い骨親和性から、これまで骨に焦点を当てた説が主流であったが、2011年に Landesberg らが後者の説を“Outside-in” theory と呼ぶなど(Ann NY Acad Sci 1218:62-79, 2011)、BP の軟組織への直接的な作用が目目されている(図1)。

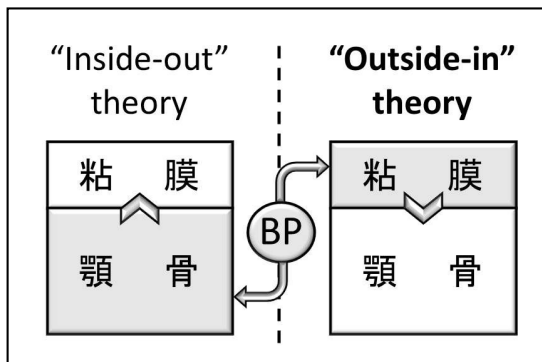


図1 BRONJの発症に関する2つの説

ゾレドロネート(ゾメタ®)は現在最もよく使われる注射用BPであるが、最高血中濃度は1µM程度であり、持続的な濃度はさらに低い。これまでのin vitroの研究の問題点は、そのような1µM以下の臨床と関連のある濃度では、培養上皮細胞の生存にほとんど影響を与えないことであった。そこで申請者は、BPとカルシウムが高い親和性を有することに着目し、培養上皮細胞を用いてゾレドロネートに対するカルシウムの影響を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究は、ビスフォスフォネートにある本来は弱い粘膜細胞毒性が、カルシウムの動員により増強されるとの仮説に立ち、上皮細胞に対する障害をビスフォスフォネートとカルシウムの協調作用の観点から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト表皮角化細胞由来細胞株(HaCaT細胞)およびヒト扁平上皮癌細胞株(HSC-4, KOSC, SAS)、ヒト乳癌細胞株(MCF-7)を用い、0.01

~1µMの低濃度ゾレドロネートに対するカルシウムの影響を下記の方法で調査した。

(1)細胞増殖に与える影響をMTT法にて解析した。

(2)アポトーシスへの影響をAnnexin-V/PIの二重染色によるフローサイトメトリーにて解析した。

(3)ミトコンドリアの経路のアポトーシスをチトクロムCの放出および膜電位の変化を測定することにより解析した。

(4)カスパーゼ3, 9の発現をウエスタンブロット法にて解析した。

(5)ゾレドロネートの薬理作用として知られるタンパクのプレニル化阻害の程度をウエスタンブロットにて解析した。

(6)pHの変化がゾレドロネートとカルシウムの協調作用に与える影響について調査した。

4. 研究成果

骨吸収抑制薬であるビスフォスフォネート(BP)が粘膜毒性を有することは知られているが、その作用は充分解明されていない。本研究では、注射用BPであるゾレドロネート(ZA)を用いて、BPの上皮細胞毒性がカルシウムによって増強されることを下記の方法で明らかにした。

初年度の研究では、培養細胞の生存にほぼ影響がないとされる1µM以下の低濃度ZAに対するカルシウム(Ca)の影響を、ヒト上皮細胞株(HaCaT細胞)を用いて調査した。その結果、単独では作用を有しない0.5µMのZAが、培地中のCa濃度の上昇とともに増殖抑制(図2)及びアポトーシス誘導(Annexin-V/PIのフローサイトメトリー解析)を引き起こすことが明らかになった。このZAに対するCaの協調作用は、カルシウムキレート剤であるEGTAにより打ち消された。

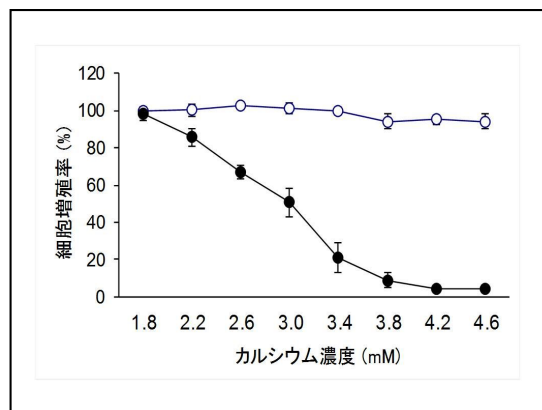


図2 培地中のカルシウム濃度が細胞増殖に与える影響 (-○- : ZA(-)、-●- : 0.5µM ZA)

次年度は、HaCaT細胞でみられたCaの協調作用が他の細胞でも同様にみられるかを、ヒト扁平上皮癌細胞(HSC-4, KOSC, SAS)およびヒト乳癌細胞(MCF-7)を用いて検討した。

その結果、HaCaT 細胞同様にこれらの細胞においても、Ca が ZA の増殖抑制効果やアポトーシス誘導作用を著しく増強することが明らかになった。さらに HSC-4 を用いてアポトーシスの内容を詳細に検討した結果、cleaved caspase-3, -9 の上昇、細胞質内のチトクローム C の上昇、ミトコンドリア膜電位の変化が生じていることが明らかになった。

最終年度は、ZA に対する Ca の相乗作用が、カルシウム溶液の pH の影響を受けることに着目して研究を行った。細胞増殖試験では、0.5 μ M の ZA はカルシウム溶液が酸性の時には増殖抑制を示さないが、pH の上昇とともに増殖を抑制するようになることが明らかになった。これまでのところ、増殖抑制に加え、アポトーシス誘導やタンパクのプレニル化阻害もアルカリ環境で強く発揮されることが示されている。カルシウム溶液はアルカリ性に傾くほどリン酸カルシウム塩を形成しやすくなることが知られており、Ca の相乗作用にリン酸カルシウム塩の形成が関与している可能性が強く示唆されている。

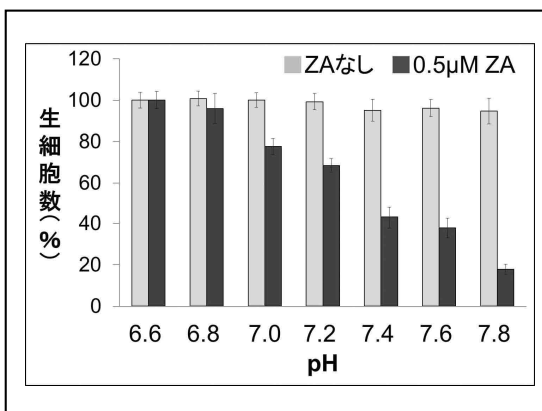


図3 カルシウム溶液の pH が細胞増殖に与える影響

以上の研究から、BP が低濃度であっても、Ca がその上皮細胞毒性を増強することが in vitro で示された。われわれは、単独では作用を有さない低濃度の ZA が、培地中のカルシウム濃度の上昇に伴い増殖抑制やアポトーシス誘導を発揮するようになることを今回はじめて示し、これらの結果は BP の粘膜毒性を解明する上で重要な知見と考えられた。今後は、このような BP とカルシウムの協調作用のメカニズムが、BP 投与患者の口腔粘膜の治癒遅延やひいては BRONJ の発症に関与するかどうかを動物実験モデルなどを用いて解明し、BP による顎骨壊死の予防へと繋げていくことを今後の課題としている。

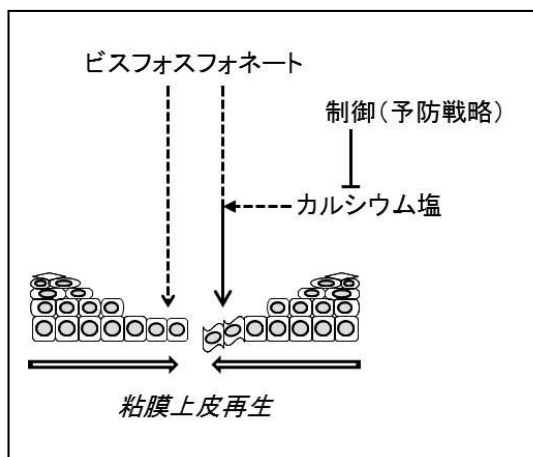


図4 カルシウムを介した BP の粘膜毒性の可能性を示す模式図

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 2 件)

Inoue S, Arai N, Tomihara K, Takashina M, Hattori Y, Noguchi M. Extracellular Ca^{2+} -dependent enhancement of cytotoxicity of zoledronic acid in human oral cancer cells. *European Journal of Pharmacology* (掲載確定) 査読有り
Arai N, Inoue S, Tomihara K, Tsuno H, Noguchi M. In vitro synergistic effects of zoledronic acid and calcium on viability of human epithelial cells. *Oral Dis* 19:200-205, 2013、査読有り

[学会発表](計 7 件)

第 67 回日本口腔科学会学術集会(栃木県・宇都宮市)・2013 年 5 月・Zoledronate の細胞毒性におけるリン酸カルシウム塩の関与・新井直也、井上さやか、富原圭、他
 第 67 回日本口腔科学会学術集会(栃木県・宇都宮市)・2013 年 5 月・カルシウムによるゾレドロンートの抗腫瘍効果の増強 - 口腔扁平上皮癌細胞株を用いた研究・井上さやか、新井直也、富原圭、他
 第 58 回日本口腔外科学会総会学術大会(福岡県・福岡市)・2013 年 10 月・アルカリ環境におけるリン酸カルシウム塩の形成と zoledronate の上皮細胞毒性の増強・新井直也、井上さやか、富原圭、他
 第 57 回日本口腔外科学会総会学術大会(神奈川県・横浜市)・2012 年 10 月・ビスフォスフォネートの上皮細胞毒性とカルシウムの相乗作用・新井直也、井上

さやか、富原 圭、他
第 10 回アジア口腔顎顔面外科学会（インドネシア）・2012 年 11 月 17 日・H-6・Synergistic effects of bisphosphonate and calcium on viability of epithelial cells; An in vitro study・Arai N, Inoue S, Tomihara K et al.
第 71 回日本癌学会（北海道・札幌）・2012 年 8 月・口腔癌細胞の増殖抑制およびアポトーシスに及ぼすゾレドロネートとカルシウムの相乗効果・井上 さやか、新井 直也、富原 圭、野口 誠
第 56 回日本口腔外科学会総会学術大会（大阪府・大阪市）・2011 年 10 月・カルシウムによるビスフォスフォネートの上皮細胞増殖抑制効果の増強・新井直也、井上さやか、富原 圭、他

研究者番号：

〔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：
出願年月日：
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

(1) 研究代表者

新井 直也（ ARAI, naoya ）
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 8 0 3 2 3 7 2 3

(2) 研究分担者

富原 圭（ TOMIHARA, Kei ）
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号： 7 0 4 0 4 7 3 8

(3) 連携研究者

（ ）