

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792189

研究課題名(和文) BRONJに伴う口腔粘膜創傷治癒不全に対するビタミンB3の治療効果の検討

研究課題名(英文) The effect of vitamins B3 for the oral keratinocytes wound healing deficiency with the bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw

研究代表者

大貫 尚志 (Ohnuki, Hisashi)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・教務補佐員

研究者番号：90568552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ビスフォスフォネート関連顎骨壊死(BRONJ)の発症機構の一つとして、ゾレドロン酸(ZOL)が口腔粘膜上皮細胞のDNA損傷を起こし、細胞周期がS期に停止するため細胞増殖能が低下することを明らかにした。水溶性ビタミンB3であるニコチン酸とニコチンアミドは、DNA修復機構に関与している。このため、ビタミンB3を添加することによりDNA損傷が軽減され口腔粘膜上皮細胞の増殖能が回復されることを期待した。本研究では、ニコチン酸、ニコチンアミドおよび代替薬のDMSOを添加したが、細胞増殖能の回復は見られなかった。一旦、重度なDNA損傷が生じた細胞では、修復過程の回復が困難であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：As one of the onset mechanisms of the bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ), zoledronic acid (ZOL) induced a DNA damage of oral keratinocytes and resulting in cell cycle S-phase arrest and repressive effects on cell viability, proliferation, and epithelial turnover. Niacin and the nicotinamide which are water soluble vitamin B3 are associated with a DNA repair mechanism. Therefore, we hoped that a DNA damage of oral keratinocytes was recovered by adding vitamins B3, and the proliferation potency of oral keratinocytes was restored. In this study, the niacin, nicotinamide and DMSO could not recovered the cellular proliferation. The keratinocytes were caused severe DNA damage by adding ZOL, suggesting that it was difficult to recover the DNA repairing.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：BRONJ 口腔粘膜上皮細胞 DNA損傷 ビタミンB3

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート(BP) 製剤は、骨粗鬆症、多発性骨髄腫、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症などの骨関連事象に対して治療効果の高い薬剤として使用されている。我が国では高齢化社会に伴い、骨粗鬆症患者が増加し、病的骨折の予防のために頻りに処方されている。一方、重篤な副作用として口腔内に特異的な症状として、ビスフォスフォネート関連顎骨壊死(BRONJ)を発症することが問題視されている。処方頻度が圧倒的に高い窒素含有BPであるゾレドロン酸(ZOL)が特にBRONJを重篤化させることが知られているが、発症機序についてはほとんど解明されていない。しかし、骨に選択的に移行するため、BPにより破骨細胞がアポトーシスに陥り、機能障害を来し、骨の修復と代謝を妨げているという機序が最も有力視されている。一方で、消化管潰瘍も頻発していることから、骨の有無にかかわらず上皮組織に障害がおこることも示唆される。つまり、BPによる顎骨壊死の発生メカニズムは骨に起因するだけでなく、口腔軟組織にも作用し、その成因は多面的であり、口腔内の骨と軟組織の両組織でメカニズムの解明が行われなければならない。

窒素含有BPは、破骨細胞中のメバロン酸代謝経路にあるFPP(ファルネシルピロリン酸)シンターゼを阻害し、FPPやGGPP(ゲラニルゲラニルピロリン酸)が減少するため、小分子GTP結合蛋白のプレニル化が起きず、破骨細胞の機能障害やアポトーシスが誘導されると考えられている。さらに、BPより誘導される破骨細胞のアポトーシスはメバロン酸経路の中間産物であるゲラニルゲラニオール(GGOH)の添加によって回復することが報告され治療薬としても期待されている。GGOHの効果は口腔粘膜の上皮細胞、線維芽細胞や血管内皮細胞に対しても同様であったという報告も散見されている。

しかし、申請者の実験結果(Ohnuki H et al.

Arch Oral Biol, 57(7):906-917, 2012)では、

- (1) 細胞周期解析にてS期停止を認めたが、アポトーシスは誘導されなかった。
- (2) GGOHを添加しても口腔粘膜上皮細胞の増殖能は回復しなかった。

このGGOHのBPによる細胞増殖抑制に関する相反する効果は、実験的に使用されているBPの濃度によるものと推測される。すなわち、効果があるとする報告で用いられているBP濃度は比較的高濃度であるのに対し、申請者の実験ではかなり低濃度のBPを使用した。これはアポトーシスが起きていないことからもうかがえる。実際、患者組織内BP濃度は明らかになっておらず、実験に用いるBP濃度の設定は議論が多い。すなわちin vitroの実験で用いるBPの使用濃度は低く設定している方がBRONJの臨床像により近いということが言える。従って、メバロン酸代謝経路をターゲットにするよりは、本申請者によって突きとめられたDNA損傷による細胞傷害(DNA損傷)を治療のターゲットにすることが、より治療効果が上がり、より治療薬開発への近道であると考えるのが妥当である。

2. 研究の目的

ビスフォスフォネート(BP)が引き起こす難治性の顎骨壊死が問題となっているものの治療薬の開発に至っていない。また最近では骨のみならず、口腔軟組織の傷害による粘膜損傷の治療不全も誘因として考えられている。申請者は新知見として、ZOLが口腔粘膜上皮細胞のDNA損傷を引き起こし、ユビキチンプロテアソームシステムが活性化され、細胞周期調節たんぱく質分解によってS期細胞周期停止を引き起こすために上皮細胞の増殖能の抑制および上皮組織再生能の低下を起こすことを明らかにした(Ohnuki H et al. Arch Oral Biol, 57(7):906-917, 2012)。

ナイアシン(ビタミンB3)はDNA修復酵素の基質で、細胞のDNA損傷修復能を活性化

することから、BPによるDNA損傷を軽減する効果があると期待でき、口腔粘膜の生物学的活性を維持することが可能である。従って本研究の目的はナイアシンの顎骨壊死に伴う粘膜損傷治療薬としての可能性を検討することである。

3. 研究の方法

ナイアシンの治療薬としての可能性を検討するために、以下の5項目で評価を行う計画とした。また、ナイアシンは、ニコチン酸とニコチンアミドを用いることとした。

2次元培養下で、

- (1) トリパンプルー染色による生細胞計測法により 10 μ M ZOL による培養細胞の増殖抑制効果を回復させるナイアシンの効果を決定する。

細胞を6ウェルプレートに播種し、播種24時間後に、ZOLまたはZOL+ナイアシンを投与する。ナイアシン投与後6日間培養し、細胞を回収後、トリパンプルー染色を行い、生細胞数をカウントし増殖能を比較する。

実験後ナイアシンの効果が生じなかった場合は、ジメチルスルホキシド DMSO を用いる。

- (2) 細胞代謝活性の指標となる MTT アッセイにより、10 μ M ZOL による培養細胞の増殖抑制効果を回復させるナイアシンの効果を決定する。

細胞を96-wellに播種し、播種24時間後に ZOL または ZOL+ナイアシンを投与する。ナイアシンを投与後48時間後に MTT 値を測定し、細胞代謝活性を検討する。

- (3) FACS(フローサイトメーター)による細胞周期解析。
- (4) ウェスタンブロッティング法による細胞周期関連タンパクの発現の増減につ

いて分析し、細胞周期停止の有無を観察する。

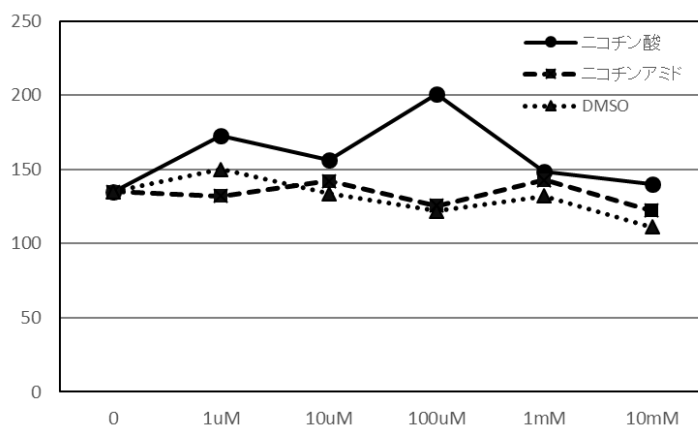
解析は両薬剤投与後48,72,96,120時間後に行い、常に ZOL 単独添加群を対照とする。

- (5) より動的な分析を行うため、培養口腔粘膜を作製し、3次的にナイアシンによる再生能回復を組織学的に、かつマーカーを使用して定量的に分析する。
- (6) 2次元創傷治癒モデルを用いナイアシンによる上皮細胞の運動能回復が得られるかの分析を経て、fucci(フーチ)システムによりこの効果が細胞周期と関連していることを裏付ける。

4. 研究成果

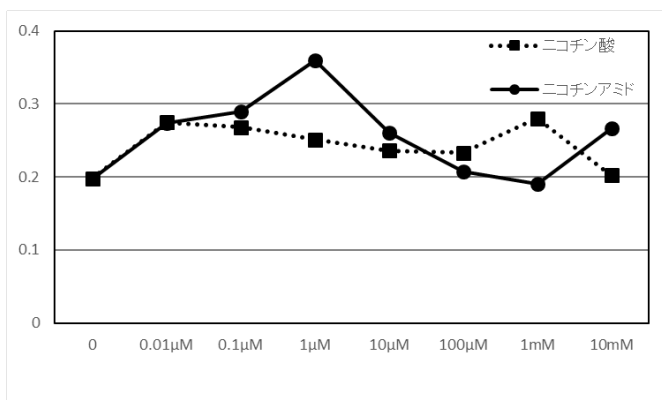
- (1) トリパンプルー染色による生細胞計測法

結果を下図に示す。ニコチン酸、ニコチンアミドの添加により細胞増殖能の回復は認められなかった。DMSO を用いてもニコチンアミドと同様の結果で細胞増殖能は認めなかった。



- (2) MTT アッセイ法

ニコチン酸、ニコチンアミドの添加により細胞代謝活性の回復は認められなかった。



(1)(2)の実験で予想に反し、細胞増殖能および代謝活性の回復を認めなかったため、当初予定していた(3)以降の実験は行えなかった。

以上の結果より、生細胞計測法およびMTTアッセイの結果より一旦重度のDNA損傷を受けた細胞は、DNA修復作用を有する薬剤を添加しても回復が困難であることが示唆された。

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) 大貫尚志, 児玉泰光, 黒川 亮, 嵐山貴徳, 永井孝宏, 和泉大輔, 高木律男: プルガダ症候群と診断された下顎骨骨折症例の1例. 第15回日本口腔顎顔面外傷学会総会・学術大会, 熊本市, 2013年7月13日.
- (2) 齋藤太郎, 大貫尚志, 寺田典子, 前田健康, 高木律男: ゴレドロン酸による口腔粘膜再上皮化障害メカニズムに関する組織学的免疫組織化学的検討. 第67回日本口腔科学会学術総会. 宇都宮市, 2013年5月22-24日.

〔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

(1)研究代表者

大貫 尚志 (Ohnuki Hisashi)

新潟大学 医歯学総合研究科 教務補佐員

研究者番号: 90568552

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: