

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463067

研究課題名(和文)メカニカルストレスを応用したビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死の病態解明

研究課題名(英文)Pathological condition elucidation of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw which applied mechanical stress

研究代表者

高野 裕史 (Takano, Hiroshi)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：30282172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ビスフォスフォネート(以下bisphosphonate: BP)は骨芽細胞に対しALP活性を上昇させ、OPGに対し抑制的に作用すること、また、機械的圧縮ストレスもOPGを抑制することが明らかとなった。したがってBPはALPの上昇によって骨芽細胞分化を促進するが、OPGの低下によって破骨細胞分化も促進させると考えられる。よってBPおよび顎骨への機械的圧縮ストレスは、骨芽細胞において骨代謝回転に促進的に作用することからBPの歯槽骨および顎骨への沈着も促進していることが示唆された。本研究結果は、BRONJの病態形成メカニズムの一端を解明する上で基礎的な知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified that bisphosphonate (BP) raised ALP activity and suppressed expression and production of OPG on osteoblasts, in addition, mechanical compression stress also suppressed expression and production of OPG. Therefore, BP promotes osteoblasts differentiation by a rise of ALP, but it is thought that promote osteoclasts differentiation by fall of OPG. Accordingly, as for BP and the mechanical compression stress to jawbone, what deposition to alveolar bone of BP and jawbone promoted because we were accelerated and acted on bone metabolic turnover in osteoblasts was suggested. When they elucidate one end of a clinical condition formation mechanism of BRONJ, this study results give fundamental knowledge.

研究分野：外科系歯学

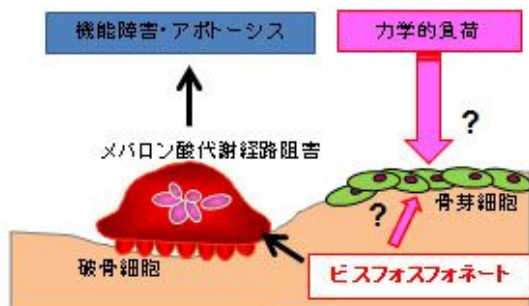
キーワード：ビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死 ビスフォスフォネート製剤 骨芽細胞 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死(以下BRONJ)は,2003年にMarxがはじめてその存在を報告して以来,世界的に症例数は増加の一途を辿っており,発症すると非常に難治性で治療法も確立されていないため,临床上大きな問題となっている.また,BRONJに関するこれまでの研究は,疫学的調査を中心に病理学的,放射線学的な報告がほとんどであり,病態解明を目的とした基礎的研究は世界的にも不十分であると言わざるを得ない.日本においては,関係学会の主導によりBRONJに対するポジションペーパーが作成され,その予防法や対応策について統一の見解が提言されたが,実際には発生機序も明らかではなく,治療法の確立のためにはBRONJの病態解明に対する基礎的な研究の蓄積が急務となっている.

窒素を含むBP製剤(NBP)による骨吸収抑制メカニズムは,骨ミネラルとの親和性が極めて高いNBPが骨に選択的に集積し,その骨を吸収した破骨細胞に特異的に取り込まれ,破骨細胞の機能を抑制し,アポトーシスを誘導することにより骨吸収を阻害する.しかし,近年,NBPは破骨細胞のみならず,他の細胞にも取り込まれ様々な反応を示すことが明らかとなっており,骨芽細胞や歯肉上皮細胞,歯根膜細胞への影響も想定される.また,NBPは骨新生を含むリモデリング活性の高い部分で作用する.BRONJの最大の特徴は,長管骨には発症せず,顎骨のみに生じることであり,会話,呼吸,咀嚼などの行為により身体他の部分の骨とは比較にならないほど頻回の力学的負荷が加わっている歯槽骨および顎骨ではNBPの蓄積が促進しているものと思われる.

申請者は,顎骨および歯槽骨に加わる力学的負荷いわゆるメカニカルストレスに着目し,それが周囲組織を形成する細胞へのNBPの取り込みとBRONJの発症や病態形成に強く関連していると考えている.これまで,骨に対する力学的負荷いわゆるメカニカルストレスは,骨形成や骨吸収,骨のリモデリングに深く関与していることが報告されており,また,申請者は,顎関節滑膜細胞への機械的圧縮ストレスが破骨細胞誘導を促進することによって,関節破壊を中心とした病態形成へ関与していることを明らかにした.しかし,BRONJの病態に力学的負荷が関与していることを示す報告は未だない.



2. 研究の目的

本研究では,NBPを作用させた骨芽細胞へのメカニカルストレスの影響を解析し,分子細胞生物学的手法を用いBRONJの病態形成メカニズムの解明を試み,BRONJ治療の一助とすることを目的とする.

3. 研究の方法

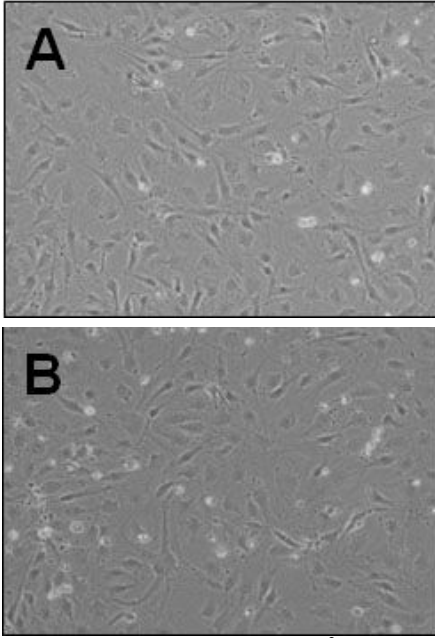
近年の研究では,NBPは破骨細胞のみならず,他の細胞にも取り込まれ様々な反応を示すことが明らかとなっており,破骨細胞と同様に骨のリモデリングに重要な骨芽細胞への影響も想定される.また,会話,呼吸,咀嚼などから直接メカニカルストレスを受けやすい顎骨,歯槽骨の骨芽細胞は,力学的負荷により様々な遺伝子発現の変化を生じていると推察できる.さらに,骨代謝やリモデリングは局所において,サイトカインやプロスタグランジンE₂(PGE₂)の作用により骨芽細胞/ストローマ細胞膜上に発現する破骨細胞分化因子(Receptor activator of NF-κB ligand:RANKL)および同細胞より産生分泌される破骨細胞形成抑制因子(Osteoprotegerin:OPG)産生のバランスにより骨代謝が調節されることが明らかとなった.

そこで本研究では,骨芽細胞へのNBPの作用に着目し,骨芽細胞におけるNBPの及ぼす影響およびNBPの作用を受けた骨芽細胞の力学的負荷に対する応答を解析し,BRONJの病態形成メカニズムの解明を試みる.

- (1) NBP (Zoledronate : Zol) の骨芽細胞への作用を確認するため,骨芽細胞へNBPを添加した後,細胞増殖能を確認する.また,骨芽細胞のアポトーシスもしくはネクローシスの誘導とRANKLおよびOPGの遺伝子発現変化を確認する.
- (2) NBPの作用を受けた骨芽細胞の力学的負荷に対する応答を確認するため,培養ヒト骨芽細胞へ伸展および圧縮ストレスを加えた場合も上記と同様に確認する.
- (3) NBPの骨芽細胞内での作用機序を確認するため,HMG-CoA還元酵素経路の酵素ファルネシルリン酸合成酵素(FPPS)の発現を確認する.
- (4) アポトーシスもしくはネクローシスの誘導因子を確認するため,TNFα,Fasリガンドの産生を確認する.細胞内のアポトーシスを誘導するシグナル伝達を確認するため,カスパーゼカスケードの活性化を確認する.

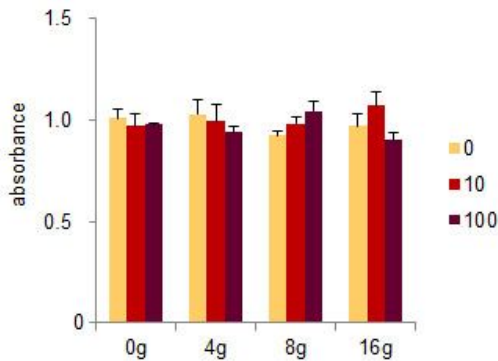
4. 研究成果

MC3T3-E1 細胞への機械的圧縮ストレス



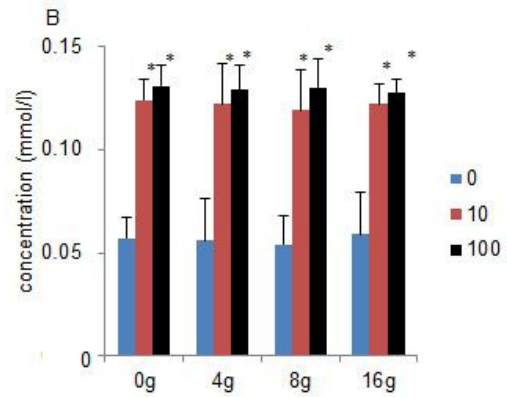
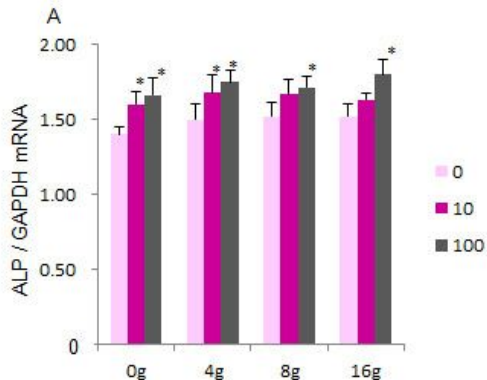
MC3T3-E1 細胞へ 16.0g/cm² の機械的圧縮ストレスを加え、100ng/ml の Zol を添加し培養。圧縮直後(A), 48 時間後 (B) において形態変化など明らかな細胞変化は認められなかった。Original magnification, X100.

Zol 添加, 機械的圧縮ストレス負荷後の細胞増殖活性



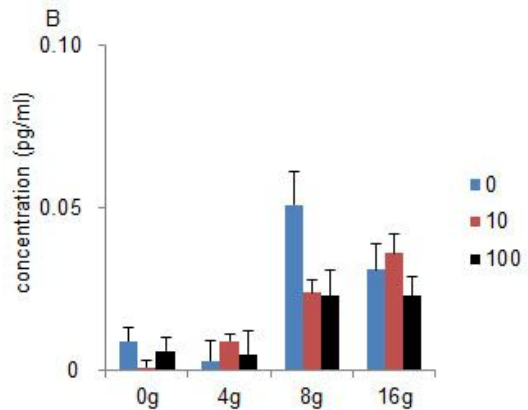
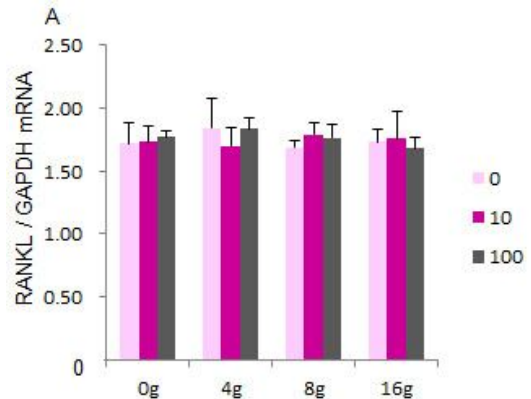
細胞増殖活性は, Zol 添加, 機械的圧縮ストレス負荷において 48 時間の作用で変化は認めなかった。

Zol 添加, 機械的圧縮ストレス負荷後の ALP の発現, 産生



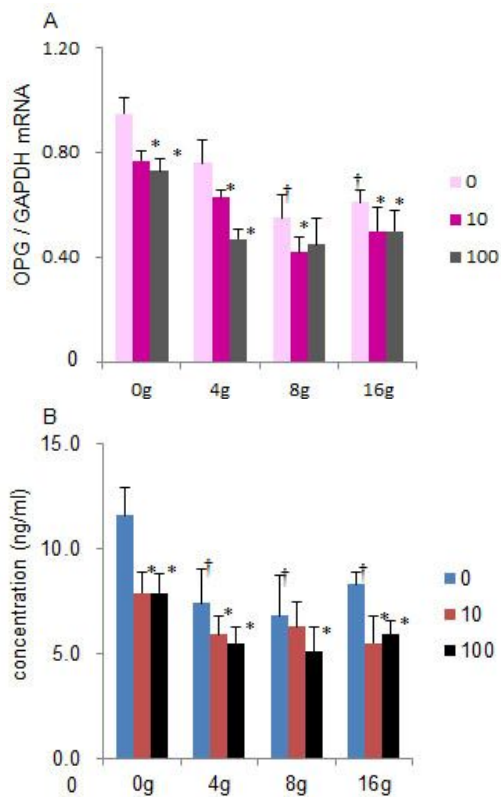
ALP mRNA 発現 (A) および ALP 産生量 (B) は Zol の添加 (10ng/ml, 100ng/ml) により有意に上昇したが, 機械的圧縮ストレス負荷 (重量: 4g, 8g, 16g) では明らかな変化を示さなかった。* $p < 0.05$ versus Zol (-)

Zol 添加, 機械的圧縮ストレス負荷後の RANKL の発現, sRANKL の産生



RANKL mRNA 発現 (A) および sRANKL 産生量 (B) では, Zol の添加 (10ng/ml, 100ng/ml), 機械的圧縮ストレス負荷 (重量: 4g, 8g, 16g) の影響を示さなかった。

Zol 添加, 機械的圧縮ストレス負荷後の OPG の発現, 産生



OPG mRNA 発現 (A) および OPG 産生量(B)は, Zol の添加(10ng/ml, 100ng/ml) および機械的圧縮ストレス負荷 (重量: 4g, 8g, 16g) により有意に低下した. * $p < 0.05$ versus Zol (-), † $p < 0.05$ versus 機械的圧縮ストレス負荷(-)

本研究結果から, Zol は骨芽細胞に対し ALP 活性を上昇させ, OPG に対し, 抑制的に作用すること, また, 機械的圧縮ストレスも OPG を抑制することが明らかとなり, BP および顎骨への機械的圧縮ストレスは骨芽細胞において, 骨代謝回転に促進的に作用することが示唆された.

以上より BP 投与患者では, 歯槽骨および顎骨に加わる力学的負荷が骨形成の活性増加から BP の骨への沈着を促進し, 特異的に病変が発症しうる可能性が考えられた.

<引用文献>

Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab.* 28, 2010
 Deng X, Tamai R, Endo Y, Kiyoura Y. Alendronate augments interleukin-1beta release from macrophages infected with periodontal pathogenic bacteria through activation of caspase-1. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15, 2009, 97-104

Monma Y, Funayama H, Mayanagi H, Endo Y. Effects of weekly administrations of alendronate+clodronate on young mouse tibia: localized action at the proximal growth plate. *Calcif Tissue Int.* 75, 2004, 115-21
 Ichimiya H, Takahashi T, Ariyoshi W, Takano H, Matayoshi T, Nishihara T. Compressive mechanical stress promotes osteoclast formation through RANKL expression on synovial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 103, 2007, 334-41

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)

高野裕史, 中田 憲, 山崎雅人, 今野泰典, 五十嵐秀光, 小澤 諒, 福地峰世, 桑島精一, 福田雅幸, ビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死の病態形成における骨芽細胞へのメカニカルストレスが及ぼす影響, みちのく歯学会雑誌, 査読有, 46, 2015, 31-32

[学会発表](計3件)

高野裕史, 中田 憲, 山崎雅人, 桑島精一, 福田雅幸 (2015) Zoledronate 添加後の骨芽細胞における機械的圧縮ストレス刺激の影響について. 第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 5 月, 大阪
高野裕史, 中田 憲, 山崎雅人, 桑島精一, 今野泰典, 五十嵐秀光, 小澤 諒, 福地峰世, 福田雅幸 (2015) Zoledronate 添加と機械的圧縮ストレス刺激が骨芽細胞へ及ぼす影響について. 第 60 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会. 10 月, 名古屋
高野裕史, 中田 憲, 山崎雅人, 桑島精一, 今野泰典, 小澤 諒, 福地峰世, 福田雅幸 (2015) ビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死の病態形成における骨芽細胞へのメカニカルストレスが及ぼす影響. 第 68 回東北地区歯科医学会. 10 月, 盛岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

高野 裕史 (TAKANO HIROSHI)
 秋田大学・医学部・助教
 研究者番号: 30282172

(2)研究分担者

福田 雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)
 秋田大学・医学部・准教授
 研究者番号: 20272049

(3)連携研究者

中田 憲 (NAKATA AKIRA)
 秋田大学・医学部・助教
 研究者番号: 50400510