

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861717

研究課題名(和文) 骨吸収阻害薬により惹起される顎骨壊死の分子機構 - 骨細胞・骨芽細胞の関与について -

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms in Osteoblast and Osteocyte Related with Drug Induced Osteonecrosis of the Jaws

研究代表者

宮川 和晃 (MIYAGAWA, KAZUAKI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50635381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビスフォスフォネート(BP)製剤や抗RANKL抗体は、作用機序は異なるものの強力な骨吸収抑制作用を示し、有害事象として顎骨壊死を生じさせることがある。本研究は、発症機序が不明である顎骨壊死の病態形成機構を明らかにするため、卵巣摘出術を施した閉経後骨粗鬆症動物モデルを用いて骨細胞および骨芽細胞に注目した解析を行った。BP製剤、抗RANKL抗体のいずれの骨吸収抑制薬もエストロゲン欠乏状態下で骨量を増加させたが、骨細胞機能や骨芽細胞の分化・機能に関連する分子の発現変化に、それぞれの骨吸収抑制薬における違いが見られた。よって、BP製剤と抗RANKL抗体では骨形成に対する影響が異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bisphosphonate (BP) and anti-RANKL antibody are widely used as anti-resorptive agents for bone metastasis and osteoporosis. Although these agents have different effect mechanism, they can sometimes result in osteonecrosis of the jaw (ONJ). We examined that these agents were different influence for the bone formation by osteocyte and osteoblast in long bones. This was evident in ovariectomized C57BL/6J mice, which were treated with zoledronic acid (ZOL) or anti-RANKL antibody. Bone mass in long bone of both mice groups treated with ZOL and anti-RANKL antibody under lack of estrogen had significantly increased compared to control mice. Additionally, the changes in the expression of bone formation-related genes (Sost, Dmp1, and Osteocalcin) in long bones of mice treated with either ZOL or anti-RANKL antibody was different. Thus, these results suggested that the regulatory mechanisms of bone formation in osteocytes and osteoblasts differs between BP and anti-RANKL antibody.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨細胞 骨芽細胞 ビスフォスフォネート 抗RANKL抗体 顎骨壊死

1. 研究開始当初の背景

Bisphosphonate (BP) 製剤やヒト抗 RANKL モノクローナル抗体 (Denosumab) は、悪性腫瘍に合併する骨転移・骨関連事象 (骨痛、病的骨折、高 Ca 血症など) や骨粗鬆症などの骨病変に対する有効な治療法として使用されている。これらの薬剤は破骨細胞性骨吸収の抑制という共通の薬理作用を示すが、両者の作用機序は異なっている。ピロリン酸の構造類似体である BP は骨表面に強固に付着して破骨細胞の骨吸収能を抑制するとともに破骨細胞のアポトーシスを誘発する。一方、抗 RANKL 抗体は、骨芽細胞や骨細胞が発現する破骨細胞誘導因子 RANKL に対する中和抗体であり、RANKL-RANK 系を特異的に阻害することにより破骨細胞の分化や生存を抑制する。結果として、いずれの場合も破骨細胞性骨吸収が抑制され、悪性腫瘍においては骨転移の抑制や骨関連事象の改善を、骨粗鬆症においては骨量の増加が認められる。一方、BP 投与患者の一部において、抜歯などの歯科的侵襲を受けたことがきっかけとなり難治性の顎骨壊死・骨髄炎を認めることがある。この病態は Bisphosphonate 関連顎骨壊死 (BRONJ) と称され、BP の代表的な有害事象として広く認識されている。しかし、その治療は抗菌薬の長期投与と局所洗浄による保存的療法が中心であり、治療に苦慮することが多い。これは、BRONJ の病態形成機構の全容が未だに不明という点にある。これまでの臨床的知見から、BP の上皮形成阻害や血管新生阻害作用による骨の虚血性変化に、歯科治療、不良な口腔衛生状態や糖尿病などのリスクファクターが加わる事が発症機序の一つとして考えられている (Paolo, et al, Oral Oncol, 2011)。しかしながら、BRONJ に関する研究は、主に BP 投与動物に対して細菌感染や外科侵襲などのリスクファクターに曝露させた後に発症した顎骨壊死の観察のみにとどまっており、詳細な病態形成機構は解明されていない。さらに、近年では抗 RANKL 抗体投与例でも顎骨壊死の発症が確認され、その発生頻度は BP の中で最も BRONJ 発症頻度の高い Zoledronic Acid と同頻度である事が報告されている (Saad, et al, Ann Oncol, 2011, Yee, et al, Clin Interv Aging, 2012)。抗 RANKL 抗体が BP と同一の分子機序により顎骨壊死を惹起しているのかどうかについてはこれまで検討がなされておらず、不明である。また、顎骨壊死の病態形成に骨芽細胞や骨細胞の機能異常が関与している可能性についてもこれまで検討が行われていない。

2. 研究の目的

BP および抗 RANKL 抗体で引き起こされる顎骨壊死の病態形成機構を明らかにするため、卵巣摘出術 (OVX) を施した閉経後骨粗鬆症動物に骨吸収抑制薬を投与したモデルを用い、骨細胞および骨芽細胞に注目した解析を行った。

3. 研究の方法

(1) OVX、骨吸収抑制薬投与マウスの作成

9 週齢の雌の C57BL/6J マウスに 卵巣摘出術 (OVX) を施行し、術後 2 週目から Bisphosphonate としてゾレドロン酸 200 µg/kg を週 2 回、1 ヶ月間腹腔内投与した (OVX-Z 群)。また、OVX していないマウスに、ゾレドロン酸を投与したものを Z 群とした。抗 RANKL 抗体投与モデルは、術後 2 週目の OVX マウスにマウス RANKL 中和抗体を 5 mg/kg 単回投与し、1 ヶ月間飼育した (OVX-D 群)。それぞれ薬剤を投与しないマウスを対照とした (C 群、OVX-C 群)。

(2) 長管骨における骨微細構造解析

OVX による骨量減少効果ならびに薬剤による骨量変化を確認するため、骨微細構造解析を行った。摘出した右側脛骨をホルマリンにて固定した後、マイクロ CT により脛骨近位骨端を撮影した。成長板直下から 500 µm の断面幅で骨微細構造解析を行い、骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N)、骨梁間隙 (Tb.Sp) を算出した。

(3) BP 製剤、抗 RANKL 抗体が骨代謝関連分子に及ぼす影響

骨細胞および骨芽細胞に対し、両者の骨吸収抑制薬が与える影響とその違いを検討するため、次のような方法を行った。

骨組織形態計測

ホルマリン固定した各群の右側脛骨を EDTA にて脱灰し、パラフィン切片を作成した。切片に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行い、各群の皮質骨における単位面積当たりの骨細胞数を計測した。

定量的 Real-time PCR 解析

骨組織における骨代謝関連分子の遺伝子発現を確認するため、左側脛骨を摘出後ただちに軟骨組織および骨髄を除去し、凍結破砕装置にて骨組織から total RNA を抽出した。骨細胞機能に関連する分子 (Sost、Dmp1 (Dentin matrix protein 1)) に加え、骨芽細胞の分化・機能に関わる分子群 (Runx2 (Runt-related transcription factor 2)、Osx (Osterix)、Col1a (type I collagen)、OC (Osteocalcin)) の遺伝子発現量を定量的 PCR 法にて測定した。なお、遺伝子発現量の算出については Gapdh (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) をノーマライザーとした比較 Ct 法により行った。

免疫組織化学染色

Sclerostin は骨細胞特異的に発現し、骨形成の促進に深く関与する Wnt/ -catenin シグナルを抑制する液性因子である。Sclerostin の骨細胞からの産生および骨細管や骨基質での蓄積・分布を確認するため、右側脛骨における抗マウス Sclerostin 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、各群の皮質骨における発現を比較した。

4. 研究成果

(1) 骨吸収抑制薬による骨微細構造変化

マイクロ CT による脛骨近位骨端における骨微細構造解析では、OVX-C 群は C 群と比較して BV/TV が 50% 減少した。一方、Z 群は C 群より 180% 増加し、OVX-Z 群は 75%、OVX-D 群は 43% 増加した。Tb. th、Tb. N および Tb. Sp の変化もまた OVX による骨粗鬆化および両者の骨吸収抑制薬による骨量上昇効果を支持する値を示した。OVX-Z 群と Z 群を比較すると、OVX-Z 群の BV/TV は 38% 減少していた。これは、OVX-C 群と C 群との減少差より 13% 少なかった。

(2) 骨細胞および骨芽細胞に着目した組織学的検討

脛骨近位端から 7 mm 遠位側の皮質骨を撮影し、単位面積当たりの骨細胞数として計測した。C 群は 515 個/mm² の骨細胞が存在し、OVX-C 群では 543 個、OVX-Z 群では 538 個/mm²、OVX-D 群では 510 個/mm² だった。OVX ならびに骨吸収抑制剤投与を実施した群でも骨細胞数に有意な変化は見られなかった。また、骨細胞の細胞形態、骨小腔に明らかな差は見られなかった。骨細胞数は、OVX や骨吸収抑制剤による影響は受けにくい傾向がみられた。次に、成長板軟骨下における二次海綿の観察を行った。OVX-C 群は活発な骨芽細胞が認められ、高代謝回転型の骨粗鬆化を示した。一方、OVX-Z 群、OVX-D 群では、骨代謝回転が低下しているため、活発な骨芽細胞が少なく、骨吸収抑制剤による影響が認められた。しかし、一般的な組織学的検討ではゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体による差を確認することができず、さらなる詳細な検討を行う必要があった。

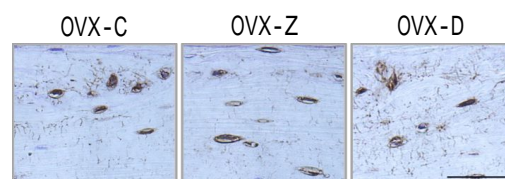
(3) 骨吸収抑制薬により惹起される骨細胞・骨芽細胞における遺伝子発現変化

組織切片による検討において、いずれの骨吸収抑制薬の投与は活性化した骨芽細胞を減少させたため、骨形成に関連する分子の発現変化が推察された。そこで、脛骨より抽出した total RNA を用いて骨細胞および骨芽細胞に発現する骨形成関連分子の遺伝子発現を定量的 PCR にて検討した。まず、骨細胞特異的に発現する骨形成関連分子の遺伝子発現量 (*Sost*、*Dmp1*) を測定した。OVX-Z の遺伝子発現はいずれの遺伝子も OVX-C 群と変化なかった。一方、OVX-D 群は OVX-C 群と比較して *Sost* では 5.8 倍、*Dmp1* は 12 倍の有意な増加を認めた。次に、骨芽細胞において骨形成機能に関連する遺伝子 (*Runx2*、*Osx*、*Col1a*、*OC*) を検討した。骨芽細胞分化初期に発現する *Runx2* および *Osx* の遺伝子発現量は、OVX-Z 群、OVX-D 群のいずれも OVX-C 群と差を認めなかった。Col1 も OVX-C と比較し OVX-Z 群、OVX-D 群に有意な発現差を認めなかった。骨芽細胞の分化後期に発現する *Oc* は OVX-D 群において 5.8 倍の遺伝子発現量の有意な増加

を認めた。これらのことからゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体による骨吸収抑制作用は骨形成に対して異なる作用を示す可能性が推察された。

(4) 皮質骨における Sclerostin の発現変化

OVX-Z 群において *Sost* の遺伝子発現量が有意に増加したことから、*Sost* 遺伝子によってコードされている Sclerostin の脛骨皮質骨における局在を免疫組織化学染色により検討した。OVX-Z 群は OVX-C 群と比較して骨細管における Sclerostin の局在の減少を認めた。一方、OVX-D 群では OVX-C 群よりも細胞質、骨小腔、骨細管、骨基質のいずれにおいても強発現を示し、*Sost* の遺伝子発現変化の結果と矛盾していなかった (図)。



図：各群の脛骨皮質骨におけ Sclerostin の局在 (バーの長さ：50 μm)

(5) 考察

閉経後骨粗鬆症を想定したマウス・ラットにおける卵巣摘出は、エストロゲン欠乏により破骨細胞による急速な骨吸収の促進とそれに伴う骨形成の促進 (高代謝型骨代謝回転) の寄与により骨量減少が認められる。本研究において、いずれの骨吸収抑制薬も OVX によるエストロゲン欠乏状態で骨量を増加させた。しかし、ゾレドロン酸と抗 RANKL 抗体では骨形成に対する影響が異なる事が示唆された。特に、抗 RANKL 抗体は骨細胞マーカー遺伝子および後期骨芽細胞マーカー遺伝子においてゾレドロン酸とは異なる反応を示した。ゾレドロン酸による骨形成抑制作用が既にいくつかの報告で述べられているが、本研究で得られたゾレドロン酸投与による結果も矛盾のないものであった。一方、本研究における抗 RANKL 抗体の結果は、後期骨芽細胞の分化マーカーである Osteocalcin の遺伝子発現が増加したにもかかわらず骨細胞における Sclerostin の発現や *Sost* 遺伝子の発現は増加していた。しかし、OVX-D 群の組織学的検討においては活発な骨芽細胞が増加している結果を得なかった。RANKL は骨芽細胞だけでなく骨細胞からも供給されていることが近年注目されており、RANKL の機能を直接抑制する抗 RANKL 抗体による骨形成への影響をより詳しく明らかにするにはさらなる検討が必要であると考えられる。今後の展望として、異なる週齢や異なる部位で評価や異なる手法での解析など、より知見を集積することで骨細胞を介した骨代謝への影響、そして薬剤の影響の違いによる顎骨壊

死機序の解明へと繋がるような研究が必要と考える。

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6件)

Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Nishino J, Koshimizu T, Ohata Y, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Dysregulated gene expression in the primary osteoblasts and osteocytes isolated from hypophosphatemic *Hyp* mice. PLOS ONE 9(4): e93840, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0093840. 査読有

宮川和晃, 道上敏美. 骨ミネラル代謝制御の司令塔としての骨細胞. 大阪府立母子保健総合医療センター雑誌. 第30巻第2号 pp.52-58, 2014, 査読有.

Yamazaki M, Kawai M, Miyagawa K, Ohata Y, Tachikawa K, Kinoshita S, Nishino J, Ozono K, Michigami T. Interleukin-1-induced acute bone resorption facilitates the secretion of fibroblast growth factor 23 into the circulation. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 33:342-354, 2015. DOI: 10.1007/s00774-014-0598-2. 査読有.

Naruse K, Uchida K, Suto M, Miyagawa K, Kawata A, Urabe K, Takaso M, Itoman M, Mikuni-Takagaki Y. Alendronate Does Not Prevent Long Bone Fragility in an Inactive Rat Model. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 34:615-626, 2016. DOI: 10.1007/s00774-015-0714-y. 査読有.

Yamada C, Aikawa T, Okuno E, Miyagawa K, Amano K, Takahata S, Kimata M, Okura M, Iida S, Kogo M. TGF- β in jaw tumor fluids induces RANKL expression in stromal fibroblasts. International Journal of Oncology, Aug; 49(2):499-508, 2016. DOI: 10.3892/ijo.2016.3548. 査読有.

Nishino J, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Yamamoto K, Miyagawa K, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Extracellular Phosphate Induces the Expression of Dentin Matrix Protein 1 through the FGF Receptor in Osteoblasts. Journal of Cellular Biochemistry, 118(5):1151-1163, 2017. DOI: 10.1002/jcb.25742. 査読有.

[学会発表](計9件)

Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Nishino J, Koshimizu T, Ohata Y, Tachikawa K,

Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Activation of FGF/FGF Receptor Signaling in the Primary Osteocytes Isolated from Hypophosphatemic *Hyp* Mice. American Society for Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting. 9/12-9/15/2014. Houston, TX, USA.

宮川和晃, 相川友直, 奥野恵実, 山田智明, 大倉正也, 古郷幹彦. 歯原性腫瘍の顎骨吸収の分子機序 腫瘍間質線維芽細胞の RANKL 発現を軸とした解析. 第59回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 2014年10月17日~10月19日, 幕張メッセ(千葉).

宮川和晃, 廣石幸恵, 磯村恵美子, 大槻浩一, 青海哲也, 田中晋, 古郷幹彦. -TCPを用いた顎裂部オトガイ骨移植術の三次元的評価. 第39回日本口蓋裂学会・学術集会. 2015年5月21日~5月22日, 砂防会館(東京).

Hiroishi S, Miyagawa K, Seikai T, Otsuki K, Tanaka-Isomura E, Tanaka S, Kogo M. 3-dimensional analysis of mandibular bone graft with -TCP for the cleft patients. 10th European Craniofacial Congress. 6/24-6/27/2015, Gothenburg, Sweden.

Miyagawa K, Hiroishi S, Matsushita Y, Tanaka S, Kogo M. Three-dimensional analysis of chin bone for secondary bone graft with beta-TCP in unilateral cleft patients. American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting. 10/9-10/12/2015, Seattle, WA, USA.

宮川和晃, 相川友直, 足立敏, 新宅優子, 田中晋, 水谷雅英, 関壮樹, 山田早織, 古郷幹彦. 下顎骨延長術にて咬合の獲得を得た両側科学頭吸収症例の1例. 第26回日本顎変形症学会総会・学術総会. 2016年6月24日~6月25日, 学術総合センター(東京).

松下豊, 宮川和晃, 廣石幸恵, 田中晋, 古郷幹彦. -TCP とオトガイ骨混合移植による顎裂部骨移植の骨質評価. 第61回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2016年11月25日~11月27日, 幕張メッセ(千葉).

宮川和晃, 相川友直, 新宅優子, 田中晋, 伊藤慎将, 三原聖美, 足立敏, 石濱孝二, 原田文司, 内橋俊大, 山田早織, 高畑惣介, 毛利真弥, 辻忠孝, 山城隆, 古郷幹彦. 下顎頭切除と上下顎移動術の一期的手術の術後安定性. 第27回日本顎変形症学会総会・学術大会. 2017年6月15日~6月16日, 東京ビックサイト TFT ホール(東京).

高畑惣介, 相川友直, 宮川和晃, 自見英治郎, 古郷幹彦. 口腔扁平上皮癌による顎骨進展様式は腫瘍内微小環境により異

なる. 第 35 回日本骨代謝学会学術大会.
2017 年 7 月 27 日 ~ 月 29 日, ホテル日航
福岡 (福岡).

〔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 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

宮川 和晃 (MIYAGAWA, Kazuaki)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号 : 5 0 6 3 5 3 8 1

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()