

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592941

研究課題名(和文)メラノコルチン受容体作動薬の骨代謝における作用の解析と顎骨壊死に対する臨床応用

研究課題名(英文)Functional analysis of melanocortin receptor agonists in bone metabolism and the possibility of clinical application for osteonecrosis of the jaw

研究代表者

佐藤 毅 (Sato, Tsuyoshi)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：60406494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の血管および骨に対する作用が注目されているが、詳細な解析が行われていない。本研究で、ACTH受容体ノックアウトマウスでは、骨の密度の上昇を認めた。骨になる細胞にACTHを作用させたところ、骨になる細胞へのなりやすさは阻害された。また、骨を壊す細胞においてはなりやすさが促進された。また、ACTH受容体ノックアウトマウスでは血管形成因子VEGF-Dの発現が有意に高かった。本研究の結果、血管形成を促進させる作用のある薬剤として、ACTHが有効であるが、骨形成を阻害する可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether adrenocorticotrophic hormone(ACTH) affects bone directly. Using ACTH receptor knockout mice, bone mineral density was significantly upregulated. Osteoblast differentiation was inhibited and osteoclast differentiation was promoted by ACTH stimulation. In ACTH receptor knockout mice, VEGF-D expression was upregulated. Although ACTH is effective for vascularization, there is the possibility that ACTH may inhibit bone formation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学

キーワード：ACTH 骨 VEGF

1. 研究開始当初の背景

近年、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の骨頭壊死に対する予防に有効であることが示されている。しかしながら、ACTH の骨への作用については、詳細な解析が行われていない。

骨壊死の病態形成のメカニズムにはいくつかの概念が提唱されている (Ajmal M, 2009; Kim TH, 2007)。外傷性大腿骨頭壊死や放射線治療後などの症候性骨頭壊死・顎骨壊死などは無血管性であり avascular necrosis (AVN) と呼ばれるが (Assouline-Dayana Y, 2002)、最近では慢性骨髄炎から移行した骨壊死のように微小血管形成を伴う microvascular necrosis (MVN) という概念が提唱されており、MVN の病態を示すステロイド性大腿骨頭壊死では ACTH の投与が発症の抑制に有効であることが示されている (Zaidi M, 2010)。BRONJ の病態は当初 AVN であると考えられていたが (Marx RE, 2003)、組織学的に慢性骨髄炎の病態を伴うことがわかってきた (池田ら 2010)。骨髄炎から移行して骨壊死に至るような BRONJ の病態は、MVN の病態に類似している可能性が示唆される。顎骨に関する炎症性疾患のうち、慢性骨髄炎および BRONJ は発症すると治療に難渋する。慢性骨髄炎・BRONJ の非外科的治療法は、消毒薬による定期的洗浄および抗生剤の長期投与であるが奏功しないこともあり、慢性骨髄炎ではときに顎骨壊死に陥ることがある。BRONJ も含めて顎骨壊死に対しては外科的切除が根治的治療法であるが、侵襲が大きく咀嚼機能が著しく損なわれる。従って、顎骨壊死の予防法・治療法の開発は急務である。慢性骨髄炎の病態は細菌感染による骨髄内の炎症性変化を原因とした血流障害であり、長期間持続すれば顎骨壊死に至る。BRONJ の病態については、破骨細胞をターゲットとした骨吸収抑制・骨細胞の減少・口腔細菌感染・血管新生抑制・上皮細胞増殖抑制など多くの要因が複合的に絡み合っている (Yoneda T, 2010)。現在のところ BRONJ の発症原因は不明であるが、申請者が仮説として考えている BRONJ 発症のメカニズムは、BP を投与している患者に対して抜歯を行う場合に、何らかの原因で生体の免疫系が機能していない状態であると、細菌の活動が活発化して局所の炎症が引き起こされ、骨吸収が亢進して骨内に BP 製剤が遊離し、周囲の細胞の増殖が抑制されてアポトーシスが誘導されることにより引き起こされる、というものである。

2. 研究の目的

ACTH は melanocortin-2 (MC2) 受容体に作用する。本研究では MC2 受容体ノックアウトマウスの骨の表現型の解析を行い、*in vivo* における ACTH の骨に対する作用を検討し、*in vitro* において ACTH の骨関連細胞に対する作用を調べる。また、ACTH に弱い親和性

のある MC3 受容体の作用も有効である可能性も考えられるため、MC2 受容体ノックアウトマウスに MC3 受容体アゴニストを投与して骨量が増加するかどうかを検討する。さらに、MC3 受容体アゴニストが顎骨壊死に対して有効かどうかを、顎骨壊死モデル動物作製を試み、投与して調べる。

3. 研究の方法

(1) MC2 受容体ノックアウトマウスの骨表現型の解析

6カ月齢の MC2 受容体ノックアウトマウスを用いて、硬組織切片作製と骨形態計測、血清骨関連マーカー濃度測定を行った。

(2) 骨関連細胞における ACTH の分化能の検討

前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を分化培地で培養して、ACTH を作用させた。また、マウス大腿骨より骨髄細胞を採取して M-CSF および RANKL を作用させて破骨細胞分化における ACTH の作用を検討した。

(3) MC2 受容体ノックアウトマウスへの MC3 受容体アゴニストの投与と顎骨壊死モデル動物作製

MC2 受容体ノックアウトマウスに MC3 受容体アゴニストである γ 2-melanocyte stimulating hormone を投与して骨量解析を行った。顎骨壊死モデル動物の作製を試みた。

(4) MC2 受容体ノックアウトマウス由来初代培養細胞の解析

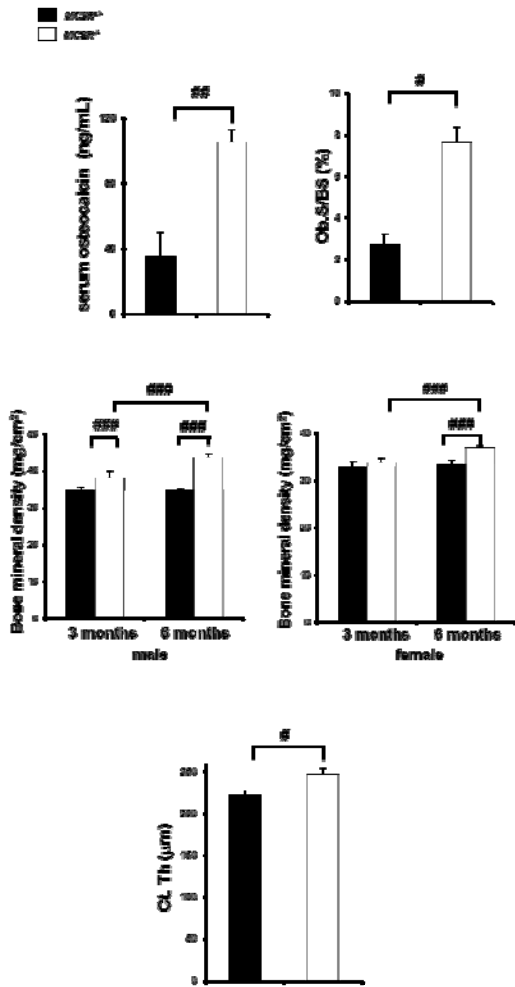
MC2 受容体ノックアウトマウスの生後4日目の頭蓋骨から間質細胞を採取して初代骨芽細胞を培養し、血管形成制御因子の発現を調べた。

4. 研究成果

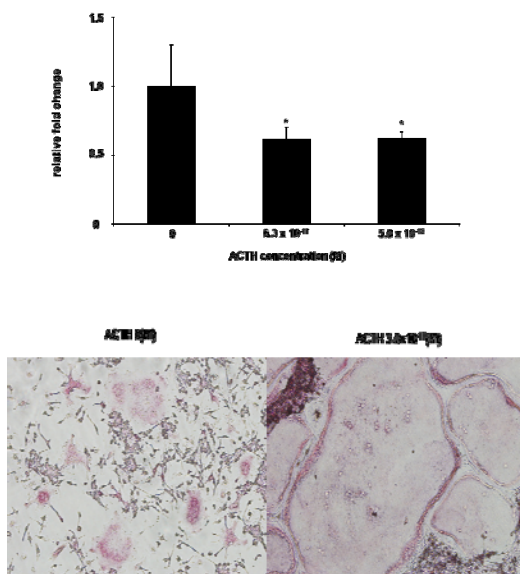
(1) MC2 受容体ノックアウトマウスでは、骨芽細胞数の増加、血清オステオカルシン濃度の上昇、皮質骨厚さの増大、骨密度の上昇を認めた。



MC2R^{+/+} MC2R^{-/-}

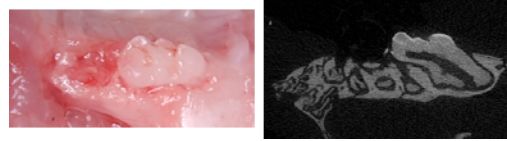


(2) 骨芽細胞に ACTH を作用させて分化能を検討したところ、分化抑制を引き起こした。また、破骨細胞においては破骨細胞分化を促進させた。

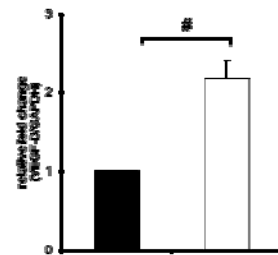
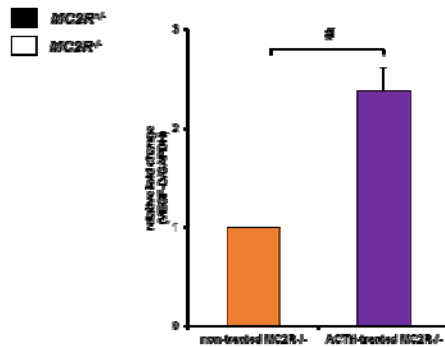
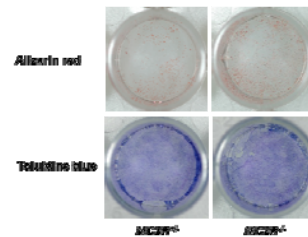


(3) MC2 受容体ノックアウトマウスに MC3 受容体アゴニストである γ 2-melanocyte stimulating hormone を投与して骨量解析を行

ったが、有意差は認められなかった。顎骨壊死モデル動物の作製を試みたが臼歯部の抜歯が困難で作製ができなかった。



(4) MC2 受容体ノックアウトマウスの生後 4 日目の頭蓋骨から間質細胞を採取して初代骨芽細胞を培養し、分化能を検討したところ、石灰化が亢進していた。また、MC2 受容体ノックアウトマウスでは血管形成制御因子の VEGF-D 発現が有意に高く、ACTH を作用させることで VEGF-D 発現は上昇した。



本研究の結果、ACTH が高値である MC2 受容体ノックアウトマウスでは、骨形成が促進しており、血管形成が亢進している可能性が考えられた。また骨壊死には血管形成を促進させる作用のある薬剤として、ACTH が有効であるが、骨形成を阻害する可能性があると考えられた。

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)

九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：10453630

(3) 連携研究者

竹田 秀 (TAKEDA, Shu)
東京医科歯科大学・医学部・教授
研究者番号：30376727

〔学会発表〕(計4件)

- ① 佐藤毅 ストレスによる骨密度低下および肥満発症メカニズムの解明と創薬への展望. 彩の国骨フォーラム研究会, 埼玉県, 2012年6月29日
- ② Sato T, Chida D, Iwata T, Usui M, Enoki Y, Matsumoto M, Xu R, Sunamura S, Ochi H, Fukuda T, Takeda S, Yoda T. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis is essential for the regulation of both bone and fat metabolism via melanocortin 2 receptor. American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, Minneapolis, 2012, Oct 13
- ③ 佐藤毅, 榎木祐一郎, 福島洋介, 中本紀道, 壁谷信, 佐野良恵, 中本文, 坂田康彰, 依田哲也: 心因性ストレスは骨組織の減少および脂肪組織の増加を引き起こす. 第66回日本口腔科学会, 広島市, 2012年5月18日
- ④ 佐藤毅, 榎木祐一郎, 中本紀道, 福島洋介, 坂田康彰, 依田哲也: ストレスホルモンによる骨代謝への直接作用の解析. 第45回口腔科学会関東地方部会, 東京都, 2011年11月19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

佐藤 毅 (SATO, Tsuyoshi)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：60406494

(2) 研究分担者

臼井 通彦 (USUI, Michihiko)