

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861940

研究課題名(和文)ビスフォスフォネート関連顎骨壊死に關与する遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Investigation of RANKL-inducible genes in zoledronate-treated mouse osteoclast precursor cells.

研究代表者

中川 貴之(Nakagawa, Takayuki)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：30456230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはBPがRANKLを介した破骨細胞の生存・分化障害が顎骨壊死に關与していると考え、ゾレドロン酸存在下と非存在下で培養したマウス破骨前駆細胞のマイクロアレイ解析を行った。その結果Nfatc1とCar2が破骨細胞分化誘導時に著明な発現を示し、ゾレドロン酸による分化阻害に伴い発現が抑制されることをつきとめた。またメバロン酸経路においてビスフォスフォネートの影響を回避するゲラニルゲラニールを投与したところ、いずれの遺伝子も発現回復が認められた。以上の知見から、ゾレドロン酸はNfatc1とCar2を抑制することでRANKL誘導性の破骨細胞分化を阻害している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osteonecrosis of the jaw (ONJ) is frequently reported as a major adverse effect induced by BP treatment. The RANKL inhibitor, denosumab, has been used to prevent SRE, but the frequency of ONJ induced by denosumab is similar to that by BPs. We therefore investigated the expression status of RANKL-inducible genes in zoledronate-treated mouse osteoclast precursor cells. Microarray analysis identified that the mRNA expression level of NFATc1 and CALL, was decreased in zoledronate-treated cells. Subsequent analyses verified that these two genes were significantly silenced by zoledronate and that their expression was restored following inhibition of zoledronate action by geranylgeraniol. Zoledronate inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation by suppression of NFATc1 and CALL gene expression. Our results suggest that these genes might be common targets for zoledronate and denosumab in the mechanism underlying RANKL-induced osteoclast differentiation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：ビスフォスフォネート関連顎骨壊死

1. 研究開始当初の背景

BP 製剤は骨粗鬆症や悪性腫瘍の骨転移における高Ca血症や疼痛の緩和に有用であり、現在広く臨床で使用されている。一方で BP 製剤の投与患者の侵襲的歯科治療後に発生する顎骨壊死(BRONJ)が問題になっている。BRONJ は難治例や進行例の報告もあり、顎骨切除などの外科的な加療が必要となる場合は術後のQOL が著しく損なわれる。このため BRONJ の病態解明は効果的な治療方針や予防策の立案のために急務であると考えられる。

2. 研究の目的

われわれはこれまでヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体であるデノスマブにより生じる顎骨壊死の発症率が BP 注射剤と同頻度であることから、RANKL を介した破骨細胞の生存・分化誘導機構の障害により顎骨壊死が生じ、BP 製剤がその障害に関与しているという仮説の下、M-CSF 存在下で RANKL によるマウス破骨前駆細胞の分化誘導の検証 BP 存在下での分化誘導の検証 BP 存在下と非存在下で培養した前駆細胞のマイクロアレイ解析による BP 製剤標的候補遺伝子の網羅的探索を行った。その結果、RANKL 投与群は破骨細胞の特徴である多核巨細胞への変化がみられたが、RANKL と BP を同時に添加した群では破骨細胞への分化は見られなかった。このため破骨前駆細胞は BP により破骨細胞への分化が阻害されている可能性が示唆された。

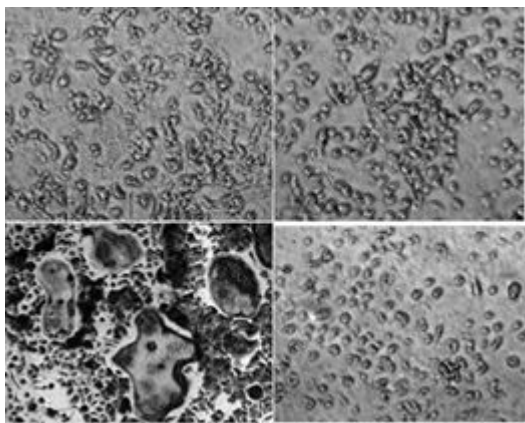


図1 M-CSF 存在下でのマウス破骨前駆細胞の分化誘導の検証  
BP 製剤(ゾレドロン酸)投与下では破骨前駆細胞の破骨細胞への分化が阻害されている。  
左上.コントロール群  
右上.BP 単独投与群  
左下.RANKL 単独投与群  
右下.RANKL+BP 投与群

そこで BP 製剤投与下と非投与下で培養した破骨前駆細胞に RANKL による分化誘導を加え、cDNA マイクロアレイ解析によって両者間で mRNA 発現レベルが異なる遺伝子の網羅的解析を行った。主に RANKL シグ

ナル関連分子を中心に BP 非投与群に比べ、BP 投与群において 1/2 以下の発現低下を示すものを候補遺伝子として抽出した。その結果 Nfatc1 と Car2 を同定した。

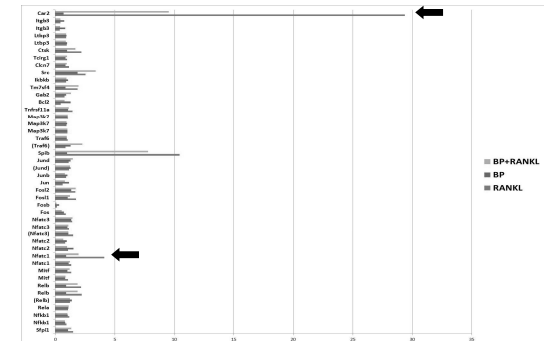


図2 BP 存在下と非存在下で培養した前駆細胞の cDNA マイクロアレイ解析による BP 製剤標的候補遺伝子の同定

矢印の遺伝子(上;Car2 下;Nfatc1)は BP 非投与群 (RANKL) に比べ、BP 投与群 (BP+RANKL)において 1/2 以下の発現低下を認めた。

これらの遺伝子に関して real-time PCR での発現レベルの検証を行ったところ、BP 非投与群に対して BP 投与群の有意な発現低下を認めた。

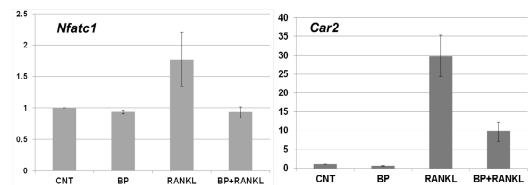


図3 候補遺伝子の real-time PCR による検証

左;Nfatc1 右;Car2 とも、BP 非投与群 (RANKL)に比べ、BP 投与群 (BP+RANKL)において有意な発現低下を認めた。

2 つの候補遺伝子のうち、NFATc1 は骨免疫学の分野では破骨細胞分化に必須の転写因子であり、RANKL シグナル伝達の中心的な役割を担う分子であることが証明されている。(cf. Takayanagi H, et al. Dev Cell. 2002 Dec;3(6):889-901) さらに抗リウマチ薬である leflunomide の骨破壊抑制効果についても、破骨前駆細胞の NFATc1 の発現が抑制されることにより生じることが示されている。(cf. Urushibara M, et al. Arthritis Rheum. 2004 Mar;50(3):794-804.) 以上の結果から BP 製剤は NFATc1 の発現が抑制を通じて RANKL シグナル経路にも関与している可能性が示唆された。

本研究ではこれらの分子機構の解析を行うことで BP 製剤関連顎骨壊死の病態が解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1. BP 存在下と非存在下でのマウス破骨前駆細胞の Nfatc1 と Car2 のタンパク発現レベルの検討

マウス破骨前駆細胞を BP 存在下と非存在下とで分けて培養し M-CSF と RANKL にて分化誘導する。その後タンパクを回収し各々の分子の抗体を用いて発現レベルの検討を western blotting 法を用いて行った。

#### 2. BP 阻害剤投与下での候補遺伝子の発現と低分子量 GTP 結合タンパクへの影響に関する検討

窒素ビスフォスフォネートはメバロン酸経路のファルネシルピロリン酸合成酵素 (FPPS) を阻害することにより、骨代謝に作用する。メバロン酸経路におけるゲラニルゲラニオール形成(プレニル化)は FPPS の働きに依存しているが、BP 製剤は低分子量 GTP 結合蛋白 (Rho, Rac, Cdc42, Ras) など細胞内シグナル分子のプレニル化を障害すると考えられている。これら分子の機能障害は、破骨細胞の機能低下やアポトーシスと関連していると推測されている。このため BP により阻害されているゲラニルゲラニオールを投与によるプレニル化を誘導し、候補遺伝子の発現を western blotting 法と蛍光免疫染色法で検討した。

### 4. 研究成果

1. マウス破骨前駆細胞において、Western blotting 法で Nfatc1 と Car2 が破骨細胞分化誘導時に著明な発現を示し、ゾレドロン酸による分化阻害に伴い発現が抑制された。

2. BP のメバロン酸経路におけるファルネシルピロリン酸合成酵素の阻害をバイパスすることにより、ビスフォスフォネートの影響を回避できるゲラニルゲラニオールを投与したところ、いずれの遺伝子も western blotting 法で発現回復が認められた。また蛍光免疫染色法でもゲラニルゲラニオール投与により破骨細胞への分化が認められる多核巨細胞において2つの候補遺伝子の発現が認められた。以上の知見から、ゾレドロン酸によるメバロン酸経路阻害が、Nfatc1 と Car2 を抑制することで RANKL 誘導性の破骨細胞分化を阻害している可能性が示唆された。

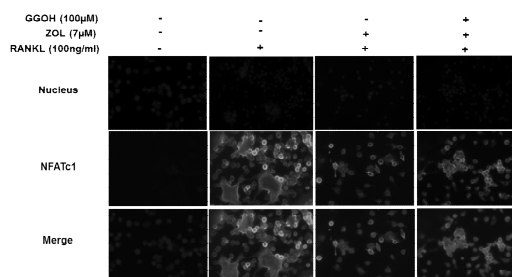


図 4 蛍光免疫染色をおこない(1 列目:対照群 2:RANKL 添加, 3:RANKL+ゾレドロン酸添加, 4: RANKL+ゾレドロン酸+GGOH 添加), ゾレドロン酸投与群とゾレドロン酸に GGOH を添加した群で検討したところ, NFATc1 の発現回復とともに多核巨細胞の形成を認めた。

このことから GGOH によるゾレドロン酸の効果を回避することにより NFATc1 の発現回復と破骨細胞の形成が誘導されることが明らかになった。

骨代謝阻害薬は癌の骨転移患者以外にリウマチなどの自己免疫疾患患者に対しても多く用いられている。われわれ歯科医師が顎骨壊死の発現を必要以上に恐れる背景には上記のような分子機構が未だ解明されていないことが一因にある。これらの研究成果は骨代謝阻害剤の使用に正しい知見を与え、リウマチや骨粗鬆症、癌の骨転移患者への利益に還元できる可能性がある。

### 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 1 件)

1. Nakagawa T, Ohta K, Kubozono K, Ishida Y, Naruse T, Takechi M, Kamata N. Zoledronate inhibits receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-induced osteoclast differentiation via suppression of expression of nuclear factor of activated T-cell c1 and carbonic anhydrase 2. Arch Oral Biol. 2015 Apr;60(4):557-65. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.09.012.(査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Zoledronate inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation via suppression of expression of NFATc1 and carbonic anhydrase 2  
Takayuki Nakagawa, Kohji Ohta, Kazumi Kubozono, Yoko Ishida, Masaaki Takechi. The Annual Meeting of American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 2014 (Honolulu, HI, USA, September 8-13, 2014)

2. RANKL シグナル経路におけるゾレドロン酸の標的遺伝子の網羅的探索  
中川貴之, 太田耕司, 久保園和美, 石田陽子, 武知正晃, 鎌田伸之。  
: 第 58 回(公社)日本口腔外科学会学術大会 (2013.10.11 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 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

中川 貴之 (Nakagawa Takayuki)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：30456230

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：