

令和元年6月16日現在

機関番号：32404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15323

研究課題名(和文)ビスホスホネート関連顎骨壊死(BRONJ)の病態解明と治療法を探る

研究課題名(英文) Research for the pathophysiological mechanism and therapeutics of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ)

研究代表者

田島 雅道 (TAJIMA, MASAMICHI)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：70130995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨吸収抑制薬ビスホスホネート(BP)は、骨粗鬆症やがんの骨転移に積極的に用いられているが、一部の患者で口腔外科的処置後に予後不良の重篤な顎骨壊死(BRONJ)が発症している。医科と歯科の治療の谷間で苦悩する患者に対し、未だに有効な治療法が見出せていない。本研究はその病態解明と治療法の確立を目的としている。骨芽細胞に障害を与えない臨床濃度のBPが、リン酸水素イオン濃度の増加した環境下ではリン酸トランスポーターの誘導を引き起こし、容易に骨芽細胞内にBPを取り込んでしまい、BPが骨芽細胞のミトコンドリアの機能を強く障害することで細胞毒性を発現することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床濃度のBPは破骨細胞内への選択的な取り込みによって、骨吸収を抑制し治療効果を発現し、低濃度のBPでは骨芽細胞に対しては障害性がほとんど認められない。しかし、リン酸水素イオン濃度の増加などで骨芽細胞のリン酸トランスポーターが誘導されると、これを介してBPの骨芽細胞内取り込みが亢進してしまい、BPがミトコンドリア機能障害を引き起こして、骨芽細胞障害が容易に発生する可能性が示された。そこで、この障害機序を阻害することにより、BRONJ発症の予防と治療に繋がられる可能性がある。BPの治療を継続しながら、基礎疾患の治療に悪影響を与えない局所的なアプローチによる治療法を考案したい。

研究成果の概要(英文)：Bisphosphonates (BP), bone resorption inhibitors, has been actively used in osteoporosis or bone metastasis of cancer. However, BP has induced serious jawbone necrosis (BRONJ) with poor prognosis in some patients after oral surgical treatments. The effective treatment has still not been found for patients suffering in the valley between medical and dental care. The purpose of research is to elucidate its pathophysiological mechanism, and to establish a therapeutic method. My data indicates that low concentration of BP, not toxic in osteoblastic cells, induced cytotoxic effects when hydrogen phosphate anion was increased in osteoblast culture. This environment increased expression of phosphate transporters in osteoblastic cells, and enhanced uptake of BP into osteoblastic cells, resulting in impairment of mitochondria.

研究分野：薬理学

キーワード：ビスホスホネート 顎骨壊死 骨芽細胞障害 リン酸トランスポーター ミトコンドリア オートファジー キレート形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨吸収抑制薬ビスホスホネート(BP)は、骨粗鬆症やがんの骨転移患者に極めて有効な治療薬であり広く用いられているが、一部の患者に口腔外科的処置後に予後不良の重篤な顎骨壊死(BRONJ)が発症している。医科の治療と歯科の治療の谷間で発症している疾患であり、強烈な異臭や膿瘍を伴い、患者は食生活や会話に困難を強いられている(図1)。

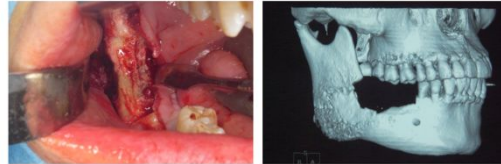


図1 ビスホスホネート(zoledronate)を5年間投与していた前立腺癌患者の抜歯後に発症した顎骨壊死

(2) BRONJ の病態については、口腔内細菌感染や顎骨の特殊性などが影響すると考えられている(米田ら、顎骨壊死検討委員会ポジションペーパー2012・2016)が、詳細は依然として不明であり、有効な治療薬や予防薬は存在しない。抜歯やインプラント等の外科的処置が BRONJ 発症の契機となることから、局所の骨創傷治癒過程での骨芽細胞増殖や血管新生に障害が起きている可能性がある。

2. 研究の目的

(1) この疾患の発生頻度(BP 投与患者全体の 0.001~0.01%であり、がん患者に限定しても 2%以下との報告がある)から考えると、BRONJ の原因として提唱されている口腔内細菌感染や顎骨の特殊性などの多くの人々に共通する要因では決して説明がつかないと考えられる。

(2) 「BRONJ の発症は、BP と同時に特定の共存因子が存在する場合に限って引き起こされる」との作業仮説を立てた。BP の破骨細胞に対する機能抑制作用とは全く異なる機序を考え、骨壊死の作用点として骨(芽)細胞を設定し、BP による骨(芽)細胞障害を増強する因子のスクリーニングを行って、分子レベルでその細胞障害機序を解析することにした。同時に、血管内皮細胞も障害の標的として解析を進めることにした。一方で、これらの細胞障害を抑制できる治療薬・予防薬の候補の検索を行うことも目的とした。この抑制物質の検索には、一刻も早い BRONJ 治療への扉を開くためにも、臨床適用可能な物質を中心にスクリーニングを行う。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞として広く用いられている MC3T3-E1 細胞の培養実験系を中心にして研究を進めた。BP による MC3T3-E1 細胞障害作用は WST-8 測定法によって評価し、細胞障害増強因子のスクリーニングを行った。一方で、BP の細胞内取り込みを可視化するために、蛍光標識化した BP を用いて MC3T3-E1 細胞内に取り込ませ、5%CO₂、37℃ 培養環境下で、細胞内の BP の動態を蛍光顕微鏡下で経時的に観察した。

(2) 細胞内での BP の局在を特定するために、ミトコンドリアやリソソームなどの細胞内小器官を蛍光標識できるプローブとの共染色を行なった。また、骨芽細胞のリン酸トランスポーター SLC20A1 (PiT-1) と SLC20A2 (PiT-2) をそれぞれ免疫染色して、細胞障害増強因子によってその変動を調べた。BP の細胞内取り込み経路を特定するために、リン酸トランスポーターの RNA 干渉法 (siRNA) を用いて、蛍光標識 BP の動態から解析を行った。一方、BP による MC3T3-E1 細胞障害作用の機序を明らかにするために、オートファジーとの関係を詳細に解析した。細胞機能に与える影響を評価する目的で、酸化ストレスで誘発される細胞内活性酸素種 (ROS) の生成反応を、タイムラプスでのライブセルイメージング解析を行った。

(3) 血管新生に重要な役割を担う血管内皮細胞として、微小血管内皮細胞由来の bEnd.3 細胞の培養実験系を用いて、同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) BP による MC3T3-E1 細胞障害作用の強さは、その骨吸収抑制効果と比例していて zoledronate > pamidronate > alendronate で順であった。その化学構造に窒素を有さず、顎骨壊死報告もほとんどない etidronate には、MC3T3-E1 細胞への障害作用は認められなかった。そこで、BP の中でも最も骨吸収抑制効果が強く顎骨壊死の報告が多い zoledronate を中心に、MC3T3-E1 細胞障害作用の解析を行った。

(2) 通常の培地 (α -MEM) よりも β -グリセロリン酸ナトリウムを添加した分化培地に変更すると、BP の MC3T3-E1 細胞障害作用が顕著に増強されることを見出した。当初は骨芽細胞の分化関連因子の中に、zoledronate による骨芽細胞障害を増強する因子があると考えて解析を行っていたが、なかなか進展が得られずにいた。その後、 β -グリセロリ

リン酸ナトリウム等のリン酸化合物自体と zoledronate の共存に重要な相互作用があるのではと仮定して、多種のリン酸化合物と BP の併用効果を調べた。その結果、ピロリン酸ナトリウムやトリリン酸ナトリウムには、BP による細胞障害作用を抑制する効果が見られ、リン酸二水素ナトリウムやリン酸一水素ナトリウムには、BP による細胞障害作用を顕著に増強する作用があることを見出した。この増強作用はβ-グリセロリン酸ナトリウムよりも強力であった。

(3) BP による MC3T3-E1 細胞障害作用が、リン酸一水素ナトリウムの共存で最も増強された(図 2)ことから、リン酸一水素ナトリウムを中心に解析をすることにした。まず、ナトリウム塩自体の関与を調べるために、リン酸一水素ナトリウムとリン酸一水素カリウムの効果を比較したが、全く相違が認められなかったことから、リン酸一水素イオン自体が BP の細胞障害増強因子として重要な役割を果たしていることが判明した。念のためにリン酸二水素ナトリウムとリン酸二水素カリウムでも同様の結果を確認した。

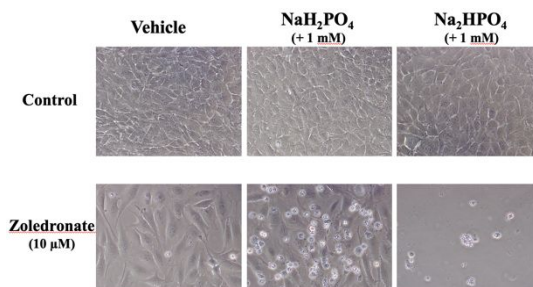


図2 Zoledronate の骨芽細胞障害に対するリン酸ナトリウムの増強効果

(4) MC3T3-E1 細胞障害作用が最も強い zoledronate を中心に解析を行っていたが、他の BP とリン酸水素イオンとの共存効果も確認したところ、pamidronate, alendronate にも同様の結果が得られたことから、リン酸一水素イオンが BP の MC3T3-E1 細胞障害作用をより普遍的に増強する機序が存在していると考えられた。

(5) そこで、リン酸一水素イオンが BP の取り込みに与える影響について解析を行った。蛍光標識化した BP の MC3T3-E1 細胞への取り込みを経時的に追跡したところ、リン酸一水素イオンの共存下で BP が細胞内へ急速に、そして大量に取り込まれることが明らかとなった。

(6) 次に、リン酸化合物の細胞内取り込みに重要な役割を果たしている骨芽細胞のリン酸トランスポーターについて、リン酸一水素イオン存在下での変動を調べることにした。まず初めに、正常状態の骨芽細胞でリン酸トランスポーター PiT-1 と PiT-2 の免疫染色を行い、両リン酸トランスポーターの発現を確認した。リン酸一水素イオンを添加することによって、PiT-1 と PiT-2 のリン酸トランスポーターが両方とも顕著に誘導されることが明らかとなった。念のために、それぞれ蛍光波長の異なる標識で共染色をすることによって、PiT-1 と PiT-2 の細胞膜上での局在が全く異なっていることも確認した。

(7) 次に、BP の細胞内取り込みがこれらのリン酸トランスポーターを介しているのか、また BP の細胞内取り込みが PiT-1 と PiT-2 のどちらかに選択性があるのかどうかについて、PiT-1 と PiT-2 の各 siRNA を用いて、BP の細胞内取り込みへの影響を調べた。その結果、siPiT-1 では BP の細胞内取り込みはほとんど影響されなかったが、siPiT-2 によって BP の細胞内取り込みが顕著に抑制された(図 3)。従って、BP の骨芽細胞内への取り込みは、PiT-2 リン酸トランスポーターを介していることが明らかとなった。骨芽細胞内へのリン酸の取り込みは、骨形成に必須の細胞外基質生成に重要な役割を果たしているために、PiT-1 には影響を与えずに、PiT-2 に選択的な拮抗薬を見出すことができれば、正常な骨形成に影響を与えずに、BP の骨芽細胞内取り込みだけを抑制して、骨壊死を予防できる可能性がある。

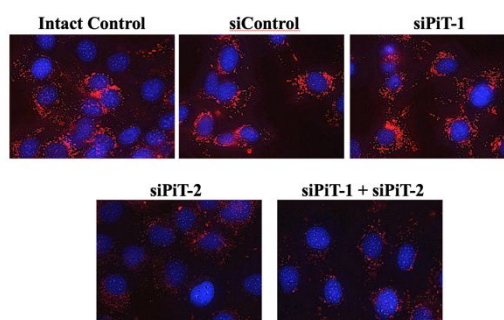


図3 蛍光標識ビスホスホネートの細胞内取り込みに対するのsiRNA影響

(8) 細胞内に取り込まれた BP の局在性を調べることで、細胞障害機序との関連を求めることにした。ミトコンドリアやリソソームなどの細胞内小器官を選択的に標識できる蛍光プローブと共染色を行うことによって、細胞内に取り込まれた BP の局在する場所を追跡したところ、時間経過にともなってリソソームに局在し、しかも長時間にわたり蓄積されることが明らかとなった。

(9) そこで次に、オートファジーとの関係について解析することを計画した。オートフ

オートファジーは細胞内に発生した異常・不要となったタンパク質や小器官などを分解して、アミノ酸として細胞内に供給する細胞内の浄化プロセスの一つであり、細胞が正常な機能を維持するための必要不可欠なシステムである。異常となった小器官やタンパク質を取り囲み、細胞質から隔離するオートファゴソームに選択的に取り込まれて蛍光を発する DAPGreen と、そのオートファゴソームがリソソームと融合して形成されるオートリソソーム内で初めて蛍光を発する DALGreen を用いて、MC3T3-E1 細胞に zoledronate を作用させて蛍光プローブの変動を追跡することにした。それに先立ち、本細胞におけるオートファジーの特性について調べたところ、正常な培養環境においても、ある程度のオートファゴソームとオートリソソームの出現が認められていた。しかし、リソソーム機能を阻害する bafilomycin A1 を処理すると、細胞内に多くのオートリソソームが出現して、やがて細胞死が誘導された。この結果から、常にオートファジーによってオートリソソーム内のタンパク質が円滑に分解されなければ、異常となったオートリソソームが細胞内に多く蓄積されて、細胞は機能障害をきたして細胞死を引き起こすことが示唆される(オートファジーフラックス[流れ]が重要であり、その阻害は細胞死につながる)。蛍光標識化 BP と DAPGreen (DALGreen) の共染色で、細胞内の BP がオートリソソームに局在し、長期間に渡り蓄積されることが確認された。そこで、zoledronate 単独がオートファジーに及ぼす影響を確認したところ、bafilomycin A1 単独よりも軽度のオートリソソームの増加であることが確認された。次に、zoledronate と bafilomycin A1 を併用して調べたところ、bafilomycin A1 単独よりも非常に大量のオートリソソームの蓄積を認め、より強力な細胞死が誘導された。この相乗効果から類推して、zoledronate の作用点は bafilomycin A1 の作用点であるリソソームとは異なる場所に存在すると考えられた。

(10) Zoledronate によるオートファジーフラックスの阻害作用機序を調べるために、ミトコンドリアに焦点を当てて解析を行った。ミトコンドリアに選択的に取り込まれる Mtpagy Dye を用いた Mitophagy Detection Kit によって、ミトコンドリアに依存したオートファジー(マイトファジー)の可能性を検討した。その結果 zoledronate が MC3T3-E1 細胞に顕著なマイトファジーを誘導することが明らかとなった。すなわち、zoledronate がミトコンドリア機能に何らかの異常をもたらしていることが示唆される。

(11) そこで、zoledronate によるミトコンドリア機能の変化について解析を行った。まず、zoledronate のミトコンドリア膜電位に及ぼす影響について JC-1 を用いて調べた。アポトーシス誘導時に認められるミトコンドリア膜電位の低下は、zoledronate によっては引き起こされなかった。次に、酸化ストレスを与えた時に発生するミトコンドリア由来の ROS 生成反応の動態を、タイムラプスモードで解析したところ、正常な MC3T3-E1 細胞では酸化ストレスを加えると、細胞内 ROS 生成が次第に増加する反応を示したが、zoledronate を処理すると、この ROS 生成反応が極端に減弱することが明らかとなった。すなわち、zoledronate によってミトコンドリア機能が障害されていることが判明した。さらに、ミトコンドリアを特異的に染色できる MitoTracker や MitoBright を用いて、ミトコンドリアの形態に及ぼす zoledronate の影響を調べたところ、zoledronate がミトコンドリアの量的な減少を引き起こすことが明らかとなった。

(12) 一方、BP の細胞障害を抑制する物質の検索から、比較的高濃度(10 mM)の L-グルタミン酸と L-アスパラギン酸に軽度の抑制効果があることを見出した。さらに解析を行い、L-体だけでなく D-体にも同様の効果があることを確認した。グルタミン酸受容体との関連性について、拮抗薬を用いて調べたが関与は認められなかった。また、ナトリウム塩とした L-グルタミン酸ナトリウムや L-アスパラギン酸ナトリウムでは抑制効果が全くないことを確認した。また、グルタミン酸やアスパラギン酸の化学構造でアミノ基を失ったグルタル酸やコハク酸にも全く抑制効果がないことを確認した。このグルタミン酸やアスパラギン酸の作用を解析する過程で、リン酸トランスポーターが関与する可能性を考える契機を得た。

(13) BP の内皮細胞障害作用を bEnd.3 細胞を用いて解析したところ、MC3T3-E1 細胞障害作用と同様に zoledronate > pamidronate > alendronate で順であったが、BP による障害作用は MC3T3-E1 細胞と比較して軽度であった。BP による血管内皮細胞障害を増強する因子を検索する中で、グルコース濃度の増加が障害増強因子になることを見出した。さらに、グルコース濃度増加によって細胞内 ROS 生成が顕著に増強されることも明らかにした。しかも、グルコースの酸化代謝物質である 3-デオキシグルコースやメチルグリオキサールによって、この細胞障害が増強されていることを明らかにした。これは血糖上昇がある場合には、創傷治癒過程での血管新生作用を、BP が阻害する要因となる可能性を示唆するものである。

これらの結果から、BP はリン酸トランスポーター(PiT-2)を介して骨芽細胞に取り込まれ、リン酸水素イオン濃度が上昇することで、リン酸トランスポーターの発現量を増

加させ、結果的にBPの骨芽細胞内取り込み量を増加させていることが明らかとなった。そして、細胞内で増加したBPがミトコンドリアの機能を障害し、異常となったミトコンドリアをオートファゴソームが積極的に取り除く現象(マイトファジー)を顕著に促進させている。さらに、オートリソソーム内に蓄積したBPによって、オートリソソーム内での正常なタンパク質分解機能が阻害されたために、細胞死を誘導して骨壊死が引き起こされると考えられる。

現在、BPがミトコンドリア機能を障害する詳細な機序を解析中であり、今まで全く予想していなかった新たな事実が明らかにされつつある。この機序に基づく治療方法は、より選択的であり、局所的なアプローチが可能になることが期待される。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3件)

- (1) 田島雅道, Bisphosphonatesはオートファジーの流れを阻害することで骨芽細胞死を誘導している, 第92回日本薬理学会年会, 大阪, 2019年3月
- (2) Masamichi Tajima and Akihiko Hasegawa, Increase of phosphate enhances the cytotoxicity of osteoblasts by bisphosphonates, 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, 2018.7
- (3) 田島雅道, 坂上宏, Bisphosphonatesはリン酸トランスポーターを介して骨芽細胞に取り込まれる, 第90回日本薬理学会年会, 長崎, 2017年3月

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 田草川 徹

ローマ字氏名: (TAKUSAGAWA, tooru)

所属研究機関名: 明海大学

部局名: 歯学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 40538443

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。