

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20556

研究課題名(和文) 感染によるBRONJ発症促進メカニズムの解明：リン酸トランスポーターの役割

研究課題名(英文) The mechanism of BRONJ development by inflammation: The role of phosphate transporters.

研究代表者

木山 朋美 (Kiyama, Tomomi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40756011

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)：本研究の目的は、ビスホスホネート(BP)の細胞内取り込み機序の同定、および感染による顎骨壊死発症促進機序の解明から、BP関連顎骨壊死(BRONJ)の発症機序の根本的解明・治療法の確立へと発展させることであった。細胞内取り込み機序として、リン酸トランスポーターのひとつであるSLC34が関与していること、また、この機序は感染により増強されることが明らかとなった。このことから、SLC34をターゲットとしたBRONJ治療法が可能となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to investigate the pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ), by elucidating the mechanism of bisphosphonate's cellular uptake, and the interrelationship between the transport mechanism and the inflammation. As the results, phosphate transporter SLC34 may be associated with the bisphosphonate's cellular uptake and the transporter is increased with inflammation. Therefore, there is the possibility that the inhibitor of phosphate transporter SLC34 can be useful for the treatment or prevention of BRONJ development.

研究分野：口腔免疫学

キーワード：ビスホスホネート トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

窒素含有ビスホスホネート(N-BP)は破骨細胞を標的とした強力な骨吸収抑制薬であり、骨粗鬆症・癌性骨転移等に広く応用されている。しかし以前から副作用として報告されていた全身的な炎症に加え、抜歯等の口腔外科処置に付随したビスホスホネート関連顎骨壊死(BRONJ)の発症が2003年に初めて報告され、現在もなお発症が拡大している。現在、BRONJの発症機序として、「顎骨の骨代謝回転異常、血管新生不全、感染による増悪化」が考えられているが、いずれも臨床報告等に留まっており、顎骨壊死発症機序の全容解明および臨床応用のためのエビデンス構築には至っていない。

さらに、N-BPは骨ハイドロキシアパタイトおよび炎症部位に強く集積し、長期投与で骨に蓄積するため、現在は無症状のN-BP投与患者においても今後、抜歯のみならず歯周疾患、歯科インプラント周囲炎など口腔内慢性炎症を契機とした多くのBRONJ発症が危惧される。したがって、BRONJ発症機序の解明に基づいたN-BP製剤投与指針の策定が喫緊の課題となっている。

## 2. 研究の目的

上述のようにBRONJ発症の機序は不明であるが、現在、歯周疾患等による細菌感染がリスク因子であること、N-BPは細胞に取り込まれて毒性を発揮することは知られている。しかし、N-BPが顎骨壊死を誘導する機序の詳細は未だ不明である。そこで本研究では、感染との複合による顎骨壊死発症促進機序、細胞内取り込み機構の解明、細胞膜インターフェイスにおけるN-BPの分子標的の同定、を目指す。これにより、対症療法に終始しているN-BP誘導性顎骨壊死における根本的治療法の確立に向けて、N-BPの細胞内取り込みをターゲットとした新規予防・治療法開発への学術的基盤を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、BRONJ治療法の確立の学術的基盤を構築することを目的に、以下を検討する。

### (1) 感染による顎骨壊死発症促進機序の解明

感染がBRONJの促進因子であることを検討するため、以下を検討する。

Lipopolysaccharide(LPS)の炎症促進作用におけるマウスin vivoでの局所的評価

既に行った実験において、LPSはN-BPのもつ全身的な炎症作用を増悪させるという結果を得ている。しかし、BRONJ発症部位は、「骨に蓄積したN-BPの遊離による、高濃度N-BP」および歯周病細菌等の存在という、非常に局所的で、特徴的な環境である。そこで、血管および血管内皮細胞の豊富な組織であ

るマウス耳介を用いて、N-BPとLPSの局所的な炎症作用を、マウス耳介炎症所見(面積)および炎症性サイトカインを指標に検討し、その相互作用を評価する。現在すでに先行実験を行っており、良好な結果を得ている。

LPSによるリン酸トランスポーターの機能亢進および発現増加に関する検討

現在行っている予備実験において、LPSがN-BPの血管内皮細胞及び顎骨周囲軟組織細胞への取り込みを増加させる結果を得ている。したがって、LPSはリン酸トランスポーターの機能亢進または、発現増加の効果を持つ可能性がある。これらをPCR、ウエスタンブロッティング法を用いて、検討する。

### (2) N-BPの細胞内取り込みに関与するリン酸トランスポーターの特定

現在、口腔内の組織及び細胞に発現する既知のリン酸トランスポーターとして、SLC20a1、SLC20a2、SLC34a1、SLC34a2、SLC34a3の5種類が明らかになっている。このうち、単一または複数のトランスポーターが関与する可能性がある。以下、これを特定する。

血管内皮細胞から、候補となるSLC遺伝子を候補となるSLCトランスポーター遺伝子ノックダウン細胞株における、N-BPの細胞毒性とradio-isotope標識N-BPの取り込み量の評価

siRNAを用いて除去し、N-BPの細胞毒性への影響、および、radio-isotope標識N-BPの取込みに対する効果を調べ、リン酸トランスポーターを特定する。

特定遺伝子発現リポゾームを用いたN-BP取り込み量の評価

岡山大学の森山らはリポゾーム(リン脂質で作成した微小粒子)に遺伝子クローニング技術で作成・精製した種々のリン酸トランスポーター分子を組み込み、遺伝子発現リポゾームを作製し、特定のトランスポーターにおける薬剤の取り込みを観察できる、非常に単純化した実験系を確立している。(Sawada, Moriyama et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2008)この実験系を用いて、N-BPの取り込みに対する効果を調べ、候補となるリン酸トランスポーターを特定する。

候補となるSLCトランスポーター遺伝子のノックアウト(KO)マウス、または、コンディショナルノックアウト(CKO)マウスにおける、BRONJ発症率・血管障害状態の評価

5種類のリン酸トランスポーターのうち、SLC34の3種類のアイソフォームにおいて、KOマウスが存在する。また、他の2種類においても血管内皮細胞をターゲットとしたCKOマウスが作成可能である。マウスBRONJモデル(Mawardi et al. J Dent Res. 2011)を用い

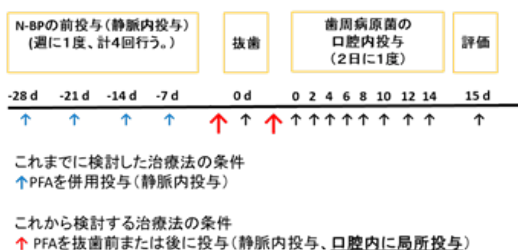
て、上記の実験で候補となったリン酸トランスポーターの KO (または CKO) マウスにおける BRONJ 発症率を、ワイルドタイプマウスと比較する。また、抜歯周囲部位における、血管内皮細胞と候補となるリン酸トランスポーターの発現を免疫染色にて観察する。さらに、Vascular Corrosion Casting System (Krucker et al. Microsc Res Tech. 2006) を用いて、レジン材料をマウス BRONJ モデル全身的に還流させ、MicroCT にて解析し、抜歯部位周囲の血管障害状評価する。

### (3) BRONJ 予防・治療法確立のための条件検討

これまでに行った実験において、N-BP とリン酸トランスポーター阻害剤の phosphonoformic acid (PFA) を静脈内投与にて併用投与した結果、BRONJ 発症率が N-BP 単独投与に比べて非常に有意に低いという結果を得ていた。(N-BP 単独投与：95%、N-BP と PFA の単独投与：33%) しかし、現在すでに、N-BP を投与されている患者は非常に多いため、この治療法の条件では、そのような患者に応用することはできない。したがって、以下の条件における PFA の BRONJ 発症に対する効果を検討する。

抜歯前に PFA を静脈内投与、または、口腔内に局所投与。

抜歯後に PFA を静脈内投与、または、口腔内に局所投与。



## 4. 研究成果

### (1) 感染による顎骨壊死発症促進機序の解明

LPS の炎症促進作用におけるマウス in vivo での局所的評価

グラム陰性菌細胞壁成分の LPS と N-BP との相互作用を評価した。まず、血管及び血管内皮細胞が豊富な組織であるマウス耳介を用いて検討を行ったところ、LPS はマウス耳介における N-BP の炎症作用を増悪させ、その際の炎症面積は有意に上昇した。

LPS によるリン酸トランスポーターの機能亢進および発現増加に関する検討

上述のマウス耳介において、N-BP および LPS によるリン酸トランスポーター (SLC20a1, SLC20a2, SLC34a1) の発現上昇がみられた。

さらに、マウス血管内皮細胞において、N-BP の細胞毒性、およびリン酸トランスポーターの発現に対する LPS の影響も検討した。その結果、LPS は N-BP の細胞毒性を増強させ、リン酸トランスポーター (SLC20a1, SLC20a2, SLC34a1) の発現を有意に上昇させた。

これらの結果から、LPS は血管内皮細胞に発現するリン酸トランスポーターの発現を上昇させ、血管内皮細胞に対する細胞毒性を増強させることで、顎骨壊死発症を促進する可能性が示唆された。この結果は、臨床報告にとどまっている、リスク因子としての「歯周疾患等による細菌感染」を科学的に支持する重要な結果だと思われる。

### (2) N-BP の細胞内取り込みに関与するリン酸トランスポーターの特定

候補となる SLC トランスポーター遺伝子ノックダウン細胞株における、N-BP の細胞毒性と radio-isotope 標識 N-BP の取り込み量の評価

血管内皮細胞から、SLC34 遺伝子を siRNA により除去し、N-BP の細胞毒性と radio-isotope 標識 N-BP の取り込み量の評価を行った。その結果、siRNA 処理されていない血管内皮細胞に比べ、SLC34a1 遺伝子ノックダウン細胞株では、細胞毒性が減少し、radio-isotope 標識 N-BP の細胞取り込み量も減少した。

候補となる SLC トランスポーター遺伝子のノックアウト (KO) マウス、または、コンディショナルノックアウト (CKO) マウスにおける、BRONJ 発症率・血管障害状態の評価

SLC20 および 34 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを用いて、マウス BRONJ モデルにおける BRONJ 発症率および抜歯部位周囲の血管傷害状態の評価を行った。その結果、SLC34 コンディショナルノックアウトマウスでは、野生型に比べ、血管傷害の抑制がみられた。

### (3) BRONJ 予防・治療法確立のための条件検討

すでに N-BP を投与されている患者に対し、リン酸トランスポーター阻害剤 (PFA) を用いることを想定し、以下の実験を行った。(プロトコールについては、(3) 研究方法を参照) N-BP を静脈内投与された野生型マウスにおいて、第一大臼歯抜歯前および抜歯後に PFA を口腔内局所投与した。その結果、抜歯前に PFA を投与した群において、BRONJ 発症率が有意に減少した。現在、N-BP を既に投与されている患者において、今後さらなる BRONJ 発症が見込まれるため、この結果は新規治療法への開発に大きく寄与すると考えられる。

<引用文献>

- 1 . A role of oral bacteria in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. Mawardi H, Giro G, Kajiya M, Ohta K, Almazrooa S, Alshwaimi E, Woo SB, Nishimura I, Kawai T. *Journal of Dental Research*. 2011 Nov;90(11):1339-45
- 2 . Identification of a vesicular nucleotide transporter. Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Apr 15;105(15):5683-6.
- 3 . New polyurethane-based material for vascular corrosion casting with improved physical and imaging characteristics. Krucker T1, Lang A, Meyer EP. *Microscopy Research and Technique*. 2006 Feb;69(2):138-47.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Kiyama T, Tsuchiya M, Okada S, Oizumi T, Yamaguchi K, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y.、Phosphonocarboxylates Can Protect Mice against the Inflammatory and Necrotic Side Effects of Nitrogen-Containing Bisphosphonates by Inhibiting Their Entry into Cells via Phosphate Transporters.、Biological and Pharmaceutical Bulletin.、査読有り、39 巻、2016 年、712-20、doi: 10.1248/bpb.b15-00770.  
Kiyama T, Egashira K, Kim JY, Villa A, Sasaki H, Woo SB, Kawai T.、Possible pathogenic engagement of soluble Semaphorin 4D produced by T cells in medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ).、Biochemical and Biophysical Research Communications.、査読有り、480 巻、2016 年、42-47、doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.012.

[学会発表](計 1件)

木山朋美、リン酸トランスポーター阻害剤による BRONJ 発症抑制機序の解明、第 125 回日本補綴歯科学会学術大会、2016 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木山 朋美 (KIYAMA, Tomomi)  
東北大学 歯学研究科・助教  
研究者番号：40756011

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

河井 俊久 (KAWAI, Toshihisa)