

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20626

研究課題名(和文) ストレスタンパク質を介するビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死の病態解明

研究課題名(英文) Clarification of developmental mechanism of the Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw undergoing stress protein

研究代表者

定岡 直 (Sadaoka, Sunao)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80549395

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)：細菌感染時にリスクが高まる骨吸収抑制剤関連顎骨壊死(MRONJ)の発症機序解明への着手に際し、骨代謝や骨関連細胞上に発現するNF- κ B(receptor activator of nuclear factor B)が、破骨細胞の分化および骨吸収の促進に重要な役割を果たすことに注目した。ストレスタンパク質として近年注目される一方でNF- κ Bの活動を調整するとされるクロモグラニンA(Chromogranin A:ChgA)の発現機構の解析を行った。細菌感染時に骨吸収抑制剤を使用した場合骨関連細胞では高いChgA遺伝子の発現が確認された。

研究成果の概要(英文)：The developmental mechanism of ARONJ/BRONJ (Anti-resorptive agents-related osteonecrosis of the jaw/Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw) is still unknown. It is suspected that osteoclasts do not resorb old bone, and oral bacterial infection will be coerced. NF- κ B is thought to play an important role in promotion of the differentiation of osteoclasts and the resorption of bone. We thought that the onset inhibition by MRONJ had to balance absorption of necrotic bone formation by NF- κ B. It is said that ChgA regulates NF- κ B. ChgA acts on scavenger receptor (SR-A) and causes iNOS production through NF- κ B. We search the oxidative stress cascade which causes MRONJ by LPS and medicine becoming unbalance of the bone remodeling through ChgA. When we used LPS and Denosmab compositely, 3T3-E1 and the ChgA expression on RAW264.7 cells increased. Expression was increased in particular on the 3T3-E1 cells

研究分野：口腔衛生学

キーワード：薬剤関連顎骨壊死 クロモグラニンA ビスフォスフォネート デノスマブ

1. 研究開始当初の背景

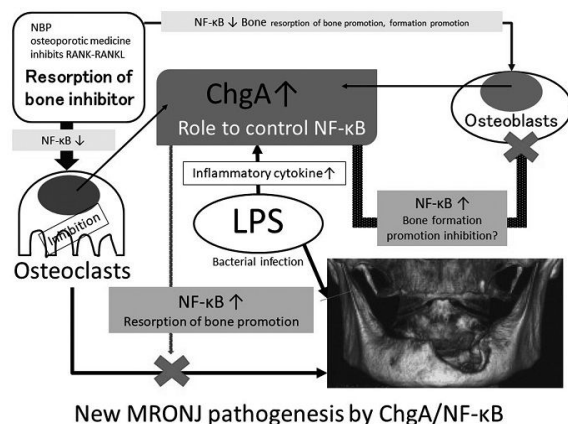
- (1) ビスフォスフォネート製剤(BPs)をはじめとする骨吸収抑制剤は骨を吸収する役目を持つ破骨細胞の機能抑制により骨吸収を抑制することから、ページェット病や高カルシウム血症、悪性腫瘍の骨転移防止および骨粗鬆症による骨折予防の目的で臨床応用されている。近年、歯科治療時に発症する薬剤関連顎骨壊死 (Medication-related Osteonecrosis of the Jaw : MRONJ) が臨床的に注目されている。
- (2) 破骨細胞の分化は前駆細胞に発現する NF- κ B 活性化受容体 (receptor activator of nuclear factor-kappa B ; RANK)と骨芽細胞に発現する NF- κ B 活性化受容体リガンド (receptor activator of nuclear factor κ B ligand ; RANKL) の関係の維持が必要である。2013 年に RANK-RANKL を特異的に阻害する骨粗鬆症薬が認可され、改めてこの機構が着目されている。NF- κ B が、破骨細胞の分化および骨吸収の促進に重要な役割を果たすことから破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞に発現する NF- κ B をコントロールすることで新生骨の形成促進過剰骨の吸収を両立する必要がある。

2. 研究の目的

- (1) MRONJ の発症阻止は NF- κ B による骨形成と過剰骨の吸収を両立する必要があると考えた。NF- κ B を調節する因子を同定することが重要となる。そこで NF- κ B の活動を調整し、酸化ストレスの生体マーカーであるクロモグラニン A(Chromogranin A:ChgA)に着目した。生体がストレスを受けると、交感神経-副腎髄質系と視床下部-副腎皮質系の活動が高まり、カテコールアミンとコルチゾールが分泌される。一方、ChgA は、副腎髄質をはじめとする内分泌細胞や神経

細胞等がストレスにตอบสนองして分泌する糖タンパク質である。近年 ChgA が唾液腺から放出されることが示され、実際に唾液中の ChgA 値は歯科診療時にストレスを受けた患者で高いことや歯周疾患の重症度と相関する ChgA は酸化ストレスの新しい指標として注目されている。

- (2) Chg ファミリーが NF- κ B pathway に関与し特に ChgA はスカベンジャー受容体 (SR-A)に作用し、NF- κ B を介して iNOS 産生を引き起こす ChgA はスカベンジャー受容体 SR-A を介して NF- κ B/iNOS 活性作用を発現するとされる。*P.gingivalis* 由来 LPS ChgA NF- κ B/iNOS 骨リモデリングのアンバランス化/炎症性サイトカイン産生 MRONJ という酸化ストレスカスケードを想定し仮説を立てた。



3. 研究の方法

- (1) 骨芽細胞と破骨細胞における ChgA/NF- κ B 活性機構の解析

マウス骨芽細胞株 : MC3T3 - E1 細胞とマウス由来マクロファージ様細胞 : RAW264.7 細胞を用いる。マウス骨芽細胞株 : MC3T3 - E1 細胞とマウス由来マクロファージ様細胞 : RAW264.7 細胞 (DS Pharma Biomedical) を用いた。

MC3T3-E1 細胞は α -MEM 培養液中に 10cm dish に播きサブコンフルエント状態にした。細胞をすべて剥がし、1,000cells

/96well-plate に播き直し一昼夜培養した。RAW264.7 細胞は D-MEM 培養液で Hydrocell 10cm dish(cellseed) を使用し 48h 培養した。

回収後 1000cells/96well-plate になるようにまき直し一昼夜培養した。

(2) 骨芽細胞/破骨細胞の ChgA 遺伝子発現誘導機構の解析

MC3T3-E1/RAW264.7 細胞は共に 24 時間 *P.gingivalis* 由来 Lipopolysaccharide 処理、骨吸収抑制剤処理、LPS+骨吸収抑制剤複合処理を 24h。骨吸収抑制剤として Pralidoxime(Denosumab; Daiichisankyo) と Bonalton(Alendronate; TEIJINPharma), Bonviva(Ibandronic acid; Chugai) を使用した。LPS は *P.gingivalis* 由来 (LPS-PG; INVIVOGEN) を使用した。ChgA 遺伝子の発現量を Taqman Gene Expression (ChgAMm00514341_m1; Cell-to-CT 1-Step TaqMan Kit; ThermoFischer) を使用し CT 法で行った。

(3) 骨関連細胞の ChgA/NF- κ B 活性の分析

LPS 処理したマウス骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞とマウス RAW264.7 細胞を用い、ChgA による NF- κ B 産生機構をシグナル伝達解析より明らかにする。ChgA siRNA(On-Target plus Smart pool; GE healthcare Japan) を 25nmol で 48h トランスフェクトした細胞を準備し比較。NF- κ Bp65(Total/Phospho)ELISA-Kit (Thermo Fisher) を使用しリン酸化された NF- κ B 発現量を測定した。MC-3T3E1 細胞と RAW 細胞 LPS&骨吸収抑制剤による処理を行い LPS 単独投与と LPS+骨吸収抑制剤複合投与時における ChgA 遺伝子発現量を RT-PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) MC3T3-E1/RAW264.7 は対照と比較し LPS や骨粗鬆症治療薬単独処理時そして複合処理時に ChgA 遺伝子の発現上昇が

確認された。MC3t3-E1 では BPs/RANKL 阻害薬処理時には LPS との複合投与処理時に ChgA 遺伝子の発現増強が確認された (Fig. 1)。RAW264.7 においても同様の結果が確認された。しかし複合投与処理による増強傾向は MC3T3-E1 と比較すると小さい (Fig.2)。

Fig. 1

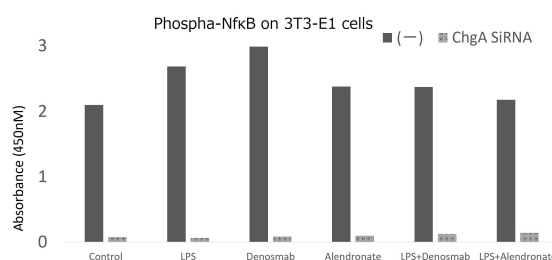
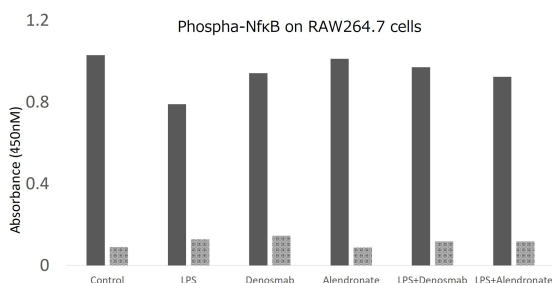


Fig.2



(2) iNOS 産生の指標となる NF- κ B p65 のリン酸化産生量は BPs 処理時には明確な有意差は確認できなかった。一方で抗 RANKL 製剤処理を施した MC3T3-E1 細胞で特に iNOS 発現増強が確認された (Fig.3)。一方で ChgA Si-RNA によるノックアウト処理を施した際には MC3T3-E1/RAW264.7 共に著しく iNOS 発現が抑制された (Fig.4)。RAW264.7 細胞では LPS/RANKL 阻害薬による処理を行うと iNOS 発現量が上昇しており ChgA による NF- κ B/iNOS 発現調整による酸化ストレスカスケードが確認された。

Fig.3

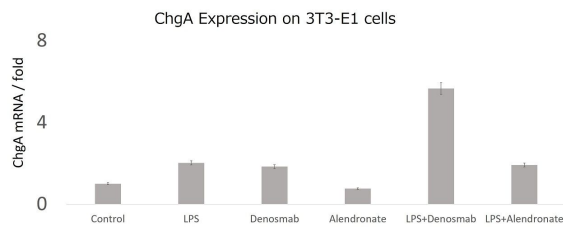
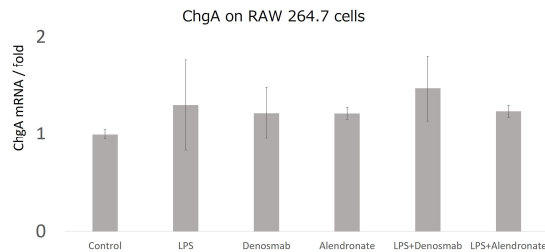


Fig.4



5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

Sunao Sadaoka, Kimitoshi Yagami.

Expression of stress-related protein of bone associated cells with the resorption of bone inhibitor administration. The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology 2017.

定岡 直, 薦田 智, 内川 竜太郎, 川原 一郎, 富田 美穂子, 土屋 総一郎 八上 公利. 間葉系幹細胞におけるクロモグラニン A の発現と動態について. 第 66 回日本口腔衛生学会 2017.

Sunao Sadaoka, Kimitoshi Yagami, Ichiro Kawahara. Expression and role of chromogranin A in mesenchymal stem cells. The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology 2016.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

定岡 直 (Sadaoka, Sunao)

松本歯科大学 歯学部 助教