

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17111

研究課題名(和文) BRONJ発症におけるリン酸トランスポーターの役割と治療標的としての可能性

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

研究代表者

木山 朋美 (Kiyama, Tomomi)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：40756011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、BRONJの発症機序の解明、さらには予防・治療法の確立を目指す為、細菌感染による炎症が細胞膜インターフェイスに与える影響及び、ビスホスホネートが抜歯後の抜歯窩治癒過程に与える影響の解明を試みた。検討の結果、細胞内取り込み機構としてリン酸トランスポーターの1つであるSLC34が関与し、この機構がグラム陰性菌LPSにより増強され、細胞毒性の増強につながり、顎骨壊死発症を促進されることが示された。また、抜歯窩治癒過程の比較的初期である肉芽組織期において血管障害が多くみられること、さらに、前述のSLC34の阻害剤の抜歯前投与を行うことで、BRONJ発症の抑制効果があることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究の研究結果により、現在すでにビスホスホネート製剤を投与されている患者に対しても、リン酸トランスポーター阻害剤の投与により、抜歯に付随して発症するBRONJを抑制できる可能性が示唆された。超高齢化に伴い、骨粗しょう症患者は増加しているため、ビスホスホネート製剤投与患者も増加している。そのため、本研究で得られた知見は、未だ確立していないBRONJの予防・治療方法の確立に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to investigate the pathogenesis of BRONJ, by elucidating the effect of inflammation on bisphosphonate's cellular uptake, and the effect of bisphosphonate's cytotoxicity on healing process after tooth extraction. As the results, phosphate transporter SLC34 may be associated with the bisphosphonate's cellular uptake and the transporter is increased with inflammation. Moreover, pre-administration of SLC 34 inhibitor suppress the BRONJ occurrence in vivo experiment. As to the effect of extraction site healing, granulation stage to angiogenic stage are the most affected.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ビスホスホネート 顎骨壊死 トランスポーター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

室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抜歯後治癒不全、続いて発症する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、感染の複合による増悪」が考えられているが、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する多くの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、予防・治療法の確立が喫緊の課題となっていた。

この課題に関し、我々はBRONJ発症機序に関し、以下の結果を報告していた。

(1) 感染がBRONJ発症に大きく関与する。

細菌感染とN-BPとの関係において、細菌成分のLPSおよびこれによって誘導される炎症性サイトカインが炎症を惹起する、いわゆるサイトカインオシレーションと、N-BP自体の全身的・局所的炎症作用とが相互に増強しあう。

(2) N-BPは細胞膜輸送機構であるリン酸トランスポーターを介して各細胞内に取り込まれ、アポトーシスを誘導する。

N-BPは破骨細胞だけではなく、乳がん細胞、前立腺がん細胞、ケラチノサイト、歯肉線維芽細胞、血管内皮細胞等で細胞毒性を示す。この毒性は、N-BPが細胞内に取り込まれ、コレステロール合成経路内のFarnesyl pyrophosphate合成酵素を阻害し、細胞にアポトーシスを誘導することに起因する。また、その取り込み機構として、リン酸トランスポーター(細胞膜輸送機構)のひとつであるSLC34a1がN-BPの細胞内取り込みに関与する。さらに、共同研究者の河井教授らが考案したマウスBRONJモデル(Mawardi et al. J Dent Res. 2011)を用いた検証において、SLC34a1阻害剤(Phosphonoformic acid, PFA)がBRONJの発症を抑制したことから、BRONJの発症は破骨細胞のみならず、血管内皮細胞など創傷治癒に必須の細胞の機能抑制を介している可能性がある。

これらの結果から、N-BP投与患者におけるBRONJは、#1細菌感染による炎症とそれに引き続くサイトカイン反応に脆弱性を示すこと、#2血管内皮細胞膜に発現するSLC34a1を介した創傷治癒不全に起因する細胞膜インターフェイス疾患であることが示唆される。しかしながら細菌感染による炎症が細胞膜インターフェイスに与える影響、N-BPが抜歯後の抜歯窩治癒過程に与える影響に関して、その本態に迫ることができていないのが現状であった。

### 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究においては、(1)細菌感染による炎症が細胞膜インターフェイスに与える影響、(2)N-BPが抜歯後の抜歯窩治癒過程に与える影響、の解明を試みることにより、BRONJの発症機序を解明し、さらに予防・治療法の確立を目指すことを目的としていた。

### 3. 研究の方法

本研究では、BRONJの発症機序、および治療法の確立を目的に、以下を検討した。

(1) N-BP投与と感染の複合による顎骨壊死発症促進の機序の解明

感染による炎症が細胞膜インターフェイスに与える影響を以下のように検討。

予備実験において、細菌成分LPSがN-BPの血管内皮細胞への取り込みを増加させる結果を得ていた。したがって、LPSはSLC34a1の機能亢進または、発現増加の効果を持ち、顎骨壊死発症を促進させる可能性がある。これらをPCR、Western Blotting法を用いて、検討。

(2) N-BPが抜歯窩治癒過程に与える影響の解明

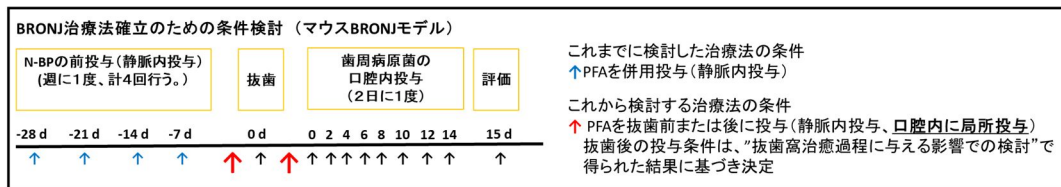
前述のマウスBRONJモデル6を用い、N-BPが抜歯窩治癒過程に与える影響を、N-BP非投与群と比較し、検討。

抜歯窩治癒過程は、マウスにおいて、一般的に、血餅期(抜歯後1日目) 肉芽組織期(抜歯後3~5日目) 仮骨期(抜歯後7~14日目) 治癒期(抜歯後21日目以降)の大きく4段階に分類される。各期における、抜歯窩の組織学的観察、抜歯窩オートラジオグラムによる各種細胞動態・分化の観察、血管障害状態の評価(Vascular Corrosion Casting System、Intravital Imaging)を行う。

(3) BRONJ予防・治療法確立のための条件検討

これまでマウスBRONJモデル(Mawardi et al. J Dent Res. 2011)を用いた検証で、N-BPとSLC34a1阻害剤の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た。(N-BP単独投与: 95%、N-BPとPFAの併用投与: 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く、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。そこで、本研究ではマウスBRONJモデルを用いて、PFAの静脈内投与を抜歯前、または抜歯後に行い、BRONJ発症に対する効果を検討する。また、抜歯後のPFA投与条件については、上述の『抜歯窩治癒過程に与える影響での検討』で得られた結果に基づき決定する。(下記図参照)この条件は、実際歯科治療を行う際に、非常に臨床的な要求に即しているといえる。

以上より、『感染による顎骨壊死発症促進機序、N-BP が抜歯窩治癒過程に与える影響』を検証し、N-BP の血管内皮細胞内取り込み阻害をターゲットとした新規治療法への最適化を行う。



#### 4. 研究成果

##### (1) N-BP 投与と感染の複合による顎骨壊死発症促進の機序の解明

グラム陰性菌細胞壁成分の LPS が血管内皮細胞における SLC34a1 を有意に発現増加させる結果を得た。これにより、LPS は血管内皮細胞に発現する SLC34a1 における発言を上昇させ、同細胞に対する細胞毒性を増強させ、顎骨壊死発症を促進させる可能性が示唆された。

##### (2) N-BP が抜歯窩治癒過程に与える影響の解明

抜歯窩治癒過程は、血餅期、肉芽組織期、仮骨期、治癒期の4段階で分類される。その結果、Vascular Corrosion Casting System を用いた検討において、N-BP 投与群は、N-BP 非投与群に比べ、比較的初期の治癒過程である肉芽組織期において、血管障害が多く見られた。

##### (3) BRONJ 予防・治療法確立のための条件検討

前年度までの研究において、N-BP とリン酸トランスポーター阻害剤を静脈内投与にて併用投与した結果、BRONJ 発症率が N-BP 単独投与に比べて有意に低いという結果を既に得ていた。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が不可能である。そのため、本年度は、マウス BRONJ モデルを用いて、リン酸トランスポーター阻害剤の投与を抜歯前、または抜歯後に行い、BRONJ 発症に対する効果を検討した。その結果、BRONJ 発症率は、抜歯前・抜歯後投与群どちらにおいても N-BP 単独投与群と比べ有意に低く、またさらに、抜歯前投与群においてより顕著であった。これにより、すでに N-BP 投与が行われている患者に対しても、リン酸トランスポーター阻害剤の投与を抜歯前に行うことで、BRONJ 発症の抑制の可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Endo Y, Funayama H, Yamaguchi K, Monma Y, Yu Z, Deng X, Oizumi T, Shikama Y, Tanaka Y, Okada S, Kim S, Kiyama T, Bando K, Shima K, Suzuki , Takahashi T	4. 巻 140
2. 論文標題 Basic Studies on the Mechanism, Prevention, and Treatment of Osteonecrosis of the Jaw Induced by Bisphosphonates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 63-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.19-00125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki, H., Bando, K., Tada, H., Kiyama, T., Oizumi, T., Funayama, H., Sugawara, S., Takahashi, T., Endo, Y.	4. 巻 42
2. 論文標題 Augmentation of Lipopolysaccharide-Induced Production of IL-1 and IL-1 in Mice Given Intravenous Zoledronate (a Nitrogen-Containing Bisphosphonate) and Its Prevention by Clodronate (a Non-nitrogen-containing Bisphosphonate).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 164-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河井 俊久  (Kawai Toshihisa)		