

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10301

研究課題名(和文) 顎骨の細胞老化標的療法による高齢者の顎骨フレイル予防戦略についての研究

研究課題名(英文) A study on preventing the fragility of jaw bone of elderly persons by targeting the cellular senescence of bone cells.

研究代表者

池邊 哲郎 (Ikebe, Tetsuro)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：20202913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 高齢者の顎骨フレイルを制御するため顎骨壊死をモデルとして、破骨細胞の細胞老化を解析した。破骨細胞をゾレドロン酸で処理することによって細胞老化(p16Ink4aの発現)が生じたが、その分子機序としてRANKの共役分子ITAM(DAP12とFcR)によるカルシウム振動の周波数変化とファルネシルニリン酸合成酵素(FDPS)の抑制によるCl-トランスポーターCIC-7の抑制による骨吸収部における酸性化低下が関わっていた。特にFDPSの低下は高齢マウスで著しく細胞老化と相関することから、メバロン酸経路におけるFDPSの下流分子を投与することによって顎骨フレイルの予防法できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の顎骨は細胞老化によって骨代謝(骨ターンオーバー)が減弱していることが考えられ、薬物など外部因子の影響によって機能低下し、顎骨フレイルに陥りやすい。特に、骨芽細胞よりも破骨細胞の細胞老化、破骨細胞の前駆細胞である骨髄細胞の細胞老化が著しいことが考えられた。従って骨吸収抑制薬の影響も受けやすく顎骨壊死リスクが高いと言える。本研究結果では破骨細胞の細胞老化による顎骨フレイルに関与する分子としてCl-トランスポーターとファルネシルニリン酸合成酵素(FDPS)を見出したため、特にFDPS作用をリカバーするゲラニルゲラニオールが顎骨フレイルの予防に貢献できるかもしれないことを示した。

研究成果の概要(英文)： In order to regulate the fragility of jaw bone of elderly persons, I focused the cellular senescence of osteoclasts in terms of anti-resorptive agents-related osteonecrosis of the jaw (ARONJ). The treatments with zoledronic acid induced cellular senescence in osteoclasts. This study demonstrated that zoledronic acid-induced cellular senescence of osteoclasts seemed to be associated with intracellular calcium oscillation which is connected with ITAM (DAP12 and FcR) adaptor signaling downstream of RANK. Likely, zoledronic acid downregulated the expression of farnesyl diphosphate synthase (FDPS) which was related to the CIC-7 Cl- transporter extrusion activity involved in the HCl extrusion, acidification on bone surface during osteoclastic bone resorption. These results suggest that a downstream molecule of FDPS, geranylgeraniol, may inhibit the cellular senescence of osteoclasts, the fragility of jaw bone of elderly persons.

研究分野：口腔外科学

キーワード：破骨細胞 細胞老化 顎骨壊死 顎骨老化 ビスホスホネート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会において、高齢者の豊かな食生活を維持するためには、口腔機能の根幹となる健康な顎骨を維持することが肝要であり、それが健康寿命に繋がるであろう。そのために高齢者の顎骨脆弱化の分子的原因を理解し、顎骨を強化する方法を考える必要がある。組織・臓器の機能低下やそれに伴う老化疾患の原因の1つに、「細胞老化」した細胞の増加・蓄積があると考えられている。「細胞老化」とは、活性酸素などが誘因となって生じる細胞生物学的な反応で、細胞周期が不可逆的に停止するが、代謝活動は存在しアポトーシスできないまま長く生存する。老化細胞には SASP と呼ばれる分泌機能があり、炎症性サイトカインやプロテアーゼが分泌されて周囲に組織傷害を招く。顎骨フレイルにも細胞老化が関係している可能性がある。

近年、様々な難治性の慢性疾患に対して新規薬剤が開発されているが、思わぬ有害事象が発生することが報告されている。その中でも、新規骨吸収抑制薬ビスホスホネートが誘因の1つと考えられる顎骨壊死は、その難治性ゆえに患者のみならず医療者も悩ませる深刻な問題である。なぜ高齢者の顎骨にこのような難治性疾患が生じるのか、多くの疑問が依然として解決されていない。老化した顎骨の性質について、分子生物学的な解析は少ない。そこで高齢者顎骨壊死の病因として顎骨細胞老化、特に破骨細胞老化を仮定し、顎骨脆弱化の分子の基盤を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、骨吸収抑制薬ビスホスホネートの細胞老化への作用を調べるために、(1)ビスホスホネートが破骨細胞の細胞老化を誘導するか否か、(2)細胞老化によって破骨細胞の骨吸収活性の変化が生じるか否か、(3)破骨細胞の細胞老化によって影響される分子は何か、(4)細胞老化によって衰えた破骨細胞の機能を回復させる分子は何か、について、高齢マウスと若年マウス、およびその細胞と顎骨壊死モデルマウスを比較することによって、顎骨フレイルの予防法を見出すことが目的である。

3. 研究の方法

・RAW 264.7 mouse macrophage cell line を培養し RANKL で刺激することによって破骨細胞を分化誘導する。

・カテプシン K のプロモーターを FDPS 遺伝子の下流に組み込み破骨細胞に分化すると FDPS を高発現するトランスジェニックマウス(Tg-FDPS マウス) を作製する。対照として5週齢 C57BL/6 マウスを用いる。

・Yeast two-hybrid screen 法および抗 CIC-7 抗体と抗 FDPS 抗体による免疫沈降法によって FDPS と cytosol C-terminus of CIC-7 (1617-72110 amino acids)との破骨細胞内での結合を調べる。

・破骨細胞へのパッチクランプ法によって細胞膜内外の外向きおよび内向きの Cl⁻電流を分析する。また、Cl⁻ indicator の N-ethoxycarbonylmethyl-6-methoxyquinolinium bromide (MQAE) を用いて破骨細胞内の [Cl⁻]_i 濃度を測定する。

・30 か月齢 (高齢) の C57BL/6 マウスと7か月齢 (若年) のマウスから腰椎、大腿骨および下顎骨を採取し、マイクロ CT にて骨容量と骨梁数を、免疫染色、RT-PCR にて細胞老化マーカー (SA-β-Gal と p16Ink4a) の発現量を比較する。

4. 研究成果

高齢者の顎骨脆弱化 (顎骨壊死や骨萎縮) の原因は、「細胞老化」した顎骨細胞 (骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、骨髄細胞) の蓄積にあると仮定して研究を開始した。加齢したマウスからの顎骨細胞の解析、加齢したマウスへゾレドロン酸投与による顎骨壊死発症モデルについての解析、培養細胞、まずは破骨細胞の分化および老化についての解析を行った。その中でも破骨細胞の *in vitro* での分化および老化について以下の事が明らかになった。

(1) 顎骨の骨代謝の中心で、破骨細胞の由来となる骨髄マクロファージ (BMM) の細胞老化誘導について多角的に解析した。BMM を、破骨細胞の分化誘導因子 RANKL、細胞老化を誘導することが知られている活性酸素供給源の過酸化水素 (H₂O₂) および骨吸収抑制薬ゾレドロン酸で処理し、細胞老化マーカーとして知られている p16Ink4a ならび p21 の発現を調べると、ゾレドロン酸処理によって p16Ink4a の発現が劇的に増加した。また、p21 の発現ではゾレドロン酸のみならず活性酸素処理においても p21 発現が増加した。このことは、骨粗鬆症等で投与される骨吸収抑制薬は、顎骨骨髄細胞の細胞老化を強力に促進することが考えられ、骨吸収抑制薬による顎骨壊死発症の基盤に骨髄細胞の老化が関与することが示唆される。破骨細胞を用いて同様の研究をしたが、破骨細胞は成熟して分化が終わっているためか、p16Ink4a の発現に顕著な

差が見られなかった。また、骨芽細胞 (MC3T3-E1) においても同様の実験を行なったが、ゾレドロン酸による細胞老化誘導作用は破骨細胞に比べて軽度であった。

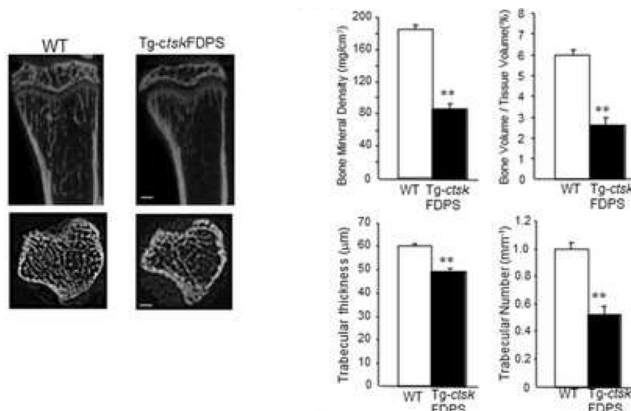
(2) 破骨細胞の前駆細胞からの分化、生存延長および細胞死を誘導することが知られている RANKL に着目し、RANK と RANKL 作用に必須な共分子である immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) の破骨細胞老化への関与について解析した。ITAM には DAP12 と FcR の 2 種類あるが、RANKL 作用時における 2 種類の ITAM の破骨細胞の Ca oscillation についての効果を調べた。DAP12 または FcR のノックアウトマウス (KO) の骨髄細胞を分離し、RANKL を作用させることによって破骨細胞に分化させる際の Ca oscillation を Fura-2 を用いて調べたところ、FcR KO では高周波側へシフト、DAP12 KO では低周波側へシフトした。高周波領域帯では、どちらか一方の ITAM がないと減弱し、低周波帯では 2 種類の ITAM が、振幅の調節を担うことが分かった。破骨細胞形成・生存に關する 2 種の ITAM 共受容体のうち FcR は高周波領域帯を、DAP12 は低周波領域帯を抑制した。ITAM のうち DAP12 が Fura-2 によって解析された Ca oscillation の振幅を維持するのに重要であることがわかった。また、BMM をゾレドロン酸で処理すると ITAM (DAP12 と FcR) の発現が抑制された。

(3) 顎骨壊死の誘因である骨吸収抑制薬ゾレドロン酸 (窒素含有ビスホスホネート) は、破骨細胞の p16Ink4a の発現を増加させ、破骨細胞に細胞老化を引き起こすことから、骨吸収抑制薬ゾレドロン酸による破骨細胞老化と破骨細胞の骨吸収機能との関係性を解析した。破骨細胞が骨吸収するためには骨表面を酸性にする必要がある。そのために破骨細胞は細胞外に塩酸を排出するが、その排出に必要なのが破骨細胞膜にある Cl⁻ (塩素) トランスポーターである。破骨細胞には Cl⁻ チャンネルのうちの ClC-7 が存在する。今回、新たに電気生理学的手法によってゾレドロン酸が破骨細胞の ClC-7 による Cl⁻ 外向き電流を抑制することが分かった。一方、ゾレドロン酸は破骨細胞のファルネシルニリン酸合成酵素 (FDPS) の活性を抑制することが知られているため、ファルネシルニリン酸合成酵素と ClC-7 との関係性を調べると、

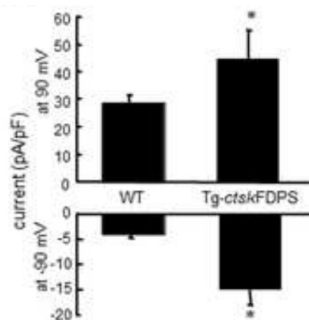
yeast two-hybrid 実験と免疫沈降実験によってファルネシルニリン酸合成酵素と ClC-7 とが破骨細胞内で結合していることが分かった。そこで FDPS のトランスジェニックマウスを作製すると、トランスジェニックマウスでは破骨細胞の ClC-7 が活性化し Cl⁻ の外向き電流が生じ、骨表面の酸性化による骨吸収活性が亢進し、骨の形態学的解析によって骨密度が低下していることが分かった。以上のことから骨吸収抑制薬ビスホスホネートは破骨細胞の細胞老化を誘導することによって顎骨のターンオーバーを阻害して顎骨フレイルをもたらす。その機序として破骨細胞のファルネシルニリン酸合成酵素 (FDPS) の発現を抑制し Cl⁻ トランスポーター ClC-7 の機能を阻害することが示唆された。また、FDPS は最終的に標的タンパクのプレニル化によって標的タンパクの細胞膜局在をもたらすため、FDPS は ClC-7 の細胞膜移動に関係しているかもしれない。

これらの研究により、細胞老化した顎骨フレイルを抑制するためには高齢者破骨細胞のファルネシルニリン酸合成酵素 (FDPS) 活性を維持することが必要であり、そのためにはメバロン酸経路において FDPS の下流にあるゲラニールゲラニールピロリン酸を投与することによって顎骨フレイルを予防できる可能性が示唆された。

破骨細胞のFDPS発現が高いと骨密度が低下する



破骨細胞のFDPS発現が高いとCl⁻電流が増加し骨吸収活性をもたらす



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hiroyuki Okada, Hiroshi Kajiyaら	4. 巻 34
2. 論文標題 CTLA4 Ig Directly Inhibits Osteoclastogenesis by Interfering With Intracellular Calcium Oscillations in Bone Marrow Macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Miner Res	6. 最初と最後の頁 1744-1752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbmr.3754	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 分 担 者	鍛冶屋 浩 (Kajiya Hiroshi) (80177378)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師 (37114)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------