

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24103

研究課題名（和文）末梢血単球を標的としたゾレドロン酸の新規骨吸収抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）Inhibition of osteolysis by zoledronate through its action in the peripheral blood monocytes

研究代表者

頌彦 玲子（瀧本）（Utasato, Reiko）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00848898

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ゾレドロン酸(ZOL)は、ヒト末梢血単核球中のCD14+単球における破骨細胞(OC)分化抑制転写因子IRF8の発現を誘導した。ZOLは、ヒト単核球の存在下、T細胞に依存してRANKLによるCD14+単球のOC分化を抑制した。ZOLは、末梢血単核球のT細胞を含む細胞群由来の液性因子を介してCD14+単球の破骨細胞分化を抑制すると考えられた。ヒト末梢血単核球をZOLで処理したところ、T細胞依存的に、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ の発現が上昇した。ZOLによるOC分化抑制にIFN- $\gamma$ が関与す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

ZOLを含め、ビスホスフォネート製剤は、成熟破骨細胞に選択的に取り込まれ、その機能障害・細胞死誘導により骨吸収を抑制する。本研究で我々は、ZOLがヒト末梢血単球の破骨細胞分化を抑制することを見出した。ZOLによる単球の破骨細胞分化抑制の機序として、単球におけるIRF8の発現誘導が示唆された。また、ZOLは末梢血単核球に作用し、IFN- $\gamma$ を含め種々のサイトカイン産生を高めることが示された。これは、骨吸収抑制剤ZOLの新しい作用機序と言える。

研究成果の概要（英文）：Zoledronate (ZOL) induced the expression of IRF8, a transcription factor that suppresses osteoclast differentiation, in CD14+ monocytes in human peripheral blood mononuclear cells. ZOL inhibited osteoclast differentiation from CD14+ monocytes in the presence of T cells in the mononuclear cells, indicating that some femoral factors are involved in this phenomenon. We found that ZOL induced the production of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$  by the peripheral mononuclear cells in a T cell-dependent manner. These results indicate that IFN- $\gamma$  is involved in the osteoclast differentiation inhibition by ZOL.

研究分野：口腔外科学

キーワード：ビスホスフォネート ゾレドロン酸 破骨細胞 炎症性サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

ゾレドロン酸は、ピロリン酸様の構造を持つため静脈内投与後に骨のヒドロキシアパタイトに沈着する。破骨細胞が骨吸収を行う際に、骨から遊離し、リン酸部分のプロトン化により細胞膜透過性が増し、破骨細胞に取り込まれる。これにより、ゾレドロン酸は、破骨細胞選択的にファルネシルピロリン酸合成酵素阻害活性を示す。その結果、破骨細胞内細胞骨格形成や情報伝達が阻害され、骨吸収能の低下とアポトーシス誘導が起こる。これが、ゾレドロン酸の骨吸収抑制作用の機序として理解されている。一方、ゾレドロン酸は、末梢血において T 細胞の活性化を介して炎症性サイトカインレベルを上昇させることから、骨への吸着前あるいは骨から遊離した後に、血液中の何らかの細胞を刺激することが示唆される。

我々は、ゾレドロン酸がヒト末梢血単核細胞(PBMC: peripheral blood mononuclear cells)中の CD14<sup>+</sup>細胞(単球)において、IRF8 (interferon regulatory factor 8)の発現を上昇させることを発見した。IRF8 は、破骨細胞分化誘導因子(RANKL)刺激で発現が低下する転写因子で、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の発現と機能を阻害することで、破骨細胞分化を抑制することが知られている [Nat Med 15:1066-71, 2009] PBMC 存在下に、ゾレドロン酸は RANKL により誘導される CD14<sup>+</sup>細胞の破骨細胞への分化を抑制した。ゾレドロン酸は、in vitro で破骨細胞のアポトーシスを誘導する濃度が 1/100 程度の濃度で有意に破骨細胞分化を抑制した。以上より、ゾレドロン酸の骨吸収抑制に破骨細胞分化阻害が重要な役割を果たしている可能性が示唆される。ゾレドロン酸はこれまで骨に沈着し、成熟した破骨細胞による骨吸収の際に、破骨細胞内に取り込まれ、その骨吸収機能を阻害しアポトーシスを誘導することで骨吸収を抑制すると理解されている。我々は、ゾレドロン酸が血液中の単球における IRF8 の発現促進を介して、単球から破骨細胞への分化を抑制するという新しい骨吸収抑制メカニズムが存在するのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

ゾレドロン酸による破骨細胞分化阻害の報告はほとんどないと言える。本研究の目的は、ゾレドロン酸による破骨細胞分化阻害のメカニズムを解明することである。上記の我々の発見は、ゾレドロン酸などの窒素含有ビスホスホネートの新たな作用機序を提案するものである。また、顎骨壊死の発症機序に骨代謝回轉阻害が示唆されていることから、本研究は顎骨壊死の機序解明に示唆を与える可能性がある。本研究では、これを検証するために、ヒト末梢血細胞を用いて、ゾレドロン酸がどのような濃度および時間でどのような細胞の関与のもとに CD14<sup>+</sup>細胞の破骨細胞分化を抑制するかを明らかにしたいと考えた。また、ゾレドロン酸の破骨細胞分化抑制が IRF8 に依存しているかを解明し、さらに、ゾレドロン酸はどのような機序で CD14<sup>+</sup>細胞における IRF8 の発現上昇をもたらすかを明らかにすることを目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

ヒト PBMC から抗 CD14 抗体結合ビーズを用いて CD14<sup>+</sup>単球を単離した。トランスウェル培養プレートの下層にヒト CD14<sup>+</sup>細胞、上層に PBMC を播種し、RANKL で破骨細胞を誘導した。この培養系に、種々の濃度のゾレドロン酸を添加し、形成された破骨細胞を酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TREAP)染色し観察した。さらに、上層の PBMC から T 細胞を除去し、CD14<sup>+</sup>細胞の破骨細胞分化への T 細胞の関与を評価した。ゾレドロン酸以外の窒素含有および非含有ビスホスホネートについても同様の解析を行った。

転写因子 IRF8 は IFN- $\gamma$  によって発現が誘導されることが知られている。そこで、PBMC をゾレドロン酸で刺激し、IFN- $\gamma$  およびその他の炎症性サイトカインの発現を mRNA およびタンパク質レベルで定量的に解析した。T 細胞その他の細胞を除去した際の PBMC、単離した CD14<sup>+</sup>単球によるサイトカイン産生を解析し、IFN- $\gamma$  等のサイトカイン産生細胞の同定を試みた。

## 4. 研究成果

ゾレドロン酸は、PBMC 存在下における CD14<sup>+</sup>単球の破骨細胞分化を、濃度依存的に抑制した。PBMC から T 細胞を除去すると、ゾレドロン酸による CD14<sup>+</sup>単球の破骨細胞分化抑制効果は減弱した。CD14<sup>+</sup>単球に IRF8 の siRNA を導入したところ、ゾレドロン酸による PBMC 存在下における CD14<sup>+</sup>細胞の破骨細胞分化抑制効果は減弱した。

ヒト PBMC による TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-1 産生に対するエチドロン酸(第1世代ビスホスフォネート)、パミドロン酸(第2世代ビスホスフォネート)、ゾレドロン酸(第3世代ビスホスフォネート)の効果を定量的に評価したところ、125  $\mu\text{mol/L}$  以下のエチドロン酸にはこれらのサイトカイン産生促進作用は認められなかった。パミドロン酸とゾレドロン酸はこれらのサイトカイン産生を促進したが、その効果はゾレドロン酸の方が強かった。PBMC から T 細胞を除去したところ、ゾレドロン酸による上記サイトカイン産生促進は消えた。PBMC 中の CD14<sup>+</sup>単球を分離し、PBMC 存在下にゾレドロン酸を添加し、CD14<sup>+</sup>単球によるサイトカイン産生を調べたところ、TNF- $\alpha$  の産生はゾレドロン酸によって変化しなかったが、ゾレドロン酸は、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-1 の産生を促進した。これらの結果は、ゾレドロン酸は T 細胞依存的に、CD14<sup>+</sup>単

球の破骨細胞分化を抑制することを示している。また、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-1 の産生の少なくとも一部は、CD14<sup>+</sup>単球が担う可能性が示唆された。以上の結果から、ゾレドロン酸は、T細胞を介して、単球が産生する IFN- $\gamma$  がオートクライン・パラクライン的に CD14<sup>+</sup>単球に作用し、IRF8 の上昇を介して、破骨細胞分化抑制した可能性が考えられた。

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 Takimoto R, Suzawa T, Yamada A, Sasa K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasama Y, Tanaka M, Kinoshita M, Ikezaki K, Ichikawa M, Yamamoto M, Shirota T, Kamiyo R	4. 巻 162
2. 論文標題 Zoledronate promotes inflammatory cytokine expression in human CD14-positive monocytes among peripheral mononuclear cells in the presence of T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 306-313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imm.13283	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧本玲子、田中元博、笹 清人、山田 篤、宮本洋一、須澤徹夫、吉村健太郎、上條竜太郎
2. 発表標題 ゾレドロン酸はIRF8の発現誘導を介して末梢血単球の破骨細胞分化を抑制する。
3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧本玲子、宮本洋一、山田 篤、須澤徹夫、笹 清人、上條竜太郎、代田達夫
2. 発表標題 ビスホスホネートのヒト末梢血単核細胞に対する作用の解析。
3. 学会等名 第65回 昭和大学学士会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学歯学部 口腔生化学講座  
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>  
昭和大学歯学部口腔外科学講座  
<https://www.showa-omfs.jp>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------