

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21087

研究課題名（和文）真菌二次代謝産物Terreinの薬剤関連性顎骨壊死病態に及ぼす影響の免疫学的検討

研究課題名（英文）Immunological study of the effects of fungal secondary metabolite terrein on drug-related osteonecrosis of the jaw

研究代表者

坂井田 京佑（Sakaida, Kyosuke）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：20907927

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：我が国における骨粗鬆症患者が年々増加している。治療薬の大きな副作用として顎骨壊死（MRONJ）の発症があり、その対応が歯科臨床現場では大きな問題である。本研究では、既存薬とは異なる機序で破骨細胞の分化誘導を制御しうる真菌二次代謝産物TerreinがMRONJ発症病態に及ぼす影響を検証した。骨粗鬆症を誘導開始と同時に各種試験薬を投与し、4週目に抜歯後、さらに4週間試験薬の投与を継続して、8週目に抜歯部の炎症状態をライブイメージングで評価した。その後上顎骨等を摘出し、硬組織の状態をマイクロCTによって評価した。解析後のサンプルを用いて組織切片を作成し、破骨細胞の分化状態をTRAP染色にて評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国において、骨粗鬆症患者は年々増加している。骨粗鬆症の進行に伴い大腿骨近位部骨折や椎体骨折などが生じると、日常生活能力（ADL）が低下する大きな要因となる。骨粗鬆症の進行を抑制するために、BP製剤や抗RANKL抗体薬等の投与が推奨されているが、副作用として顎骨壊死（MRONJ）の発症があり、その対応が歯科臨床現場では大きな問題となっている。既存薬とは異なる機序で破骨細胞の分化誘導を制御しうる真菌二次代謝産物Terreinは、骨粗鬆症のみならずMRONJ発症を抑制する可能性がある。本研究結果により、今後の骨粗鬆症治療に新たな選択肢を提供できる可能性があり、学術的・社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要（英文）：The number of osteoporosis patients is increasing. Osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is a major side effect of therapeutic drugs, and how to deal with it is a major problem in clinical dentistry. In this study, we investigated the effect of fungal secondary metabolite terrein on the pathogenesis of MRONJ, which is capable of regulating osteoclast differentiation through a mechanism different from that of existing drugs. Various test drugs were administered at the same time as the initiation of osteoporosis induction, and after tooth extraction in the 4th week, administration of the test drug was continued for an additional 4 weeks, and in the 8th week, the inflammatory status of the extracted tooth was evaluated by live imaging. After that, the maxilla and other bones were removed, and the condition of the hard tissue was evaluated by micro-CT. Tissue sections were prepared using samples after analysis, and the differentiation state of osteoclasts was evaluated by TRAP staining.

研究分野：歯科保存領域

キーワード：真菌二次代謝産物Terrein MRONJ 骨粗鬆症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、骨粗鬆症の治療として、破骨細胞を標的としたビスフォスフォネート (BP) 製剤や抗RANKL抗体薬が用いられており、抜歯に伴う薬剤関連性顎骨壊死 (MRONJ) の発症が懸念される。近年、高齢者の残存歯が増加し、歯科診療におけるMRONJ発症リスクが高まっている。申請者は、真菌二次代謝産物Terreinに着目し、既存薬とは異なる機序でマウス骨粗鬆症モデルにおける破骨細胞分化抑制による骨破壊抑制効果を見出した。本知見から、Terreinを新規骨粗鬆症治療薬として応用できる可能性がある。本研究では、マウス骨粗鬆症モデルを用いて、抜歯介入に伴うMRONJ発症病態にTerreinが及ぼす影響を検証する。

2. 研究の目的

超高齢社会を迎えた我が国において、骨粗鬆症患者は約1,300万人に達し、年々増加している。骨粗鬆症の進行に伴い大腿骨近位部骨折や椎体骨折などが生じると、日常生活能力 (ADL) が低下する大きな要因となる。そのため、骨粗鬆症の進行を抑制するために、BP製剤や抗RANKL抗体薬等の破骨細胞を標的とした薬剤の投与が推奨されている。既存の骨粗鬆症治療薬の破骨細胞を介した骨吸収抑制作用は非常に強く、病的骨折を効果的に予防できるため、骨粗鬆症治療薬を内服する高齢患者数が増加している。しかし、既存の骨粗鬆症治療薬の大きな副作用の一つとして、顎骨壊死 (MRONJ) の発症があり、その対応が歯科臨床現場では大きな問題となっている。そこで本研究では、既存薬とは異なる機序で破骨細胞の分化誘導を制御する真菌二次代謝産物TerreinがMRONJ発症病態に及ぼす影響を免疫学的視点から検証することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、マウス骨粗鬆症モデルを作製し、各種薬剤投与下で抜歯介入を行い、抜歯窩の治癒に及ぼす影響を検証する。マウス骨粗鬆症モデルは、通法に従いマウス (C57BL/6, 雌性, 10週齢) の卵巣を摘出して骨粗鬆症を誘導する。各種薬剤の投与は、腹腔内に直接注射する。実験群 (OVXマウス) に、Terrein投与群 (10-30 mg/kg)、BP製剤、または抗RANKL抗体投与群、PBS投与群、の3群を設定する。対照群 (偽手術 [sham] マウス) に PBS投与群を設定し、以下の評価項目を検討する。抜歯窩の治癒病態に各薬剤が及ぼす影響の組織学的解析：令和3年度】骨粗鬆症を誘導開始 (卵巣摘出) と同時に各種試験薬を投与し (腹腔投与は週2回)、卵巣摘出4週目にマウスの上顎第一大臼歯を抜歯する。その後、4週間試験薬の投与を継続して、卵巣摘出8週目に抜歯部の炎症状態をライブイメージング評価 (XenoLight Redirect Inflammation ProbeおよびIVIS spectrum) する。その後、安楽死させ、上顎骨および大腿骨組織を摘出して、硬組織の状態はマイクロCT画像解析によって評価する。マイクロCT解析後のサンプルを用いて、パラフィン切片を作成し、抜歯部および大腿骨成長板下部における破骨細胞への分化状態はTRAP染色を用いて組織学的に評価する。さらに顎骨壊死組織からmRNAを抽出して、次世代シーケンサーを用いて、NLRP3/Caspase-1/IL-1bやIL-36/TGF- β と
いった既報の顎骨壊死関連遺伝子の変化も含め網羅的解析を行う。なお、解析に必要な次世代シーケンサーやマイクロCT解析装置等は学内共同施設 (岡山大学病院バイオバンク、岡山大学医学部共同研究室等) に具備されており、本実験を滞りなく行うことは可能である。顎骨壊死病巣部に集積する免疫細胞動態の解析：令和3-4年度】骨粗鬆症を誘導開始 (卵巣摘出) と同時に各種試験薬を投与し (腹腔投与は週2回)、卵巣摘出4週目にマウスの上顎第一大臼歯を抜

歯する。その後、4週間試験薬の投与を継続して、卵巣摘出8週目に安楽死させ、上顎骨および大腿骨を摘出する。摘出組織から、抜歯窩を含む上顎骨および大腿骨成長板周囲軟組織を採取し、Mizrajiらの方法(2013)を用いて細胞を分離する。そして、各種免疫担当細胞特異的表面マーカーで染色後、Flow Cytometryにて免疫細胞(好中球、マクロファージ [M1またはM2]、CD4陽性IL-17A陽性Th17細胞等)の動態を解析する。また、病巣局所で産生される炎症性サイトカインの定量は、定量性real-time PCR法を解析する。なお、解析に必要なFACS装置およびソフトウェア等は学内共同施設に具備されており、本実験を滞りなく行うことは可能である。

4. 研究成果

骨粗鬆症を誘導開始と同時に各種試験薬を投与し、4週目に抜歯後、さらに4週間試験薬の投与を継続して、8週目に抜歯部の炎症状態をライブイメージングで評価した。その後上顎骨等を摘出し、硬組織の状態をマイクロCTによって評価した。解析後のサンプルを用いて組織切片を作成し、破骨細胞の分化状態をTRAP染色にて評価した。

現状COVID-19の影響によりスムーズな研究活動の実施ができず、大きな研究実績は得られていない。今後終焉に伴い研究が進んでいくものと予想される。

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 1件）

1. 著者名 Sakaïda Kyosuke, Omori Kazuhiro, Nakayama Masaaki, Mandai Hiroki, Nakagawa Saki, Sako Hideo, Kamei Chiaki, Yamamoto Satoshi, Kobayashi Hiroya, Ishii Satoki, Ono Mitsuaki, Ibaragi Soichiro, Yamashiro Keisuke, Yamamoto Tadashi, Suga Seiji, Takashiba Shogo	4. 巻 12
2. 論文標題 The Fungal Metabolite (+)-Terrein Abrogates Ovariectomy-Induced Bone Loss and Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand-Induced Osteoclastogenesis by Suppressing Protein Kinase-C β II Phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.674366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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
---------------------------	-----------------------	----

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