

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：17102  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22592219  
 研究課題名（和文）ステロイド誘発性ならびにビスフォスフォネート誘発性顎骨壊死の病態解析と予防の研究  
 研究課題名（英文）Study of steroid-induced and bisphosphonate-induced osteonecrosis  
 研究代表者  
 窪田 泰孝（KUBOTA YASUTAKA）  
 九州大学・大学病院・講師  
 研究者番号：60205151

## 研究成果の概要（和文）：

骨に対するステロイド、ビスフォスフォネートの薬理作用を検討するため安定的に増殖する上皮細胞と脂肪由来幹細胞の培養を試みた。その結果、不死化し安定した増殖能を示す歯肉上皮細胞の樹立と、骨芽細胞への分化誘導が可能である CD105 陽性間葉系幹細胞の分離培養を行った。

次に、スタチンの破骨細胞形成に対する影響を RAW 264.7 細胞を用いて検討した。その結果、アトルバスタチンとシンバスタチンは RAW 264.7 細胞において MAPK を介して TNF- $\alpha$  の発現を増強させ、その結果同細胞での RANK 発現を増強させ、破骨細胞への分化誘導を促進させる事が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

To investigate the pharmacological effects of steroid and bisphosphonate on bone, we tried to establish proliferative epithelial cells and fat-derived mesenchymal stem cells. In this study, we established epithelial cells and CD105-positive mesenchymal stem cells which can differentiate into osteoblasts.

Next, we investigated the effects of statin on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. In this study, it was suggested that atorvastatin and simvastatin may stimulate osteoclastogenesis indirectly by inducing the RANK expression via increasing the expression of TNF- $\alpha$  through MAPK pathways in RAW 264.7 cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ビスフォスフォネート、ステロイド、スタチン、顎骨壊死

## 1. 研究開始当初の背景

スタチンは3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤で、HMG-CoA がメバロン酸に代謝される過程を阻害し、最終的なコレステロール産生を阻害するため、現在、高脂血症治療薬として広く使用されている。一方、第2および第3世代窒素含有ビスフォスフォネートもHMG-CoA代謝産物であるメバロン酸がジェラニルピロリン酸に代謝され、そのジェラニルピロリン酸がファルネシルピロリン酸に代謝される過程を阻害し、スタチン同様にメバロン酸代謝経路阻害薬である。しかし、同じ代謝経路の阻害剤であるにも関わらず、ビスフォスフォネートは骨への結合能が非常に高く、骨へより選択的に吸収されて破骨細胞を阻害する(Hughes, et al. *J Bone Miner Res* 10: 1478-87, 1995)。そのためステロイド誘発性骨壊死や骨粗鬆症、多発性骨髄腫、悪性腫瘍の骨転移などに対する治療に広く使用されている。ところが、窒素含有ビスフォスフォネートの副作用として病的骨折や骨壊死を誘発することも近年、多数報告されている。興味ある事にビスフォスフォネート誘発性骨壊死のほとんどは顎骨に発生し、またステロイドとの併用や糖尿病などによってその危険性が高まるが、詳細な機序は不明である。ステロイドは単独使用においてもステロイド誘発性顎骨壊死のみならず大腿骨頭壊死の原因になることが整形外科領域においても知られている。しかしながら、ステロイド誘発性骨壊死の詳細な発生機序はやはり不明で、治療法として破骨細胞阻害薬のビスフォスフォネートの使用や、ステロイド誘発性高脂血症による骨内の微小血流傷害が骨壊死の一因と考え、高脂血症治療薬であるスタチンの応用などが考えられているが、いずれも有効性を支持する十分な科学的根拠は未だ得られていない。

スタチンやステロイド、ビスフォスフォネートは世界中で最も多く用いられている薬物の1つであり、今後もますますその需要は高まると考えられるが、これら薬剤の相互作用は非常に複雑で、顎骨に対する影響の詳細な解析や骨壊死に対する予防を含めた治療法の確立は歯科・口腔外科のみならず、領域を越えた重要な課題の一つである。

## 2. 研究の目的

ステロイド誘発性骨壊死やビスフォスフォネート誘発性骨壊死の病態を解明するためにはステロイドやビスフォスフォネートの破骨細胞に対する影響のみならず、軟組織の創傷治癒や細菌感染、微小血管への影響を加えて検討する必要がある。そこで、

本研究ではステロイドとビスフォスフォネートの破骨細胞、骨芽細胞、歯肉角化細胞、血管内皮細胞に対する薬理作用を感染や炎症性サイトカインの影響を含めて研究を行い、ステロイド誘発性顎骨壊死とビスフォスフォネート誘発性顎骨壊死の病態を解明することを目標とする。また、スタチンを含めてこれら薬剤の相互作用についても検討を行い、骨壊死に対する予防の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

1) ステロイド、ビスフォスフォネートの薬理作用を検討するためには歯肉上皮細胞と骨形成能が高い間葉系幹細胞の樹立が不可欠である。本研究では安定した増殖能をもつ不死化歯肉上皮細胞の樹立と脂肪から間葉系幹細胞の抽出と骨形成能を検討する。

2) スタチンの破骨細胞分化に対する影響をRAW 264.7細胞、MC3T3-E1細胞を用いて検討する。

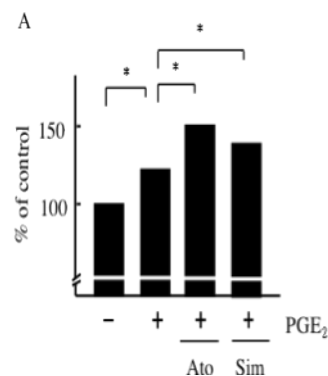
## 4. 研究成果

1) SV40感染によって不死化歯肉上皮細胞を樹立した。

2) 脂肪組織より、CD105陽性間葉系幹細胞を抽出し、同細胞が骨分化誘導培地で骨芽細胞への分化し、骨形成が可能であることを確認した。

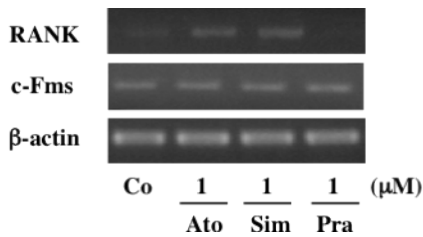
3) 次に、スタチンの破骨細胞形成に対する影響についてRAW 264.7細胞を用いて検討した。

その結果、RAW 264.7細胞をMC3T3-E1細胞と共存培養した場合、プロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)はM-CSF存在下でTRAP活性を上昇させた。また、アトルバスタチンとシンバスタチンは、このPGE<sub>2</sub>によるTRAP活性の上昇をさらに増強させた。

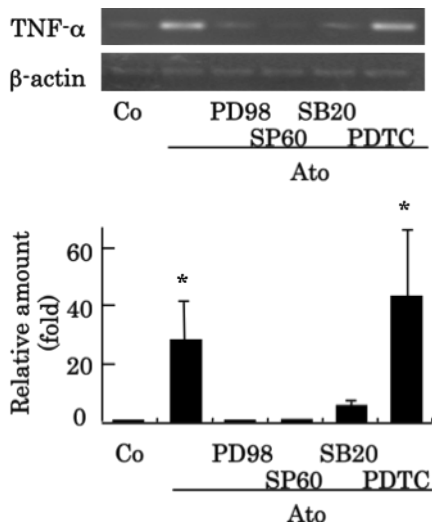


RAW 264.7細胞において、スタチンはRANK

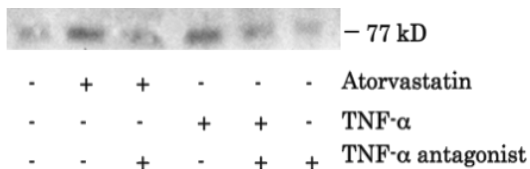
mRNA とその蛋白の発現を増大させた。



スタチンは RAW 264.7 細胞において TNF- $\alpha$  mRNA と蛋白の発現を増強させ、この TNF- $\alpha$  mRNA 発現増強は、PD-98059、SB-203580 ならびに SP-600125 によって阻害された。一方、PDTC は何ら影響を及ぼさなかった。



TNF- $\alpha$  は RAW 264.7 細胞において RANK 蛋白の発現を増強させ、スタチンによる RANK の発現は TNF- $\alpha$  抗体で阻害された。



以上の結果より、アトルバスタチンとシンバスタチンは RAW 264.7 細胞において MAPK を介して TNF- $\alpha$  の発現を増強させ、その TNF- $\alpha$  が RANK 発現を増強させ、その結果、破骨細胞への分化誘導を促進させる事が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Shudou H, Sasaki M, Yamashiro T, Tsunomachi S, Takenoshita Y, Kubota Y, Ninomiya T, Kawazu T, Mori Y. Marsupialization for keratocystic odontogenic tumours in the mandible: longitudinal image analysis of tumour size using 3D visualized CT scans. Int J Oral Maxillofac Surg 41: 290-296, (2012). (査読有り)

(2) Kami YN, Chikui T, Okamura K, Kubota Y, Oobu K, Yabuuchi H, Nakayama E, Hashimoto K, Yoshiura K. Imaging findings of neurogenic tumours in the head and neck region. Dentomaxillofac Radiol 41: 18-23, (2012). (査読有り)

(3) Kubota Y, Imajo I, Itonaga R, Takenoshita Y. Effects of patient age and the size of primary lesions on the shrinking speed after marsupialization of keratocystic odontogenic tumors, dentigerous cysts, and radicular cysts. Br J Oral Maxillofac Surg 51: 358-362, (2013). (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

(1)角町鎮男、矢内雄太、秋本直柔、窪田泰孝、井関充及、森悦秀.  
義歯性潰瘍より発症した BP 製剤関連顎骨壊死の一例.  
日本口腔外科学会九州地方会.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

窪田泰孝 (KUBOTA YASUTAKA)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：60205151

### (2)研究分担者

梶岡俊一 (KAJIOKA SHUNICHI)  
九州大学・医学研究院・特任准教授  
研究者番号：90274472