

## 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 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792009

研究課題名（和文）

スフィンゴシン1リン酸はビスホスホネートの骨形成抑制を制御できるか

研究課題名（英文）

Can sphingosine-1-phosphate control bisphosphonate-mediated bone formation?

研究代表者

安部 貴大（ABE TAKAHIRO）

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：20383250

研究成果の概要（和文）：

ビスホスホネート(BP)による顎骨壊死の副作用が世界的に認知され、本邦でも 2008 年に日本口腔外科学会が予防・診断・治療に関するガイドラインを策定し一定のコンセンサスが得られた。しかし、その病態は未だ不明な点が多く、治療への手掛かりはない。最近 sphingosine-1-phosphate(S1P)が骨リモデリング調節に関与するとの報告がなされた。我々は BP にリスク因子を付加することで RANKL/OPG の不均衡を生じることを実験的に示したが、本研究ではさらに S1P が BP の骨リモデリングへの影響を与えるかの検証を行うことを目指した。

研究成果の概要（英文）：

The jawbone necrosis caused by bisphosphonate (BP) is a globally recognized adverse effect of BP treatment. In 2008, the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons defined guidelines for prevention, diagnosis, and medical treatment of this adverse effect, and obtained consensus for these guidelines in Japan. However, many aspects related to the morbidity of this condition have not been clarified, and there are no instructions for medical treatment. A recent study showed that sphingosine-1-phosphate (S1P) participates in bone remodeling regulation. Although we have shown experimentally that RANKL/OPG imbalance was produced by adding risk factors to BP, the aim of this study was to verify whether S1P further influences BP-mediated bone remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：S1P, ビスホスホネート, 骨芽細胞, 間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Wilkinson GS らは、最近の疫学調査で

16,073 例のがん患者を対象としてパミドロネート、ゾレドロネートの静注投与を受けた

患者群における顎顔面骨炎の発症リスクが1割に及ぶことが報告され、ビスホスホネート関連顎骨壊死 (BRONJ) との関連が示唆されている (*J Natl Cancer Inst* 99: 1016-24, 2007). 現在までに欧米顎顔面口腔外科学会、また本邦でも日本口腔外科学会が、BRONJの予防・診断・治療に関するガイドラインを策定し一定のコンセンサスが得られた。しかし、症例検討に基づく報告は多数あるものの、その病態は未だ不明な点が多く、さらなるデータの蓄積を必要とする。我々はゾレドロン酸 (ZOL) を用いて骨リモデリング調節に重要な RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand), OPG (osteoprotegerin) の血清濃度を検討したところ、ZOL 投与で OPG が上昇することや、リスク因子とされるコルチコステロイドの併用と LPS (lipopolysaccharide) の口腔内刺激で sRANKL が有意に上昇することを確認し、BRONJ における RANKL/OPG の不均衡、RANKL shedding 機構への関与が示唆された (安部ら, 第 54 回日本口腔外科学会総会; 札幌, 2009). 最近, これら RANKL・OPG のバランスを調節するカップリング因子として、脂質メディエーターである sphingosine 1-phosphate (以下 S1P) が重要な役割を果たしているという知見が報告された。

骨組織はダイナミックな組織であり、絶えずリモデリングを繰り返している。すなわち破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成がバランスを保つことによって維持されている。しかし、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成はそれぞれが独立して行われているのではなく、骨吸収と骨形成のバランスを保つべく破骨細胞、骨芽細胞の双方がシグナルを出してクロストークしている。1998 年に須田らによって RANKL が同定され、骨芽細胞膜上に発現した RANKL が破骨細胞前駆細胞と接触し成熟破骨細胞に分化することが明らかとなり、破骨細胞分化には骨芽細胞との細胞接触が不可欠であること、また RANKL のデコイとして OPG が明らかにされた (*Endocr.Rev.*, 20: 345-357, 1999). ただし、骨吸収領域に存在する破骨細胞がどのように骨芽細胞を動員するかについてはこれまで不明であった。ここで S1P が骨芽細胞の動員に関わる因子として注目を集めている。最近明らかとなった知見を以下に掲げる。

(1) 骨芽細胞の前駆細胞である間葉系幹細胞と破骨細胞を共存培養することで培地に石灰化を生じる、つまり骨分化が促進する。さらにこれら幹細胞の chemokinesis が増加する。一方、S1P 受容体を阻害することで培地の石灰化は抑制され、さらに間葉系幹細胞の chemokinesis も低下する (Penderson,

et al: *PNAS.*, 105: 20764-20769, 2009).

(2) S1P は成熟骨芽細胞の S1P 受容体に結合して Chemotaxis を促進すると共に、cell survival に働く。さらに骨芽細胞に RANKL を発現させ、破骨細胞分化を促進する (Ryu J., et al: *EMBO J.*, 25 :5840-5851, 2006).

## 2. 研究の目的

破骨細胞より放出される S1P は、間葉系幹細胞の遊走、生存、骨分化を促進する一方で、RANKL を発現して骨吸収活性を促進するカップリング因子として作用すると思われる。このことは BP が骨吸収活性を抑制し、かつ骨形成能も抑制する作用を持つことから、S1P 調節系への影響が示唆される。我々はこれまで BRONJ のリスク因子に挙げられているコルチコステロイドや口腔感染を想定した LPS を BP と併用することで OPG, RANKL への影響を検討してきたが、S1P 機能との関わりについては未知である。そこで、仮に S1P が OPG/RANKL のバランスを制御できるとすれば、BRONJ の予防・治療への応用の可能性が期待できるのではないかと考える。

本研究の目的は、BRONJ の病態解明を目指してこれまで進めてきた基礎研究を発展させてさらなる理解を深めることであり、S1P に関する以下の疑問点を議題として、これを明らかにするため、

- (1) 破骨細胞の活性化促進により S1P が放出され、パラクライン作用で間葉系幹細胞が骨吸収領域へ動員するか。
  - (2) S1P は動員された間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化も誘導するか。
  - (3) S1P は RANKL, OPG の血清濃度に影響するか。
  - (4) S1P は BP の作用に影響を及ぼすか。
- に対して、検証を進める計画を立てた。

## 3. 研究の方法

当初の目標として、間葉系幹細胞から骨芽細胞が分化し骨形成を行う過程における S1P のシグナル伝達経路を解明する。そして動物実験によって、BP の骨抑制に S1P がどのように作用するのかを検討していく。(平成 22 年度) *in vitro* で間葉系幹細胞における S1P 受容体の局在、ならびに S1P シグナル伝達経路を解析する。また、S1P が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化、増殖、生存、chemokinesis に影響するか解析する。(平成 23 年度以降) 前年度の *in vitro* の解析結果をもとに、ラットを用いて *in vivo* での解析を行う。まず、S1P による間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化、chemokinesis が BP 投与下の生体でどう影響するか、卵巣摘出モデルを用いて検討する。さらに、BRONJ のリスク因子であるコルチコステロイドや LPS を BP と

併用することで生じる骨形成抑制を S1P が回復するか否か、骨形態計測、RANKL/OPG 血清濃度測定などを行い検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) S1P 受容体サブタイプの確認

S1P 受容体は S1P<sub>1</sub>–S1P<sub>5</sub> の 5 種類あることが知られている (Rosen, et al : *Nat. Rev. Immunol.*, 5 : 560-570, 2005). RT-PCR, ウェスタンブロット法により、確立された細胞株、初代培養を用いて S1P 受容体 S1P<sub>1</sub>–S1P<sub>5</sub> のどのサブタイプが、どの分化レベルの細胞に発現しているかについて検討を行った。細胞種によって発現は異なることが明らかとなり、受容体サブタイプの発現様式に多様性があることが示された。

##### (2) 各サブタイプの機能解析

S1P 受容体のサブタイプが複数発現する場合、S1P とそれぞれの阻害剤 (既知) を処理することで、骨芽細胞分化、増殖、生存が阻害されるか否かの検証を試みた。これにより骨芽細胞分化、増殖、生存については一定の characterize があることが示唆されたが、chemokinesis がどのサブタイプを介するののかについては現在検討中である。

##### (3) DNA マイクロアレイを用いた S1P シグナルの網羅的発現解析

S1P 受容体の各サブタイプから入力される下流のシグナル伝達経路は未分化間葉系幹細胞ではまだ十分には分かっておらず、まずは手がかりとして S1P の刺激による網羅的発現の増減を確認することを目的に、DNA マイクロアレイを行うこととした。これまで、文献的には骨芽細胞や脂肪細胞分化など、一定の分化誘導を行った系でのシグナル解析を行った報告はあるが、未分化間葉系幹細胞そのものが S1P に対してどのような挙動を示すかについては知られていない。今回の解析結果では、生存や分化 (特に神経系の因子) を促進し細胞活性を高める一方で、がん化を抑制させる傾向が認められた。骨芽細胞関連因子については SOX2, 11, BMP2, MEF2C, PTHLH, FAK, MSX2, GREM1 などに発現上昇が認められたのに対し、RUNX2 や AMG, FGF2 といった因子については減少していた。すなわち、S1P が単独である特定の分化を誘導するというのではなく、分化能のポテンシャルを高める役割に関与していることが示唆された。

##### (4) S1P シグナル伝達経路の解析

計画当初は以下の既知シグナルに着目し、その選択的阻害剤を用いた阻害実験によって増殖、生存、chemokinesis について検討を行う予定であった。つまり、シグナル経路とそれに対する既知の阻害剤を列挙すると、

- ・ p43/44MAPK 経路 : 選択的 MEK 阻害剤 U0126
- ・ PIK3/Akt 経路 : 選択的 PI3K 阻害剤 wortmannin

- ・ Ras/ERK 経路 : 選択的 AP-1 阻害剤 curcumin
- ・ NF- $\kappa$ B 経路 : p65 サブユニットのモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、陽性の場合 NF- $\kappa$ B 阻害剤 helenalin

などである。各種阻害剤についてはすでに入手しており、予備実験には着手しているが、上記 (3) のマイクロアレイデータと合わせて、今後検討を重ねていく予定である。

(5) 動物実験については研究期間中に代表研究者の移動があり、当初の計画通りの遂行が困難であった。しかし、動物実験施設の使用申請を行い基盤整備を進めており、今後も引き続き行っていく予定である。

およそ 10 年前に S1P 受容体が発見されて以来、S1P はシグナル伝達を担う物質として注目を集めている。現在、血管系や神経系における機能を中心として精力的に研究が進められているが、未解明の点が多い。特に S1P の骨代謝における作用は、上記の報告を除き国内外において未だ散見されるのみである。本研究で得られた結果は、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化における S1P の機能、および BP の作用を解明することであった。このことは近々の緊急課題として挙げられる BRONJ の病態解明への一助となる可能性を有し、将来 BRONJ の予防・治療薬への応用が期待される。さらには S1P が骨形成の正の調節因子として創薬ターゲットと成り得ることから、骨造成法における重要な知見が得られる可能性があり、組織工学的手法への応用も期待されるもので、今後さらなる検証を進めていきたい。

#### 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 6 件)

1. Sato T, Chida D, Iwata T, Usui M, Hatori K, Abe T, Takeda S, Yoda T. Non-neuronal regulation and repertoire of cholinergic receptors in organs. *BioMolecular Concepts* 1; 357-366, 2010.
2. Sato T, Abe T, Chida D, Nakamoto N, Hori N, Kokabu S, Sakata Y, Tomaru Y, Iwata T, Usui M, Aiko K, Yoda T. Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. *FEBS Letters* 584; 817-824, 2010.
3. 中本紀道, 依田哲也, 中本文, 安部貴大, 佐藤毅, 坂田康彰. 両側下顎埋伏過剰歯の抜去後に同部位に新たな過剰歯が発生した 1 例. *日本口腔外科学会雑誌* 56(9); 506-510, 2010.
4. Shimamura Y, Abe T, Nakahira M, Yoda T, Murata S, Sugawara M. Immunohistochemical

analysis of oral dysplasia: diagnostic assessment by fascin and podoplanin expression. *Acta Histochem Cytochem*. 2011 Dec 28;44(6):239-45. Epub 2011 Oct 14.

5. Sato T, Nakamoto N, Abe T, Fukushima Y, Tomaru Y, Sakata Y, Nakazawa M, Nakamoto A, Kawasaki H, Wada Y, Ohara H, Araki R, Tanaka J, Yoda T. Preliminary results of a study comparing conventional radiography with phase-contrast radiography for assessing root morphology of mandibular third molars. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011 Feb;40(2):91-5.

6. Sato T, Nakamoto A, Hori N, Enoki Y, Fukushima Y, Nakamoto N, Sakata Y, Yamanaka H, Chida D, Abe T, Yoda T. Proteomic analysis of a masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia: a preliminary study using 2D-DIGE system. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 2012 Nov; 24(4): 185-188.

[学会発表] (計9件)

1. 安部貴大, 小林明男, 佐藤毅, 福島洋介, 堀直子, 依田哲也, 高戸毅: 口内炎発症における唾液中ストレス因子の検討と概日リズム変動への影響. 第56回日本口腔外科学会総会 2011年10月21-23日 大阪

2. 阿部雅修, 森良之, 西條英人, 安部貴大, 杉山円, 古賀陽子, 高戸毅: 口腔前癌病変悪性化におけるエピジェネティクスを指標としたリスクマーカーのゲノム網羅的探索. 第35回日本頭頸部癌学会 2011年6月8-10日

3. Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Abe T, Takato T, Hoshi K. : Nanog promotes osteogenic differentiation of mesenchymal cells by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. 2011 annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 16-20, 2011, San Diego, California, USA, San Diego Convention Center

4. 阿部達也, 安部貴大, 古賀陽子, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山円, 瀬戸一郎, 星和人, 西條英人, 森良之, 高戸毅: 東京大学医学部附属病院顎口腔外科における歯原性腫瘍の統計的観察. 第66回日本口腔科学会学術集会 2012年5月17-18日 広島国際会議場, 広島

5. 岡安麻里, 須佐美隆史, 井口隆人, 内野夏子, 上床喜和子, 森良之, 西條英人, 安部貴大, 古賀陽子, 末永英之, 大久保和美, 高戸毅: 完全両側性唇顎口蓋裂患者の顎顔面形態・咬合の成長による変化と顎矯正手術の

必要性. 第22回日本顎変形症学会総会 2012年6月18-19日 福岡国際会議場, 福岡

6. 瀬戸一郎, 森良之, 西條英人, 古賀陽子, 安部貴大, 末永英之, 阿部雅修, 菅野勇樹, 杉山円, 星和人, 高戸毅: 当科における生体内吸収性 PLLA/HA 骨接合プレート (Super Fixsorb) 治療成績とその合併症. 第57回日本口腔外科学会総会 2012年10月19-21日 パシフィコ横浜会議センター, 横浜

7. 森良之, 末永英之, 阿部雅修, 古賀陽子, 菅野勇樹, 杉山円, 安部貴大, 瀬戸一郎, 西條英人, 星和人, 高戸毅: 超音波骨切削器を用いた Short Lingual osteotomy (SLO). 第57回日本口腔外科学会総会 2012年10月19-21日 パシフィコ横浜会議センター, 横浜

8. 安部貴大, 小笠原徹, 阿部雅修, 佐藤稔久, 西條英人, 星和人, 森良之, 高戸毅: iNOS 発現阻害による炎症時 NO および peroxynitrite の消去が骨芽細胞の増殖・分化に及ぼす影響. 第12回日本再生医療学会総会 2013年3月21日, パシフィコ横浜, 横浜

9. Abe M., Yamashita S., Mori Y., Abe T, Saijo H, Kawase-Koga Y., Suenaga H., Ushijima T. and Takato T. Identification of novel methylation-silenced genes which are associated with malignant transformation from oral premalignant lesions to oral cancers. The Ninth AACR-JCA Joint Conference - Breakthrough in basic and translational cancer research, Maui, HI, USA, February, 2013

[図書] (計2件)

1. 安部貴大: 喉に異物を誤飲・誤嚥させたら?, タービンなどで口唇・舌・頬粘膜・口腔底粘膜を損傷したら? 医師・歯科医師のための口腔診療必携 - 困ったときのマニュアル・ヒント集 202, 133, 136 高戸毅 監修, 金原出版, 東京, 2010

2. 安部貴大: 「口腔保湿剤、薬剤性歯肉炎、基底細胞母斑症候群、脈瘤性骨嚢胞」看護学大辞典第6版 総ページ数 1538 永井良三, 田村やよひ監修, メヂカルフレンド社出版, 東京, 2013

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 貴大 (ABE TAKAHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号: 20383250

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :