

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23659957

研究課題名（和文）メバロン酸経路を標的とした破骨細胞回復療法の開発

研究課題名（英文）A study on mevalonic acid pathway-targeting therapy to recovery osteoclasts damaged with bisphosphonate

研究代表者

池邊 哲郎 (IKEBE TETSURO)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20202913

研究成果の概要（和文）：骨粗鬆症や癌骨転移の治療薬として使用されるビスフォスフォネート製剤（BP）は破骨細胞を抑制することによって骨吸収を防ぐ薬物であるが、抜歯などを契機に顎骨壊死を引き起こす副作用が知られている。ビスフォスフォネート関連顎骨壊死（BRONJ）は治療に難渋し大きな臨床課題であるが基本的な治療薬はない。BRONJ の治療法を開発するためには、BP で抑制された破骨細胞を再活性化させなければならない。そこで、BP によって抑制された破骨細胞のメバロン酸経路を回復させるために、メバロン酸経路の中間代謝産物であるゲラニルゲラニル酸（GGOH）が破骨細胞の分化を回復させ、顎骨壊死の進行を抑制させることができるか否かを検討した。その結果、RAW264.7 細胞およびマウス骨髄細胞を用いた培養細胞実験系で、ゾレドロ酸は、破骨細胞の分化（RANK 発現、運動能、多核化、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（TRAP）発現、細胞融合促進因子 STAMP の発現）を強力に抑制したが、GGOH を投与すると、ゾレドロ酸の効果を部分的に抑制できた。このことからメバロン酸経路の GGOH は、BP によって抑制された破骨細胞の分化（多核化）を促進ならびに活性化して BRONJ の治療のターゲット分子となり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Nitrogen-containing bisphosphonate (BP) is used as effective therapeutic agent for managing bone-resorbing diseases such as osteoporosis and cancer bone metastasis. It is well known that osteonecrosis of the jaw occasionally occurs in the patients treated with nitrogen-containing bisphosphonate after tooth extraction, which is called as BRONJ. Although BRONJ is quite difficult to treat and annoys both the patients and dentists for a long time, any effective therapies for BRONJ have not been established. The target cell of BP is osteoclast. BP inhibits the mevalonic acid pathway of osteoclast to inhibit osteoclastic bone-resorbing activity. In order to recover the BP-induced inhibition of osteoclast activity, the effects of geranylgeraniol (GGOH), an intermediate of mevalonic acid pathway, on BP-induced inhibition of osteoclast activity was investigated in this study. As a result, the addition of GGOH to cultured osteoclasts restored multinucleation, TRAP expression, cell migration ability and the expression of cell fusion-promoting factor STAMP of BP-inhibited osteoclasts. This study suggests that GGOH may neutralize the adverse effects of BP in osteoclasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,200,000	1,300,000	2,500,000
2012 年度	360,000	390,000	750,000
総計	1,560,000	1,690,000	3,250,000

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：破骨細胞、顎骨壊死、ビスフォスフォネート、メバロン酸

1. 研究開始当初の背景

BRONJ についてのこれまでの研究は、疫学的な研究や診断についての研究、壊死骨を切除する外科療法の症例提示などが主体であり、その原因治療の試みに関する研究論文は全く無いと云える。これまで、骨粗鬆症、癌骨転移、関節リウマチなど骨疾患において骨破壊をもたらす破骨細胞は患者扱いされ、破骨細胞を抑制する薬剤の開発ばかりが注目されてきた。逆に、破骨細胞の状態を改善するような治療法を目指す発想は非常に少なく、ビスフォスフォネートの効果を相殺できるような治療法の開発は皆無であった。しかし BP 関連顎骨壊死の出現は、破骨細胞を過度に抑制すると骨の正常な代謝が阻害されることを示唆しているのみならず、生体の恒常性維持における破骨細胞の普遍的な重要性を意味しているであろう。骨粗鬆症などの疾患に対して BP が一定の効果をもたらした後や BRONJ に罹患した後は、破骨細胞を復活させ再活性化させる必要があるであろう。破骨細胞を回復させ、骨の turnover を調節する薬剤および因子の検討はこれまでにない試みであった。

2. 研究の目的

BP によって機能が抑制された前駆破骨細胞および成熟破骨細胞の機能を回復させる方法を探索する。BP が破骨細胞のメバロン酸経路を阻害することから、メバロン酸経路の下流分子である GGOH を供給することによって、BP 存在下でもメバロン酸経路を進行させ、前駆細胞から破骨細胞への分化が誘導されるか否か、従来の破骨細胞の性質（機能）が回復しているか否かを解析する。

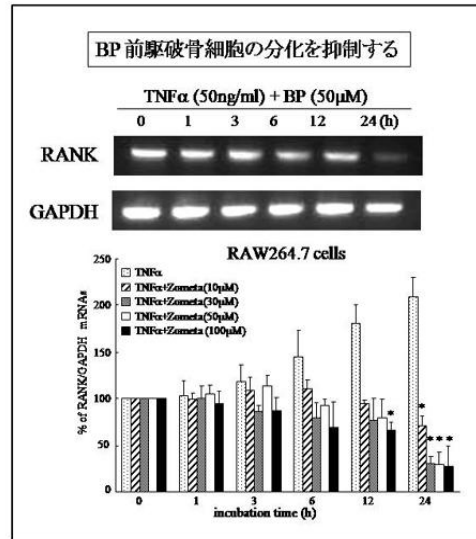
3. 研究の方法

1) 前駆破骨細胞から成熟破骨細胞への分化、
2) 成熟破骨細胞の性質、の2つの系で調べる。また、破骨細胞として、①RAW264.7 細胞（前駆破骨細胞の性質を有するマウスマクロファージ細胞株）と②マウス骨髄から分離した骨髄細胞（M-CSF により破骨細胞へ分化させる、またはストローマ細胞や骨芽細胞との共存培養によって破骨細胞へ分化させる）、を用いた。破骨細胞の分化では、RANK 発現、多核化、TRAP 発現、細胞融合促進因子 STAMP 発現を調べ、破骨細胞の活性化では、細胞運動能力および pit formation を解析した。マウスに *in vivo* で BRONJ を誘導し、GGOH の効果を調べた。

4. 研究成果

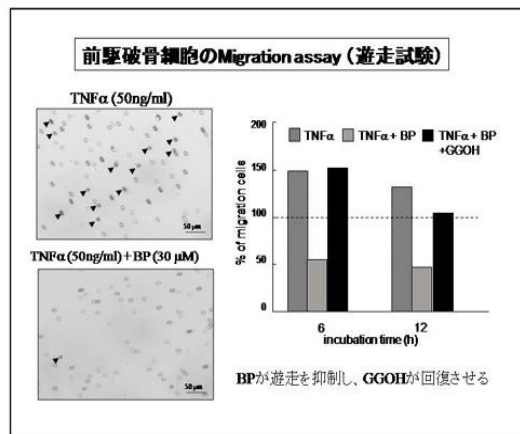
・RAW264.7 細胞およびマウス骨髄細胞を培養し、窒素含有 BP であるゾレドロン酸を加

えると、ゾレドロン酸の濃度および作用時間



に依存して、RAW264.7 細胞の TNF alpha による RANK 発現が抑制された。RANK の TNF alpha による発現増強およびゾレドロン酸による発現抑制は、RT-PCR による mRNA 発現ばかりでなく、Western blot および flow cytometry によるタンパク質発現でも確認された。

・pit formation アッセイにて骨吸収活性を調べると、RANKL や TNF alpha による

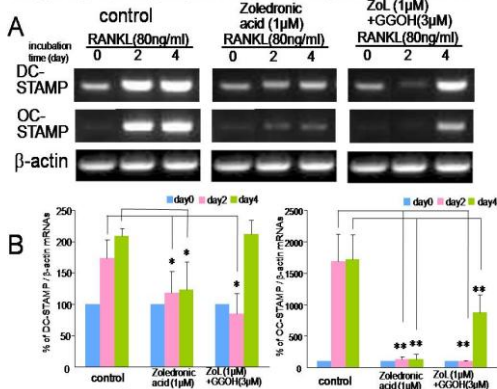


RAW264.7 細胞およびマウス骨髄細胞の骨吸収活性はゾレドロン酸によって抑制された。

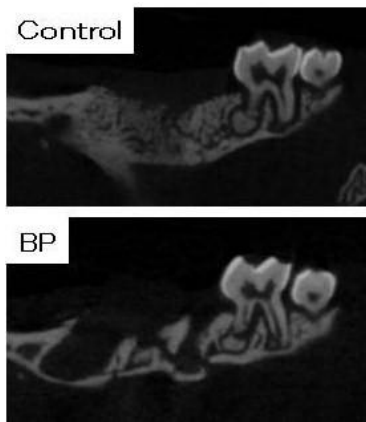
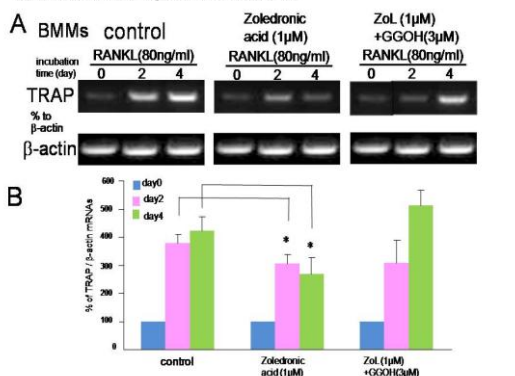
・ダブルチャンバー法による細胞運動能の解析を RAW264.7 細胞で行うと、TNF alpha による運動能の亢進が、ゾレドロン酸によって抑制された。

- ・ゾレドロン酸は各種細胞内シグナル伝達経路のうち、転写因子 NF- κ B の活性化を抑制していた。
- ・マウス骨髄細胞を RANKL と M-CSF で破骨細胞に分化させる系で、ゾレドロン酸を加えると、濃度に依存して TRAP 陽性の多核細胞数が減少し、逆に単核細胞の割合が増加した。
- ・マウス骨髄細胞を RANKL と M-CSF で破骨細胞に分化させる系で、ゾレドロン酸を加えると、TRAP 発現が抑制されることを PT-PCR で確認した。

ゾレドロン酸は細胞融合促進因子(STAMPs)の遺伝子発現を抑制し、この抑制はGGOHにより部分的に回復する



ゾレドロン酸はTRAP mRNA 発現を抑制し、この抑制効果はGGOHにより部分的に回復する



・マウス骨髄細胞を RANKL で破骨細胞に分化させる系で、ゾレドロン酸を加えると、細胞融合促進因子 STAMP (DC-STAMP 、 OC-STAMP

P) の発現が抑制されることを PT-PCR で確認した。

- ・ゾレドロン酸とともにグラニルゲラニル酸 (GGOH) で細胞を処理すると、ゾレドロン酸で抑制された細胞運動能、TRAP 陽性多核細胞数、TRAP 発現および STAMP 発現がともに部分的に回復した。
- ・マウス下顎骨のマイクロ CT 像
ゾレドロン酸投与によって壊死は発現しなかったが、骨硬化が見られた。

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 2 件)

(1) Kimachi K, Kajiya H, Nakayama S, Ikebe T, Okabe K. Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 383: 297-308, 2011.

(2) Ikebe T. Pathophysiology of BRONJ: Drug-related osteoclastic disease of the jaw. (review) *Oral Science Int* 10: 1-8, 2013.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：