

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462837

研究課題名(和文)ビスフォスフォネート(BP)の顎骨の感染メカニズムの解明

研究課題名(英文)A study on mechanism of bisphosphonate-related infection of the jaw.

研究代表者

領家 和男 (RYOKE, KAZUO)

鳥取大学・医学部・特任教授

研究者番号：20093635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨分化をモニター出来るヒト間葉系幹細胞株(HSC)を樹立した。このヒト骨髄由来HSCを用いBRONJの治療に使用するPTHの投与量、投与間隔を検討した結果、PTHは100ng/ml、4日の投与間隔が最適であった。さらにHSCにBPを作用させたが、骨形成はみられず、BPは骨芽細胞にも抑制効果を認めた。BPのヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)と歯周靭帯線維芽細胞(HPdLF)に対する細胞増殖阻害は、両細胞共に濃度依存的に認められたが、HPdLFではより強く認めた。細胞遊走能への阻害は、HPdLFで著明であった。線維芽細胞成長因子(bFGF)の発現は、BP処理により両細胞群でその発現に差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：1.We established HSC(Human Mesenchymal Stem Cell) enabling to monitor of bone differentiation.As for the remedy against BRONJ, the medication of PTH was examined using this HSC derived from the human bone marrow.The optimum administration of PTH was a dosage of 100ng/ml with 4-day intervals.An addition of BP to HSC demonstrated no any bone formation,which implied that BP could suppress the osteoblastic formation. 2.BP inhibited both NHDF and HPdLF proliferation in dose dependency,especiallyly the tendency was remarkable in the latter.Inhibiting of cell migration was marked in HPdLF.An expression of bFGF was detected in both HPdLF and NHDF groups after BP processing,but there was no significant difference between them.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HSC：ヒト間葉系幹細胞 BRONJ：ビスフォスフォネート関連顎骨壊死 ヒト皮膚線維芽細胞 歯周靭帯線維芽細胞 細胞増殖能 BP：ビスフォスフォネート 骨芽細胞 骨免疫

1. 研究開始当初の背景

BPによる有害事象による骨の露出、骨壊死、骨髄炎は顎骨にのみ発生し、他の骨には見られないのが特徴的であるとともに、一旦発症すると標準的な歯科口腔外科的治療には反応せず極めて難治性である。申請者らのグループは、徳島大学、高知大学、山口大学、島根大学と共同(平成21年度科研)でBP投与患者に対し発症のリスク因子およびBRONJの予後の予測因子について検討した。具体的には骨の代謝マーカーの測定で、血中の骨吸収マーカーであるNTXと骨形成マーカーであるBAPの両方が低いいわゆる骨代謝がlow turn overの場合、発症のリスクは極めて高く、一度発症すればBRONJは治癒しない。一方NTXは低いが、BAPが正常な場合、BRONJは治癒することもあるが治癒しないこともあり予後を予測することは断定出来なかった。さらにBRONJの発症の予測ならびに外科的適応の基準について倫理委員会の承認を経てBRONJ患者およびBP製剤投与患者を対象に顎骨骨密度を測定した。その結果、顎骨骨密度が450 mg/ml前後を境に発症群と非発症群に分かれた。また外科的適応の切除断端のBone densityと治癒状況についても同様に450 mg/ml以上が非治癒の重要な骨密度であることが判明した。このことは、顎骨骨密度も腰椎や大腿骨同様にBPの効果があることを想定させるものであり、顎骨骨密度の高値がBRONJ発症の系統的な危険因子であることを明らかにした(平成23年日本口腔外科学会総会にて発表)。手術の際、顎骨骨密度が450 mg/ml前後の部位より血行が確認でき、それ以上の高値を示す部位では血行の確認が出来なかった。これらのことから、BP製剤による骨密度の増加は、骨髄由来間葉系幹細胞の脂肪細胞へ分化抑制と骨芽細胞への分化促進と共に血管新生の抑制に関連していることが示唆された(平成24年4月日本口腔科学会中国四国地方会にて発表)。そこで骨芽細胞に対するBPの影響について検討したところ、破骨細胞と同様、骨芽細胞へも影響をきたすことが明らかとなった。しかしその骨芽細胞への抑制効果はBMPR, Smads, Runx2, Msx2の発現から骨芽細胞分化に影響をきたすことが明らかとなったが、骨芽細胞への抑制効果のメカニズムは依然として不明である。さらにこれらの臨床研究から以下の事を確認した。(1)創傷治癒の遅延 (2)骨密度の上昇 (3)血管新生の抑制が挙げられた。

2. 研究の目的

BPの骨芽細胞への抑制効果としてBMPR, Smads, Runx2, Msx2の発現から骨芽細胞の分化に影響することが明らかになり、(1)創傷治癒の遅延、(2)骨密度の上昇、(3)血管新生の抑制がBRONJの発症に関連している因子として明らかになった。そのため、BPの顎骨の感染メカニズムの解

明に関し、これら上記3項目に関連している因子として、

- (1)肉芽組織を構成する線維芽細胞と、さらにFGF(fibroblast growth factor)に着目し、BP製剤は線維芽細胞とFGFに關与しているとの仮説を立てた。
- (2)さらにBP製剤による線維芽細胞に対するbFGF発現への影響への関与の可能性、bFGFのBRONJへの治療法の可能性にも着目した。
- (3)人工染色体ベクター(Mammalian Artificial Chromosome:MAC)を用いて、骨分化をモニター出来るヒト間葉系幹細胞を樹立することにある。この骨分化をモニター出来るヒト間葉系幹細胞を用い、骨分化に影響を与える因子(PTHなど)を検討し、感染メカニズムの解明や治療法への応用を目的とした。さらに、近年PTH(副甲状腺ホルモン)間歇的投与は新規の骨形成促進薬として登場した。PTHの持続投与時には骨吸収を促進し間歇的投与時には骨分化を促進するdual actionを有する。BRONJの治療戦略として注目されつつあるが投与条件については未だ議論が多い。本研究では骨分化をモニターできるヒト間葉系幹細胞を利用してin vitroでPTHの投与濃度、投与間隔による最適な骨分化条件の検索を行う。骨分化をモニター出来るヒト間葉系幹細胞を利用したBPの骨分化における影響の検討。
- (4)骨芽細胞自体の免疫担当細胞としての機能の解明。

3. 研究の方法

- (1)線維芽細胞はヒト皮膚線維芽細胞(Normal Human Dermal Fibroblasts; NHDF)とヒト歯周靭帯線維芽細胞(Human Periodontal Ligament Fibroblasts; HPdLF)を用い、BPはアレンドロン酸ナトリウム三水和物(Alendronic Acid Monosodium Salt Trihydrate)の細胞増殖および遊走能への影響を比較した。
- (2)上記BP製剤によるbFGF発現への影響を、6well plateに細胞を播種しBP製剤添加して培養した細胞の蛋白を回収し、bFGFの発現をWestern blottingにて検討した。
- (3)人工染色体ベクター(Mammalian Artificial Chromosome:MAC)を用いて、骨分化マーカーであるオステオカルシン(Osteocalcin:OC)を発光でモニター出来るヒト間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell:MSC)を構築する。近年PTH(副甲状腺ホルモン)は新規の骨形成促進薬として登場した。持続投与時には骨吸収を促進し、間歇的投与時には骨分化を促進するdual actionを有する。口腔顎顔面領域ではビスフォスフォネート関連顎骨壊死の治療戦略として注目されつつあるが投与条件については未だ議論が多い。本研究では、骨分化をモニターできるヒト間葉系幹細胞を利用し

て in vitro にて PTH の投与による最適な骨分化条件 (投与濃度、投与間隔) の検索を行った。具体的にはアレンドロネートを各々 50,100,200,300ng/ml、投与間隔は 1 から 4 日とした。さらに この骨分化をモニター出来るヒト間葉系幹細胞に、BP 製剤 (アレンドロネート 4 μ M/ml,8.7 μ M/ml) を作用させその影響を検討した。

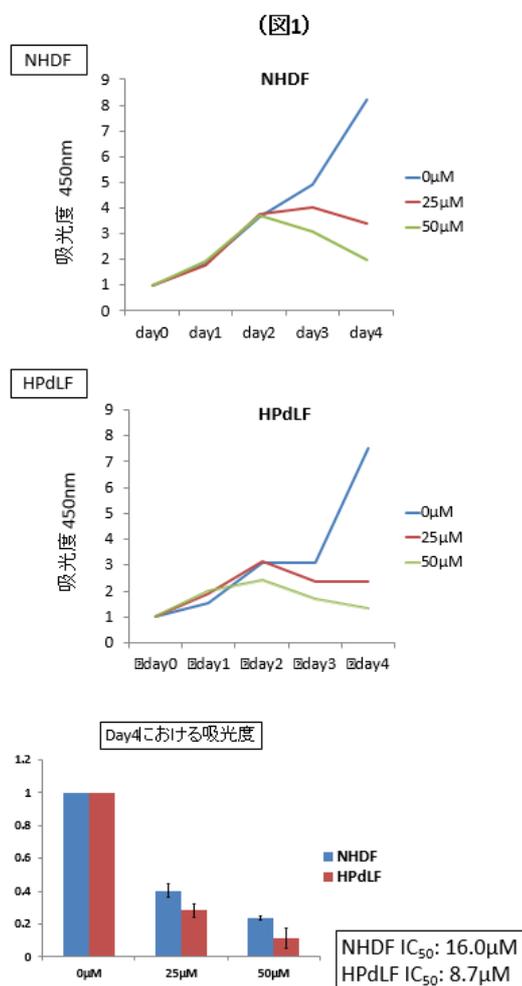
(4) 骨芽細胞自体の免疫担当細胞としての機能の解明に関し、骨芽細胞は ヒト骨芽細胞(NHOst)と マウス骨芽細胞(MC3T3)を用い、BP 添加、無添加培養上清を採取し、骨免疫との関連性を検索するためサイトカイン

(IL-6,IL-1beta,IL-17A,M-CSF,P-Selectin,IL-33,Osteoprotegerin,IL-34,TRANCE/RANKL,Osteopontin,TNF RI) を、ELISA(マルチプレックスサスペンションアレイ解析)で解析した。具体的にはターゲットタンパク質検出反応の測定は、検体を 1 ウェルあたり 50 μ L 使用し 2 重測定とした。検量線に使用するスタンダード溶液は、付属のマニュアルより 1 点追加し 7 ポイント調整し、3 重測定とした。ターゲットタンパク質に特異的な抗体を結合したビーズとサンプルおよびスタンダード溶液との抗原抗体反応を行った。ビーズを洗浄後、ビオチン化二次抗体を反応させ、ストレプトアビジン-PE でラベルした。ビーズを洗浄後、測定用バッファーに再懸濁させた。使用するプレートは各測定キットにつき 1 枚とした。その後 Luminex® System による MFI 値測定および濃度の算出を行った。

4. 研究成果

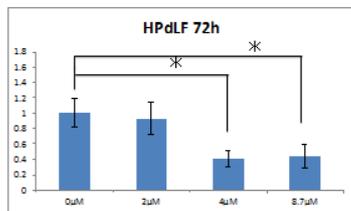
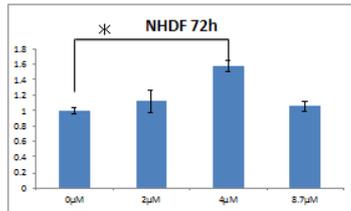
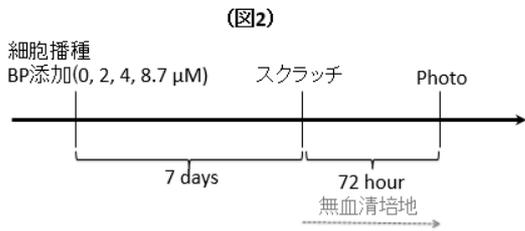
(1) BP 製剤による細胞増殖への影響

NHDF,HPdLF とともに濃度依存的に細胞増殖阻害を生じた。NHDF と比較し、HPdLF はより低い IC₅₀ を示した (図 1)。



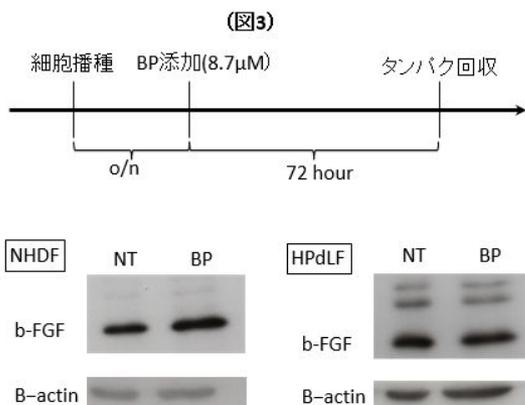
BP 製剤による遊走能への影響

HPdLF において 4 μ M 以上の濃度で処理した細胞の遊走率が NHDF 群と比較して低下した (図 2)。



n=12
* p<0.05

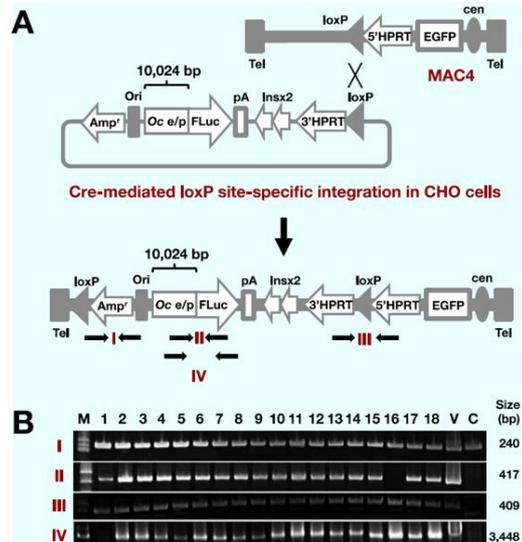
(2) BP 製剤による bFGF 発現への影響
NHDF と HPdLF の両細胞群においても、BP 製剤の処理による bFGF の発現の変化は認めなかった (図 3)。



結論：BP 製剤により線維芽細胞の増殖能および遊走能が抑制され、とりわけ口腔内線維芽細胞では皮膚線維芽細胞に比較して BP 製剤に対する感受性が高いことが示唆された。このことは BP 製剤使用患者で外科侵襲後の口腔内の創傷治癒遅延が生じる理由の一つとして考えられた。さらに今回の研究では BP 製剤は線維芽細胞における bFGF 発現には影響せず、BP 製剤の線維芽細胞増殖抑制に bFGF 発現量は関与してない可能性が示唆された。

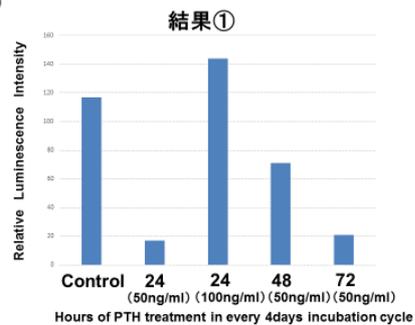
(3) 鳥取大学医学部細胞工学分野の協力の下に、人工染色体ベクター(MAC)を用いて、骨分化マーカーであるオステオカルシンを発光でモニター出来るヒト間葉系幹細胞を構築した (図 4) (Yonago Acta medica 2015;58:23-29)。

(図4)



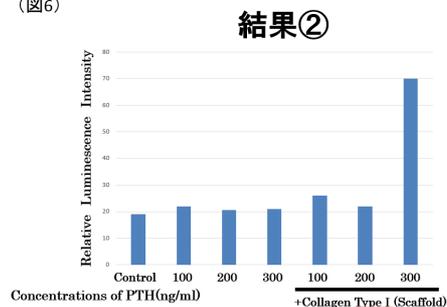
骨分化をモニター出来るヒト間葉系幹細胞を用いた PTH の投与における最適な骨分化条件 (投与濃度、投与間隔) については、100ng/ml, 4 日間隔が最も最適と考えられた (図 5、図 6)。

(図5)



PTHの間歇的投与条件によりOCの発現量の変化を認めた。

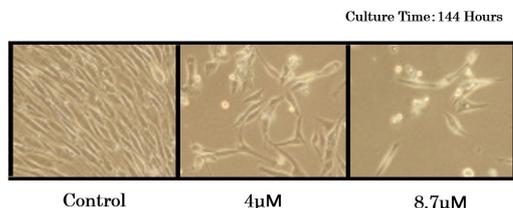
(図6)



PTHとCollagen Type I の併用によりOC発現量の増加を認めた。

上記骨分化をモニター出来るヒト間葉系幹細胞に BP 製剤 (アレンドロネート) を作用させると、濃度依存的に骨分化が抑制された (写真 1)。

(写真1)



アレンドロネート濃度依存的に細胞数の減少を認めた。

(4) マウスの骨芽細胞(MC3T3)とヒトの骨芽細胞(NHOst)の両細胞株に BP 製剤 (アレンドロネート) 添加培地で培養し、骨芽細胞成長に関するサイトカインについて検討した結果 BP 投与群では濃度依存性に M-CSF が減少し、オステオポンチンも減少した。RANKL は 3 倍増加し、BP は M-CSF を介する骨形成抑制効果が示唆された (表 1)。

(表1)

	HOB 2日培養		HOB11B	HOB31B	HOB51	HOB52	Osteo-100	MC3T3(3日培養)		
	PC1	PC2						IL-6	IL-17A	IL-33
IL-6(pg/ml)	229.5	264.6	40.1	34.7	0.7	1934.6	0.6	0.7	1.0	0.8
IL-17A(pg/ml)	10.7	10.1	10.1	9.5	-	-	-	-	-	-
IL-33(pg/ml)	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-
M-CSF(pg/ml)	450.3	706.7	49.3	62.8	141.5	421.4	141.5	162.7	149.0	96.4
P-Selectin(pg/ml)	23.9	19.0	10.1	2.1	-	-	-	-	-	-
IL-33(pg/ml)	-	-	-	-	2.4	3.9	2.4	2.2	2.2	2.4
Osteopontin(pg/ml)	7199.4	8551.5	2132.8	2150.4	1.8	11477.3	-	382.5	386.3	375.9
IL-34(pg/ml)	59.6	54.7	34.7	34.7	109.9	165.7	100.0	102.7	76.0	110.0
TRANCE/RANK L(pg/ml)	7.9	6.8	4.7	3.7	1.0	2.1	1.0	1.0	2.1	3.2
Osteonectin(pg/ml)	21022.3	16964.4	8029.0	9309.5	924.7	7181.5	301.4	2901.2	2125.9	2528.9
TNF- α (pg/ml)	353.1	388.5	59.1	66.0	-	764.8	-	-	-	-

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 4 件)

Satoshi Yokogi, Toshiaki Tsubota, Keita Kanki, Junya Azumi, Noriko Itaba, Hiroyuki Oka, Minoru Morimoto, Kazuo Ryoke and Goshi Shiota
Wnt/Beta-Catenin Signal Inhibitor HC-1 Sensitizes Oral Squamous Cell Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil through Reduction of CD44-Positive Population
Yonago Acta medica, 59(2), 93-99, 2016
査読有

Kazuhiro Tohashi, Motoki Nakabayashi, Isamu Kodani, Kazunori Kidani and Kazuo Ryoke
Associations between Systemic Markers of Bone Turnover or Bone Mineral Density and Anti-Resorptive Agent-Related Osteonecrosis of the Jaw in Patients Treated with Anti-Resorptive Agents
Yonago Acta medica, 59(1), 45-53, 2016
査読有

Sachiyo Nishio, Takahito Ohira, Naohiro Sunamura, Mitsuo Oshimura, Kazuo Ryoke, Hiroyuki Kugoh
Repression of hTERT transcription by the introduction of chromosome 3 into human oral squamous cell carcinoma
Biochemical and Biophysical Research Communications, 466(4), 755-759, 2015
査読有

Takashi Narai, Motonobu Katoh, Toshiaki Inoue, Makoto Taniguchi, Kanako Kazuki, Yasuhiro Kazuki, Kenzo Sato, Isamu Kodani, Kazuo Ryoke and Mitsuo Oshimura
Construction of a Luciferase Reporter System to Monitor Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Using a Mammalian Artificial Chromosome Vector
Yonago Acta medica, 58(1), 23-29, 2015
査読有

[学会発表] (計 12 件)

奈良井節, 加藤基伸, 井上敏昭, 小谷勇, 押村光雄, 領家和男, 副甲状腺ホルモン投与によるヒト間葉系幹細胞の骨分化への影響 (6)) 第 46 回 (公社) 日本口腔外科学会中国四国支部学術集会、2017.5.27、YIC スタジオ (山口県山口市)

谷口奈緒美, 領家和男, 奈良井節, 田村隆行, 土井理恵子, 小谷勇, 口腔線維芽細胞に対するビスフォスフォネート製剤の影響について (2-P-3) 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2017.4.26~28、ひめぎんホール (愛媛県県民文化会館) (愛媛県松山市)

奈良井節, 加藤基伸, 井上敏昭, 小谷勇, 押村光雄, 領家和男, ヒト間葉系幹細胞における副甲状腺ホルモンの間歇的投与による最適な骨形成条件の検索 (O-01-6) 第 16 回日本再生医療学会総会、2017.3.7~9、仙台国際センター (宮城県仙台市)

岡本秀治, 澤田彩子, 井東朗子, 加須屋浩, 横木智, 奈良井節, 中林基, 土井理恵子, 領家和男, ビスフォスフォネートおよびデノスマブによる Medication Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) について (8)) 第 35 回鳥取県西部歯科臨床懇談会、2016.2.21、鳥取県西部歯科医師会館 (鳥取県米子市)

奈良井節, 加藤基伸, 小谷勇, 押村光雄, 領家和男, 人工染色体ベクターを利用した骨分化をモニター可能なヒト間葉系幹細胞株の樹立 (1)) 第 21 回山陰口腔疾患研究会、2015.12.12、米子ワシントンホテル

ルプラザ(鳥取県米子市)

横木智, 小谷勇, 土井理恵子, 領家和男、
ヒト口腔扁平上皮癌細胞における
Wnt/ β -catenin シグナル抑制性低分子化
合物の抗腫瘍効果(4.) 第14回中国四国
口腔癌研究会、2015.11.7、Junko
Fukutake hall(岡山大学鹿田キャンパス
内)(岡山県岡山市)

岡本秀治, 岡本充浩, 廣田健太郎, 中林基,
土井理恵子, 小谷勇, 領家和男、ビスフォ
スフォネート関連顎骨壊死に対し PTH 療
法を行った4例(2-C-14) 第69回 NPO
法人日本口腔科学会学術集会、2015.5.13
~15、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

中林基, 小谷勇, 土井理恵子, 本城正, 田
村隆行, 岡本秀治, 領家和男、BRONJ に
対する外科療法の予後と局所の骨密度と
の関係(33) 第44回(公社)日本口腔外
科学会中国四国支部学術集会、2015.4.18、
香川県歯科医療専門学校7階8020ホール
(香川県高松市)

奈良井節, 加藤基伸, 小谷勇, 押村光雄,
領家和男、骨分化をモニターできるヒト間
葉系幹細胞株の樹立(O-23-1) 第14回日
本再生医療学会、2015.3.19~21、パシフ
ィコ横浜(神奈川県横浜市)

奈良井節, 加藤基伸, 小谷勇, 押村光雄,
領家和男、骨分化をモニターできるヒト間
葉系幹細胞株を利用した骨再生因子の検
索(16) 第62回 NPO 法人日本口腔科学
会中国・四国地方部会、2014.10.25、徳島
大学歯学部大講堂(徳島県徳島市)

奈良井節, 小谷勇, 領家和男、骨分化をモニ
ターできるヒト間葉系幹細胞株の樹立(1-
P1.3-3) 第59回(公社)日本口腔外科
学会総会・学術集会、2014.10.17~19、幕
張メッセ 国際会議場・国際展示場(千葉
県千葉市)

奈良井節, 加藤基伸, 押村光雄, 小谷勇,
領家和男、骨分化をモニターできる ヒト
間葉系幹細胞株の樹立(2-E-2) 第68回
NPO 法人日本口腔科学会学術集会、
2014.5.7~9、京王プラザホテル(東京都新
宿区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

領家 和男 (RYOKE, Kazuo)
鳥取大学・医学部・特任教授
研究者番号: 20093635

(2)研究分担者

山本 哲也 (YAMAMOTO, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 00200824

上山 吉哉 (UEYAMA, Yoshiya)
山口大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号: 00168668

萩野 浩 (HAGINO, Hiroshi)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号: 80208412

小谷 勇 (KODANI, Isamu)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号: 10294315

本城 正 (HONJO, Tadashi)
鳥取大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10379844