

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10285

研究課題名(和文)ビスフォスフォネートとカルシウム塩の結合体の粘膜為害性作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mucous membrane damaging effect of the complex of bisphosphonate and calcium salt

研究代表者

黒原 一人 (Kurohara, Kazuto)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90401364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ビスフォスフォネート(BP)骨細胞に作用して骨吸収を抑制する薬剤で、がんの骨転移および骨粗鬆症患者の治療に用いられている。頻度は少ないが顎骨壊死を生じるがその発生機序は明らかではない。本研究では、BPがカルシウム塩の存在下により上皮細胞毒性の増強が培養pH条件により影響されることを培養細胞とモデルマウスを用いて評価した。その結果、上皮細胞増殖、創部組織に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤関連顎骨壊死は治療に難渋する症例があり、社会的にも注目されている。薬剤関連顎骨壊死の発生機序や条件については明らかにされておらず、治療方法は確立されていない。本研究成果は、薬剤関連顎骨壊死の発生条件もしくは増悪条件を検討する際に寄与する情報であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Bisphosphonate (BP), a drug that acts on bone cells to suppress bone resorption, is used to treat patients with bone metastasis of cancer and osteoporosis. Although it occurs less frequently, it causes osteonecrosis of the jaw, but the mechanism of its occurrence is not clear. In this study, we evaluated that the enhancement of epithelial cytotoxicity of BP in the presence of calcium salt was affected by the culture pH conditions using cultured cells and model mice. As a result, it was suggested that it affects epithelial cell proliferation and wound tissue.

研究分野：歯科口腔

キーワード：ビスフォスフォネート BRONJ 粘膜為害性 カルシウム塩

1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート (BP) は破骨細胞に作用して骨吸収を抑制する薬剤で、がんの骨転移および骨粗鬆症患者の治療に用いられている。Marx により頻度は低い、難治性の顎骨壊死 (BP-Related Osteonecrosis of the Jaw, BRONJ) が発生することが報告された。その病態に関しては完全に解明されておらず、BP の使用による、骨代謝の障害、粘膜への為害性、循環障害、免疫の障害などが病因として考えられている。BRONJ が特に顎骨に生じていることから解剖学的、細菌学的特徴が BRONJ の発生に關与していると考えられている。例えば、顎骨を被覆する口腔粘膜は薄いため、粘膜傷害による感染はその直下の顎骨に容易に波及する、歯垢中に 800 種類以上、 $10^{11} \sim 10^{12}$ 個/cm³ の常在細菌が存在することなどが特徴としてあげられる。

研究分担者らにより、BP の粘膜への為害性に着目し、BP がカルシウム併存下で培養上皮細胞に増殖抑制・アポトーシス誘導を起こすことが明らかにされてきた。本研究では BRONJ はどのような機序で発症するかといった問いに対して、BP と Ca 塩の協調作用の面からアプローチすることにした。

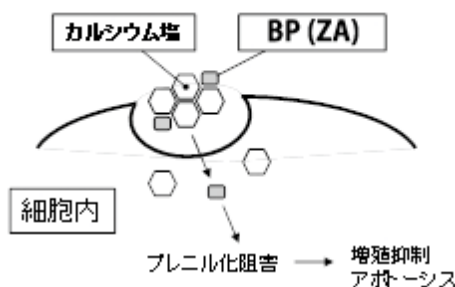


図1 BPとCa塩の協調作用概念図

2. 研究の目的

BRONJ はどのような機序で発症するかを解明するために、BP と Ca 塩の協調作用の面からとらえ、本研究の目的として、BP の上皮細胞毒性が Ca 塩併存下で増強するメカニズムの解明することと設定した。

3. 研究の方法

1) ビスフォスフォネート (BP) とカルシウム (Ca) の協調作用の作用機序の解明

リン酸カルシウムは、遺伝子導入やドラッグデリバリーに用いられるなど細胞内に移行しやすい性質がある。そこで、わたしたちは、『Ca 濃度の上昇に伴い細胞外で微細なリン酸カルシウム塩が形成され、これに BP が結合して細胞内に運搬されることで、BP の細胞内への取り込みが上昇するのではないか (図1)』と仮説を立てた。この仮説を以下の2つの方法で検証する。

- (1) 同じ濃度の Ca 溶液であっても、リン酸カルシウムはアルカリ環境で形成されやすいので、培養実験系を用いて、異なる pH の Ca 溶液が細胞に与える影響を調べ、リン酸カルシウム塩の形成と BP の作用増強との関係を明らかにする。
- (2) 協調作用に Ca 塩の形成が重要であれば、Ca 溶液の代わりにリン酸カルシウム塩を加えても BP の作用増強が再現されることが考えられる。リン酸カルシウムの「ナノ粒子」を用いて協調作用の有無や程度を明らかにする。

【実験方法詳細】

(i). Ca 溶液の pH が協調作用に与える影響

まず、pH の条件を pH6.0~8.0 で数段階に調整したリン酸含有 DMEM 培地を用い 10 mM CaCl₂ 溶液を作製する。塩の形成 (析出) と pH の関係を確認する。析出したカルシウム塩がリン酸カルシウムであるかどうかは、リン酸非含有培地を用いて同様の実験を行い確認する。また、カルシウムキレート剤 (EDTA) にて塩の形成が阻害されるかどうかを解析する。

上記のように作製した 10 mM の CaCl₂ 溶液を、終濃度が 1.9~3.4 mM となるように 5%FBS 含有 DMEM 培地に加える (図2)。尚、DMEM 培地には最初から 1.8 mM の CaCl₂ が含まれている。この実験系を用いて、カルシウム塩の関与に関する下記の実験を行う。

a. ヒト表皮角化細胞由来細胞株 (HaCaT 細胞) を用いて、ZA (ゾメタ®, BP の一種) の濃度を 0.5 μM 以下に設定し、培地に種々の pH に調整した CaCl₂ 溶液を添加して、細胞増殖に与える影響を MTT 法にて解析する。ZA やカルシウムへの暴露時間は、24~72 時間とする。

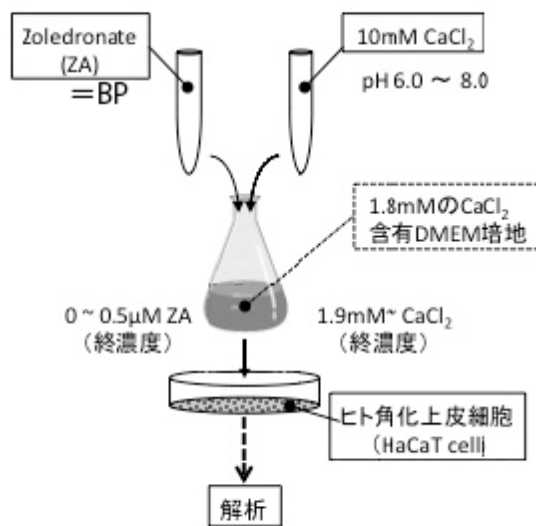


図2 培養細胞の実験系概念図

- b. アポトーシスへの影響を、Annexin-V/PI の二重染色によるフローサイトメトリーにて解析する。また、カルシウムの影響を強く受けるミトコンドリアの経路のアポトーシスを、ELISA 法によるチトクロム C 放出の測定、マイトキャプチャー法による膜電位の変化の測定、リアルタイム PCR やデジタル PCR およびウエスタンブロット法によるカスパーゼ 3, 9 や PARP の発現の解析にて評価する。
- c. Ras タンパク質は、細胞周期、細胞移動、老化、アポトーシスなどの多様な生体機能に關与するシグナル伝達経路に關連する低分子量グアノシントリホスファターゼ(GTP アーゼ)である。ゾレドロネートのような窒素含有ビスフォスフォネートの作用である small GTPase のプレニル化阻害作用の影響を見るために Ras 抗体を用いたウエスタンブロット法にて解析する。

(ii). リン酸カルシウムのナノ粒子の作用の検討

10 mM CaCl₂ 溶液(pH6.0~8.0)の代わりにリン酸カルシウムのナノ粒子を添加し、1.と同様の解析を行う。ナノ粒子には、焼成ハイドロキシアパタイト高分散性ナノ粒子 nano-SHAp (株式会社ソフセラ、平均粒径 20nm) を使用する。

2. 動物実験による協調作用のメカニズムの検証

BP 投与によるマウスの BRONJ モデルを用い、Ca 塩の存在が BRONJ の成立に影響を与えるかどうかを以下の方法で明らかにする。

- 1) 抜歯後に口腔内環境をアルカリ性に保ち、BRONJ の頻度や程度を検討する。
- 2) 粘膜下にリン酸カルシウムのナノ粒子の徐放材を移植し、粘膜に対する BP と Ca 塩の協調作用を *in vivo* で検討する。

【実験方法詳細】

生後 7~10 週のマウスに、ZA を眼窩静脈叢内投与する。1 週間後に全身麻酔と局所麻酔を併用し、第一大臼歯を抜歯する。抜歯窩治癒不全モデル(顎骨壊死モデル)を作製する。生食のみを投与した群を対照群とする。このマウスを用い、抜歯局所の pH やハイドロキシアパタイトナノ粒子の存在が BRONJ 発症に与える影響を調べる。抜歯創部の pH 環境は、抜歯後 3 日間飲料水の pH を 6.5~8.0 の間で変化させて調整する。ナノ粒子の影響は、nano-SHAp をコーゲンシートとともに抜歯窩もしくは近隣の粘膜下に移植し、ナノ粒子を徐放させる。顎骨壊死の発症時期や頻度、重症度について、肉眼的および X 線学的、組織学的に解析する。

4. 研究成果

(i). Ca 溶液の pH が協調作用に与える影響

塩化カルシウム(CaCl₂)を用いた培地 pH が塩の析出への影響を確認した。培地はもともと pH 緩衝作用がある。そのため、血清量などの条件も変更して培地 pH が塩の析出への影響を評価した。

ヒト表皮角化細胞由来細胞株(HaCaT 細胞)を用いて、pH 条件により ZA(ゾメタ®)と CaCl₂ 塩を添加した場合の、細胞増殖に与える影響を確認した。細胞増殖に影響を及ぼすことを示唆された。また、HaCaT 細胞を用いて pH 条件により ZA(ゾメタ®)と CaCl₂ 塩を添加した場合の、アポトーシスに与える影響を評価している。同様の条件で、窒素含有ビスフォスフォネートの作用である small GTPase のプレニル化阻害作用についても確認している。

(ii). 動物実験による協調作用のメカニズムの検証

BP 投与によるマウスの BRONJ モデルを用いて、抜歯後に口腔内環境をアルカリ性に保ち、BRONJ の頻度や程度を確認評価した。抜歯創部の組織標本を顕微鏡下に画像評価した。組織の異常を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	新井 直也 (Arai Naoya) (80323723)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	

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