

A study on the involvement of zoledronate in innate immunity via TLR4 signaling

村津, 大地
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/26338>

出版情報：九州大学，2012，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：



Zoledronate の TLR4 シグナルを介した
自然免疫への関与

A study on the involvement of zoledronate in innate immunity
via TLR4 signaling

2013 年

九州大学大学院歯学府歯学専攻
口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野

村津 大地

指導教員

九州大学大学院歯学研究院
口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野

中村 誠司 教授

本研究の一部は以下の学術雑誌に投稿中である。

Zoledronic acid enhance lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory reaction by
controlled SOCS1 expression in macrophages

Daichi Muratsu, Daigo Yoshiga, Takaharu Taketomi, Tomohiro Onimura,
Yoshihiro Seki, Akinobu Matumoto, and Seiji Nakamura

Submitted to PLoS ONE

2012 年 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会にて
「Zoledronate の TLR4 シグナルを介した自然免疫への関与」
として本研究の一部を発表し、優秀ポスター賞を受賞した。

略語一覧

ATP: adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)

α -MEM: alpha-minimum essential medium

BP: bisphosphonate (ビスフォスフォネート)

BrdU: bromodeoxyuridine

BRONJ: bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (ビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死)

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

ERK: extracellular regulated kinase

FBS: fetal bovine serum (ウシ胎児血清)

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HRP: horse radish peroxidase

IFN: Interferon

I κ B: inhibitor of kappa B

IL: interleukin

iNOS: inducible nitric oxide synthase

IRAK: IL-1 receptor-associated kinase (IL-1 受容体結合キナーゼ)

LPS: lipopolysaccharide (菌体外多糖)

mRNA: messenger ribonucleic acid

MyD88: myeloid differentiation factor 88

NBP: nitrogen-containing bisphosphonate (窒素含有ビスフォスフォネート)

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

NO: nitric oxide (一酸化窒素)

PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)

PBST: phosphate-buffered saline with TritonX-100

PI: propidium iodide (ヨウ化プロピジウム)

PGE: prostaglandin E

RANK: receptor activator of nuclear factor kappa-B

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate–polyachrylamide gelelectrophoresis

SOCS: suppressor of cytokine signaling

STAT: signal transduction and activator of transcription

TIR: toll-interleukin 1 receptor (Toll/IL-1 受容体)

TIRAP: TIR domain containing adaptor protein

TLR: toll-like receptor (Toll 様受容体)

TNF: tumor necrosis factor

TRAF: TNF receptor-associated factor

TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-deoxyuridine,
5'-Triphosphate biotin nick end labeling

WST: water soluble tetrazolium

ZOL: zoledronate (ゾレドロネート)

目 次

要旨	6
緒言	9
材料と方法	13
結果	21
研究 1 ZOL がマクロファージ、骨芽細胞、破骨細胞の TLR4 発現 に与える影響	
1-1 ZOL が C57BL/6J マウス由来破骨細胞の分化に与える影響	21
1-2 ZOL が各種細胞の TLR4 発現に与える影響	24
1-3 ZOL が SaOS-2 細胞の TLR4 発現に与える影響	26
研究 2 ZOL が RAW264.7 細胞の TLR4 シグナルに与える影響	
2-1 ZOL が LPS 刺激時の炎症性サイトカイン産生および 一酸化窒素産生に与える影響	27
2-2 ZOL が LPS 刺激時のアポトーシスに与える影響	32
2-3 ZOL が TLR4 シグナル伝達分子および抑制因子の発現に与える影響	35
研究 3 ZOL が RAW264.7 細胞の増殖活性に与える影響	37
考察	40
謝辞	45
参考文献	46

要 旨

ビスフォスフォネート (bisphosphonate: BP) 製剤は骨粗鬆症など骨の脆弱化を特徴とする疾患に対する有効な治療薬として用いられるが、重篤な副作用としてビスフォスフォネート関連顎骨壊死 (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: BRONJ) を生じる事例が報告されている。BRONJ 発症メカニズムの詳細は未だ不明であるが、その発症は顎骨に限定されており、さらに口腔内は細菌が豊富であるため、細菌感染に対する免疫系の関与も示唆され始めている。

一般に細菌に対する免疫反応が惹起されると、その初期段階で自然免疫が重要な働きをする。この自然免疫における代表的な受容体として Toll 様受容体 (toll-like receptors: TLRs) が知られている。本研究では、口腔内細菌に多いグラム陰性菌の菌体外多糖 (lipopolysaccharide: LPS) と、その受容体である TLR4 を介した炎症反応への BP の影響を明らかにするために、自然免疫の代表的細胞であるマクロファージを含む各種細胞に対する、窒素含有 BP であるゾレドロネート (zoledronate: ZOL) の影響を検討した。

研究 1 ZOL がマクロファージ、骨芽細胞、破骨細胞の TLR4 発現に与える影響

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 SaOS-2 細胞、C57BL/6J マウス由来マクロファージならびに破骨細胞を用いて、ZOL が TLR4 の発

現に与える影響を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて解析したところ、すべての細胞において発現を認めたが、ZOL 添加による TLR4 の発現量に変化は認めなかった。また、ZOL が破骨細胞の分化へ与える影響を tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色と RT-PCR 法にて解析したところ、ZOL 添加群において TRAP 陽性細胞数の減少と、細胞形態の変化を認め、さらに receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) の発現抑制を認めた。

研究 2 ZOL が RAW264.7 細胞の TLR4 シグナルに与える影響

RAW264.7 細胞を用いて、ZOL が TLR4 シグナルへ与える影響を解析した。炎症性サイトカイン (interleukin (IL)-1 β 、IL-6、TNF- α) と一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 合成酵素である inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現を RT-PCR にて解析したところ、ZOL 添加群において強い発現誘導を認めた。また、iNOS によって合成され、培地中に放出される NO を Griess 法にて測定したところ、ZOL 添加群において NO 産生の増加を認めた。さらに、ZOL 添加による細胞のアポトーシスを terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-deoxyuridine, 5'-Triphosphate biotin nick end labeling (TUNEL) 染色とフローサイトメトリー法にて解析したところ、ZOL 添加群においてアポトーシスの誘導の亢進を認めた。また、ZOL が TLR4 シグナル伝達分子および抑制因子へ与える影響をウェスタンブロット法にて解析したところ、ZOL 添加群において TLR4 シグナル抑制因子である suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 とその誘導分子である signal transduction and

activator of transcription (STAT) 1 の発現が減弱していた。また、ZOL 添加群において TLR4 シグナル伝達分子である myeloid differentiation factor 88 (MyD88) の発現が増強しており、LPS 刺激時の inhibitor of kappa B (I κ B)- α 活性化を認めた。

研究3 ZOL が RAW264.7 細胞の増殖活性に与える影響

RAW264.7 細胞を用いて ZOL が細胞増殖活性に与える影響を bromodeoxyuridine (BrdU) 染色と water soluble tetrazolium (WST)-8 法にて解析したところ、ZOL 添加群において細胞増殖活性の減少を認めた。

以上より、BP の影響を受けることで、細菌感染による TLR4 シグナルを介した炎症反応が増強され、BRONJ 発症における自然免疫の関与が示唆された。

緒 言

ビスフォスフォネート (bisphosphonate: BP) は、石灰化抑制作用を有する生体内物質であるピロリン酸の P-O-P 構造を、安定な P-C-P 構造に変えたものの総称である。この構造により、BP は骨のハイドロキシアパタイトに親和性を示し、血中に存在する BP のほとんどは骨に移行することが知られている [1]。この BP には窒素を含むタイプと含まないタイプの二種類があり、骨組織に付着した BP を破骨細胞が取り込むことによって、それぞれ異なる作用機序で破骨細胞をアポトーシスに誘導する [2, 3]。窒素含有 BP (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) は、細胞膜を作るタンパク質を結合させる際に必要となるメバロン酸経路を阻害することによってアポトーシスを誘導する [4, 5]。また、窒素非含有 BP は細胞の中で代謝され、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP) を機能しない形の分子に置き換え、細胞のエネルギー代謝の中で ATP を競合的に阻害してアポトーシスを誘導する。元来 BP は水道管の水垢取りに用いられていたが、1960 年代に Fleisch ら [6] が、BP の骨吸収抑制作用について報告して以降、臨床応用についての研究が進み、骨吸収亢進を呈する様々な骨代謝性疾患においてその有用性が報告され、現在では国内外のガイドラインにて骨粗鬆症治療薬の第一選択薬となっている。さらに癌領域においても、悪性腫瘍による高カルシウム血症、固形癌の骨転移や多発性骨髄腫における有用性が報告され [7, 8]、こちらも国内外のガイドラインで推奨される癌の支持療法となっている。それ以外でも、骨 Paget 病や小児骨形成不全といった疾患において

もその有用性が報告されており、BP は骨代謝異常疾患の治療には不可欠なものとなっている。

しかし、2003 年に重篤な副作用として、顎骨が壊死するビスフォスフォネート製剤関連顎骨壊死（bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: BRONJ）が報告されて以降 [9, 10]、BRONJ の発症報告は年々増加傾向にある。現在のところ、BP 投与を避ける以外の有効な予防法はなく、また一旦発症すると症状は進行性で、極めて難治性であるため、早急な対応が迫られている。BRONJ の発症のメカニズムとして、血管新生抑制 [11, 12] と破骨細胞のアポトーシスによる骨硬化 [13, 14] や創傷治癒遅延 [15]、さらに口腔内細菌の増殖や、細菌の骨面への接着亢進による細菌感染 [16] によって発症していると考えられているが、詳細は未だ不明である。また、BRONJ の発症は顎骨に限られており口腔内は細菌が豊富であることから、免疫系への関与も示唆され始めている [17]。

免疫は、病原体（細菌やウイルスなど）の侵入を察知し排除する生体防御システムで、基本的に生物が持つ異物や病原体に対する防御システムである非特異的な「自然免疫系」と、後天的に外界との関係で獲得していく特異的、多様な「獲得免疫系」から成り立っている。自然免疫応答において決定的な役割を果たす受容体として、Toll 様受容体 (toll-like receptors: TLRs) が知られており、微生物や毒性物質が生体内に侵入すると、病原体に関連した特有の分子パターンを認識する。TLRs は侵入した病原体に対する最初の防衛に関与するが、炎症反応の惹起や、免疫細胞の活性化においても重要な役割を果たしている。TLRs は 1980 年代にショウジョウバエで正常な発生に必要な

な遺伝子として発見された [18]。1997 年には哺乳類にも Toll 遺伝子と相同性の高い遺伝子が発見され、ほとんどの哺乳動物で 10 ～ 15 種類の TLRs が確認されており、ヒトでは 10 種類 (TLR1 ～ TLR10) が報告されている。TLRs は病原体のもつ特異的分子により活性化されて二量体を形成することで機能する。活性化された TLRs は、細胞内シグナル伝達経路を介して転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を活性化し [19]、Interferon (IFN)- α や IFN- β または interleukin (IL)-1、IL-6、IL-8、tumor necrosis factor (TNF)- α をはじめとして、他にも様々なサイトカインを誘導し炎症を惹起する (図 1)。

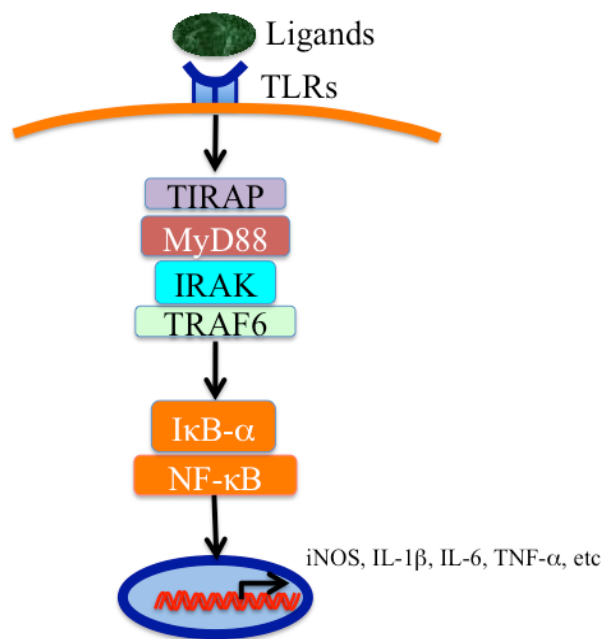


図 1 TLRs シグナル伝達

TLRs シグナル伝達経路の活性化は、細胞質側の Toll/IL-1 受容体 (TIR) ドメインから開始されるが、これは TIR アダプタータンパク質 (TIRAP) となり myeloid differentiation factor 88 (MyD 88) と結合する。リガンドの刺激を受けると直ちに、MyD 88 は IL-1 受容体結合キナーゼ (IRAK) を TLRs に呼び寄せる。リン酸化によって活性化された IRAK は、次に TNF receptor-associated factor (TRAF) 6 と結合し、最終的には NF- κ B の活性化に至る。

骨破壊をきたす炎症性疾患として、関節リウマチが知られている。関節リウマチにおける骨破壊の機序としては、マクロファージをはじめとした免疫担当細胞によって産生された炎症性サイトカインによる破骨細胞の分化誘導の促進、matrix metalloproteinase (MMP) やカテプシンなどの基質分解酵素による基質の分解、線維芽細胞増殖因子や血小板由来成長因子などの増殖因子による肉芽様滑膜形成の骨への直接侵入などが原因として考えられている。その中でも特に炎症性骨破壊においては破骨細胞の存在が必須であると考えられている [20-22]。

口腔内には様々な菌が定着しており、その種類は 350 ～ 700 種と言われ、様々な口腔内疾患の発症に関与している。慢性歯周炎は骨破壊を伴う疾患であり、その代表的な起因菌としてグラム陰性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* が知られている。グラム陰性菌の主な病原因子は菌体外多糖 (lipopolysaccharide: LPS) で、デンタルプラークが蓄積することによって、嫌気性菌であるグラム陰性菌が増加し、LPS も増加する。慢性歯周炎による骨吸収が起こっている部分では LPS によって活性化されたマクロファージを代表とする免疫担当細胞によって、持続的に炎症性サイトカインが産生されており、それに伴って骨を含む周囲組織の破壊が起こっている可能性が考えられている。

そこで本研究では、BRONJ 発症における自然免疫の関与に着目し、LPS の特異的受容体である TLR4 を介した炎症反応における BP の影響を明らかにするために以下の検討を行った。

材料と方法

1. 細胞培養と試薬

本研究では、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 SaOS-2 細胞、C57BL/6J マウス由来マクロファージならびに破骨細胞を用いた。培地には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose 1X (Sigma Aldrich 社, USA) もしくは α -minimum essential medium (α -MEM) (Sigma Aldrich 社, USA) に 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) (Sigma Aldrich 社, USA)、100 unit/ml のペニシリンおよびストレプトマイシン (penicillin/streptomycin: P/S) (Invitrogen 社, USA) を添加したものをい、37°C、5% CO₂ 存在下で細胞培養を行った。

NBP としてゾレドロンート (zoledronate: ZOL) (Toronto 社, Canada) を使用した。また、LPS (Sigma Aldrich 社, USA) として大腸菌由来のものを使用した。

2. RNA の抽出および complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) の合成

RNA の抽出にはフェノール・クロロホルム法を用いた。まず、RAW264.7 細胞、MC3T3-E1 細胞、SaOS-2 細胞、C57BL/6J マウス由来マクロファージならびに破骨細胞を Trizol[®] Reagent (Invitrogen 社, USA) を 1.0 ml 加え、セルスクレーパーにて破碎した。その後、これらに 0.2 ml のクロロホルム (Nacalai Tesque 社, Japan) を加えて攪拌し、4°C、12,000 rpm で 15 分間遠心

した後に RNA を含む水層を採取した。これに 0.5 ml の 2-プロパノール (Nacalai Tesque 社, *Japan*) を加えて攪拌後、4 °C、13,000 rpm で 10 分間遠心し上清を除去後に得られた RNA ペレットを 80% エタノール (Nacalai Tesque 社, *Japan*) で洗浄後乾燥させ、30 µl の 0.1% ジエチルピロカーボネート (diethyl pyrocarbonate: DEPC) (Sigma Aldrich 社, *USA*) 処理水に溶解した。その後、吸光度計 (NANO DROP 1000) (Thermo Scientific 社, *USA*) にて RNA の濃度を測定した。RNA 抽出後、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) にて cDNA を作製した。RT-PCR は、GeneAmp RNA PCR キット (Applied Biosystems 社, *USA*) を使用し、42°C: 15 分 (逆転写)、99 °C: 5 分 (熱変性)、5°C: 5 分 (冷却) の条件で行った。

3. RT-PCR 法

PCR には KOD Plus (TOYOBO 社, *Japan*) を用い、94°C: 2 分 (hot start 法による denature ステップ) を 1 サイクル行い、94°C: 30 秒 (denature ステップ)、58°C: 30 秒 (annealing ステップ)、68°C: 1 分 (extension ステップ) を 15 サイクル、94°C: 30 秒 (denature ステップ)、60°C: 30 秒 (annealing ステップ)、68°C: 1 分 (extension ステップ) を 15 サイクル行った。TLR4、receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプライマー配列は表 1 に示す。(F: センス、R: アンチセンス) なお、得られた PCR 産物を 3.0% アガロースゲル (Invitrogen 社, *USA*) 上で電気泳動を行い、臭化エチジウム溶液 (Nacalai Tesque 社, *Japan*) を用いて染色し、紫外線により可視化した。

表 1 RT-PCR のプライマーと反応条件			
抽出する mRNA		プライマーの塩基配列 (5'→3')	アニーリング温度 (°C)
<i>mouse TLR4</i>	F	CAAGAACATAGATCTGAGCTTCAACCC	58
	R	GCTGTCCAATAGGGAAGCTTTCTAGAG	58
<i>mouse RANK</i>	F	GTCTTCTGGAACCATCTTCTCC3	60
	R	CACAGACAAATGCAAACCTTG	60
<i>mouse GAPDH</i>	F	ACCACAGTCCATGCCATCAC	58
	R	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	58
<i>human TLR4</i>	F	GGTGGAAGTTGAACGAATGG	58
	R	CTGTCCTCCCACTCCAGGTA	58
<i>human GAPDH</i>	F	GGTCGGAGTCAACGGATTG	58
	R	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	60

4. リアルタイム RT-PCR 法

real-time RT-PCR は Brilliant SYBR[®] Green QPCR Reagents (STRATAGENE 社, USA) を用いて行った。熱変性は 95°C で 1 サイクル目が 10 分間、2 サイクル以降は 30 秒間で行った。アニーリングは 30 秒で行い、伸長反応は 72°C で 30 秒間とし、全て 40 サイクルの増幅を行った。*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*、*inducible nitric oxide synthase (iNOS)*、*GAPDH* のプライマー配列は表 2 に示す。

(F: センス、R: アンチセンス) 定量化には MxPro QPCR Software (STRATAGENE 社, USA) を用いた。各 messenger RNA (mRNA) の発現量は GAPDH mRNA を用いて補正し $\Delta\Delta CT$ 法により相対的発現量を算出した。

表 2 RT-PCR のプライマーと反応条件			
抽出する mRNA		プライマーの塩基配列 (5'→3')	アニーリング温度 (°C)
<i>mouse IL-1β</i>	F	CAGGATGAGGACATGAGCACC	60
	R	CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC	60
<i>mouse IL-6</i>	F	CCAGAGATACAAAGAAATGATGG	58
	R	ACTCCAGAAGACCAGAGGAAT	58
<i>mouse TNF-α</i>	F	GGGGCCACCACGCTCTTCTG	58
	R	GGCAGGGGCTCTTGACGGC	58
<i>mouse iNOS</i>	F	CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAG	60
	R	GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG	60
<i>mouse GAPDH</i>	F	CAATGCATCCTGCACCACCAA	58
	R	GTCATTGAGAGCAATGCCAGC	58

5. Griess 法

RAW264.7 細胞を 96 well plate に 1×10^3 cells/well に播種した。0、24 時間後に Griess Reagent Kit (DOJINDO 社, Japan) を用いて培地中の一酸化窒素 (nitric oxide: NO) を NO₂ に置換し、Labsystems Multiscan MS (Thermo Scientific 社, Germany) にて測定を行った。

6. terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-Deoxyuridine,

5'-Triphosphate biotin nick end labeling (TUNEL) 染色

RAW264.7 細胞を BD Falcon カルチャースライド (Becton Dickinson 社, USA) に 1×10^3 cells/well 播種した。In situ Cell Death Detection Kit (Roche applied science 社, Swiss) を用いてアポトーシス細胞を染色した。その後、Hoechst にて核染色し、水性封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium, Vector

Laboratories 社, *USA*) にて封入を行い、BIOREVO (対物レンズ × 20) (KEYENCE 社, *Japan*) を用いて観察を行った。また、試料上の範囲を無作為に 5 視野選択して、TUNEL 陽性細胞数を計測し、それらを Hoechst 陽性細胞数で除したものを TUNEL 陽性細胞率として算出した。

7. フローサイトメトリー法

RAW264.7 細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells/well に播種した。0、24、48、72 時間後に回収し、Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Becton Dickinson 社, *USA*) で細胞に染色を行い、FACS Verse™ (BD Biosciences 社, *USA*) を用いて測定した。

8. water soluble tetrazolium (WST) -8 法

RAW264.7 細胞を 96 well plate に 1×10^3 cells/well に播種した。0、24、48、72 時間後に回収し、WST-8 生細胞数検出キット (Nacalai Tesque 社, *Japan*) を用いた。その後、WST-8 が細胞内脱水素酵素により還元されて生じた水溶性ホルマザン色素をマイクロプレートリーダー (Thermo Scientific 社, *USA*) にて測定した。

9. 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 染色

RAW264.7 細胞を BD Falcon カルチャースライド (Becton Dickinson 社, *USA*) に 1×10^3 cells/well 播種した。5-Bromo-2'-deoxyuridine Labeling and Detection Kit 1 (Roche applied science 社, *Swiss*) を用いてアポトーシス細胞を

染色した。その後、ヨウ化プロピジウム (propidium iodide: PI) 含有水性封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium with PI, Vector) (Laboratories 社, USA) にて核染色および封入を行い BIOREVO (対物レンズ × 20) (KEYENCE 社, Japan) を用いて観察を行った。また、試料上の範囲を無作為に 5 視野選択して、BrdU 陽性細胞数を計測し、それらを PI 陽性細胞数で除したものを BrdU 陽性細胞率として算出した。

10. ウェスタンブロット法

RAW264.7 細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells/well に播種した。溶解溶液 (40 μ M Hepes、150 μ M 塩化ナトリウム、0.5% ノニテッド P-40、1 μ M EDTA、1 μ M バナデート、50 μ M フッ化ナトリウム、1 μ M ジチオスレイトール、100 μ M ピロリン酸ナトリウム、10% グリセリン) を用いて細胞からタンパク質を抽出し、吸光度測定にて濃度定量後、1 レーン当たり総タンパク質量が 75 μ g になるようにして、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) を行った (30 mA、3 時間)。その後、タンパク質成分を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore 社, USA) に転写 (200 mA、2 時間) し、抗体の非特異的結合を防ぐために、10% スキムミルク/PBS 中で室温にて 30 分間ブロッキングを行った。次に、1 次抗体を 4°C にて 24 時間反応させた。使用した一次抗体を表 3 に示す。次に、phosphate-buffered saline with TritonX-100 (PBST) で 15 分 × 2 回洗浄後、2 次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG (Jackson Immuno-Research Laboratories 社, USA) または、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗ネズミ IgG (Jackson Immuno-Research Laboratories 社,

USA) を用い、室温で 30 分間反応させた。その後、PBST で 15 分 × 4 回洗淨し、Super signal (PIERCE 社, USA) で発色させて X 線フィルム (Fuji Film 社, Japan) 上で検出した。

表 3 ウエスタンブロット法で使用した一次抗体	
抗体 (製造会社, 国)	希釈倍率
Polyclonal rabbit anti-mouse IκB-α antibody (Cell Signaling Technology 社, USA)	1 : 1000
Monoclonal mouse anti-mouse Phospho IκB-α antibody (Cell Signaling Technology 社, USA)	1 : 1000
Polyclonal rabbit anti-mouse STAT1 antibody (Cell Signaling Technology 社, USA)	1 : 1000
Polyclonal rabbit anti-mouse SOCS1 antibody (abcam社, USA)	1 : 1000
Polyclonal rabbit anti-mouse MyD88 antibody (abcam 社, USA)	1 : 1000
Polyclonal rabbit anti-mouse ERK-2 antibody (SantaCruz Biotechnology社, USA)	1 : 1000

11. マウス骨髄からのマクロファージおよび破骨細胞の分化誘導

C57BL/6J マウスの大腿骨と脛骨から骨髄を採取し、10% FBS α-MEM を用いて洗淨後、 2×10^6 cells/ml で 5 cm dish に播種した。24 時間 5% CO₂、37°C インキュベーターで予備培養を行った後、浮遊細胞を含む上清を回収し、室温、2,000 rpm、10 分間行い 10% FBS α-MEM を用いて洗淨した。 2×10^6 cells/ml で 5 cm dish に播種し、macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) (10 ng/ml) (PeproTech 社, UK) 添加して 3 日間培養を行い、マクロファージを誘導した。その後、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) (50 ng/ml) (PeproTech 社, UK) + M-CSF (10 ng/ml) 含有 10% FBS α-MEM に培地交換を行い、3 日間培養して破骨細胞に分化させた。

12. tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色

破骨細胞を 24 well plate で培養し分化誘導させた。培養上清を除去後に Leukocyte acid phosphatase kit (Sigma-Aldrich 社, *USA*) を用いて破骨細胞の染色を行い、BIOREVO (対物レンズ × 20) (KEYENCE 社, *Japan*) を用いて観察した。

13. 統計学的処理

統計処理には Mann-Whitney の U 検定を用い、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

結 果

研究 1 ZOL がマクロファージ、骨芽細胞、破骨細胞の TLR4 発現に与える影響

1-1 ZOL が C57BL/6J マウス由来破骨細胞の分化に与える影響

C57BL/6J マウスの大腿骨と脛骨から骨髓を採取し、M-CSF (10 μ g/ml) を用いてマクロファージへ誘導した。そこに、RANKL (50 μ g/ml) + M-CSF (10 μ g/ml) 含有 10% FBS α -MEM に培地交換を行い、48 時間培養後に ZOL (10 μ M) を追加投与し 24 時間培養を行った。

この培養細胞を用いて TRAP 染色を行ったところ、TRAP 陽性で数個の核を有する多核巨細胞を認めたが、ZOL 添加群ではコントロール群と比較して、プレート上の TRAP 陽性細胞数が減少しており、細胞形態にも変化を認めた (図 2)。破骨細胞への分化の過程で誘導される RANK の発現を RT-PCR 法で解析したところ、コントロール群において RANK の発現を認めたが、ZOL 添加群では RANK の発現は減弱していた。また、マクロファージにおいて ZOL 添加の有無に関わらず RANK の発現を認めなかった (図 3)。

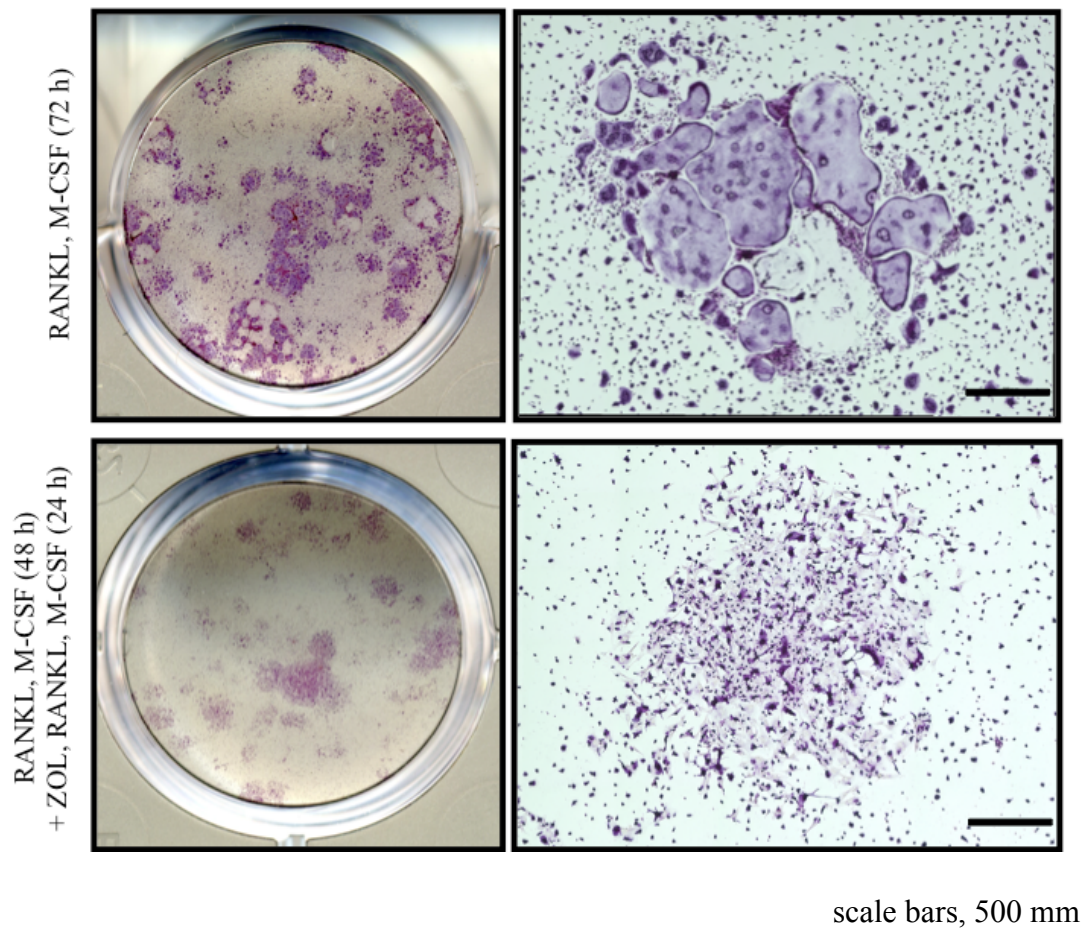


図 2 ZOL が破骨細胞の分化誘導に与える影響

C57BL/6J マウスの大腿骨と脛骨から骨髓を採取し、24 時間 5% CO₂、37°C インキュベーターで予備培養を行った。その後、浮遊細胞を含む上清を回収し、M-CSF 添加して 3 日間培養を行い、マクロファージを誘導した。そこに、RANKL + M-CSF 含有 10% FBS α -MEM に培地交換を行い、48 時間培養後に ZOL (10 μ M) を追加投与し 24 時間培養を行った。TRAP 染色を行ったところ、TRAP 陽性で数個の核を有する多核巨細胞を認めたが、コントロール群と比較して、プレート上の TRAP 陽性細胞数が減少しており、また、細胞形態にも変化を認めた。

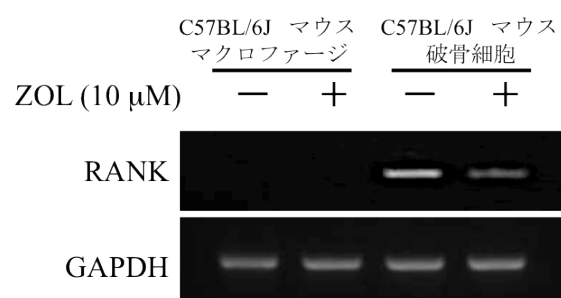


図 3 ZOL が破骨細胞特異的因子の発現に与える影響

破骨細胞のコントロール群において RANK の発現を認めたが、ZOL (10 μ M) 添加群における RANK の発現は減少していた。また、マクロファージでは ZOL (10 μ M) 添加の有無に関わらず RANK の発現を認めなかった

1-2 ZOL が各種細胞の TLR4 発現に与える影響

RAW264.7 細胞、MC3T3-E1 細胞、C57BL/6J マウス由来マクロファージおよび破骨細胞における TLR4 の発現を RT-PCR 法にて解析した。まず、ZOL (0 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、 1 、 $10\ \mu\text{M}$) 添加 24 時間後の RAW264.7 細胞と MC3T3-E1 細胞の TLR4 の発現を解析したところ、両細胞ともに発現を認めたが、ZOL 添加による TLR4 の発現量に変化は認めなかった (図 4)。ZOL ($10\ \mu\text{M}$) 添加 24 時間後の C57BL/6J マウス由来マクロファージおよび破骨細胞の TLR4 の発現を解析したところ、両細胞において発現を認めたが、ZOL 添加による TLR4 の発現量の変化は認めなかった (図 5)。

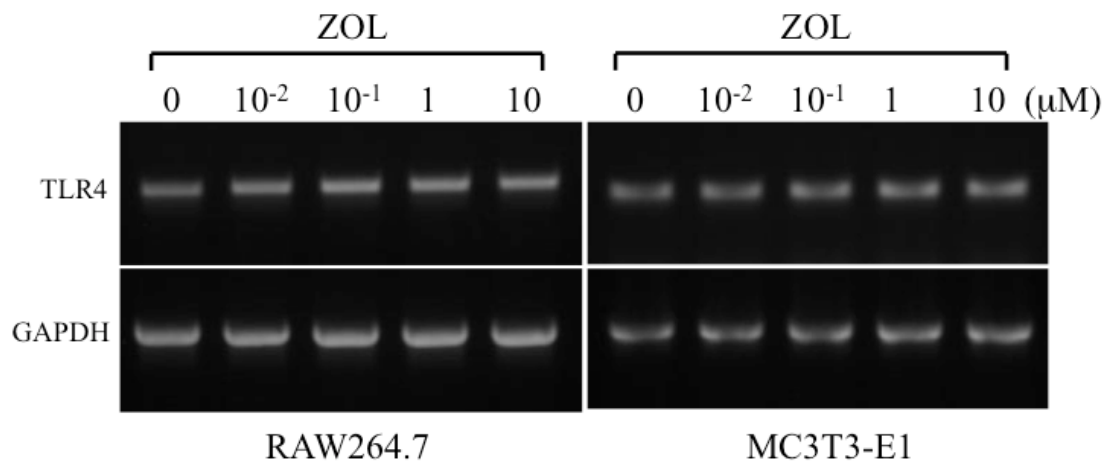


図 4 ZOL が RAW264.7 細胞、MC3T3-E1 細胞の TLR4 発現に与える影響

RAW264.7 細胞、MC3T3-E1 細胞ともに TLR4 の発現を認めたが、ZOL (0、10⁻²、10⁻¹、1、10 μM) 添加による発現量の変化は認めなかった。

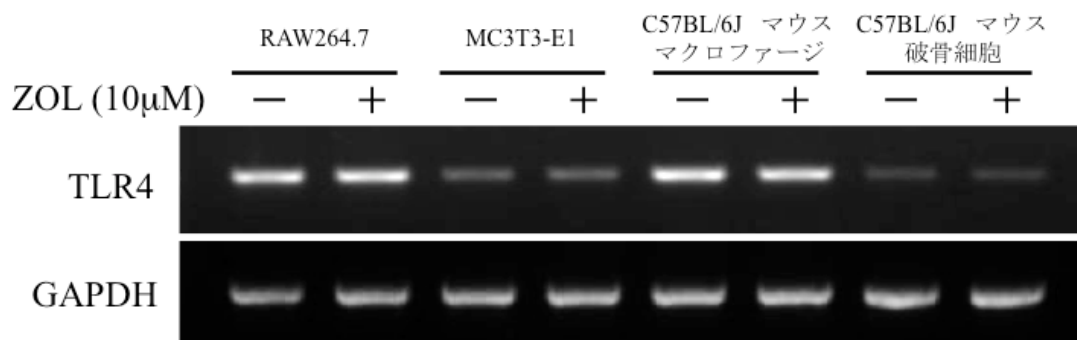


図 5 ZOL が RAW264.7 細胞、MC3T3-E1 細胞、C57BL/6J マウス由来マクロファージおよび破骨細胞の TLR4 発現に与える影響

RAW264.7 細胞、MC3T3-E1 細胞、C57BL/6J マウス由来マクロファージおよび破骨細胞において TLR4 の発現を認めたが、すべての細胞において ZOL (10μM) 添加による発現量の変化は認めなかった。

1-3 ZOL が SaOS-2 細胞の TLR4 発現に与える影響

SaOS-2 細胞における、ZOL (0、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10 μ M) 添加 24 時間後の TLR4 の発現を RT-PCR 法にて解析したところ、SaOS-2 細胞において TLR4 の発現を認めたが、ZOL 添加による TLR4 の発現量の変化は認めなかった (図 6)。

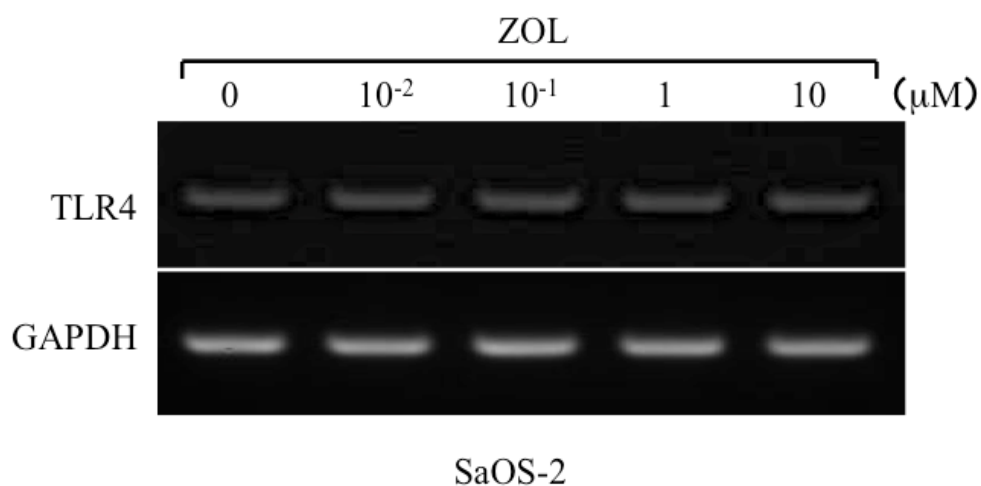


図 6 ZOL が SaOS-2 細胞の TLR4 の発現に与える影響

SaOS-2 細胞において TLR4 の発現を認めたが、ZOL (0、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10 μ M) 添加による TLR4 の発現量の変化は認めなかった。

研究 2 ZOL が RAW264.7 細胞の TLR4 シグナルに与える影響

2-1 ZOL が LPS 刺激時の炎症性サイトカイン産生および一酸化窒素産生に与える影響

RAW264.7 細胞における炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) と NO 合成酵素である iNOS の発現を、リアルタイム RT-PCR 法にて解析した。また、培地中の NO 産生量を Griess 法にて測定した。まず、ZOL (0、10⁻²、10⁻¹、1、10 μ M) 添加 24 時間後に LPS (100 ng/ml) 刺激を 6 時間行ったら、ZOL 濃度依存的に炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) の発現誘導の亢進を認めた (図 7)。iNOS においても ZOL 濃度依存的に発現誘導の亢進を認めた (図 8A)。さらに、NO 産生量を測定するために ZOL (0、10⁻²、10⁻¹、1、10 μ M) 添加 24 時間後に LPS (100 ng/ml) 刺激を 24 時間行ったら、ZOL 濃度依存的に NO 産生量の増加を認めた (図 8B)。

次に ZOL (10 μ M) 添加 24 時間後に、LPS (100 ng/ml) 刺激 (0、1、2、4、6 時間) を行ったら、ZOL 添加群において炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) の発現誘導の亢進を認めた (図 9)。iNOS においても同様に ZOL 添加群において発現誘導の亢進を認めた (図 10A)。さらに NO 産生量を測定するために ZOL (10 μ M) 添加 24 時間後に LPS (100 ng/ml) 刺激を 24 時間行ったら、ZOL 添加群において産生量の増加を認めた (図 10B)。

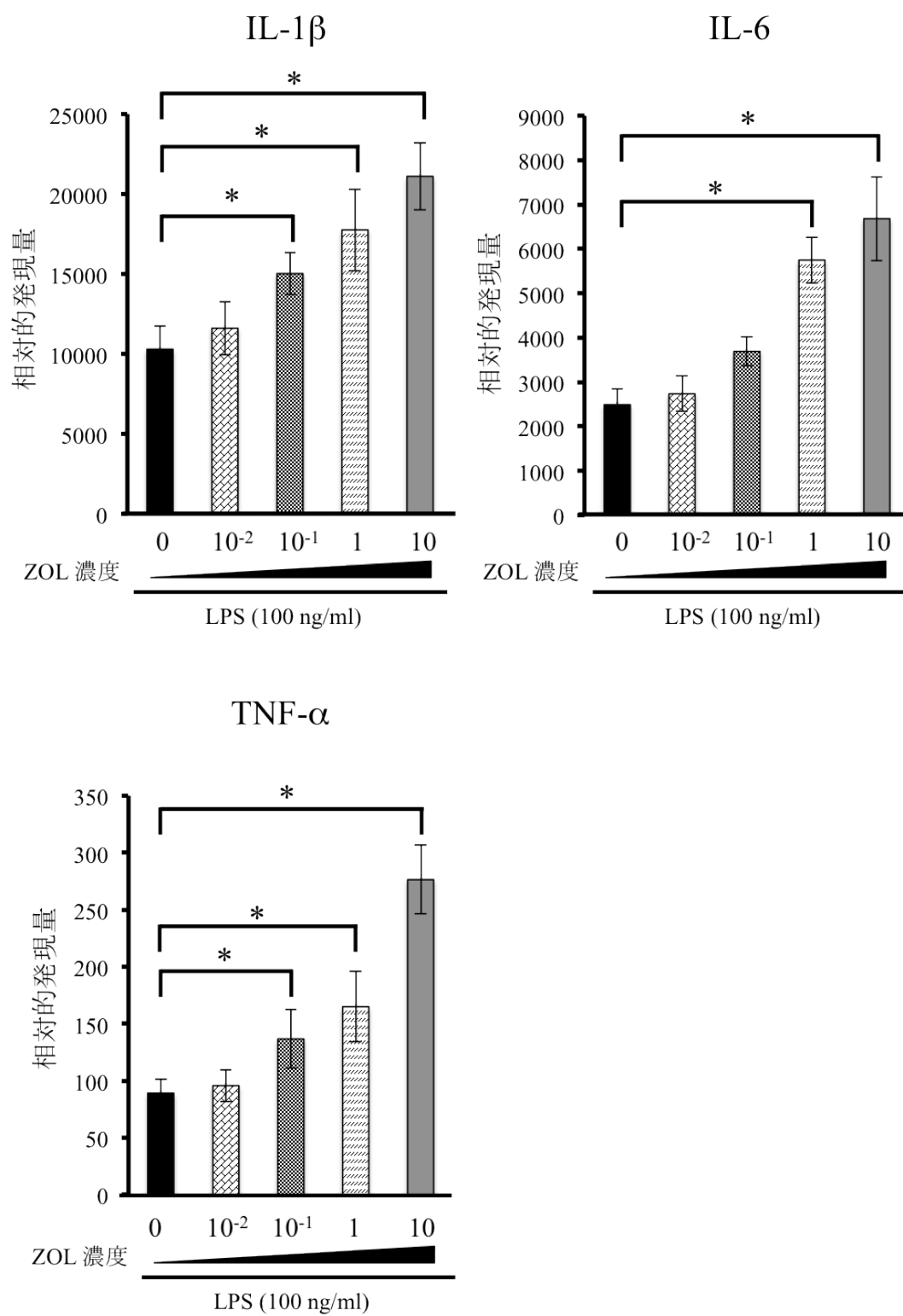


図 7 ZOL が RAW264.7 細胞における炎症性サイトカイン産生に与える影響

ZOL (0、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10 μM) 濃度依存的に IL-1 β 、IL-6、TNF- α の発現誘導の亢進を認めた。(Mann-Whitney U-test * $p < 0.05$)

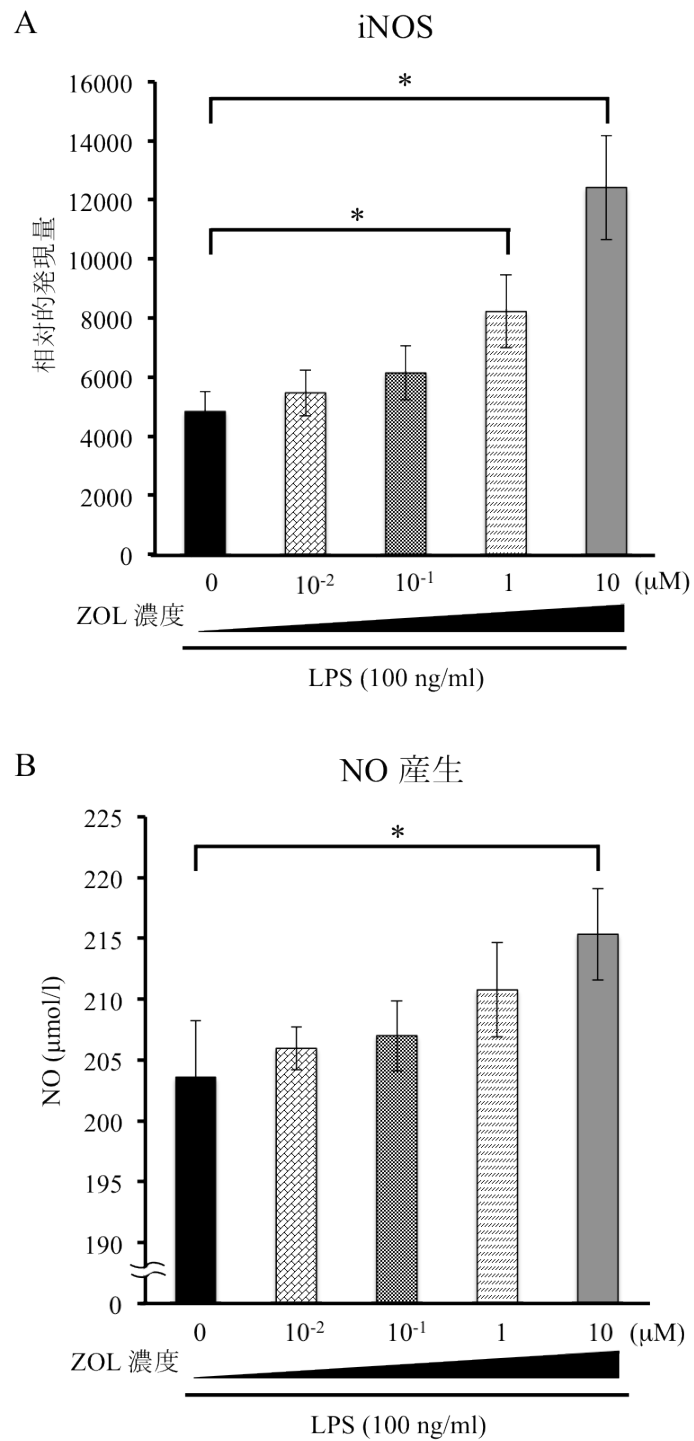


図 8 ZOL が RAW264.7 細胞における iNOS の発現と NO 産生に与える影響
 ZOL (0、10⁻²、10⁻¹、1、10 μM) 濃度依存的に iNOS の発現誘導の亢進を認めた (A)。
 LPS (100 ng/ml) 刺激時の培地中の NO は ZOL (0、10⁻²、10⁻¹、1、10 μM) 濃度依存的に産生量の増加を認めた (B)。(Mann-Whitney U-test * $p < 0.05$)

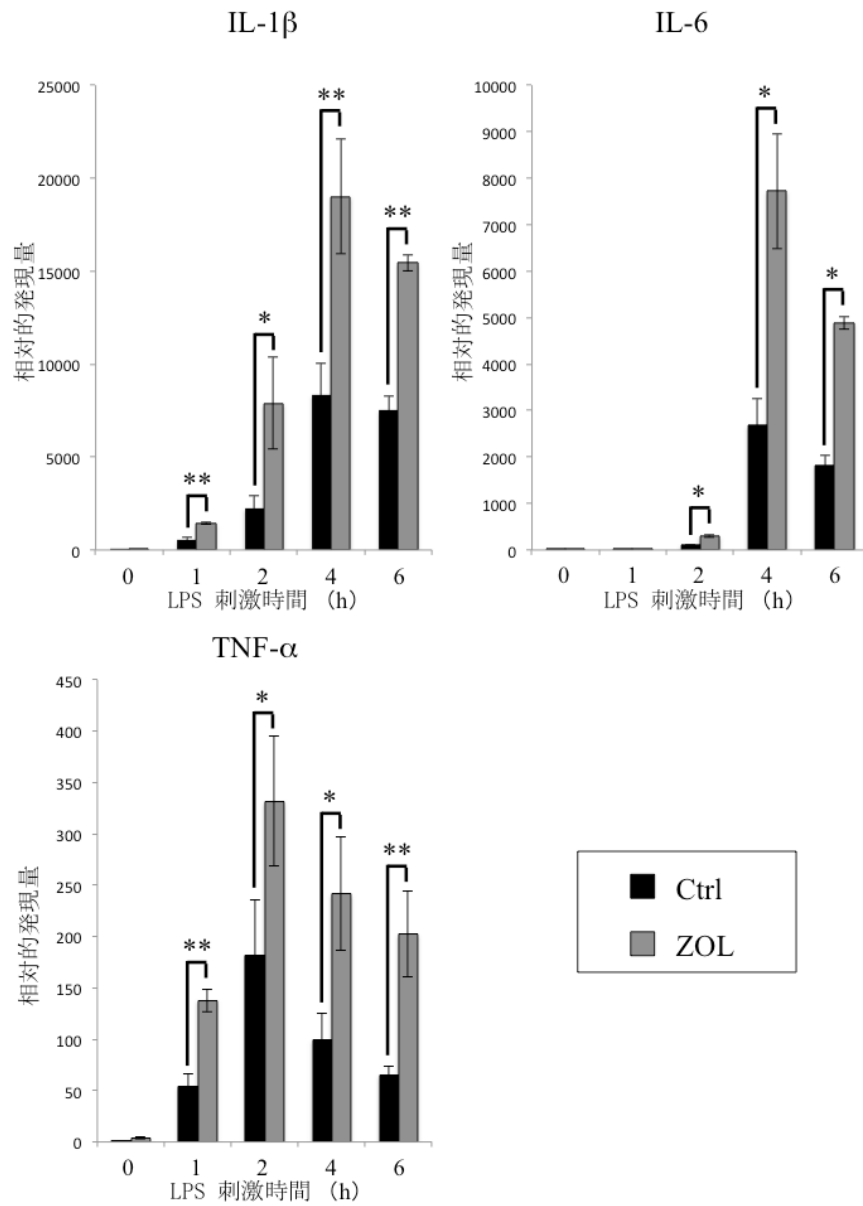


図 9 ZOL が RAW264.7 細胞における炎症性サイトカイン産生に与える影響

ZOL (10 μ M) 添加群において IL-1 β 、IL-6、TNF- α の発現誘導の亢進を認めた。
(Mann-Whitney U-test * p < 0.05, ** p < 0.01)

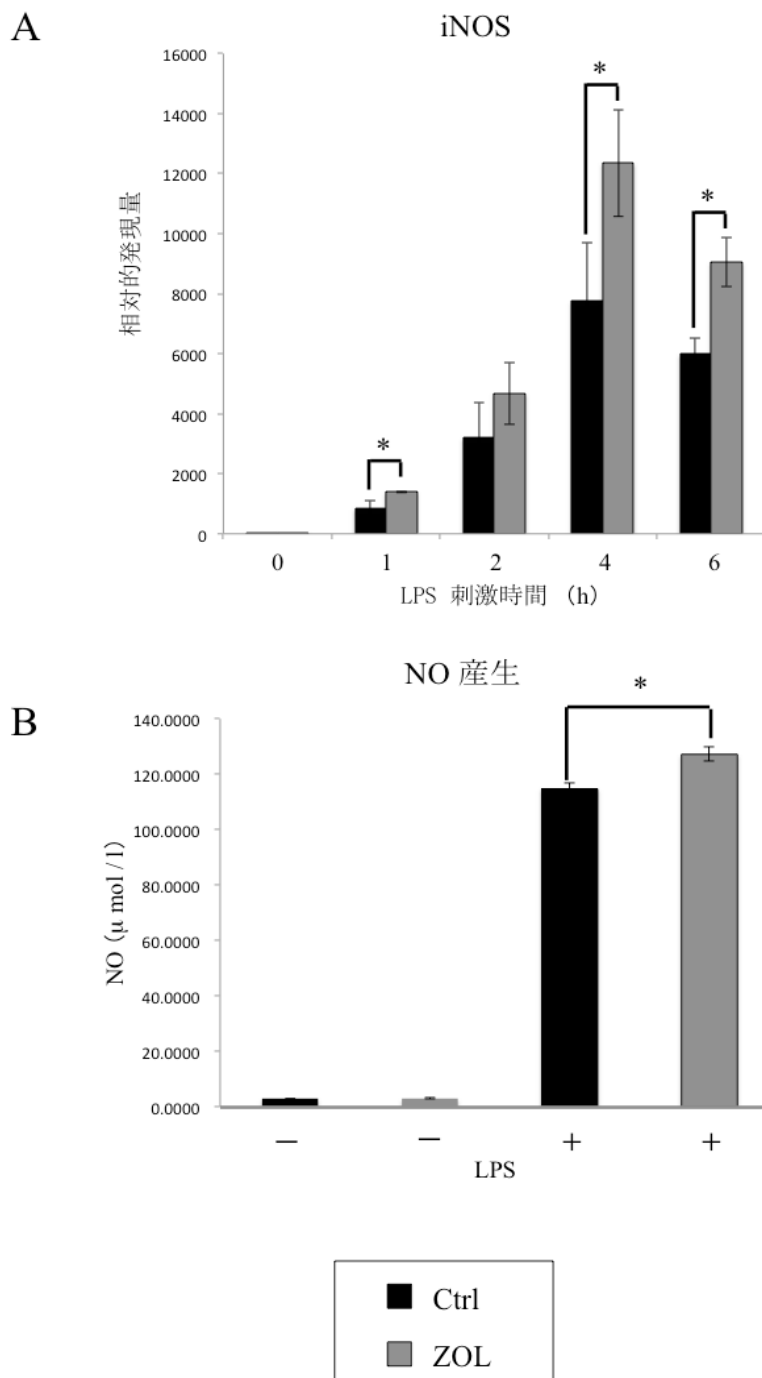


図 10 ZOL が RAW264.7 細胞における iNOS の発現と NO 産生に与える影響

ZOL (10 μM) 添加群において iNOS の発現誘導の亢進を認めた (A)。LPS (100 ng/ml) 刺激時の培地中の NO は ZOL (10 μM) 添加群において産生量の増加を認めた (B)。(Mann-Whitney U-test $*p < 0.05$)

2-2 ZOL が LPS 刺激時のアポトーシスに与える影響

LPS 刺激による RAW264.7 細胞のアポトーシスに対する ZOL の影響を TUNEL 染色とフローサイトメトリー法にて解析した。RAW264.7 細胞に対して、LPS (100 ng/ml)、ZOL (10 μ M)、ZOL (10 μ M) + LPS (100 ng/ml) 刺激を行い、72 時間刺激後に TUNEL 染色を行った。TUNEL 陽性細胞数 と Hoechst 陽性細胞数を測定したところ、コントロール群に対して、LPS 添加群の TUNEL 陽性細胞率の増加を認めた (図 11)。ZOL 添加群ではさらに TUNEL 陽性細胞率が増加しており、ZOL + LPS 添加群において最も TUNEL 陽性率が増加していた。次にフローサイトメトリー法にて 0、24、48、72 時間でのアポトーシス細胞数を測定したところ (図 12)、コントロール群に対して、LPS 添加群、ZOL 添加群で同程度のアポトーシス誘導の亢進を認め、ZOL + LPS 添加群において最も強くアポトーシス誘導が亢進されていた。

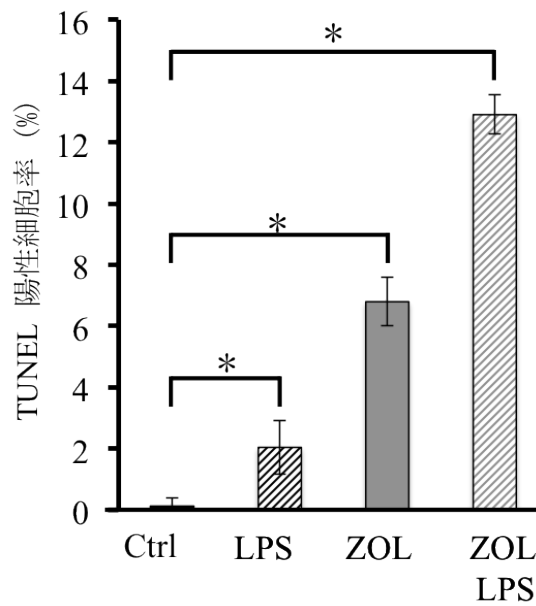
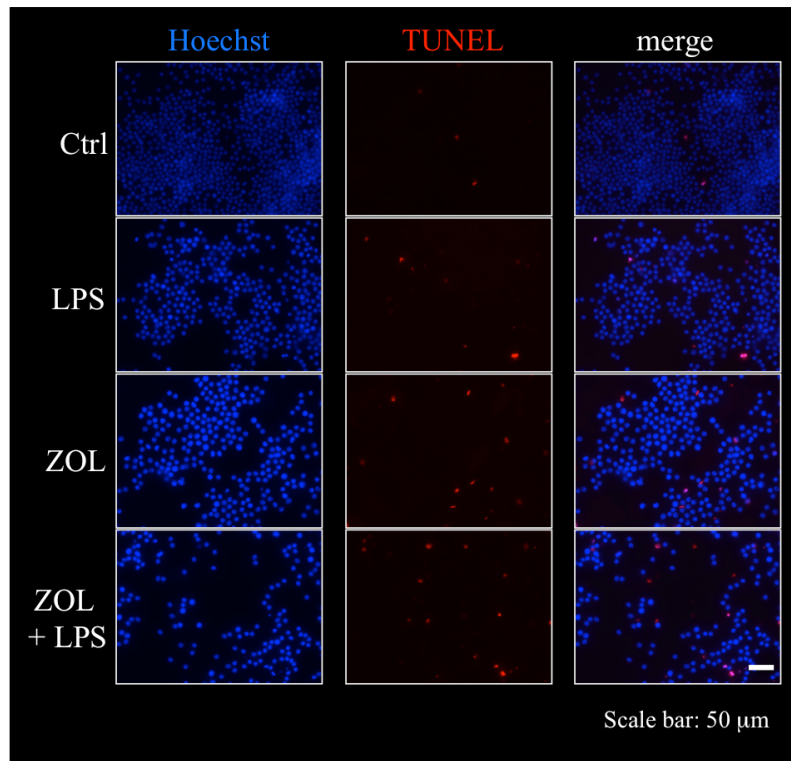


図 11 ZOL が LPS 刺激時の RAW264.7 細胞のアポトーシスに与える影響

コントロール群に対して LPS (100 ng/ml) 添加群の TUNEL 陽性細胞率が増加していた。ZOL (10 μM) 添加群ではさらに TUNEL 陽性細胞率が増加しており、ZOL (10 μM) + LPS (100 ng/ml) 添加群において最も TUNEL 陽性細胞率が増加していた。(Mann-Whitney U-test * $p < 0.05$)

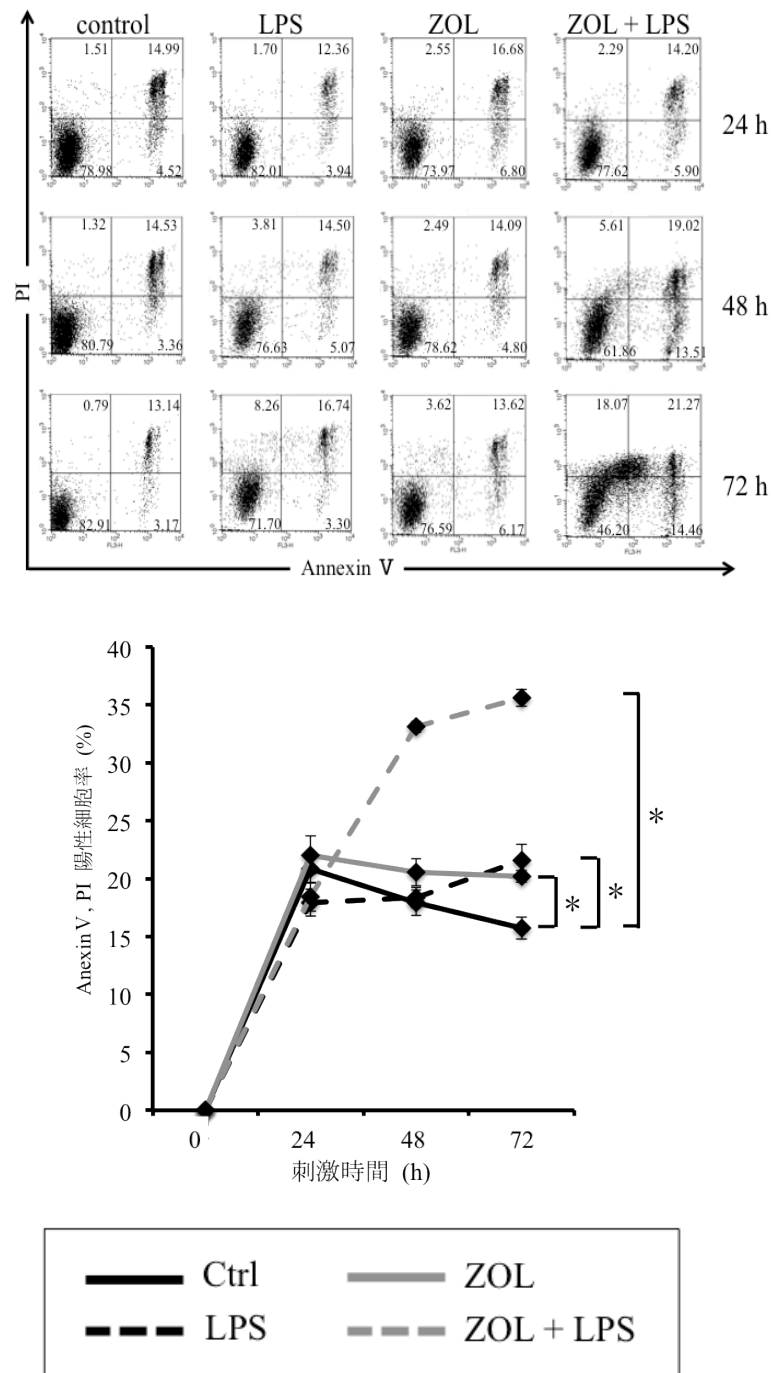


図 12 ZOL が RAW264.7 細胞のアポトーシスに与える影響

コントロール群に対して、LPS (100 ng/ml) 添加群と ZOL (10 μ M) 添加群は同程度のアポトーシス誘導の亢進を認め、ZOL (10 μ M) + LPS (100 ng/ml) 添加群において最も強くアポトーシス誘導の亢進が認められた。(Mann-Whitney U-test * p <0.01)

神田 詩織 <s-kanda@dent.kyushu-u.ac.jp>2-3 ZOL が TLR4 シグナル伝達分子および抑制因子の発現に与える影響

RAW264.7 細胞における TLR4 シグナル伝達分子の発現とその活性化、さらに TLR4 シグナル伝達抑制因子の発現をウェスタンブロット法にて解析した。ZOL (10 μ M) 添加を 0、1、4、8、12 時間行ったところ、ZOL 添加により signal transduction and activator of transcription (STAT)1 の発現は時間依存的に発現が減弱していた (図 13)。さらに、STAT1 によって誘導される TLR4 シグナル伝達抑制因子 suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 は ZOL 添加 1 時間後に発現が増加していたが、その後時間依存的に発現の減弱を認めた。また、SOCS1 が作用する部分の下流にある分子 MyD88 は ZOL 添加後時間依存的に発現が増強していた。また、ZOL (10 μ M) 添加 24 時間後に LPS (100 ng/ml) 刺激を 0、15、30、60 分間行ったところ (図 14)、inhibitor of kappa B (IkB- α) のリン酸化は LPS 刺激後時間依存的に増加しており、ZOL 添加群においてより強いリン酸化を認めた。また、IkB- α はリン酸化すると分解が亢進するが、IkB- α の分解は LPS 刺激時間に伴って亢進しており、ZOL 添加群においてより分解が亢進していた。

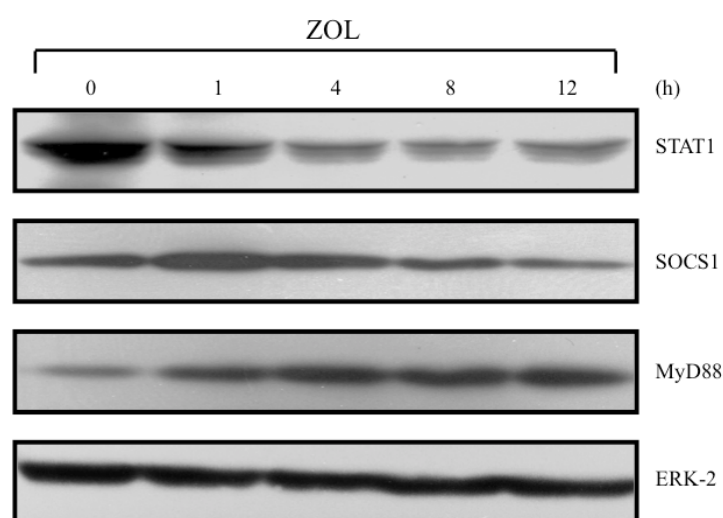


図 13 ZOL が TLR4 シグナル伝達抑制因子に与える影響

ZOL (10 μ M) 添加によって STAT1 の発現の減弱を認めた。SOCS1 の発現は、ZOL (10 μ M) 添加後 1 時間で増強したが、その後発現は時間依存的に減弱した。一方、ZOL (10 μ M) 添加による MyD88 の発現は時間依存的に増強した。

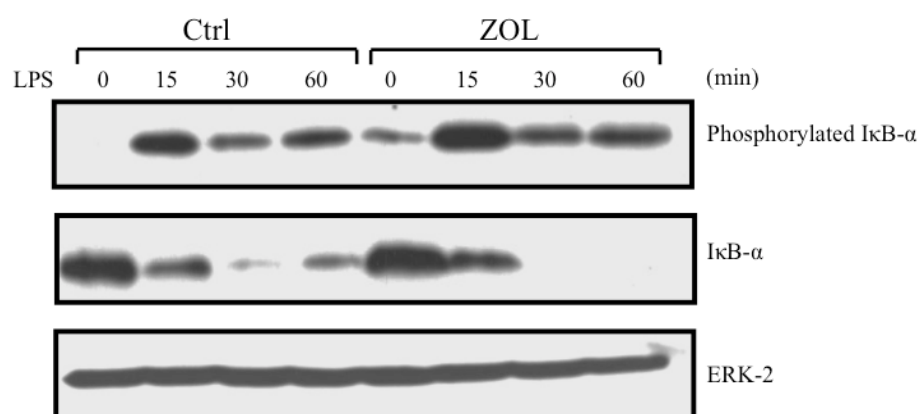


図 14 ZOL が TLR4 シグナル伝達分子に与える影響

ZOL (10 μ M) 添加群において Phosphorylated IκB-α が増強しており、IκB-α の分解も亢進していた。

研究3 ZOL が RAW264.7 細胞の増殖活性に与える影響

RAW264.7 細胞における細胞増殖活性を BrdU 染色と WST-8 法にて解析した。RAW264.7 細胞に対して、LPS (100 ng/ml)、ZOL (10 μ M)、ZOL (10 μ M) + LPS (100 ng/ml) で刺激を行い、72 時間刺激後に BrdU 染色を行った。BrdU 陽性細胞数と PI 陽性細胞数を測定したところ、コントロール群に対して、LPS 添加群の BrdU 陽性細胞率の減少を認めた (図 15)。ZOL 添加群ではさらに BrdU 陽性細胞率が減少しており、ZOL + LPS 添加群において最も BrdU 陽性細胞率の減少を認めた。次に WST-8 法にて 0、24、48、72 時間での細胞増殖活性を測定したところ、コントロール群に対して、LPS 添加群の細胞増殖活性の低下を認めた。ZOL 添加群ではさらに細胞増殖活性が低下しており、ZOL + LPS 添加群において最も細胞増殖活性の低下を認めた (図 16)。

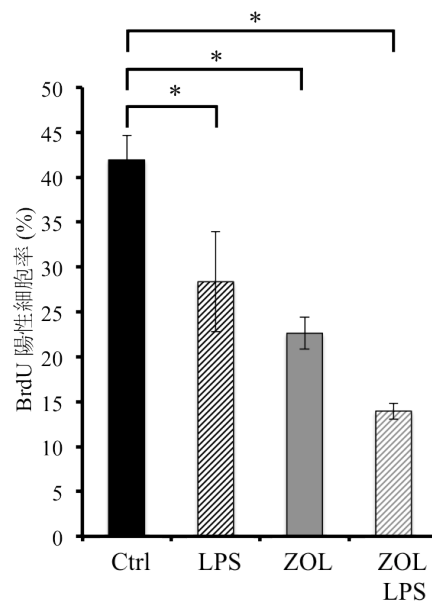
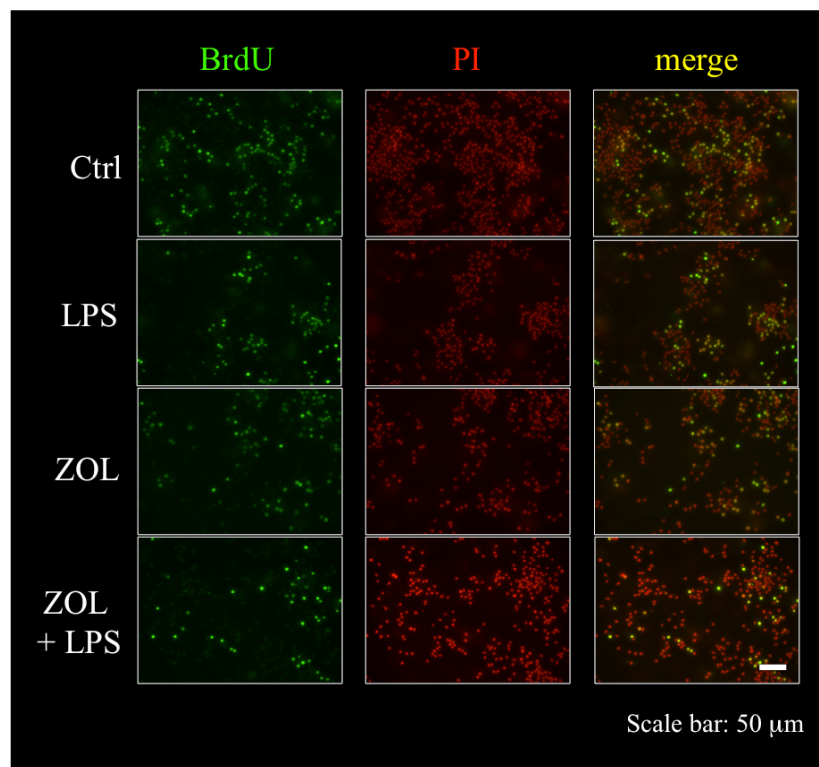


図 15 ZOL が RAW264.7 細胞の増殖活性に与える影響

コントロール群に対して LPS (100 ng/ml) 添加群の BrdU 陽性細胞率が減少していた。ZOL (10 μ M) 添加群ではさらに BrdU 陽性細胞率が減少しており、ZOL (10 μ M) + LPS (100 ng/ml) 添加群 において最も BrdU 陽性細胞率が減少していた。
(Mann-Whitney U-test * p < 0.05)

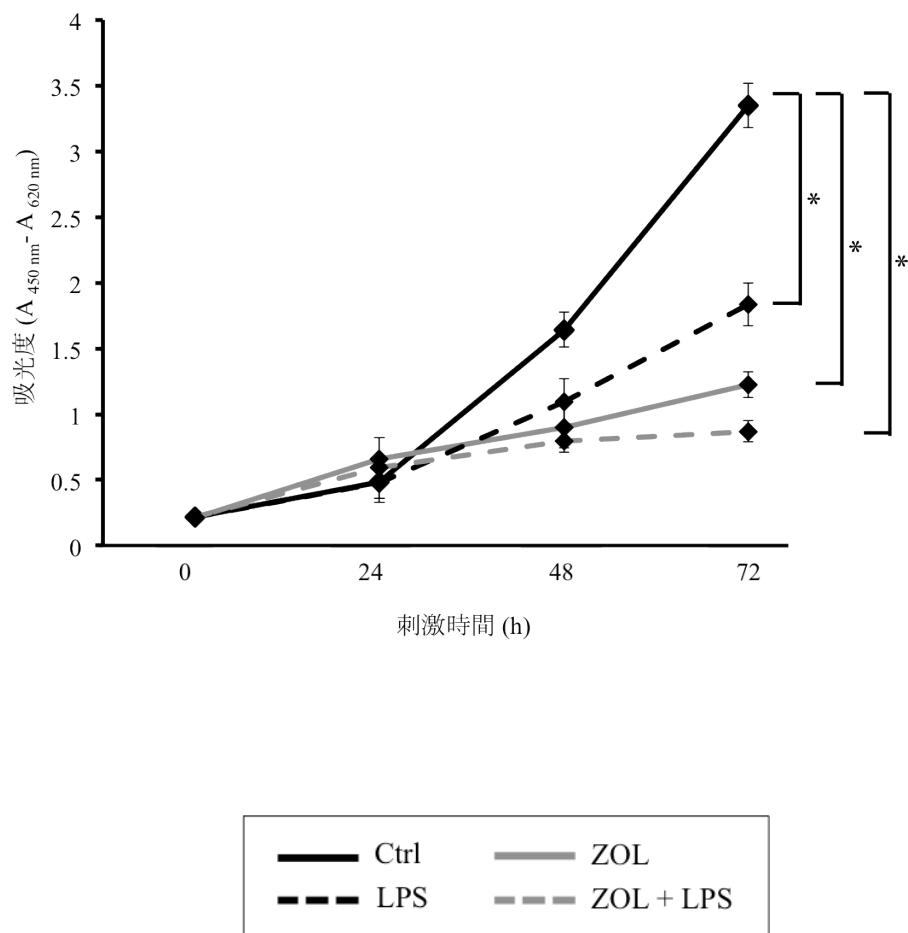


図 16 ZOL が RAW264.7 細胞の増殖活性に与える影響

コントロール群に対して LPS (100 ng/ml) 添加群の細胞増殖活性が低下していた。ZOL (10 μ M) 添加群ではさらに細胞増殖活性は低下しており、ZOL (10 μ M) + LPS (100 ng/ml) 添加群において最も細胞増殖活性が低下していた。(Mann-Whitney U-test $*p < 0.05$)

考 察

C57BL/6J マウス由来マクロファージと破骨細胞の TLR4 の発現を比較したところ、マクロファージにおいて TLR4 の強い発現を認めた。血球系細胞である破骨前駆細胞の表面の RANK に骨芽細胞が分泌する RANKL [23, 24] が結合すると、その細胞内ドメインにシグナル伝達因子である TRAF が結合し、破骨細胞の分化が促進される。また、破骨細胞に分化する時に細胞の形質や遺伝子発現変化が起こるため [25]、分化前のマクロファージでは TLR4 シグナルによって IL-6 や TNF- α を産生するが、成熟した破骨細胞はこれらのサイトカインをほとんど産生しないことが報告されている [26]。今回、ZOL 添加群において RANK の発現が減弱しており、さらに TRAP 染色においても破骨細胞の分化抑制が認められた。これは、RANK の発現が減弱したため、RANKL との結合が困難となり、成熟破骨細胞への分化誘導が阻害されたためであると考えられた。また、RAW264.7 細胞、MC3T3-E1 細胞、SaOS-2 細胞、C57BL/6J マウス由来マクロファージ細胞および破骨細胞における TLR4 の発現に関しては、RAW264.7 細胞と C57BL/6J マウス由来マクロファージにおいて強い発現を認めたが、MC3T3-E1 細胞、SaOS-2 細胞、C57BL/6J マウス由来破骨細胞における発現は弱かった。以上より、BRONJ 発症における TLR4 を介した炎症の惹起において、マクロファージの関与が強いと考えられた。

LPS が TLR4 に結合すると、TLR4 下流の種々のアダプター分子を介して細胞内にシグナルが伝達され、核内転写因子 NF- κ B を活性化することで炎

炎症性サイトカインが誘導される。今回、RAW264.7 細胞を LPS 刺激した際に、炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6 および TNF- α の誘導、ならびに NO の産生が ZOL 存在下で増強されることが示された。また、NBP 投与患者の血液中では TNF- α や IL-6 など炎症性サイトカインが増加していることが報告されているが [27]、我々が RAW264.7 細胞を ZOL 単独で刺激したところ、炎症性サイトカインの有意な増強は認めなかった。

産生された炎症性サイトカインである IL-1 β と TNF- α はアポトーシスの誘導に関与している [28, 29]。IL-1 β は不活性な前駆体として産生され、IL-1 β converting enzyme (ICE) によって前駆体ドメインが切断されて活性型となる。この ICE は最初に発見されたカスパーゼであり、アポトーシスの実行過程を司る一群のシステインプロテアーゼである。そして、TNF- α はアポトーシス誘導因子として作用し、カスパーゼ 8 を活性化させてアポトーシスを誘導する [30]。また、NBP はメバロン酸経路を遮断することによって細胞膜を作る小さなタンパク質を結合させるプレニル化を阻害し、細胞のアポトーシスを誘導することが知られている [5]。今回、NBP である ZOL を単独添加したところ細胞増殖活性が低下し、アポトーシスの亢進を認めた。これは ZOL が RAW264.7 細胞のメバロン酸経路を遮断したためであると考えられた。さらに、LPS 刺激を行うことによって ZOL 添加群における細胞増殖活性の大幅な低下と、アポトーシスの大幅な亢進が認められた。これは ZOL のメバロン酸経路遮断作用と、LPS 刺激時の炎症性サイトカイン産生増加に伴うカスパーゼの活性化との相加作用が起こるためであると考えられた。

TLR シグナルの抑制機構 [31] として IRAK-M や SOCS1 が知られており、ともに IRAK の酵素活性を阻害する [32]。IRAK-M は NF- κ B 経路を介して誘導される単球・マクロファージ系の細胞に特異的に発現している分子で [33]、MyD88 から IRAK1 と IRAK4 の解離を抑制することにより IRAK/TRAF6 複合体の形成を阻害する。一方、SOCS1 は TLR 刺激により誘導されるサイトカイン誘導性タンパク質で、NF- κ B や STAT1 の活性化を阻害する。さらに、SOCS1 が存在しない場合、IFN- γ の炎症シグナルが過剰に活性化され、その結果 prostaglandin E (PGE) 2 による抑制効果が消失することが報告されている [34]。また、IRAK-M と SOCS3 は NBP 刺激によって減弱することが報告されている [35, 36]。今回の研究では、ZOL 単独刺激によって SOCS1 の発現が減弱しており、NBP 刺激が SOCS3 の発現誘導を抑制するという過去の報告 [36] と同様の結果であった。一方、MyD88 の発現増強が認められたが、これは SOCS1 と IRAK-M が ZOL 添加によって発現が減弱し、抑制機構としての作用が弱まったためではないかと考えられた。

TLR シグナル伝達において、I κ B- α は炎症性サイトカインの産生に直接関与する NF- κ B に結合し、抑制因子として作用する [37]。I κ B- α はリン酸化することによってタンパク分解し、NF- κ B を遊離する。その後、NF- κ B が分離し核内へ移行することによって炎症性サイトカインが産生される。今回、ZOL 添加群において LPS 刺激時の I κ B- α のリン酸化が増強し、タンパク分解も亢進していた。

以上より、マクロファージが BP の影響を受けることで、SOCS1 や IRAK-M などの TLR4 シグナル抑制作用が低下し、TLR4 シグナル伝達物質

が増加するため、NF- κ B の遊離が促進される。その結果、炎症性サイトカインや NO の産生が増加し、過度の炎症を惹起する。さらに、炎症性サイトカインが PEG2 による抗炎症システムを抑制することで過剰な炎症状態に発展することが示唆された。

骨内 BP の濃度は代謝の活発な骨部位においては選択的に上昇する。特に、顎骨とりわけ歯牙支持組織である歯槽骨は常に摂食に伴う強力な咀嚼圧にさらされる部位であるため、骨のリモデリングが活発となり、骨選択的に高濃度の BP が蓄積される [38, 39]。病理学的に BRONJ 発症部位の腐骨と正常骨髄を比較すると、BRONJ 症例の骨梁幅は約 3 ～ 4 倍に肥厚していることが報告されている [40]。また、BRONJ 腐骨周囲の骨においては骨髄腔が広範に線維化しており、線維化骨髄腔内においては血管の崩壊や閉塞性変化が併存している [40]。つまり、BP 服用・投与患者の歯槽骨では、血管内皮あるいは血管壁を原因とした顎骨局所循環障害と骨硬化性変化が起こっていると考えられる。そして、歯槽骨は解剖的には薄い歯肉粘膜を介するのみで、外傷などによって容易に細菌感染にさらされてしまう [41, 42]。

以上より、BP 長期投与による骨変化と口腔内環境および本研究の結果をふまえ、BRONJ の発症機序を以下のように推察した。BP が歯槽骨に長期間蓄積されることによって、顎骨局所循環障害および骨硬化性変化が生じる。そして、外科処置や外傷、潰瘍などによって歯槽骨が細菌感染に直接暴露されることで骨が破壊され、蓄積されていた高濃度の BP が拡散する。さらに、免疫応答によって集積したマクロファージをはじめとした免疫担当細胞が BP を取り込むことで、TLR4 を介した炎症性サイトカインを多量に産生し、

さらなる骨破壊を引き起こす。その結果、長期的に細菌に暴露されることとなり細菌感染と炎症の増悪を繰り返し、骨髄炎が惹起されることで BRONJ が発症すると考えられた (図 17)。

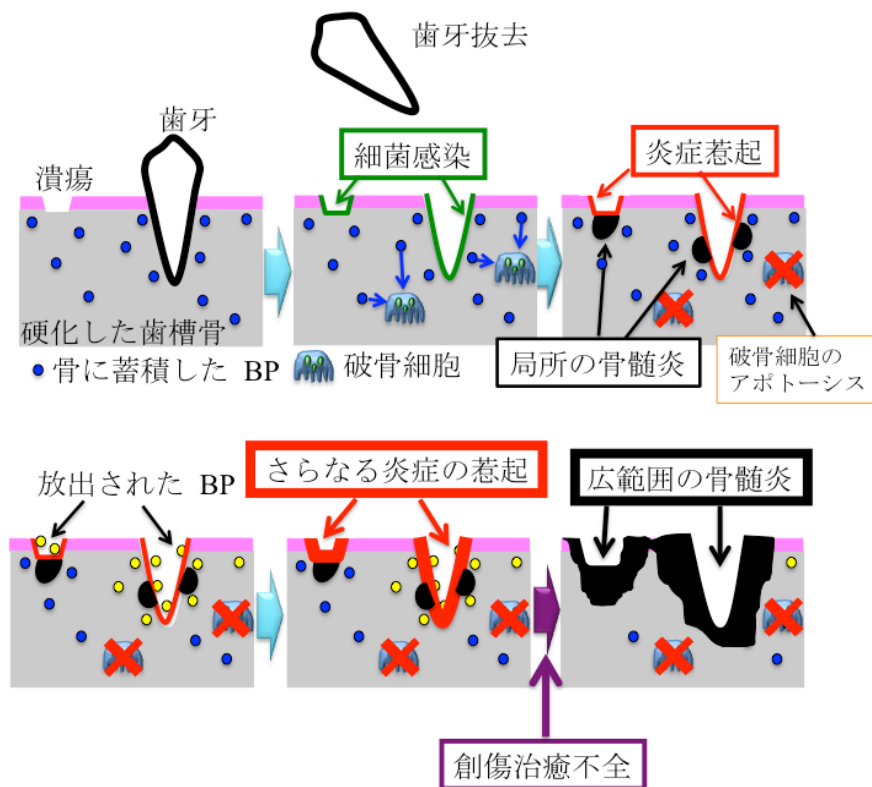


図 17 BRONJ 発症における自然免疫の関与モデル

BP が歯槽骨に長期間蓄積されることによって、顎骨局所循環障害および骨硬化性変化が生じる。歯槽骨は外科処置や外傷、潰瘍などで感染に直接暴露されることによって炎症が惹起され、局所の骨髄炎および骨破壊を起こすことで蓄積されていた BP が拡散する。免疫応答によって集積したマクロファージなどの免疫担当細胞が、BP を取り込むことで 炎症性サイトカインを大量に産生し、広範囲に骨髄炎を引き起こすことによって BRONJ が発症する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導を頂きました九州大学大学院 歯学
研究院 口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野 中村誠司 教授に深甚
なる謝意を表します。また直接御指導頂きました九州大学大学院 歯学研究院
口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野 武富孝治 助教、九州歯科大学
生体機能科学専攻 口腔顎顔面外科学講座 形態機能再建学分野 吉賀大午 助
教に謹んで感謝の意を表します。また、常に研究の協力ならびに励ましの言
葉を頂きました九州大学大学院 歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 顎顔面
腫瘍制御学分野の教室員の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] M. J. Rogers, D. J. Watts, R. G. Russell, Overview of bisphosphonates, *Cancer* 80 (1997) 1652-1660.
- [2] K. Hoekman, A. T. van Holten-Verzantvoort, H. M. Pinedo, [Bisphosphonates in the treatment and prevention of bone metastases], *Ned Tijdschr Geneesk* 141 (1997) 2217-2222.
- [3] B. Ramaswamy, C. L. Shapiro, Bisphosphonates in the prevention and treatment of bone metastases, *Oncology (Williston Park)* 17 (2003) 1261-1270; discussion 1270-1262, 1277-1268, 1280.
- [4] A. A. Licata, Discovery, clinical development, and therapeutic uses of bisphosphonates, *Ann Pharmacother* 39 (2005) 668-677.
- [5] E. R. van Beek, L. H. Cohen, I. M. Leroy, F. H. Ebetino, C. W. Lowik, S. E. Papapoulos, Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates, *Bone* 33 (2003) 805-811.
- [6] H. Fleisch, R. G. Russell, S. Bisaz, P. A. Casey, R. C. Muhlbauer, The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution, *Calcif Tissue Res* (1968) Suppl:10-10a.
- [7] J. R. Berenson, A. Lipton, Bisphosphonates in the treatment of malignant bone disease, *Annu Rev Med* 50 (1999) 237-248.
- [8] A. Lipton, Emerging role of bisphosphonates in the clinic--antitumor activity and prevention of metastasis to bone, *Cancer Treat Rev* 34 Suppl 1 (2008) S25-30.
- [9] R. E. Marx, Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic, *J Oral Maxillofac Surg* 61 (2003) 1115-1117.
- [10] N. Salesi, R. Pistilli, V. Marcelli, F. A. Govoni, F. Bozza, G. Bossone, V. Venturelli, B. Di Cocco, U. Pacetti, A. Ciorra, C. Di Fonso, E. Cortesi, E. Veltri, A. Vecchione, Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis: a review of twelve cases, *Anticancer Res* 26 (2006) 3111-3115.
- [11] S. Greenberger, E. Boscolo, I. Adini, J. B. Mulliken, J. Bischoff, Corticosteroid suppression of VEGF-A in infantile hemangioma-derived stem cells, *N Engl J Med* 362 (2010) 1005-1013.
- [12] D. Ribatti, N. Maruotti, B. Nico, V. Longo, D. Mangieri, A. Vacca, F. P. Cantatore,

- Clodronate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo, *Oncol Rep* 19 (2008) 1109-1112.
- [13] D. Patschan, K. Loddenkemper, F. Buttgereit, Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis, *Bone* 29 (2001) 498-505.
- [14] G. Favia, G. P. Pilolli, E. Maiorano, Histologic and histomorphometric features of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an analysis of 31 cases with confocal laser scanning microscopy, *Bone* 45 (2009) 406-413.
- [15] Y. Kobayashi, T. Hiraga, A. Ueda, L. Wang, M. Matsumoto-Nakano, K. Hata, H. Yatani, T. Yoneda, Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice, *J Bone Miner Metab* 28 (2010) 165-175.
- [16] N. H. Naik, T. A. Russo, Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the role of actinomyces, *Clin Infect Dis* 49 (2009) 1729-1732.
- [17] F. Wilde, K. Steinhoff, B. Frerich, T. Schulz, K. Winter, A. Hemprich, O. Sabri, R. Kluge, Positron-emission tomography imaging in the diagnosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107 (2009) 412-419.
- [18] K. V. Anderson, L. Bokla, C. Nusslein-Volhard, Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product, *Cell* 42 (1985) 791-798.
- [19] K. Takeda, S. Akira, Toll-like receptors in innate immunity, *Int Immunol* 17 (2005) 1-14.
- [20] K. Redlich, S. Hayer, R. Ricci, J. P. David, M. Tohidast-Akrad, G. Kollias, G. Steiner, J. S. Smolen, E. F. Wagner, G. Schett, Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction, *J Clin Invest* 110 (2002) 1419-1427.
- [21] A. R. Pettit, H. Ji, D. von Stechow, R. Muller, S. R. Goldring, Y. Choi, C. Benoist, E. M. Gravallese, TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis, *Am J Pathol* 159 (2001) 1689-1699.
- [22] H. Takayanagi, T. Juji, T. Miyazaki, H. Iizuka, T. Takahashi, M. Isshiki, M. Okada, Y. Tanaka, Y. Koshihara, H. Oda, T. Kurokawa, K. Nakamura, S. Tanaka, Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts, *J Clin Invest* 104 (1999) 137-146.
- [23] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinoshita, S. Mochizuki, A.

- Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, T. Suda, Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 3597-3602.
- [24] D. L. Lacey, E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, W. J. Boyle, Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation, *Cell* 93 (1998) 165-176.
- [25] B. Zhao, M. Takami, A. Yamada, X. Wang, T. Koga, X. Hu, T. Tamura, K. Ozato, Y. Choi, L. B. Ivashkiv, H. Takayanagi, R. Kamijo, Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis, *Nat Med* 15 (2009) 1066-1071.
- [26] K. Itoh, N. Udagawa, K. Kobayashi, K. Suda, X. Li, M. Takami, N. Okahashi, T. Nishihara, N. Takahashi, Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages, *J Immunol* 170 (2003) 3688-3695.
- [27] D. Thiebaud, A. Sauty, P. Burckhardt, P. Leuenberger, L. Sitzler, J. R. Green, A. Kandra, J. Zieschang, P. Ibarra de Palacios, An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates, *Calcif Tissue Int* 61 (1997) 386-392.
- [28] D. E. Wesche-Soldato, R. Z. Swan, C. S. Chung, A. Ayala, The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis, *Curr Drug Targets* 8 (2007) 493-500.
- [29] C. Herrington, P. A. Hall, Molecular and cellular themes in inflammation and immunology, *J Pathol* 214 (2008) 123-125.
- [30] A. O. Aliprantis, R. B. Yang, D. S. Weiss, P. Godowski, A. Zychlinsky, The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2, *EMBO J* 19 (2000) 3325-3336.
- [31] Y. C. Lu, W. C. Yeh, P. S. Ohashi, LPS/TLR4 signal transduction pathway, *Cytokine* 42 (2008) 145-151.
- [32] I. Kinjyo, T. Hanada, K. Inagaki-Ohara, H. Mori, D. Aki, M. Ohishi, H. Yoshida, M. Kubo, A. Yoshimura, SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage

activation, *Immunity* 17 (2002) 583-591.

[33] L. L. Hubbard, B. B. Moore, IRAK-M regulation and function in host defense and immune homeostasis, *Infect Dis Rep* 2 (2010).

[34] T. Chinen, K. Komai, G. Muto, R. Morita, N. Inoue, H. Yoshida, T. Sekiya, R. Yoshida, K. Nakamura, R. Takayanagi, A. Yoshimura, Prostaglandin E2 and SOCS1 have a role in intestinal immune tolerance, *Nat Commun* 2 (2011) 190.

[35] J. T. Norton, T. Hayashi, B. Crain, M. Corr, D. A. Carson, Role of IL-1 receptor-associated kinase-M (IRAK-M) in priming of immune and inflammatory responses by nitrogen bisphosphonates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011) 11163-11168.

[36] J. S. Reuben, L. Dinh, J. Lee, J. Stateson, H. Kamara, L. Xiang, L. A. Opperman, Bisphosphonates inhibit phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 and expression of suppressor of cytokine signaling 3: implications for their effects on innate immune function and osteoclastogenesis, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 111 (2011) 196-204.

[37] S. H. Lee, M. Hannink, Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon), *J Biol Chem* 277 (2002) 23358-23366.

[38] M. Sato, W. Grasser, N. Endo, R. Akins, H. Simmons, D. D. Thompson, E. Golub, G. A. Rodan, Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure, *J Clin Invest* 88 (1991) 2095-2105.

[39] T. Usui, S. Tanaka, T. Sonoda, Y. Ozawa, K. Teramura, E. Nakamura, T. Watanabe, S. Higuchi, Drug disposition of incadronate, a new bisphosphonate, in rats with bone metastases, *Xenobiotica* 27 (1997) 479-487.

[40] 長谷川, 程, 丸山, 小林, 又賀, 田中, 岡田, 田上, 小松, 泉, 齊藤, 高木, 田中, 林, 朔, ビスフォスフォネート製剤による顎骨壊死の病理組織学的検討, *日本口腔科学会雑誌* 58 (2009) 199.

[41] S. L. Ruggiero, S. B. Woo, Biophosphonate-related osteonecrosis of the jaws, *Dent Clin North Am* 52 (2008) 111-128, ix.

[42] C. A. Migliorati, M. M. Schubert, D. E. Peterson, L. M. Seneda, Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy, *Cancer* 104 (2005) 83-93.