

学位論文題名

Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in
RAW264.7 cells

(各種ビスフォスフォネート製剤のRAW264.7細胞における破骨細胞分化
誘導系に与える影響)

学位論文内容の要旨

【緒言】

ビスフォスフォネート (BP) 製剤は、ピロリン酸の P-O-P 構造の O を C で置換した化合物である。全ての BP 製剤は P-C-P 構造が基本骨格となっていて、その側鎖に様々な構造を持たせることで各種 BP 製剤が作られている。臨床においては、骨吸収抑制作用が注目され骨粗鬆症、骨ページェット病などの骨疾患治療へと用いられ、さらにはがん骨転移予防など、がん治療の場においても重要な位置を占めるようになってきている。しかし、BP 系薬剤関連顎骨壊死などの重篤な副作用も報告されている。生体内においては骨組織に特異的に取り込まれ、骨吸収時に破骨細胞に直接作用することで破骨細胞の融合（多核化ならびに巨大化）を促進するが、骨吸収能を抑制し、アポトーシスを誘導すると言われている。しかし、BP 製剤による破骨細胞の融合やアポトーシス誘導作用、骨吸収抑制作用は異なるメカニズムによる可能性が示唆されており、その詳細は未だ明らかになっていない。そこで、本研究では RAW264.7 (RAW) 細胞における破骨細胞分化誘導系に対する BP 製剤の直接的な影響について検討した。

【材料と方法】

RANKL 添加培養液を用いて RAW 細胞を 3~8 日間培養し、破骨細胞数および巨大破骨細胞 (8 核以上) 数を求めた。その結果により培養期間を 6 日間とし、各種 BP 製剤 (窒素非含有: エチドロネート、TRK-530、窒素含有: アレンドロネート、リセドロネート、ゾレドロネート) 存在下で RAW 細胞を培養し、破骨細胞数および巨大破骨細胞数を求めた。BP 製剤は異なる作用時間 (1, 3, 5 日) ならびに最終濃度 (0.01~10 μ M) で作用させた。破骨細胞への作用が BP 製剤の RAW 細胞への細胞毒性によるものか調査するため細胞毒性試験を行った。現在商品化されている BP 製剤の中で最も骨吸収抑制作用が強いとされる窒素含有のゾレドロネートと現在新規に開発されている窒素非含有の TRK-530 を用いて、さらなる破骨細胞分化誘導系に対する影響を検索した。pit assay を用いて骨吸収能への影響を調査した。BP 製剤を培養 3 日目、5 日目に投与し 1, 3, 6, 12, 24 時間後に RNA を回収し real time PCR 法を用いて破骨細胞分化関連遺伝子ならびにアポトーシス関連因子について調査した。さらに DNA フラグメンテーション解析法ならびに Caspase3/7 活性測定を行った。

【結果】

BP 製剤を作用させず、破骨細胞を培養した場合、破骨細胞数および巨大破骨細胞数は共に培養 6 日目をピークにその後減少した。そのため、以降の破骨細胞数を求める実験では培養期間を 6 日間として行った。全ての BP 製剤によって破骨細胞数ならびに巨大破骨細胞数は濃度かつ作用時間依存的に有意に減少した。窒素含有の BP 製剤は RANKL 非添加 RAW 細胞に対し毒性を認め、窒素非含有の BP 製剤では認められなかった。破骨細胞への作用を確認するため同様の細胞毒性試験を RANKL 添加して行くと、窒素含有の BP 製剤ならびに非含有の BP 製剤共に破骨細胞に対し大きく毒性を示し、窒素含有の BP 製剤は、RANKL 非添加 RAW 細胞よりも破骨細胞への毒性が大きかった。窒素含有と非含有 BP 製剤で異なった結果が得られたことから、窒素含有のゾレドロネートと窒素非含有の TRK-530 に対し、以下の実験を行った。pit assay においてコントロール群では骨吸収窩が 56%であったのに対し、ゾレドロネート投与群では 0%、TRK-530 投与群では 0.5%であった。real time PCR 法において、NFATc1 の発現は、両群とも 3 日目投与では有意な差を認めなかったが、5 日目投与では時間依存的に発現が減少した。DC-STAMP の発現は、両群とも 3 日目投与の 1 時間後、24 時間後でコントロールに対し有意な差が認められなかったが、その他の時間では発現が減少した。TRAP の発現は、両群とも 3 日目投与では、1 時間後、3 時間後で発現が減少し、5 日目投与では投与後から減少した。Fas の発現は、両群とも 3 日目投与並びに 5 日目投与の 1 時間後、3 時間後で著しく発現が増加した。Caspase3 の発現は、両群とも 3 日目投与では有意な差を認めなかったが、5 日目投与では Fas と同様に投与後 3 時間後で発現が増加した。Caspase8 の発現は、両群とも 5 日目投与で有意な差を認めなかったが、3 日目投与では投与後 12 時間後に発現が増加した。Bcl-xL の発現は、両群とも 3 日目投与では投与後 6 時間で発現が減少し、5 日目投与では投与後に時間依存的に減少した。DNA フラグメンテーション解析法においては両群にのみ DNA ラダーが確認され、Caspase3/7 活性もコントロールに対し両群で有意な活性の上昇を認めた。

【考察】

BP 製剤は、濃度ならびに作用時間依存的に破骨細胞数を有意に減少させた。窒素非含有 BP 製剤は RAW 細胞のような免疫系の細胞に対して毒性を示さず、破骨細胞にのみ作用したため、破骨細胞に特異的に作用することが示唆された。窒素含有 BP 製剤は破骨細胞への作用だけではなく、RAW 細胞に対して毒性を示したが、破骨細胞への影響がより大きいことが確認された。pit assay では、BP 製剤投与群で骨吸収窩が著しく減少した。破骨細胞数の減少に比べ、骨吸収窩が大きく減少したため、BP 製剤は破骨細胞の骨吸収能を低下することが示唆された。real time PCR 法において、破骨細胞分化・融合の過程での BP 製剤の影響を確認するため BP 製剤を培養 3 日目に投与する群と、成熟破骨細胞への影響を確認するため BP 製剤を培養 5 日目に投与する群に分類し、RNA を回収した。検討した遺伝子は破骨細胞分化のマスターレギュレーションである NFATc1、破骨細胞の融合に関与する DC-STAMP、

破骨細胞のマーカーである TRAP などの破骨細胞の分化関連遺伝子とした。また、アポトーシス関連因子としてはアポトーシス促進因子である Fas、Caspase3、Caspase8 とアポトーシス抑制因子である Bcl-xL とした。3 日目投与群ならびに 5 日目投与群において破骨細胞の分化関連遺伝子の発現が減少したため、BP 製剤による破骨細胞分化・融合の抑制が示唆された。また、アポトーシス促進因子の発現は増加し、アポトーシス抑制因子の発現が減少した。さらに、BP 製剤投与群にのみ DNA ラダーが確認され、Caspase3/7 活性も BP 製剤投与群に有意な活性の上昇を認めたため、BP 製剤による破骨細胞のアポトーシス誘導が示唆された。

【結論】

BP 製剤は破骨細胞分化誘導系において、濃度ならびに作用時間依存的に破骨細胞数を減少させ、骨吸収能を低下させることが示唆された。また、アポトーシスの誘導だけではなく、破骨細胞の分化ならびに融合の抑制も示唆された。窒素非含有の BP 製剤である TRK-530 は破骨細胞数を大きく減少させ、破骨細胞の骨吸収能も大きく低下させた。また、窒素含有 BP 製剤ソレドロネートに比べ RAW 細胞に毒性を示さず、破骨細胞に特異的に反応する可能性が示され、将来的に副作用の少ない BP 製剤となる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells

(各種ビスフォスフォネート製剤のRAW264.7細胞における破骨細胞分化誘導系に与える影響)

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

【緒言】

ビスフォスフォネート (BP) 製剤は、ピロリン酸の P-O-P 構造の O を C で置換した化合物である。全ての BP 製剤は P-C-P 構造が基本骨格となっていて、その側鎖に様々な構造を持たせることで各種 BP 製剤が作られている BP 製剤は骨粗鬆症の治療薬としてだけではなく、がん診療の場においても重要な位置を占めるようになった。生体内においては骨組織に特異的に取り込まれ、骨吸収時に破骨細胞に直接作用することで破骨細胞の融合 (多核化ならびに巨大化) を促進するが、骨吸収能を抑制し、アポトーシスを誘導すると言われている。しかし、BP 製剤 による破骨細胞の融合やアポトーシス誘導作用、骨吸収抑制作用は異なるメカニズムによる可能性が示唆されており、その詳細は未だ明らかになっていない。そこで、本研究では BP 製剤の破骨細胞分化誘導系に対する影響について検討した。

【材料と方法】

RANKL 添加培養液を用いて RAW264.7 細胞を各種 BP 製剤 (窒素非含有 : エチドロネート、TRK-530、窒素含有 : アレンドロネート、リセドロネート、ゾレドロネート) 存在下で培養し破骨細胞数および巨大破骨細胞 (8 核以上) 数を求めた。BP 製剤は異なる作用時間 (1、3、5 日) ならびに最終濃度 ($0.01 \sim 10 \mu\text{M}$) で作用させた。破骨細胞への作用が BP 製剤の RAW 細胞への細胞毒性によるものか調査するため細胞毒性試験を行った。窒素含有のゾレドロネートと現在新規に開発されている窒素非含有の TRK-530 を用いて、さらなる破骨細胞分化誘導系に対する影響を検索した。pit assay を用いて骨吸収能への影響を調査し、real time PCR 法を用いて破骨細胞分化関連遺伝子ならびにアポ

トーチス関連因子について調査した。さらに DNA フラグメンテーション解析法ならびに Caspase3/7 活性測定を行った。

【結果】

今回調べた全ての BP 製剤によって破骨細胞数ならびに巨大破骨細胞数は濃度かつ作用時間依存的に減少した。現在頻繁に使用されている窒素含有の BP 製剤は RANKL 非添加の RAW264.7 細胞に対し毒性が認められ、窒素非含有では認められなかった。これらの BP 製剤の中で特徴的な結果を示したゾレドロネートと TRK-530 に関して、BP 製剤添加 3 日目と 5 日目の両群で破骨細胞特異的遺伝子の発現減少、アポトーシス促進遺伝子の発現増加ならびにアポトーシス抑制遺伝子の発現減少、DNA ラダーの検出、Caspase 活性の増強を認め、pit 面積は大きく減少した。

【考察】

BP 製剤は破骨細胞分化誘導系において、濃度ならびに作用時間依存的に破骨細胞数を減少させ、骨吸収能を低下させることが示唆された。また、アポトーシスの誘導だけではなく、破骨細胞の分化ならびに融合の抑制も示唆された。窒素非含有の BP 製剤である TRK-530 は破骨細胞数を大きく減少させ、破骨細胞の骨吸収能も大きく低下させた。また、窒素含有 BP 製剤ゾレドロネートに比べ RAW 細胞に毒性を示さず、破骨細胞に特異的に反応する可能性が示され、将来的に副作用の少ない BP 製剤となる可能性が示唆された。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。主な質問内容は、以下の通りであった。

- 1) BP 製剤の破骨細胞への影響に関する in vitro と in vivo の報告の違いについて
- 2) RAW 細胞の性質について
- 3) がん治療の場でどのように BP 製剤が用いられているのか
- 4) 窒素含有の BP 製剤が RAW 細胞に対してなぜ毒性を示す理由について
- 5) アポトーシスのデスレセプター経路とミトコンドリア経路の関係について
- 6) リアルタイム PCR の結果について
- 7) Fas リガンドについて
- 8) RAW 細胞に RANKL を投与した場合のアポトーシスについて

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答と説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに発展的研究へのモチベーションも高く将来性についても評価された。

審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が歯学博士の学位を授与される資格を有するものと認めた。