

学 位 論 文 要 約

Bisphosphonates induced reactive oxygen species inhibit proliferation and migration of oral fibroblast: a pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw

(ビスフォスフォネートが誘導する活性酸素は、口腔線維芽細胞の増殖と遊走を阻害する：顎のビスフォスフォネート関連骨壊死の病因)

(著者：谷口奈緒美、尾崎充彦、小沼邦重、石川瑞穂、領家和男、小谷勇、岡田太)

令和2年 Journal of Periodontology 掲載予定

ビスフォスフォネート (Bisphosphonate ; BP) 製剤は、強力な骨吸収抑制作用を有しており、骨粗鬆症や骨転移などにおいて広く使用されている、極めて臨床的有用性が高い薬剤である。しかしながら、一方でBP関連顎骨壊死 (Bisphosphonate - Related Osteonecrosis of the Jaw ; BRONJ) という重篤な副作用がある。BRONJの発生機序の仮説として顎骨のリモデリングの変化、口腔内細菌感染、免疫抑制、血管新生の抑制などが挙げられている。しかし、未だBRONJ発症メカニズムの解明には至っていない。

本研究では、BP製剤がヒト歯周靭帯線維芽細胞に与える影響を酸化ストレスとの関連から解析し、活性酸素除去による創傷治癒効果を検討した。

方 法

実験にはヒト歯周靭帯線維芽細胞 (HPdLF) と、その対照としてヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) とを用いた。試薬はalendronate製剤と活性酸素消去剤としてN-アセチル-L-システイン (N-Acetyl-L-cysteine ; NAC) を用いた。BP製剤とNACを添加し増殖アッセイ、創傷治癒アッセイを行った。活性酸素 (Reactive oxygen species ; ROS) 検出にはCM-H2DCFDAを使用し、蛍光強度をマイクロプレートリーダーにて測定した。BRONJマウスモデルにはBP製剤であるゾレドロン酸を、コントロール群には生理食塩水を尾静脈投与した。NAC群にはNACを抜歯2週間前より飲水投与した。右側上顎第一大臼歯を抜歯し、抜歯1週間後の創傷治癒の違いを観察した。

結 果

BP製剤はNHDFとHPdLFの増殖を抑制した。HPdLFはNHDFよりも強く抑制され、IC50の濃度

はNHDFよりも低かった。BP製剤を作用させると、HPdLFから活性酸素の産生量が約1.5～2倍に増加したが、一酸化窒素の産生には差がなかった。活性酸素の増加によりHPdLFの遊走能が抑制された。活性酸素消去剤であるNACを添加することにより増殖能ならびに遊走能は回復した。BP製剤投与したマウスでは上皮壊死が生じたが、NAC+BP群のマウスでは上皮壊死は生じず、抜歯窩は治癒した。

考 察

本研究において、HPdLFはBP製剤の濃度依存的に増殖が抑制され、BP製剤を作用させることにより遊走能も抑制された。BP製剤による細胞の増殖抑制はNHDFとHPdLFとも生じたが、増殖アッセイから算出したIC50はNHDFと比較し、HPdLFは3倍以上低かった。これは、HPdLFはBP製剤による影響を受けやすく、より低濃度のBP製剤で細胞毒性が生じることを示した。BRONJは主に口腔で報告されている。今回の著者らの報告は口腔内とその他の部位由来の線維芽細胞を比較した最初の報告であり、部位による線維芽細胞の感受性の違いはBRONJが顎骨に特異的に生じる一つの機構であると考えられた。

本研究ではBP製剤によってHPdLFから発生する活性酸素が増加し、遊走能が抑制された。さらに活性酸素消去剤であるNACを培地に添加することにより、線維芽細胞からの活性酸素は減少し、遊走能も回復した。これは、BP製剤添加によるHPdLFの遊走能の低下は活性酸素が原因であることを示唆している。

in vivo において、BP群では上皮壊死が生じたマウスを認めた。control群とBP+NAC群では上皮壊死は認めなかったことからBP製剤が抜歯窩周囲の軟組織に影響し、上皮壊死が生じたと考えられる。さらに、BP+NAC群における軟組織の治癒はcontrol群と比較して差がなかったことから、活性酸素消去剤であるNACはBP製剤による軟組織壊死を抑制することが示唆された。

結 論

HPdLFはNHDFよりもBP製剤に対して感受性が高く、低濃度のBP製剤でHPdLFに対して細胞毒性を示した。これはBRONJが顎骨に生じる原因の一つと考えられた。BP製剤によりHPdLFからの活性酸素産生量の増加は、遊走能を低下させ、BRONJ病変の創傷治癒の遅延に繋がっていると考えられた。BP製剤の投与によりマウス抜歯窩上皮には壊死が生じたが、NAC投与により上皮壊死は生じなかった。NACによる過剰な活性酸素の除去はBRONJ病変の予防あるいは治療に繋がる可能性が示唆された。