

学位研究紹介
--------

## ゾレドロン酸はヒト口腔粘膜上皮細胞に対して DNA 損傷を介する S 期停止を誘発する

### Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes

新潟大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面口腔外科学分野  
(主任：高木 律男 教授)

大貫尚志

Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences  
(Chief: Prof. TAKAGI Ritsuo)

Hisashi Ohnuki

#### 【目 的】

近年、ビスフォスフォネート製剤 (BP) は骨粗鬆症、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症や骨転移など様々な疾患の治療薬として広く使用されており、患者の QOL 向上に貢献している。一方、2003 年に初めて BP に関連した顎骨壊死 (BRONJ) の発症が報告されてから、その有害事象が注目されるようになった。BP は骨に選択的に沈着し、破骨細胞に対しメバロン酸経路を介してアポトーシスを誘導し、破骨細胞の機能障害による骨改造機転の障害により骨吸収が抑制されるため BRONJ が発症するとの説が提唱されているが、BRONJ 発症メカニズムは未だ明らかとなっていない。抜歯などの観血的処置が最大の BRONJ の発症リスクとされ、骨の創傷治癒不全が BRONJ の発症起点になるとされているが、口腔粘膜の創傷治癒遅延も BRONJ 発症と関連することが示唆されている。本研究では BP が口腔粘膜にも障害を与えたと考え、窒素含有 BP のゾレドロン酸 (ZOL) の口腔粘膜上皮細胞に対する影響を 2 次元培養および 3 次元培養口腔粘膜細胞 / 上皮組織にて検討を行った。

#### 【材料および方法】

インフォームドコンセントを得た患者の第三大臼歯抜歯時の余剰歯肉より口腔粘膜上皮細胞を単離し、無血清培地中で培養を行った。MTT 法により cell viability 測定、BrdU 法と生細胞数測定法で cell proliferation を検討し

た。MTT 法と BrdU 法は培地中に ZOL (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10  $\mu$ M) を添加し 2 日間培養後に測定、生細胞数は ZOL (0, 3, 10  $\mu$ M) 添加し 6 日間培養後計測した。細胞周期とアポトーシス解析は、ZOL (0, 10  $\mu$ M) を添加 48, 72, 96, 120 時間後にフローサイトメーターで解析した。また、同時間処理後の細胞周期関連タンパク質 (phospho-Chk1, phospho-Chk2, cyclinA, cyclinB1, p27<sup>KIP1</sup>, Rb, phospho-Rb) の発現についてウェスタンブロット法により検討した。さらに、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加することにより細胞周期調節タンパク質の発現の変化について検討を行った。また、3 次元培養による培養口腔粘膜 (EVEPOME) を作製し、培養口腔粘膜上皮に対する ZOL の影響に関する組織学的観察を行った。すなわち上皮細胞播種後 11 日目に AlloDerm<sup>®</sup> 上に重層扁平上皮を形成した後、ZOL (0.10  $\mu$ M) を添加しさらに 7 日間培養を行い、切片を作製した。HE 染色を行い、EVPOME の形態観察および Ki-67, Geminin, phospho-H2A.X 免疫染色を行った。さらに、全基底細胞数に対する各免疫染色陽性細胞を計数することで Labeling index を算出した。統計学的手法は repeated one-way ANOVA および paired t-test を用いた。

#### 【結果と考察】

MTT 法により ZOL は濃度依存的に培養口腔粘膜上皮細胞の cell viability を低下させること、BrdU 法と生細胞数測定法においても濃度依存的に ZOL は培養口腔粘膜上皮細胞の cell proliferation を抑制することが観察された。また、ZOL による培養口腔粘膜上皮細胞のアポトーシス誘導は認められなかったが、細胞周期は S 期で停止した (図 1)。この結果は、cyclinA, cyclinB1, p27<sup>KIP1</sup>, phospho-Rb の発現の経時的な減少あるいは消失と一致する所見だった。さらに、ZOL を添加した細胞に MG132 を添加すると、cyclinA, cyclinB1, p27<sup>KIP1</sup> の発現の回復が確認された。これは、cyclinA, cyclinB1, p27<sup>KIP1</sup> の発現低下がユビキチンプロテアソームシステムの活性化により分解が起こることが示唆された。ベースラインの 3 次元培養口腔粘膜でみられた表層角化を伴う重層扁平上皮は、さらに 7 日間培養後の ZOL 未添加の EVPOME では上皮層の角化が進行し、上皮全体の厚さが増加したのに対し、ZOL を添加したものでは、基底層細胞の配列に乱れが生じ、上基底細胞層の数の減少も認めた。この結果は、免疫染色によって確認される基底細胞層の Ki-67 陽性細胞の顕著な減少と一致するもの

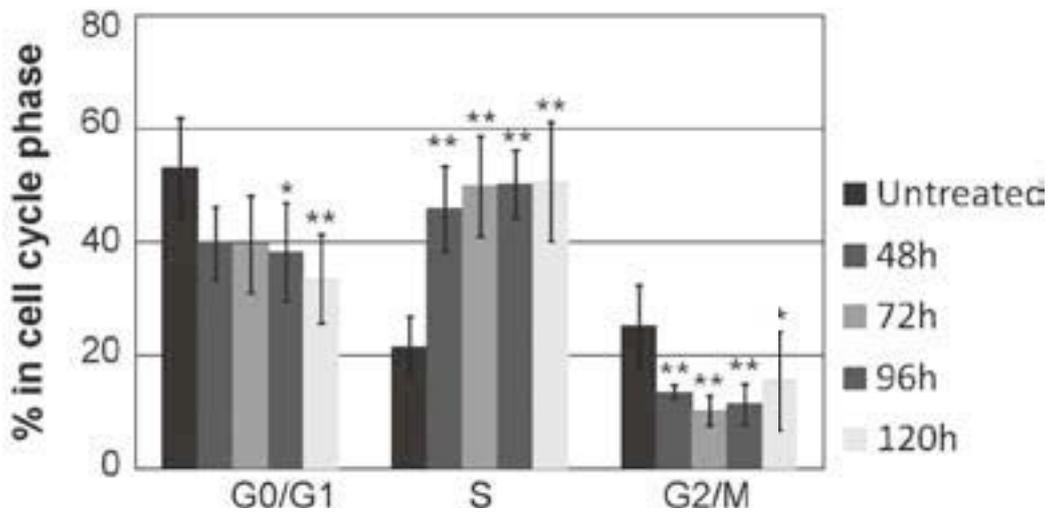


図1 細胞周期解析：ZOLによる口腔粘膜上皮細胞の細胞周期の経時的変化 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

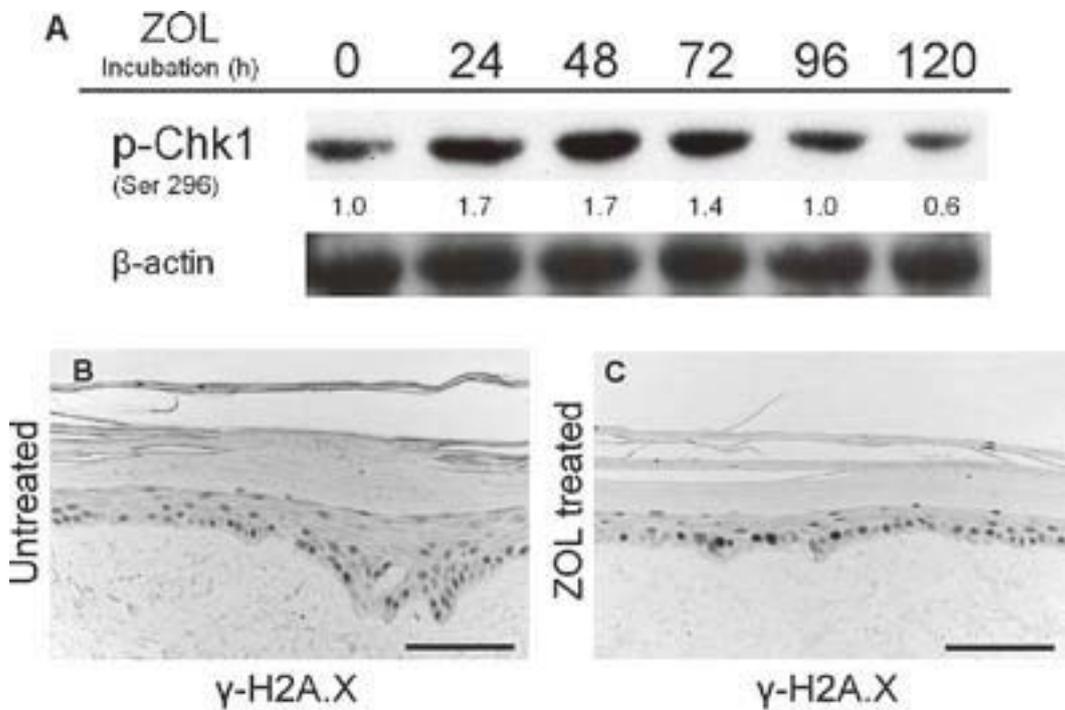


図2 口腔粘膜上皮細胞における DNA 損傷の検出

- A : 口腔粘膜上皮細胞に対する ZOL による p-Chk1 (Ser296) キナーゼ発現の経時的変化
- B : 培養口腔粘膜に対する ZOL 未処理時の  $\gamma$ H2A.X の発現
- C : 培養口腔粘膜に対する ZOL 処理時の  $\gamma$ H2A.X の発現

であった。一方、ZOL 未添加に比べ、ZOL を添加した EVPOME は、基底細胞層における Geminin 陽性細胞が有意に増加していることが確認された。またウェスタンブロット法では ZOL 添加により phospho-Chk1 の発現が 48 時間以内に確認され、ZOL 添加の EVPOME においても基底細胞層における phospho-H2A.X 陽性細胞の有意な増加が確認された (図 2)。以上の結果から、

ZOL により口腔粘膜上皮細胞に DNA 損傷が起こること、ユビキチンプロテアソームシステムが活性化され、細胞周期関連タンパク質分解によって細胞周期が S 期に停止した結果、口腔粘膜上皮細胞の増殖に抑制が起こることが示された。従って ZOL は口腔粘膜上皮の増殖能に障害を加えることで BRONJ 発症に関与することが示唆された。