

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11246

研究課題名(和文) 骨芽細胞ニッチおよび造血幹細胞が引き起こす骨粗鬆症分子病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Pathological study for the osteoporosis produced by the osteoblastic niche and hematopoietic stem cells

研究代表者

山近 英樹 (YAMACHIKA, EIKI)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：10294422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣摘出処理、ビスフォスフォネート投与およびテリパラチドの投与が、Tリンパ球分画に影響を与えることが明らかになった。マウス大腿骨骨髓では、卵巣摘出や、ゾレドロネート投与によりCD3陽性細胞が減少する。テリパラチド投与は、卵巣摘出や、ゾレドロネート投与により減少したCD3陽性細胞を増加させる効果がある。

また、マウス顎骨の新生骨において、ゾレドロネート投与によりミネラル/マトリックス比は有意に増加する一方で、結晶化度、プロテオグリカン含有率、コラーゲン構造の完全性は減少する。

研究成果の概要(英文)：The distribution of T cells was influenced by the ovariectomy and administrations of bisphosphonate or teriparatide. The number of CD3+ cells within the femur bone marrow of the mice was down-regulated by the ovariectomy and administration of zoledronate. However, this number was up-regulated by the administration of teriparatide. Mineral/matrix ration was significantly increased by the administration of zoledronate within the newly formed bone in the mandible of mice, however crystallinity, relative proteoglycan content and collagen structural integrity were significantly decreased.

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨 顎骨壊死 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞は骨芽細胞ニッチとよばれる微小環境をつくりだし造血幹細胞(HSC)の恒常性を維持している。これまで骨粗鬆症について、骨芽細胞、破骨細胞などに着目する研究は多数あるが、骨粗鬆症と骨芽細胞ニッチ、HSCとの関連を研究した報告は極めて少なかった。申請者は骨粗鬆症に関する研究、骨髄由来幹細胞に関する研究をとおして骨粗鬆症モデルマウスでT細胞、B細胞の細胞分画(サブセット)や血清中のM-CSF量が変動する現象を発見していた。

2. 研究の目的

骨粗鬆症と骨芽細胞ニッチおよびHSCの関連を解明し、ビスフォスフォネート(BP)による顎骨壊死(BRONJ)の分子病態メカニズムを検討する。これにより骨粗鬆症やBRONJの新規治療法の礎となる基礎的研究を展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)骨粗鬆症や骨粗鬆症治療薬が免疫系細胞へ与える影響の解明 リンパ球サブセット解析;骨粗鬆症モデルマウスはOVXにより作製した。骨粗鬆症治療薬にはゾレドロネート、テリパラチド(副甲状腺ホルモン)を用い、投与開始後10週、20週、30週でマウスから末梢血を採取した。抗CD45FITC抗体、抗CD3ePE-Cy7抗体、抗CD19APC抗体、抗CD49bPE抗体、抗CD11cV450抗体で多重染色を行いリンパ球のサブセット(T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞)をフローサイトメーターBD社製FACS Ariaにより解析した。さらにT細胞については、胸腺を回収し、抗CD4PE抗体、抗CD8aAPC-Cy7抗体によるサブセット解析、CD4+細胞については、抗Foxp3 Alexa Fluor 488、Th17-cytokine staining Panelでさらにサブセット解析を行った。

サイトカイン、ケモカイン、リンパ球転写因子のMultiple Assayによる解析;前述の骨粗鬆症モデルマウスを、同様にゾレドロネート、テリパラチドを投与し投与開始後10週、20週、30週で血清を回収する。EGF、G-CSF、M-CSF、TGF、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、Foxp3などは、MILLIPLEX® MAP Mouse Cytokine/Chemokine Multiplex Assays(ミリポア社製)で解析した。(2)骨粗鬆症や骨粗鬆症治療薬が大腿骨、下顎骨の骨密度、および骨質(構造特性および材料特性)へ与える影響の解明 骨密度(BMD)の解析;上記同様に骨粗鬆症モデルラットはOVXにより作製した。骨粗鬆症治療薬にはゾレドロネート、テリパラチド(副甲状腺ホルモン)を用い投与開始後2日目に、1.0mmラウンドバーを用いて下顎枝に貫通孔を作製した。さらに貫通孔作製28日後に下顎骨および大腿骨を摘出した。摘出した下顎骨および大腿骨はpQCT

(Norland/Stratec XCT Research SA+; Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany)にて骨密度(BMD)を測定した。尚計測部位は、大腿骨では、遠位骨端部成長線部より1, 2, 3mm近位部の3ポイントとした。また下顎骨では、穿孔部を中心とした直径0.8mmのROI(region of interest)とした。構造特性の計測;上記同様にて摘出した、下顎骨および大腿骨は、構造特性の計測のためbone volume / tissue volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular number (Tb. N), trabecular separation (Tb. Sp)を計測項目とした。microCTは、Scan Xmate-A080, COMSCAN TECNO CO., LTD, Yokohama Japan.を用い、解析には骨解析ソフトTRI/3D-BON (Ratoc System Engineering Tokyo, Japan)を用いた。材料特性の計測;上記同様にて摘出した下顎骨の貫通孔周囲の新生骨は、材料特性の計測のため、ラマン分光顕微鏡(NRS-5100; Jasco, Tokyo, Japan)を用い、マッピング測定範囲:300 μm × 120 μm. 計測ポイント:貫通孔より100 μm外側からランダムに5箇所を設定し、計測項目は mineral/matrix, Crystallinity, B-type carbonate substitution, Relative proteoglycan contents, Collagen structural integrityの5項目とした。

4. 研究成果

(1) マウス大腿骨骨髄におけるCD3陽性細胞数についてコントロール群、ゾレドロネート投与群、テリパラチド投与群での比較では、大腿骨骨髄面積10⁴ μm²あたりに、それぞれ2.5個、0.25個、1.5個であり、ゾレドロネート投与によりマウス大腿骨骨髄では、CD3陽性細胞が有意に減少するものと思われた。マウス末梢血におけるリンパ球サブセット解析では末梢血リンパ球中のT細胞の割合はコントロール群、ゾレドロネート投与群、テリパラチド投与群は、それぞれ43%、43%、32%であった。末梢血リンパ球中のB細胞の割合は、コントロール群、ゾレドロネート投与群、テリパラチド投与群それぞれ43%、43%、57%であった。末梢血リンパ球中のT細胞の割合は、コントロール群、ゾレドロネート投与群、テリパラチド投与群それぞれ2.1%、2.4%、4.4%であった。末梢血中では、ゾレドロネート投与は、末梢血中のT、B、T細胞に影響を与えないが、テリパラチド投与はT細胞の割合を減じ、B細胞、T細胞の割合を増加させた。マウス胸腺細胞におけるリンパ球サブセット解析では、胸腺細胞では、CD4陽性、CD8陽性のDP細胞は全T細胞中にしめる割合が、コントロール群、ゾレドロネート投与群、テリパラチド投与群でそれぞれ16%、13%、36%であった。CD4陰性、CD8陰性のDN細胞は、全T細胞中にしめる割合がコントロール群、ゾレドロネート投与群、テリパラチド投与群でそれぞれ

1.5%, 1.8%, 2.3%であった。CD4 あるいは CD8 のいずれかが陽性の SP 細胞は、全 T 細胞中にしめる割合がコントロール群、ゾレドロンート投与群、テリパラチド投与群でそれぞれ 83%, 86%, 61%であった。これらより胸腺では、ゾレドロンート投与は、DP 細胞、DN 細胞、SP 細胞に影響を与えないことがわかった。一方テリパラチド投与では、胸腺細胞は、DP 細胞、DN 細胞を増加し、SP 細胞を減じることがわかった。また胸腺細胞では、T 細胞は、全 T 細胞中にしめる割合がコントロール群、ゾレドロンート投与群、テリパラチド投与群でそれぞれ 0.5%, 0.4%, 0.6%で有意差はなかった。

血清中のサイトカイン測定では、IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 RANTES(CCL-5) および tumor necrosis factor (TNF) が、ゾレドロンート投与群で低いことが示唆された。

(2) 大腿骨の骨密度 (BMD) では、遠位骨端部成長線部より 1, 2, 3mm 近位部の 3 ポイント Region1, Region2, Region3 それぞれについて、いずれも Sham 群に比較して、OVX 群で低値をしめした。一方ゾレドロンート投与群では Sham 群と同程度の値を示し、BMD 上は OVX による骨粗鬆症が、ゾレドロンート投与により生理的狀態に回復していると言えた。下顎新生骨の骨密度 (BMD) では、Sham 群、OVX 群、ゾレドロンート投与群間で、有意差は認めなかった。大腿骨の骨質構造特性の評価項目では、BV/TV (骨量), Tb.N (骨梁数), Tb.Th (骨梁幅) は、いずれも Sham 群に比較して、OVX 群で低値をしめした。一方、Tb.Sp (骨梁間隙) は、OVX 群が高値をしめした。一方ゾレドロンート投与群では、BV/TV (骨量), Tb.N (骨梁数), Tb.Th (骨梁幅) および、Tb.Sp (骨梁間隙) が Sham 群と同程度の値を示し、これらの評価項目上では、OVX による骨粗鬆症が、ゾレドロンート投与により生理的狀態に回復していると言えた。ラマン分光顕微鏡による、下顎貫通孔周囲の新生骨の評価で Mineral/matrix は、Sham 群、OVX 群に比較して、ゾレドロンート投与群で有意に増加しており、下顎骨新生骨において過剰な石灰化を示した。また、Crystallinity は、Sham 群、OVX 群に比較して、ゾレドロンート投与群で有意に低下しておりゾレドロンートが結晶格子の配列に参与し、結晶構造の完全性を低下または結晶の成熟を妨げる可能性を示した。B-type carbonate substitution は ZOL 群と OVX 群との間に有意差を認めず、ゾレドロンートは CO_3^{2-} 置換を引き起こさないことが示唆された。Relative proteoglycan contents は、Sham 群、OVX 群に比較して、ゾレドロンート投与群で有意に低下しておりゾレドロンートが下顎骨新生骨においてアパタイト形成に良好な環境を誘導していることが示唆された。Collagen structural integrity は Sham 群、OVX 群に比較して、ゾレドロンート投与群で有意に低下しており

ゾレドロンートが下顎骨新生骨のコラーゲンの質の劣化を誘導することを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Molecular alterations of newly formed mandibular bone caused by zoledronate. Yoshioka Y, Yamachika E, Nakanishi M, Ninomiya T, Nakatsuji K, Matsubara M, Moritani N, Kobayashi Y, Fujii T, Iida S. Int J Oral Maxillofac Surg. 査読有、2018 Mar 14. pii: S0901-5027(18)30042-0. doi: 10.1016/j.ijom.2018.02.002. [Epub ahead of print]

Medication-related osteonecrosis of the jaws caused lethal sepsis in an edentulous patient with multiple systemic factors. Yamashiro K, Sato A, Okazaki F, Nakano M, Sawaki K, Hirata Y, Yamachika E, Iida S, Takashiba S. Clin Case Rep. 査読有、2016 Dec 30;5(2):97-103. doi: 10.1002/ccr3.751. eCollection 2017 Feb.

The influence of zoledronate and teriparatide on gamma delta T cells in mice Eiki Yamachika, Yuichi Matsui, Masakazu Matsubara, Tatsushi Matsumura, Naoki Nakata, Norifumi Moritani, Atsushi Ikeda, Hidetsugu Tsujigiwa, Naoya Ohara, Seiji Iida Journal of Dental Sciences, 査読有、2017 12, 333-339 Doi 10.1016/j.jds.2017.03.007

骨吸収抑制薬関連顎骨壊死に由来した非クロストリジウム性ガス壊疽の 1 例 松原 正和(岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科分野), 石田 展久, 池田 篤司, 山近 英樹, 明石 翔, 飯田 征二 日本口腔外科学会雑誌、査読有、(0021-5163)63 巻 10 号 Page506-511(2017.10)

Anti-osteoporosis effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid in ovariectomized mice with increasing of bone density Kenichiro Kita, Eiki Yamachika, Masakazu Matsubara, Hidetsugu Tsujigiwa, Nobuhisa Ishida, Norifumi Moritani, Tatsushi Matsumura, Masahide Mizutani, Yuki Fujita, Kiyofumi Takabatake, Kenichiro Ejima, Hitoshi Nagatsuka, Yoshinori Yamaguchi, Seiji Iida Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有、2016 28(1): 66-72

Treatment of Osteonecrosis of the Jaw. Yamachika E, Matsubara M, Ikeda A, Matsumura T, Moritani N, Iida S. J

Craniofac Surg. 査読有、2015
Oct;26(7):e575-7. doi:
10.1097/SCS.0000000000002127

〔学会発表〕(計 11 件)

ゾレドロネート投与による下顎新生骨における分子改変 吉岡洋祐、山近英樹、中辻和樹、松原正和、森谷徳文、飯田征二 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2017/10/20-10/23 京都

ビスフォスフォネート製剤による免疫細胞への影響について $\gamma\delta$ T 細胞を指標として 中辻和樹、山近英樹、松井裕一、松原正和、森谷徳文、吉岡洋祐、飯田征二 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2017/10/20-10/23 京都

大量骨溶解を呈した下顎骨扁平上皮癌の一例 石田展久、松原正和、明石 翔、薬師寺翔太、山近英樹、飯田征二 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2017/10/20-10/23 京都

セツキシマブ単剤投与が著効した手術拒否進行下顎がんの 1 例 山近英樹、池田篤司、松原正和、石田展久、森谷徳文、仲田直樹、中辻和樹、吉岡洋祐、武田斉子、飯田征二 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2017/10/20-10/23 京都

人工呼吸管理中に浮腫による巨舌を呈した 1 例 石邊紀章、澤木康一、藤田佑貴、山近英樹、佐藤亜希、岡崎文彦、中野 誠、松村達志 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2017/10/20-10/23 京都

脱分化脂肪細胞を用いた骨再生医療の展望 - 脂肪幹細胞との比較実験 - 松原正和、山近英樹、中辻和樹、松井裕一、吉岡洋祐、明石 翔、松原理沙、飯田征二 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2017/10/20-10/23 京都

The influence of Zoledronate and Teripartide on Gd cells in mice. E. Yamachika, Y. Matsui, A. Ikeda, Y.

Yoshioka, M. Tatsubara, N. Moritani, T. Matsumura, S. Iida 98th Annual Meeting Scientific Sessions & Exhibition American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Las Vegas NV USA 2016 年 09 月 18 日 ~ 2016 年 09 月 23 日

薬剤誘発性顎骨壊死が起因となった頬部ガス壊疽の一例 石田展久、松原正和、明石翔、合田宜子、山近英樹、飯田征二 第 70 回日本口腔科学会学術集会 福岡 2016 年 04 月 15 日 ~ 2016 年 04 月 16 日

テリパラチドとアモキシシリン投与が著効した MRONJ Stage3 の 1 例 山近英樹、松原正和、松井裕一、森谷徳文、松村達志、吉岡洋祐、田村庄平、妹尾昌紀、有村友紀、飯田征二 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会 名古屋 2015 年 10 月 16 日 ~ 2015 年 10 月 18 日

ビスフォスフォネート系製剤およびテリパラチドがリンパ球分画へ与える影響 松井裕一、山近英樹、有村友紀、合田裕、高畠清文、松原正和、飯田征二 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会 名古屋 2015 年 10 月 16 日 ~ 2015 年 10 月 18 日

リゼドロネートおよびテリパラチドがリンパ球分画へ与える影響 松井裕一、山近英樹、有村友紀、合田裕、高畠清文、松原正和、飯田征二 第 69 回日本口腔科学会学術集会 大阪 2015 年 05 月 13 日 ~ 2015 年 05 月 15 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山近 英樹 (YAMACHIKA Eiki)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：10294422

(2) 研究分担者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA Hidetsugu)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号：70335628

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()