

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11930

研究課題名(和文) T細胞が制御する骨代謝機構の解明と骨破壊性疾患分子標的薬の可能性の検討

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of bone metabolism regulated by gamma delta T cells and investigation of the possibility of a molecular targeted agent for metabolic bone diseases

研究代表者

西村 寿晃(NISHIMURA, KAZUAKI)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：50367611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨代謝と免疫細胞の関連において、不明な点は未だ多い。本研究では、末梢血中では数%しか存在しない T細胞が関与する骨代謝制御のメカニズムを解明し、新たな治療選択肢を検討する事を目的とした。 T細胞受容体ノックアウトマウスを用いた実験で、 T細胞が破骨細胞由来のタンパク質を抗原認識し活性化されることで、RANKL依存性破骨細胞分化を制御している事が明らかとなった。 T細胞の認識抗原をコントロールすることは新たな骨代謝関連疾患の治療選択肢になることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎え、多くの高齢者が抱えている骨代謝関連疾患に対する新たな予防や治療方法は重要な課題の一つと言え、治療手段の選択肢の多様化が求められている。本研究は免疫を司る細胞である T細胞が関与する骨代謝制御のメカニズムを解明し、新たな治療選択肢を検討する事を目的とした。 T細胞が骨を壊す破骨細胞由来のタンパク質を抗原認識し活性化されることで、破骨細胞分化を制御している事が明らかとなった。 T細胞に関連するタンパク質をコントロールすることは新たな骨代謝関連疾患の治療選択肢になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is reported that subsets of T cell receptor (TCR) T cells affect bone remodeling by the production of osteoclastogenesis up- or down-regulatory factors. On the other hand, possible enrolment of TCR T cells which consist only 1-5% of whole T cell population in bone remodeling process remains unclear. The present study investigated the possible regulatory roles of T cells in the osteoclastogenesis. T cells regulate RANKL-induced osteoclastogenesis in vivo and in vitro. This regulation is not required cell-cell contact but activated T cells by proteins produced from osteoclasts modulate osteoclastogenesis. It was suggested that controlling the antigens recognized by T cells may be novel option for patients with metabolic bone diseases.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：免疫学 T細胞 骨代謝 破骨細胞 骨芽細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨組織は破壊と形成のバランスで恒常性を維持している。歯科矯正治療による歯の移動は圧迫側での骨吸収と牽引側での骨添加・形成が活発となり、骨の改造現象が歯槽骨で生じる。しかし、そのバランスが局所的に破綻すれば、歯の移動が阻害される事や、歯槽骨が破壊され歯を失う事もある。また、そのバランスの破綻が全身的に生じれば、骨粗鬆症、関節リウマチ、ガンの骨転移による骨量減少などを引き起こすこととなり長寿高齢化社会を迎えた先進諸国において重要な医療課題となっており、その予防・治療法の確立が望まれている。

免疫細胞と骨の関連性が注目されるなか、骨免疫学(Nature.2000)の分野において、 $\alpha\beta$ T細胞と骨代謝の関連を示す報告は多数ある。一方、 $\alpha\beta$ T細胞とは抗原受容体遺伝子が異なる $\gamma\delta$ T細胞と骨代謝との関連性はほとんど報告されていない。 $\gamma\delta$ T細胞は末梢血中で約5%しか存在しないが、腫瘍細胞に対する優れた認識・攻撃性を有することからガン治療への応用(Cell Mol Immunol.2013)、ビスホスホネート製剤(BP)による顎骨壊死の診断応用の可能性(JBMR.2013)などが報告されており、近年 $\gamma\delta$ T細胞の機能が多方面で注目されている。

これまで我々は、免疫学的な観点からビスホスホネート製剤による顎骨壊死の原因解明過程で、 $\gamma\delta$ T細胞が骨髄中に Homing し破骨細胞分化を強力に抑制すること、また前破骨細胞の融合が抑制された状態またはビスホスホネート存在下において骨芽細胞の分化を抑制することを確認しており(BBRC 2016)、これは $\gamma\delta$ T細胞が骨代謝制御に重要な役割を果たしている事を示唆しているが、詳細なメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

免疫系の細胞と骨の関連が明らかになってきているが不明な点も多い。本研究の目的は、 $\gamma\delta$ T細胞が骨吸収と骨形成の両方をコントロールし骨代謝を制御するメカニズムの解明と分子標的薬を用いた骨破壊性疾患への臨床応用の可能性を検討することである。本研究は、様々な骨破壊性疾患での新たな治療選択肢としての臨床応用の可能性があるものと考ええる。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスと $\gamma\delta$ TCR ノックアウトマウスの骨髄中のT細胞比率

$\gamma\delta$ TCR ノックアウト ($\gamma\delta$ KO) マウスおよび野生型 (WT) マウスそれぞれから脾細胞および骨髄細胞を抽出し、フローサイトメーターにて $\alpha\beta$ T細胞と δ T細胞の比率を検討した。

(2) $\gamma\delta$ T細胞の破骨細胞分化への影響の検討

$\gamma\delta$ KO マウスおよび WT マウスより骨髄 (BMM) 細胞を回収し、macrophage colony stimulating factor (M-CSF)、Receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL)を添加し破骨細胞分化誘導をおこなった。 $\gamma\delta$ T細胞は磁気分離法により WT マウスより回収し、フローサイトメーターにて純度 95%以上であることを確認して使用した。RANKL で刺激した骨髄細胞と $\gamma\delta$ T細胞を細胞接触が可能な条件下または非接触条件下で培養した。非接触条件下における影響を調べるためにはトランスウェルチャンバーを用いた。

(3) 実験動物を用いた $\gamma\delta$ T細胞の骨代謝への影響の検討

ドナーマウス (WTマウス)より得た $\gamma\delta$ T細胞は4日間培養し、レシピエントマウス($\gamma\delta$ KO)の尾静脈より移植した。その後、大腿骨を回収し μ CTおよびフローサイトメーターにて解析した。

4. 研究成果

(1)骨髄中の $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞の割合

脾臓では CD3 陽性細胞の中で $\gamma\delta$ T細胞の比率は約 2.5%で末梢血中の比率と同程度であった。一方、骨髄においては $\gamma\delta$ T細胞が約 10%存在していた(図 1)。これは $\gamma\delta$ T細胞が骨髄に遊走

していることを示唆している。

(2) 破骨細胞分化に対する $\gamma\delta$ T 細胞の影響

$\gamma\delta$ KO マウスから採取した骨髄細胞は WT マウスの骨髄細胞より有意に Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 陽性細胞が多く認められ、TRAP 陽性細胞あたりの核数も、 $\gamma\delta$ KO マウスは WT マウスより有意に多かった。また、培養液上清中の IFN- γ 濃度は WT マウスで $\gamma\delta$ KO マウスより有意に高かった(図 2)。(図 2: $\gamma\delta$ T 細胞の破骨細胞分化抑制効果 A: TRAP 染色、B: 多核 TRAP 陽性細胞数、C: TRAP 陽性細胞における核数、D: 培養液上清中の IFN- γ 濃度)

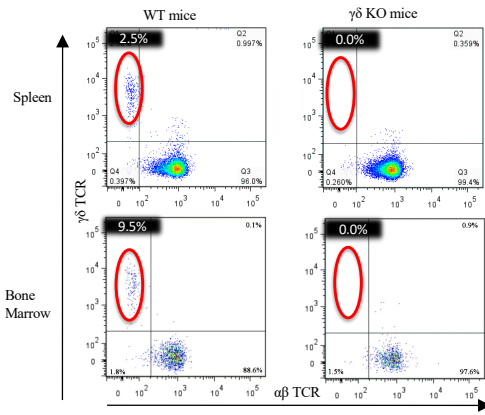


図 1: 脾臓と骨髄における $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞の割合

(3) $\gamma\delta$ T 細胞由来の IFN- γ の破骨細胞分化に対する影響

$\gamma\delta$ T 細胞と WT マウス又は、 $\gamma\delta$ KO マウス由来の骨髄細胞の共培養をトランスウェルチャンバーを用いて、細胞間接触がない状態でおこなった。いずれの群においても共培養下で破骨細胞への分化は有意に抑制された。IFN- γ の中和抗体添加によって、WT 骨髄細胞では破骨細胞分化が促進されたが、 $\gamma\delta$ KO 骨髄細胞では変化がなかった。リコンビナント IFN- γ の添加で、破骨細胞分化は WT 骨髄細胞、 $\gamma\delta$ KO 骨髄細胞のいずれにおいても抑制された。IFN- γ

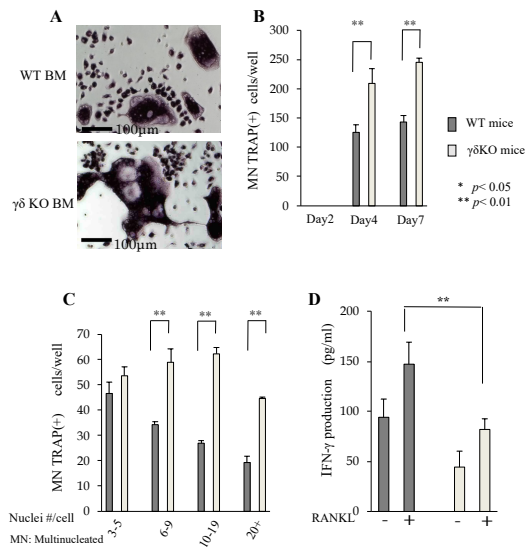


図 2: $\gamma\delta$ T 細胞の破骨細胞分化抑制効果

KO マウスから採取した $\gamma\delta$ T 細胞は、WT マウス骨髄細胞または $\gamma\delta$ KO マウス骨髄細胞との共培養で、いずれも破骨細胞分化の抑制を示さなかった。この結果は、 $\gamma\delta$ T 細胞から産生される IFN- γ が破骨細胞分化の抑制を担っていることを示唆している(図 3)。(図 3: (A) トランスウェルチャンバーを用いて骨髄細胞と WT マウス由来 $\gamma\delta$ T 細胞を共培養時の TRAP 陽性細胞数 (B) IFN- γ 中和抗体およびリコンビナント IFN- γ 添加時の TRAP 陽性細胞数 (C) トランスウェルチャンバーを用いて骨髄細胞と IFN- γ KO マウス由来 $\gamma\delta$ T 細胞を共培養時の TRAP 陽性細胞数)

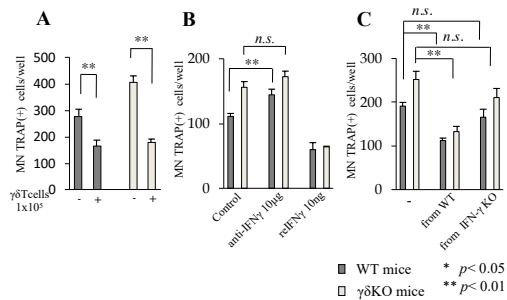


図 3: $\gamma\delta$ T 細胞由来の IFN- γ の破骨細胞分化抑制効果

(4) $\gamma\delta$ T 細胞の骨密度への影響

μ CT 解析において、大腿骨の海綿骨の bone volume / tissue volume (BV/TV) は $\gamma\delta$ KO マウスの方が WT マウスに比べて有意に低かった。WT マウス由来の $\gamma\delta$ T 細胞を $\gamma\delta$ KO マウスに移入したところ、大腿骨における BV/TV が WT マウスと同程度まで回復した(図 4)。その他の

海綿骨微細構造パラメーターも WT マウスと同程度まで回復していた。また、移植した $\gamma \delta T$ 細胞が骨髄に遊走していることをフローサイトメーターにて確認した。

以上の結果より、RANKL 依存性の破骨細胞形成において $\gamma \delta T$ 細胞は調節的役割を果たしており、本調節機構においては細胞—細胞の接触は不要であり、 $\gamma \delta T$ 細胞が $IFN-\gamma$ を産生し、RANKL 依存性の破骨細胞形成を調整している可能性が示唆された。

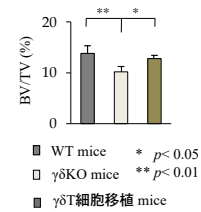


図4： $\gamma \delta T$ 細胞の骨密度への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshimichi Imai, Tetsu Nakajo, Kazuaki Nishimura, Hiroyuki Kanzaki, Takayoshi Daimaruya, Akimitsu Satoh, Kaoru Igarashi, Masahiro Tachi	4. 巻 29(2)
2. 論文標題 Nasopharyngoscopic Analyses through Anterior Maxillary Distraction Osteogenesis for Adolescent Patients with Cleft Palate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Craniofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 270-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SCS.0000000000004095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroyuki Kanzaki, Yoshimichi Imai, Tetsu Nakajo, Takayoshi Daimaruya, Akimitsu Sato, Masahiro Tachi, Youhei Nunomura, Yusuke Itagaki, Kazuaki Nishimura, Shoko Kochi, Kaoru Igarashi	4. 巻 28(4)
2. 論文標題 Midfacial Changes Through Anterior Maxillary Distraction Osteogenesis in Patients with Cleft Lip and Palate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Craniofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 1057-1062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SCS.0000000000003506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 今井 啓道, 西村 壽晃, 三浦 千絵子, 佐藤 顕光, 村木 健二, 土谷 忍, 五十嵐 薫, 館 正弘
2. 発表標題 顎裂手術と矯正治療の連携と工夫 東北大学病院での医科・歯科連携による顎裂部骨移植 歯科との連携で可能となった形成外科での顎裂部骨移植
3. 学会等名 日本口蓋裂学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 布村 陽平, 西村 壽晃, 今井 啓道, 五十嵐 薫
2. 発表標題 片側性唇顎口蓋裂患者における上顎前方牽引による治療効果とその持続性
3. 学会等名 日本口蓋裂学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村 壽晃, 田原 麻梨江, 中村 健太郎
2. 発表標題 超音波を用いたビスホスホネート関連顎骨壊死治療法
3. 学会等名 生体医歯工学共同研究拠点成果報告
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井 武展, 大竹 智久, 崔 大煥, 石川 宗理, 末石 研二, 渡邊 章, 斎藤 力, 石塚 洋一, 天野 克比古, 長尾 雅史, 西村 壽晃, 河井 敬久
2. 発表標題 変形性顎関節症の軟骨破壊に対する性ホルモンと機械的刺激の作用機序の解明
3. 学会等名 東京歯科大学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuaki Nishimura, Marie Tabaru, Kentaro Nakamura
2. 発表標題 Impact of Ultrasound therapy on Bisphosphonate related osteonecrosis of the Jaw
3. 学会等名 International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuaki Nishimura, Alexandru Movila, Kaoru Igarashi, Toshihisa Kawai
2. 発表標題 Possible involvement of T cells in osteoclastogenesis
3. 学会等名 International association for dental research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤千晶, 西村壽晃, 五十嵐薫
2. 発表標題 東北大学病院顎口腔機能治療部における唇顎口蓋裂患者に対する歯科矯正用アンカースクリューの使用実態
3. 学会等名 日本口蓋裂学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井健人, 中村健太郎, 田原麻梨江, 西村壽晃
2. 発表標題 薄板のたわみ振動を利用した MHz 口腔用 振動子に関する基礎検討
3. 学会等名 日本音響学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Marie Tabaru, Kento Fujii, Kentaro Nakamura, Mutsuo Ishikawa, Kazuaki Nishimura
2. 発表標題 Evaluation of low-intensity ultrasonic transducer for oral treatment
3. 学会等名 symposium on ultrasonic electronics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Satom, Kazuaki Nishimura, Marie Tabaru, Kentaro Nakamura
2. 発表標題 Impact of Ultrasound therapy on Bisphosphonate related osteonecrosis of the Jaw
3. 学会等名 International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	一文字 功 (Ichimonji Isao) (40753215)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	
研究分担者	五十嵐 薫 (Igarashi Kaoru) (70202851)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	石井 武展 (Ishii Takenobu) (80433978)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	