

令和 4 年 5 月 4 日現在

機関番号：85306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09721

研究課題名(和文) 免疫異常と基質タンパク構造変異からみたMRONJ発症の解明と発症前診断の検討

研究課題名(英文) A study for MRONJ and its presymptomatic diagnosis from the viewpoint of changes in immunity and matrix protein structure of bone

研究代表者

山近 英樹 (Yamachika, Eiki)

独立行政法人国立病院機構岡山医療センター(臨床研究部)・独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター(臨床研究部)・歯科医師

研究者番号：10294422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゾレドロンート投与にて、新生骨では結晶構造が未熟なまま過剰な石灰化を示す骨が形成される。さらに骨の基質タンパクであるI型コラーゲンの架橋構造が、劣化(老化)しているものと思われた。同時に骨髄、末梢血中でリンパ球、サイトカインの解析から免疫応答の調整が乱れ、炎症の増悪・遷延化を来しやすい環境がつけられていると考えられた。これらの結果は顎骨壊死の病態解明に有効と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではMRONJを免疫機構の異常と結合組織基質タンパクの脆弱化が複合して発症する病態ととらえ、MRONJが引き起こしている免疫系細胞の異常、および間質細胞が造り出す結合組織基質タンパク構造の異常を示した。これらの結果は、今後のMRONJの研究や、発症前診断、新規治療法の開発につながるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Zoledronate affects the material characteristics of newly formed bone. The mineral/matrix ratio in rats that received zoledronate was significantly increased, while crystallinity and collagen structural integrity were significantly decreased. Zoledronate also decreased the T cell number in the bone marrow and peripheral blood. Additionally, serum levels of cytokines that affect T cell activation and immunity were significantly changed. These results may explain why bone that received zoledronate exhibited peculiar biological phenomena such as MRONJ

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨 顎骨壊死 骨粗鬆症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) は、ビスフォスフォネート (BP)、デノスマブ (Dmab) など骨関連薬剤により難治性の顎骨壊死を生じる疾患である。MRONJ を引き起こす薬剤としては、BP あるいは Dmab があげられるがこれらの薬剤は一般に破骨細胞に抑制的に作用している。例えば Dmab は、RANKL-RANK 系を遮断することで、また BP は直接破骨細胞に取り込まれ、いずれも破骨細胞の機能を抑制する。これは骨粗鬆症治療薬あるいはがんの骨転移抑制薬としてのこれらの薬剤を説明するが、MRONJ の顎骨壊死すなわち免疫能の混乱、低下を伴う感染症的な側面や、骨露出、粘膜上皮の消失すなわち骨基質、結合組織基質の脆弱化といった側面を説明できない。一方で、高齢化にともない骨粗鬆症患者、がん患者が増えることから MRONJ はより深刻化すると予想され、発症前診断や根治的治療法が待たれるところである。

2. 研究の目的

MRONJ の分子病態メカニズムを「免疫機構の異常」と「骨および結合組織の基質タンパク質の構造変化」より解明する。さらに基質タンパクの構造解析より MRONJ の発症前診断の可能性と、新規治療法を検証する。

3. 研究の方法

骨修飾薬が T 細胞に与える影響の解明

マウスへの投与実験により末梢血、脾臓、胸腺の CD4 陽性 T 細胞のサブセット解析を行う。

骨修飾薬がサイトカインおよび T 細胞以外の血球系細胞に与える影響の解明

骨修飾薬のマウスへの投与実験により、血清サイトカインをマイクロプレートアッセイおよび ELISA にて解析を行う。さらに T 細胞以外の血球系細胞に与える影響を FACS にて解析する。

ラマン解析による基質タンパクの構造解析および発症前診断の検証

骨修飾薬投与マウスから骨基質および結合組織を採取して、ラマン解析により基質タンパクの架橋構造の変化を解析する。

4. 研究成果

(1)

ビスフォスフォネート、テリパラチドおよびカテプシン K インヒビターによる「免疫機構の異常」と「骨および結合組織の基質タンパク質の構造変化」に取り組み、とりわけ、これらの薬剤により、新規形成骨中の石灰化度、結晶化度、アパタイトにおける C03 2-置換度、プロテオグリカン量、コラーゲンの質についてラマン分光顕微鏡を用いた解析をおこなった。具体的には、ラット下顎骨に人工的に貫通孔を形成し孔周囲から新生骨を再生させたところ、ビスフォスフォネート処理群では新生骨中の石灰化度は上昇するが、基質タンパクである I 型コラーゲンの架橋構造について言えば、劣化 (老化) しているものと思われた。一方カテプシン K インヒビター処理群では、結晶化度に異常を示しアパタイトにおける C03 2-置換度が上昇するものと思われた。またマウスを用いた研究によりビスフォスフォネート処理群において大腿骨骨髄での T 細胞の数が減少し、血清中のインターロイキン 2, インターロイキン 7, インターロイキン 15 に変動を認めた。一方テリパラチド処理群では、ガンマデルタ T 細胞が末梢血中で増加する可能性が示唆された。

(2)

卵巣摘出による骨粗鬆症モデルマウスにおいて、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。マウス大腿骨骨髄では、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ものと思われた。

また、ラット下顎新生骨においてゾレドロネート投与は、ミネラル/マトリックス比 (mineral/matrix ratio) を有意に増加させ、下顎新生骨において過剰な石灰化を示すことがわかった。一方で、ゾレドロネート投与は、結晶化度 (crystallinity) を低下させ結晶格子の配列に關与し、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。ゾレドロネート投与によりプロテオグリカン含有率 (relative proteoglycan content) が低下しており下顎新生骨においてアパタイト形成に適した環境を誘導する一方で、コラーゲン構造の完全性 (collagen

structural integrity)は減少することがわかった。

一方、ラット下顎新生骨においてテリパラチド投与では、下顎新生骨のミネラル/マトリックス比(mineral/matrix ratio)と、コラーゲン構造の完全性(collagen structural integrity)のいずれもが劣化していることがわかった。これらの原因について、血清中の抗酸化物質活性の計測からは、テリパラチド投与によりマウス血清中の抗酸化物質活性が減少し、相対的に酸化ストレス指標が増加していることが確認された。

(3)

マウスにおいてビスフォスフォネート投与によりマウス大腿骨骨髄中の Runx が減少することが確認された。さらにこのときに CD3 陽性細胞をヘルパーT 細胞へ分化誘導する Th-PoK タンパクの発現が確認された。そこでマウス胸腺および末梢血の CD3 陽性細胞を、CD4 および CD8 の T リンパ球分画をフローサイトメーターにて確認すると(1)CD4+/CD8-細胞はゾレドロネート投与により胸腺および末梢血中で増加すること。(2)CD4-/CD8+細胞はゾレドロネート投与により胸腺で増加し末梢血中で減少すること。(3)CD4+/CD8+細胞はゾレドロネート投与により胸腺で減少すること。(4)CD4-/CD8-細胞はゾレドロネート投与により胸腺で増加することがわかった。すなわちゾレドロネート投与により末梢血中のヘルパーT 細胞が増加、細胞障害性 T 細胞が減少しているものと思われた。さらに血清中のサイトカイン解析よりは、ゾレドロネート投与により IL-1beta, TNF-alpha, IL-17 が対照群に比較して減少していた。

(4)

マウスへのゾレドロネート投与により末梢血 T 細胞の減少、胸腺 DP 細胞、DN 細胞の増加、CD4SP 細胞、CD8SP 細胞の減少を確認した。これらは、ゾレドロネート投与群において細胞性免疫が抑制されている可能性を示唆した。さらに、ゾレドロネート投与群において末梢血中 B 細胞の増加と T 細胞の減少を認め、RT-PCR からは Wnt10 の発現が亢進することがわかった。血清サイトカイン解析からは IL-6, IFN-gamma, TNF-alpha が増加しており、これらのことよりゾレドロネート投与により過剰な炎症反応が遷延化する可能性が示唆された。

以上(1)～(4)より

ゾレドロネート投与にて、新生骨では結晶構造が未熟なまま過剰な石灰化を示す骨が形成されることがわかったが、同時に免疫応答の調整が乱れ、炎症の増悪・遷延化を来しやすい環境がつけられていると考えられる。これらの結果は顎骨壊死の病態解明に有効と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kiyofumi Takabatake, Masakazu Matsubara, Eiki Yamachika, Yuki Fujita, Yuki Arimura, Kazuki Nakatsuji, Keisuke Nakano, Histoshi Nagatsuka, Seiji Iida	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparing the Osteogenic Potential and Bone Regeneration Capacities of Dedifferentiated Fat Cells and Adipose-Derived Stem Cells In Vitro and In Vivo: Application of DFAT Cells Isolated by a Mesh Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 12392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshioka Y, Yamachika E, Nakanishi M, Ninomiya T, Akashi S, Kondo S, Moritani N, Kobayashi Y, Fujii T, Iida S	4. 巻 29;9(1)
2. 論文標題 Intermittent parathyroid hormone 1-34 induces oxidation and deterioration of mineral and collagen quality in newly formed mandibular bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44389-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshioka Y, Yamachika E, Nakanishi M, Ninomiya T, Nakatsuji K, Kobayashi Y, Fujii T, Iida S	4. 巻 56(8)
2. 論文標題 Cathepsin K inhibitor causes changes in crystallinity and crystal structure of newly-formed mandibular bone in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The British journal of oral and maxillofacial surgery	6. 最初と最後の頁 732 ~ 738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bjoms.2018.08.003.	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 Yoshioka Y, Yamachika E, Nakanishi M, Ninomiya T, Nakatsuji K, Matsubara M, Moritani N, Kobayashi Y, Fujii T, Iida S	4. 巻 47(9)
2. 論文標題 Molecular alterations of newly formed mandibular bone caused by zoledronate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International journal of oral and maxillofacial surgery	6. 最初と最後の頁 1206 ~ 1213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijom.2018.02.002.	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田畑光康、山近英樹、森谷徳文、松村達志、岡本成美、中田靖章、飯田征二
2. 発表標題 当科における外科療法をおこなった慢性顎骨骨髓炎症例に対する統計的検討
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本成美、山近英樹、松原正和、藤田佑貴、吉岡洋祐、飯田征二
2. 発表標題 イマチニブ投与患者における抜歯窩治癒遅延の1例(ONJとの関連から)
3. 学会等名 第40回岡山歯学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡洋祐、山近英樹、森谷徳文、飯田征二
2. 発表標題 iPTH投与による酸化・抗酸化バランスおよび下顎新生骨における骨質の変化
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村庄平、松原正和、山近英樹、松村達志、吉岡洋祐、飯田征二
2. 発表標題 両側下顎臼歯部に発生したビスフォスフォネート関連顎骨壊死に対しテリパラチドが奏功した1例 骨代謝マーカーの計測の有用性
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 成美, 山近 英樹, 松原 正和, 藤田 佑貴, 吉岡 洋祐, 飯田 征二
2. 発表標題 イマチニブ投与患者における抜歯窩治癒遅延の1例(ONJとの関連から)
3. 学会等名 岡山歯学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡 洋祐, 山近 英樹, 中辻 和樹, 松原 正和, 森谷 徳文, 飯田 征二
2. 発表標題 ゾレドロンート投与は下顎新生骨の骨質材質特性を劣化させる
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松原 正和, 山近 英樹, 中辻 和樹, 吉岡 洋祐, 石田 展久, 明石 翔, 松本 卓, 高島 清文, 飯田 征二
2. 発表標題 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた骨再生療法についての検討
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 佑貴, 松村 達志, 澤木 康一, 柳 文修, 山近 英樹, 岡崎 文彦, 中野 誠, 飯田 征二
2. 発表標題 テリパラチド投与により良好な治療結果が得られたMRONJの1例
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡 洋祐, 山近 英樹, 中西 真, 二宮 禎, 明石 翔, 松原 正和, 森谷 徳文, 小林 泰浩, 藤井 達生, 飯田 征二
2. 発表標題 PTH間歇投与による下顎新生骨の骨質変化 ラマン分光法を用いた骨質解析
3. 学会等名 日本骨形態計測学会
4. 発表年 2018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	辻極 秀次 (Tsuji giwa Hidetsugu) (70335628)	岡山理科大学・理学部・教授 (35302)	
研究分担者	森谷 徳文 (Moritani Norifumi) (60467751)	岡山大学・岡山大学病院・講師 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------