

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791485

研究課題名（和文） 免疫抑制剤を局所投与した移植骨の骨系細胞における NFAT シグナルの解析

研究課題名（英文） Analysis of NFAT signaling of osseous cells of iso-grafted bone treated with topical administration of immunosuppressant agent.

研究代表者

廣谷 拓章 (Hirokuni Hiroaki)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90312595

研究成果の概要(和文)：

骨吸収を担う破骨細胞や骨形成を担う骨芽細胞の分化に NFAT が深く関与していることが明らかにされ、関心が高まっている。本研究では自家骨移植と考える同系マウスの骨移植の実験モデルを作製し、免疫抑制剤であるサイクロスポリン A (CsA) を移植骨に持続的に投与して、骨系細胞における NFAT シグナルの解析を行った。摘出した移植骨を軟 X 線撮影して骨塩量を比較したが、CsA 投与骨と生食を投与した対照骨で明らかな違いは見られなかった。CsA 投与骨の破骨細胞数は減少していたが、骨芽細胞数にも減少傾向があり、NFAT の抑制によるリモデリングの低下が生じていたことが推測された。また、Fas 介在性アポトーシスに NFAT が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The present study was undertaken to analyze NFAT signaling of osseous cells of iso-grafted bone treated with topical administration of immunosuppressant drug, cyclosporine A. The iso-grafted bone was dissected and taken by soft X-ray. Topical cyclosporine A had no effect on bone mineral content. Topical cyclosporine A decreased the number of osteoclast and osteoblast. These results suggest that topical cyclosporine A decreased bone turnover of iso-grafted bone and another data suggest that NFAT is involved in Fas-mediated apoptosis of osseous cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	660,000	3,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域では嚢胞や腫瘍、顎裂やインプラントなどの治療に際して骨欠損部の補填のために自家骨移植が必要な場合がある。移植骨の生着の可否や経時的吸収量は予後を左右する重大な問題であるが、有効な手段が無いのが現状である。骨代謝は骨形成を司る骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞のバランスの上に成り立っており、破骨細胞の分化・活性にはTリンパ球や骨芽細胞、繊維芽細胞などが産生するRANKLが必須で、RANKLのデコイレセプターであるOPGはその活性を抑制する。関節リウマチ(RA)などの病的骨吸収部ではRANKLの産生が上昇しており、活性化された破骨細胞によって関節の破壊が起こっていることが明らかにされている。このように骨吸収の抑制にはRANKLやOPGの制御を含めた破骨細胞の分化、増殖、活性を制御することが重要であり、様々な研究が進められている。一方、NFAT(nuclear factor of activated T cells)はTリンパ球においてIL-2やTNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインの産生を促す転写因子として研究され、通常は細胞質内に非活性型として存在し、calcineurinによる脱リン酸化を受けると活性型となり、標的遺伝子の転写を開始する。臓器移植後などに用いられる免疫抑制剤であるCsAやFK506はcalcineurinを選択的にブロックすることでNFATの活性化を阻害し、免疫抑制作用を起こす。我々は破骨細胞へのCsA投与が破骨細胞のアポトーシスを誘導することを発見し報告した。また、破骨細胞にNFATが発現していることや破骨細胞の分化に必須であるRANKLによってその発現が上昇すること、単球系細胞株であるRAW264.7cellに活性型NFATを過剰発現させるとRANKL投与なしに骨吸収能を持つ破骨細胞へと分化することを報告した。最近、破骨細胞がテスレプター/リガンドであるFas/FasL経路でアポトーシスを起こすことや、破骨細胞のFas発現にRANKLが関与していることが報告されたが、RANKLにより破骨細胞のNFAT発現が上昇することを考え合わせると、破骨細胞のFas産生にNFATが大きく関与している可能性がある。またRA滑膜の繊維芽細胞におけるVEGF産生にNFATが重要であり、産生されたVEGFは破骨細胞の活性化を促すこと、CsAの全身的投与によってRA部でのNFATの活性化が阻害されて破骨細胞の活動が抑制されること、骨芽細胞の増殖にcalcineurin/NFATが関与していることなども報告されており、骨系細胞におけるNFATの重要性への関心が非常に高まっている。

CsAやFK506などの免疫抑制剤の全身的投与が骨代謝に与える影響については以前より研究されているが、*in vitro*での破骨細胞抑制作用の報告とは逆に、骨吸収が促進して骨減少を生じるとする報告が多くみ

られる一方で、逆に骨増生が進むとする報告もあり、見解の一致をみていない。これは免疫抑制剤の投与を受ける臓器移植後や重度のRAの患者の多くが、骨代謝に様々な影響を及ぼすステロイドやビタミンDなどの多種の薬剤を同時に服用しているために、免疫抑制剤単独の骨代謝への影響の評価が難しいことが一因と考えられているが、*in vitro*と*in vivo*での結果の大きな乖離については未だ解明されていない。また、免疫抑制剤には副作用が多く、長期的な高用量での全身的投与には問題が多い。一方、免疫抑制剤を用いた骨移植の実験系としてはラットや豚などを用いての血管柄付きの同種骨移植あるいは同系骨移植への全身的投与の実験系での報告があるが、骨形成が促進されるとする報告と、骨肥大は認めるものの骨強度は低下するとの報告があり一致しておらず、またその詳しい機序については不明なままであった。

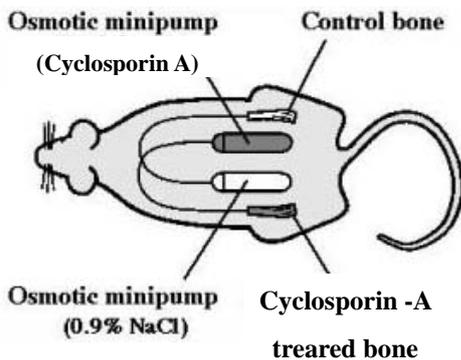
2. 研究の目的

本研究では以上の点をふまえて、近交系マウスであるC3H/HeJ-+/+ (以下C3H/+)マウスの脛骨を用いての同系移植骨(自家移植骨と同等と考え得る)にオスモティックポンプを用いてCsAを持続的に局所投与し、NFATの活性を局所的に抑制することが移植骨の骨形成、骨吸収に与える影響について解析した。骨系各細胞については、破骨細胞や骨芽細胞、繊維芽細胞のNFATの活性動態が移植骨の骨形成・骨吸収に与える影響を検討した。また、wild typeであるC3H/+マウスに対して、機能的なFasを遺伝的に欠損しているC3H/HeJ-lpr/lpr (以下C3H/lpr)マウスを用いて同様の骨移植を行い、C3H/+マウスの結果と比較・検討を行い、Fas/FasL経路でのアポトーシスが移植骨の骨形成・骨吸収に与える効果、およびNFAT活性とFas介在性アポトーシスの関係を検討した。

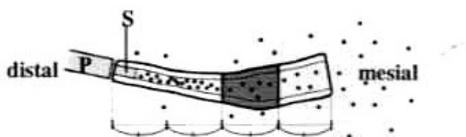
3. 研究の方法

同系骨移植の実験系として、同系マウスであるC3H/HeJ-+/+ (以下C3H/+)マウス、およびFas欠損同系マウスであるC3H/HeJ-lpr/lpr (以下C3H/lpr)マウスを用いた。これらのマウスは20代以上兄妹交配を行った近交系マウスであり、遺伝的にはほぼ同一な個体群で、組織適合抗原が同一であるため、個体間で骨移植を行ったばかりでも移植片と宿主間の免疫応答は起こらず、自家骨移植と同じ状態を得ることが出来る。10週齢のオスのマウス同士で同系骨移植を行った。donorマウスをエーテルで屠殺した後

に骨膜に触れないように筋肉を可及的に除去して両側脛骨を摘出した。近遠心両骨端をエンジンおよびダイヤモンドホイールを用いて切断の後、ポリエチレンチューブを介してオスモティックミニポンプを移植骨の骨髓腔内に接続し、一方の脛骨にCsAを、他方の脛骨に0.9% NaClを持続的に投与した。これら一対の脛骨と、接続されたオスモティックミニポンプ（2個）は、同系統のrecipientマウスの側背部皮下の両側へ同時に移植した（下図）。

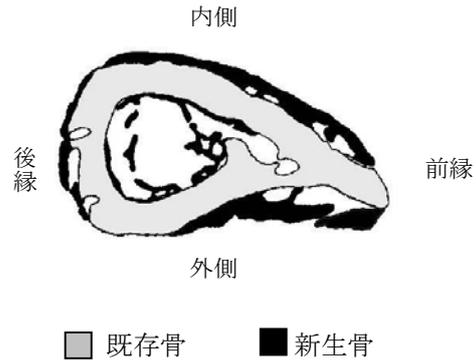


それぞれ、CsA濃度(0, 5, 10, 50mg/kg/day)と投与期間(0, 2, 4週間)の異なる群を作り、一定の投与期間の後、移植骨を摘出した。摘出した移植骨は固定後、SOFTXを用いて軟X線撮影を行った。その後、対であるCsA投与骨と対照骨の、長軸の中心から近心1/4の部位(下図)の同一部位から横断組織標本を作製した。



P: ポリエチレンチューブ
S: ステンレスパイプ

その後、移植骨の既存骨および外骨膜側、骨髓腔内における新生骨(皮質骨)の面積を測定・比較し、骨形態計測学的検索を行った(下図)。



また、骨表面にあり、TRAP染色陽性で核を3個以上持つ細胞を破骨細胞と定義し、その数を測定した他、骨芽細胞に覆われた骨面の長さを測定した。

分子生物学的には、摘出した骨組織をhomogenizeした後RNAを抽出してRT-PCRを行い、得られたfirst strand cDNAから各種特異的primerを用いて、NFATの各アイソフォーム(NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4)やRANK(RANKLレプター)、RANKL、OPG、TRACPやcathepsin Kなどの発現量をPCRで定量した。同様に摘出した骨組織から蛋白質を抽出し、western blottingにて細胞生存のシグナル伝達物質の一種であるAkt, ERK, NF- κ Bの蛋白発現量を定量した。

4. 研究成果

C3H/+マウスを用いた実験では、移植骨の軟X線写真による骨塩量は、対照骨とCsA投与骨に有意な違いはみられなかった。また、C3H/lprマウスでの実験でも同様に明らかな骨塩量の違いはなかった。

横断組織標本での検索では、いずれのマウスもCsA濃度が50mg/kg/dayの移植骨の骨髓腔や骨膜上には細胞がほとんどみられず、CsA濃度が高すぎたと考えられた。C3H/+マウスではCsA投与骨は対照骨と比較して外骨膜側の新生骨量が増大する傾向があった。またTRACP染色陽性破骨細胞数はCsA投与骨で減少していたが、骨芽細胞で覆われた骨面の長さも減少傾向があり、CsA投与によって移植骨の骨代謝が低下していることが示唆された。CsAを投与したC3H/lprマウスの移植骨の新生骨量はC3H/+マウスよりも若干増加傾向があったが、有意差はなかった。免疫染色の結果、C3H/+マウス群ではCsA投与骨のNFATの発現は対照骨よりも低下しており、局所投与したCsAによって移植骨中のNFATの活性が抑制されていることが示された。この傾向は破骨細胞近傍の骨組織によくみられ、骨芽細胞や線維芽細胞では若干見うけられた。C3H/lprマウス群ではCsAを投与した移植骨の破骨細胞数

は C3H/+マウス群のそれと比べて増加傾向があり、破骨細胞の Fas 介在性アポトーシスに NFAT が関与していることが示唆された。

摘出した移植骨を homogenize して採取した RNA で PCR を行い、破骨細胞のマーカーである TRACP や cathepsin K の発現量を測定した。C3H/+マウスでは CsA 投与骨でこれらの発現量が対照骨に比べて低下していたが、C3H/lpr マウスでは対照骨との差ははっきりしなかった。また RANKL の発現量は C3H/+マウス、C3H/lpr マウスで差はみられなかった。

Western blotting による生存因子 (Akt, ERK, NF- κ B) の蛋白発現量を観察したところ、CsA 投与骨では Akt と ERK の発現量の低下傾向があったが、NF- κ B には変化がなかった。また Fas/FasL 欠損がおよぼす影響については C3H/+マウス群と類似の傾向を示し、不明であった。

以上の結果から、CsA の移植骨への局所投与によって、移植骨内の破骨細胞や骨芽細胞、線維芽細胞の NFAT の活性が抑制されて、移植骨の骨代謝が低回転化したことが推察された。また、Fas/FasL 経路を欠損した C3H/lpr マウス群との比較から、破骨細胞の Fas 介在性アポトーシスに NFAT が関与していることが示唆されたが、Akt, ERK, NF- κ B といった生存因子への影響は判然としなかったことから、その機序については更なる検討が必要と考えられた。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣谷 拓章 (Hirotsugu Hiroaki)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90312595

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：