

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592471

研究課題名(和文) 骨粗鬆病態での骨折局所におけるサイトカインネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of the cytokine network in fracture site under conditions of osteoporosis

研究代表者

佐藤 田鶴子(SATOH TAZUKO)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：40095138

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症での骨折治癒の遅延と全身的な免疫応答がどのように関与しているかを骨粗鬆マウスの脛骨骨折モデルを用いて、マルチプルサイトカインアッセイ法により検討した。その結果、骨折72時間以内に現れる全身的なサイトカイン変動が直接左右するものではなく、骨粗鬆状態での骨の修復機転あるいはリモデリングに関係する骨芽細胞や破骨細胞などのサイトカインレセプターの影響が関与しているのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the cytokine network in fracture under conditions of osteoporosis. Tibia fractures were made in ovariectomy mice, and analyzed cytokine expression using multiple cytokine assays. The results suggested that the delay of fracture healing may be related to the influence of cytokine receptors of osteoblasts or osteoclasts in osteoporosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：老年歯科学、骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

現在、わが国では急増する高齢者に伴い、2000年での推定骨粗鬆症患者は1200万人を超えている。そのほとんどが女性に見られる閉経後のエストロゲン減少による閉経後骨粗鬆症と老人性骨粗鬆症であるが、薬剤の副作用として高齢者の服用機会が多いステロイドによる続発性骨粗鬆症も

増加している。これに加え、高齢者の筋力低下や脳血管障害、認知症あるいは平衡機能障害などを原因とする転倒で生じる大腿骨頸部骨折患者は、男女12万人で前年比の30%も増加している(2002年)。さらに、寝たきり老人の原因の第2位が大腿骨頸部骨折(約20%)というデータもある。これは骨粗鬆病態がいかに骨折の治癒を妨げ、QO

Lを著しく低下させているかをあらわしている。また、歯科領域においては骨粗鬆症治療薬であるビスフォスホネートが抜歯後に顎骨壊死を招いたとの報告があり、服用患者への抜歯は注意が必要となっている。これも食物摂取に影響しQOLを低下される危険性がある。

これまでマウスを用いた研究から骨粗鬆症の発症に炎症性サイトカインであるIL-6の増加が深く関与していることが報告され、さらに閉経後の骨粗鬆症患者の末梢血ではIL-6をはじめIL-1 β 、TNF- α が上昇し、INF- γ 、GM-CSFなどが減少していることも報告されている。このように骨粗鬆症では全身的にサイトカインの変動が認められている。また、正常マウスの脛骨骨折においては血清中のIL-6とIL-10が骨折後3時間で急上昇し、その後治癒過程の進行に伴い急激に減少することが報告されている。このことは骨折が全身のサイトカインに影響を及ぼしていることを示している。したがって、骨粗鬆病態での骨折はさらに全身的なサイトカインの発現異常を引き起こすことが考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、骨粗鬆モデル動物を用いて実験的骨折を起こし、骨粗鬆状態での局所的な骨折が全身的なサイトカイン発現にどのような変化を及ぼしているかをマルチプルサイトカインアッセイを用いて網羅的に探索に解析する。この結果から、標的となるサイトカインに対する局所抗サイトカイン療法への発展が期待でき、骨粗鬆病態での骨折治療に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨粗鬆マウスの作製

7週齢、体重約26gのICR雌性マウスを用いて、1週間予備飼育した後、ペントバルビタールナトリウム 50mg/mLの腹腔内投与(40mg/kg)による全身麻酔下で、卵巣摘出手術(Ovariectomy: OVX)を施した。その後、24週間飼育して閉経モデルマウス(OVX)とした。また、対照(OVX Sham)マウスは同週齢のICR雌性マウスにOVX偽手術を行い、同期間飼育した。

(2) 脛骨骨折

36週齢の実験群および対照群のマウスを上記全身麻酔下で、非観血的に持針器を用いて片側の脛骨を実験的に単純骨折させ、骨折部をデジタルレントゲンで確認した後、伸縮テープで固定した。

(3) 酸化-抗酸化バランス

骨粗鬆群とコントロール群の血清および唾液を用いて、全身の酸化ストレスを計測した。酸化度はd-ROMs TEST、抗酸化能はBAP TESTを活性酸素分析器で評価した。

(4) マルチプルサイトカインアッセイ

それぞれの群のマウスに対し、骨折1週間前、骨折1・3・24・72時間後に尾静脈からの採血を行い、血清を分離してマルチプルサイトカインアッセイのサンプルとした。なお、測定したサイトカインは、図1に示す23種類である。

Analyte	Standard PMT Setting (CAL2 Low RPI Target)	Analyte	Standard PMT Setting (CAL2 Low RPI Target)	Analyte	Standard PMT Setting (CAL2 Low RPI Target)
Concentration of Standard 1 (pg/ml)					
IL-1 α	28,218	IL-10	17,820	IFN- γ	27,833
IL-1 β	47,501	IL-12(p40)	21,819	KC	54,780
IL-2	64,364	IL-12(p70)	23,380	MCP-1	48,206
IL-3	28,393	IL-13	40,497	MIP-1 α	40,629
IL-4	96,756	IL-17	33,750	MIP-1 β	23,734
IL-5	46,658	Eotaxin	47,194	RANTES	14,966
IL-6	17,037	GM-CSF	46,924	TNF- α	49,245
IL-9	30,424		41,031		

Made in USA.

図1 測定したサイトカイン

4. 研究成果

(1) モデルマウスの骨粗鬆症の評価

OVX3か月後の血中エストロゲンの測定、大腿骨遠位骨端部のマイクロCT撮影による3次元エックス線画像解析および骨密度の定量的解析などにより、コントロールであるSham Ope群と比較した。その結果、OVX群はコントロール群に比べエストロゲンの低下、皮質骨の肥厚と海綿骨梁の吸収とそれに伴う骨密度の低下を認めた。これによりOVXによる骨粗鬆病態がモデルマウスで認められた。

(2) 脛骨骨折とその予後

持針器によるマウス脛骨の非観血的骨折は瞬時かつ容易に行える手技であり、エックス線上で完全骨折が確認できた。

(3) 酸化-抗酸化バランスの変化

骨粗鬆群の酸化度はコントロール群に比べ、有意に高い値を示した。一方、抗酸化能はやや低下する傾向を示したが、統計学的には有意差は見られなかった(図2, 3)。つまり、骨粗鬆病態では酸化度の上昇による酸化-抗酸化バランスの破綻によって酸化ストレス状態にあると思われた。しかし、このことが全身的な免疫応答に関与し、炎症性サイトカインの発現変動にどのように影響していたかは本研究では明らかにできなかった。

(4) 骨粗鬆マウスのサイトカイン変動
 骨粗鬆症マウス群の血清サンプルをサイトカインアッセイし、その発現パターンを検討した。その結果、今回の骨折1週前の血清サンプルによるマルチプルアッセイでの検出では、これまでの骨粗鬆病態でのIL-1 β 、IL-6、TNF- α の上昇やINF- γ 、GM-CSFの減少は今回の検討では明らかにならなかった。ただし、骨折1週前の測定でIL-4のみが骨粗鬆群において有意に高値を示した。また、脛骨のホモジナイズサンプルでは測定限界値以下となり局所におけるサイトカインの発現も定量できなかつた。つまり、骨粗鬆病態のサイトカイン変動をより詳細に検討するためには、網羅的なスクリーニングアッセイでは限界があることが分かった。

しかしながら、骨折後のサイトカイン発現が骨粗鬆群とコントロール群とが同じような変動パターンを示すサイトカインが多いことが分かった。その一つは骨折1時間後にサイトカインの発現が低下し、それが24時間まで続き、72時間で骨折前の状態に回復するといったサイトカインの変動パターンであり、この傾向を示すがサイトカインが多く認められた。一方、IL-6とG-CSFは骨折1時間後までは受傷前とほとんど変化を示さなかったが、3時間後急激にサイトカインの発現が上昇し、24時間以降徐々に低下する変動パターンを示した。

また、骨折後に骨粗鬆群と非骨粗鬆群とで発現変動パターンに大きな違い現れたのは、IL-4とIL-9であった。IL-4は術前より実験群が高値を示したが、1時間後には急激に低下したが、コントロール群は3時間後まで骨折前とほぼ変化が見られなかった。IL-9は両群ともに1時間後に急激に低下したが、骨粗鬆群は3時間後に骨折前の値まで上昇したが、非骨粗鬆群は72時間でもわずかに上昇したのみであった(図4)。

これらの結果から、ごく一部のサイトカインを除き骨折後に現れる全身的なサイトカインの発現は、骨粗鬆状態でも正常時とほぼ同じような変動パターンを示すことがわかった。したがって、骨粗鬆状態で骨折局所に生じる治癒機転の遅れは、骨折72時間以内に現れる全身的なサイトカイン変動が直接左右するものではなく、骨粗鬆状態での骨の修復機転あるいはリモデリングに関する骨芽細胞や破骨細胞などのサイトカインレセプターの影響が関与しているのではないかと考えられた。

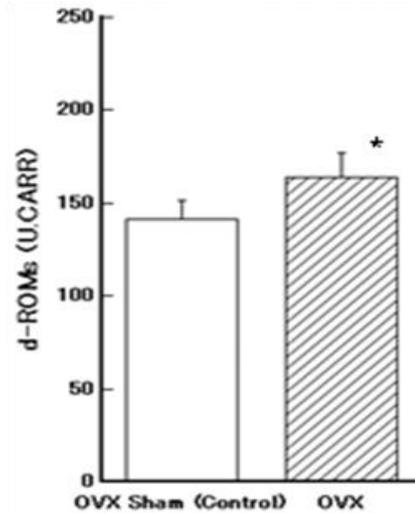


図2 OVX Sham、OVX マウス の酸化度
 * :p<0.05 (OVX Sham VS. OVX)

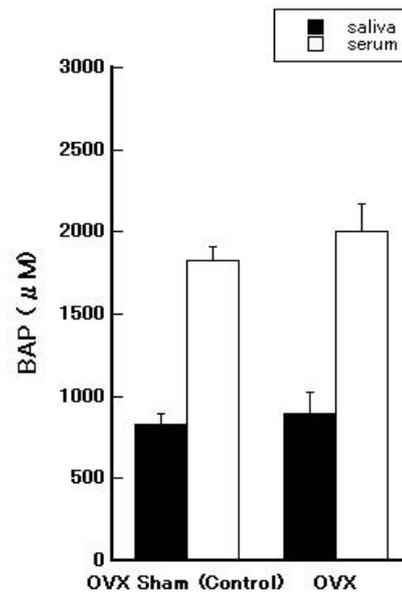
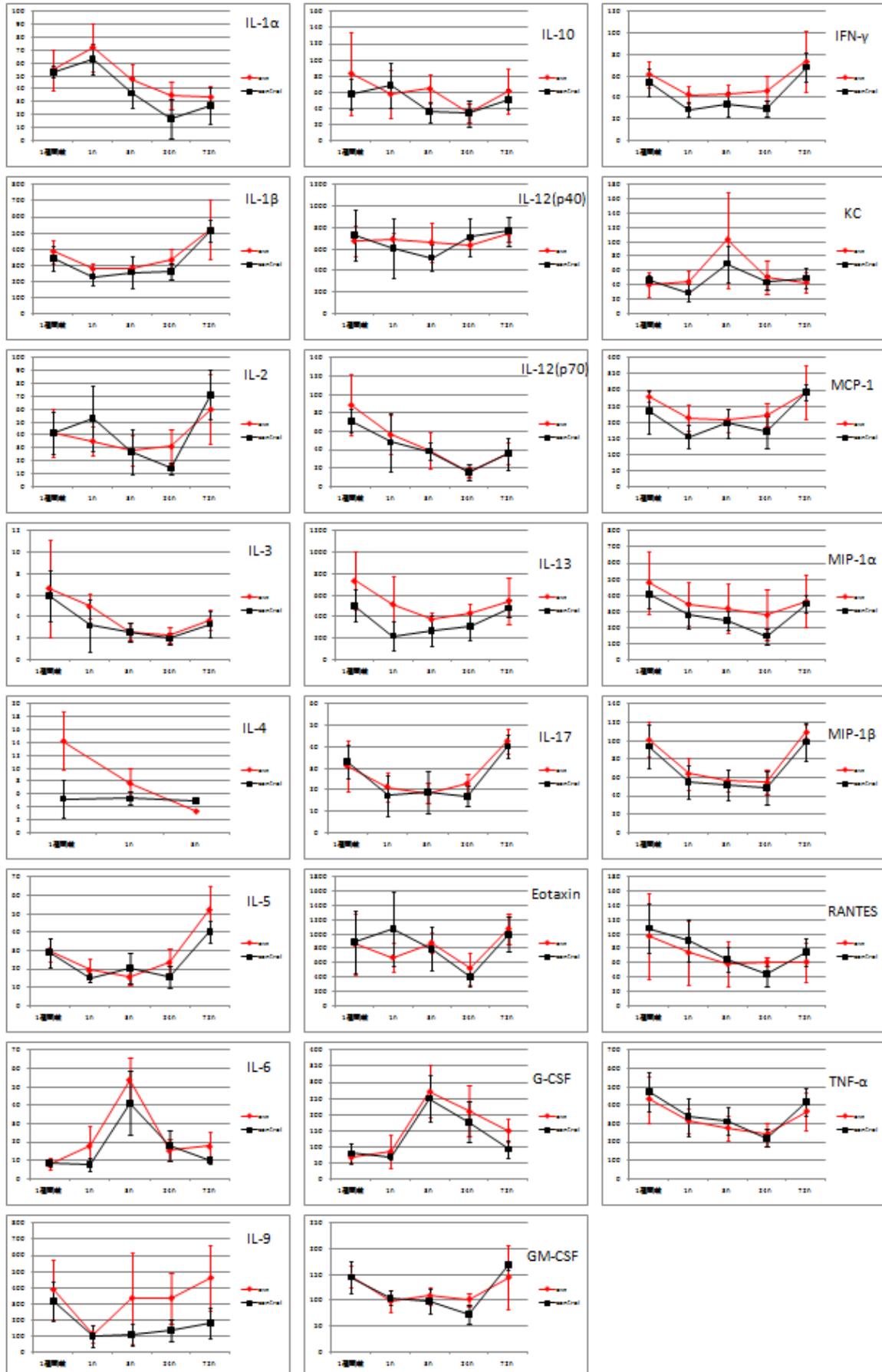


図3 OVX Sham、OVX マウス の抗酸化能
 唾液 : n. s.
 血清 : n. s.

図4 サイトカインマルチプルアッセイ

(赤: OVX マウス、黒: OVX Sham)



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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ①山内由隆、松野智宣、倉治真夏、米山勇哉、小俣和彦、貴美島 香、佐藤田鶴子、閉経による唾液分泌の変化と全身および唾液腺局所の酸化-抗酸化バランスとの関連、第 11 回日本抗加齢医学会総会、平成 23 年 5 月 28 日
- ②山内由隆、松野智宣、小俣和彦、米山勇哉、佐藤田鶴子、マウス顎下腺におけるRed-ox 関連遺伝子と加齢性組織変化の関連について、第9回日本抗加齢医学会、平成21年5月29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]

<http://www.tky.ndu.ac.jp/omfs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 田鶴子 (SATO TAZUKO)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号：40095138

(2) 研究分担者

松野 智宣 (MATSUNO TOMONORI)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：80199827

小俣 和彦 (OMATA KAZUHIKO)
日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：00434142

鈴木 哲朗 (SUZUKI TETSURO)
浜松医科大学・感染症学講座・教授

研究者番号：00250184

(3) 連携研究者

なし