

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791543
 研究課題名（和文）骨粗鬆症モデルにおけるビスホスホネートの T 細胞免疫応答能の解析
 研究課題名（英文）Studies on the immune-response of T cells in animal model with osteoporosis taking bisphosphonates.
 研究代表者
 安部 貴大（ABE TAKAHIRO）
 埼玉医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20383250

研究成果の概要（和文）：ゾレドロン酸（ZOL）とプレドニゾロン（PSL）の投与と口腔感染を想定した菌体毒素（LPS）処理による RANKL/OPG の変化ならびに T 細胞の影響を検討した。C57BL/6，NOD-scid，健常ヒト末梢血単核球を移植した NOD-scid マウスについて骨形態計測，血中 RANKL および OPG 濃度の測定，T 細胞局在を免疫組織学的に検討した。ZOL 投与により OS/BS・OV/BV が抑制され，Ob.S/BS・Oc.S/BS が減少した。C57BL/6 の ZOL と PSL の併用で，LPS 処理により血中 RANKL 濃度が上昇した。骨代謝回転の著明な抑制効果を認め，ZOL 投与での骨代謝や免疫応答に PSL や LPS が影響することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to examine, in a basic setting, changes in receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG), and the expression of T cell receptor (TCR) in mice treated with zoledronate (ZOL) and prednisolone (PSL) and lipopolysaccharide (LPS). C57BL/6, NOD-scid, and NOD-scid transplanted peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were used. Peripheral blood samples were obtained to assay for OPG and RANKL. Femur and mandible were prepared for histomorphometric analysis. The microarchitecture of the bone samples was assessed by micro-CT. TCR expression was analyzed by immunohistochemistry. Histomorphometric analysis indicated that OS/BS and OV/BV were lowered by the administration of ZOL. Ob.S/BS and Oc.S/BS were decreased. In the C57BL/6 group taking both of ZOL and PSL, injection of LPS into the oral mucosa increased the levels of serum-RANKL. We showed that combined administration of ZOL with PSL decreased bone turn-over, and furthermore the combination causes a different pattern of TCR expression. These findings suggest that PSL and LPS have differential effects on bone metabolism and the immunoresponse to ZOL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ゾレドロン酸、コルチコステロイド、RANKL、OPG、TCR

1. 研究開始当初の背景

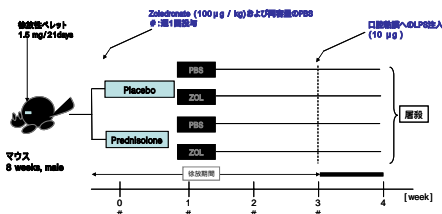
Wilkinson GS らの報告で 16,073 例のがん患者を対象としたパミドロネート、ゾレドロネートの静注投与を受けた患者群における疫学調査の結果、顎顔面骨炎の発症リスクが 1 割に及び、改めてビスホスホネート関連顎骨壊死 (BRONJ) との関連が示唆された (J Natl Cancer Inst 99; 1016-24, 2007)。現在までに欧米顎顔面口腔外科学会、また本邦でも日本口腔外科学会が、BRONJ の予防・診断・治療に関するガイドラインを策定し一定のコンセンサスが得られているが、その病態は未だ不明な点が多い。文献的にも症例検討に基づく報告は多数あるものの、病態を解明する基礎検討は少なくさらなるデータの蓄積を必要とする。

2. 研究の目的

ゾレドロネート (ZOL) およびプレドニゾン (PSL) 投与し、さらに口腔感染を想定した菌体毒素 (LPS) 処理によって生じる骨量変化、血清 RANKL, OPG 濃度の変化、T 細胞への影響について検証する。

3. 研究の方法

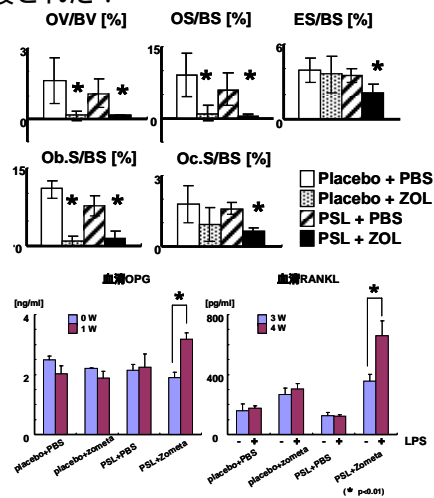
8 週令、雄の C57B16 マウス、T/B 細胞を欠損した NOD-scid マウス、また NOD-scid に健常ヒト末梢血から単離した単核球 (hPBMCs) を腹腔内に移植したマウスを用いて。これらに 21 日間徐放性ペレットである PSL (1.5mg) もしくは Placebo (1.5mg) を背部皮下へ埋入し、続いて ZOL (100 µg/kg) もしくは同量の PBS を週 1 回で計 4 回皮下投与を行った、またペレットが吸収される 3 週目で下顎骨膜下に LPS (10 µg) を局注し 4 週目で検体を採取した。解析は下顎骨、大腿骨、脛骨の骨形態計測、ELISA 法による血清 RANKL, OPG 濃度の測定、フローサイトメトリーによる脾臓内ヒト T 細胞の測定、hPBMCs 移植群での骨髄中ヒト由来 T 細胞の局在を免疫組織学的に検討した。



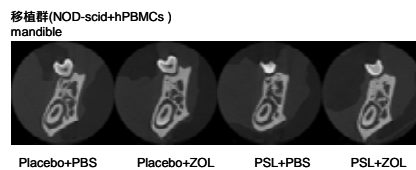
4. 研究成果

ZOL 投与により OS/BS・OV/BV が抑制され、Ob.S/BS・Oc.S/BS が共に対象群と比較し大き

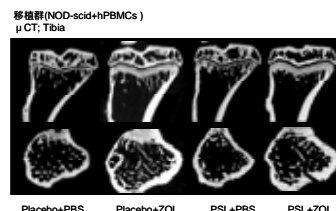
く減少した。Wild type として用いた C57B16 では ZOL および PSL 併用と LPS 処理により血中 RANKL 濃度が対象群と比較し上昇した。また、顎骨および大腿骨組織において TCR と TCR の発現パターンに 2 剤の組み合わせで異なる傾向が見られた。これらより ZOL と PSL の併用で骨代謝回転の著明な抑制効果を認め、口腔粘膜への LPS 処理で血中 RANKL 濃度の有意な上昇を認め、ZOL 投与での骨代謝や免疫応答に PSL や LPS が影響することが示唆された。



NOD-scid を用いた系において、hPBMCs 移植群と非移植群の両者で ZOL の投与で骨吸収能・骨形成能の抑制効果を認めた。hPBMCs 移植群における ZOL 投与で骨髄および脾臓でのヒト由来 T 細胞の局在に変化を認めた。hPBMC 移植マウスにおいて、ZOL 投与による骨代謝回転の抑制効果が、PSL を併用することで抑制の回復傾向を認めた。また、ヒト由来 T 細胞の免疫応答にも変化を生じることが示唆された。



ZOL の骨抑制は石灰化不全と考えられ、破骨細胞の抑制と同時に軟骨の骨分化抑制への関与が示唆された。また ZOL と PSL の併用と LPS 処理による RANKL 発現上昇にはリンパ球由来の存在が示唆され、潜在する免疫能が RANKL 発現に影響すると思われた。



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)

[雑誌論文](計13件)

Sato T, Nakamoto N, Abe T, Fukushima Y, Tomaru Y, Sakata Y, Nakazawa M, Nakamoto A, Kawasaki H, Wada Y, Ohara H, Araki R, Tanaka J, Yoda T. Preliminary results of a study comparing conventional radiography with phase-contrast radiography for assessing root morphology of mandibular third molars.

Dentomaxillofac Radiol, 査読有, 2010 (in press).

Sato T, Abe T, Chida D, Nakamoto N, Hori N, Kokabu S, Sakata Y, Tomaru Y, Iwata T, Usui M, Aiko K, Yoda T. Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. FEBS Letters 査読有, 584; 817-824, 2010.

Abe T, Sato T, Tomaru Y, Sakata Y, Kokabu S, Hori N, Kobayashi A, Yoda T. IgG4-related sclerosing sialadenitis: Report of 2 cases and review of the literature. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 査読有, 108(4); 544-550, 2009.

Yoda T, Sato T, Abe T, Sakamoto I, Tomaru Y, Omura K, Hatano N, Takato T, Ishii Y. Long-term results of surgical therapy for masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia accompanied by limited mouth opening. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 査読有, 38; 1143-1147, 2009.

Motosugi U, Ogawa I, Yoda T, Abe T, Sugasawa M, Murata S, Yasuda M, Sakurai T, Shimizu Y, Shimizu M. Ghost cell odontogenic carcinoma arising in calcifying odontogenic cyst. Ann Diagn Pathol, 査読有, 13; 394-397, 2009.

Sato T, Abe T, Nakamoto N, Tomaru Y, Koshikiya N, Nojima J, Kokabu S, Sakata Y, Kobayashi A, Yoda T. Nicotine induces cell proliferation in association with cyclin D1 up-regulation and inhibits cell differentiation in association with p53 regulation in a murine pre-osteoblastic cell line. Biochemical and Biophysical Research

Communications 査読有, 377; 126-130, 2008.

Sato T, Abe T, Ichikawa M, Fukushima Y, Nakamoto N, Koshikiya N, Kobayashi A, Yoda T. A randomized controlled trial assessing the effectiveness of professional oral care by dental hygienists. Int J Dent Hyg 査読有, 6; 63-67, 2008.

嶋村由美子, 安部貴大, 小林明男, 依田哲也. HTLV-1 キャリアに発症した舌癌の1例. 日本口腔腫瘍学会誌, 査読有, 21(3); 211-216, 2009.

高城文彦, 菅澤正, 松村聡子, 盛田恵, 嶋村由美子, 安部貴大, 中平光彦, 肥後隆三郎. TS-1 が著効を示した高齢者下咽頭進行癌の2例. 第22回関越DIF研究会講演集(癌と化学療法社), 査読無, 10-13; 2009.

安部貴大, 小林明男, 今井謙一郎, 坂田康彰, 佐藤毅, 依田哲也. 自己免疫性膵炎を合併したIgG4関連慢性硬化性顎下腺炎の1例. 日本口腔外科学会雑誌 査読有, 54(10); 558-562, 2008.

嶋村由美子, 小林明男, 安部貴大, 富高優子, 福島洋介, 依田哲也. 両側に発生したガマ腫の1例. 日本口腔診断学会雑誌 査読有, 21(2); 292-296, 2008.

中澤麻有子, 坂田康彰, 古株彰一郎, 福島洋介, 中本紀道, 安部貴大, 小林明男, 依田哲也. 矯正用アンカースクリューを固定源として整復した歯槽骨骨折の1例. 日本口腔外傷学会誌 査読有, 6(1); 13-18, 2008.

安部貴大, 今井謙一郎, 坂田康彰, 中本紀道, 小林明男, 依田哲也. 骨破壊を呈した顎放線菌症1例. 日本口腔診断学会誌 査読有, 21(1); 49-54, 2008.

[学会発表](計6件)

安部貴大, 堀直子, 佐藤毅, 嶋村由美子, 小林明男, 依田哲也: ゾレドロネートおよびコルチコステロイド併用によるRANKL/OPGへの影響. 第54回日本口腔外科学会, 札幌, 2009年10月10日

金築真理, 安部貴大, 古株彰一郎, 堀直子, 福島洋介, 佐藤毅, 坂田康彰, 今井謙一郎, 小林明男, 依田哲也: IgG4関連疾患と考えられる自己免疫性膵炎合併ミクリツ病の1例. 第62回日本口腔科学会, 福岡, 2008年4月18日

佐藤毅, 安部貴大, 中本紀道, 古敷谷昇, 福島洋介, 古株彰一郎, 坂田康彰, 都丸泰寿, 小林明男, 依田哲也: Acetylcholineは骨芽細胞の分化を抑制し増殖を促進する. 第62回日本口腔科学会, 福岡, 2008年4月18日

野島淳也，安部貴大，古株彰一郎，依田哲也：BMP の骨芽細胞分化誘導作用における Smad1 および Smad4 依存的シグナルの解析．第 62 回日本口腔科学会，福岡，2008 年 4 月 17 日

佐藤毅，安部貴大，狩野証夫，古株彰一郎，田口茂和，堀直子，今井謙一郎，小林明男，依田哲也：咀嚼筋腱・腱膜過形成症患者の咬筋腱膜組織における腱マーカー因子の免疫組織学的検討．第 21 回日本顎関節学会，大阪，2008 年 7 月 27 日

安部貴大：ZOMETA 使用における BRONJ 対策と対応-歯科・口腔外科の役割について - ノバルティス血液セミナー講演，大宮，2010 年 3 月 5 日

6．研究組織

(1)研究代表者

安部 貴大 (ABE TAKAHIRO)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：20383250

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし