

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10220

研究課題名(和文) 破骨細胞前駆細胞の骨組織への遊走を制御する T細胞の機能解明と分子標的薬の検討

研究課題名(英文) Elucidation of the function of gamma delta T cells that control the migration of osteoclast precursor cells to bone tissue and investigation of the possibility of molecular-targeted agents

研究代表者

西村 寿晃 (Nishimura, Kazuaki)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：50367611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、病的骨吸収において、骨吸収と骨形成の両方をコントロールする T細胞の関与の解明と生理的骨吸収を阻害することなく病的骨吸収のみをターゲットにした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。

T細胞はサブセットによって産生するサイトカイン、破骨細胞に対する影響が異なる。また、非炎症組織と炎症組織から回収した T細胞はそのサブセットが異なっていた。これらは病的骨吸収と生理的骨リモデリングにおいて重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

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、歯周病をはじめとする局所的な骨吸収性疾患や多くの高齢者が抱えている全身的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、生理的骨吸収を阻害することなく病的骨吸収のみを対象にした新たな治療選択肢を検討する事を目的とした。 T細胞が関与する病的骨吸収と生理的骨リモデリングのメカニズムの違いを解明し、病的骨吸収のみをターゲットにした分子標的薬の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the functions of T cells that control both bone resorption and bone formation. Another is to examine the possibility of clinical application to osteoclastic diseases using molecularly targeted agents that target only pathological bone resorption without inhibiting physiological bone remodeling. Each subset of T cell differs in cytokines production and their effects on osteoclasts. Furthermore, the subsets of T cells collected from non-inflamed and inflamed tissues were different. It was suggested that these data indicate T cells may play an important role in pathological bone resorption and physiological bone remodeling.

研究分野：歯科矯正学

キーワード： T細胞 マクロファージ遊走阻止因子 破骨細胞 骨代謝 免疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞前駆細胞(OCp)は、骨組織へ遊走し恒常的な骨リモデリングに関与する事が知られているが、病的骨吸収におけるOCp遊走と骨吸収の関係は不明であった。申請者は、病的骨吸収ではマクロファージ遊走阻止因子(MIF)がOCpの受容体に結合し、破骨細胞分化を過剰促進し、骨吸収を増悪させること(JBMR 2016)、またOCpは、生理的状态と病的骨吸収状態では異なる細胞癒合因子を発現しており(FASEB 2018)、生理的骨吸収と病的骨吸収に何らかの違いがある事を報告した。

一方、T細胞は受容体構造の違いにより、T細胞とT細胞が存在する。T細胞は腫瘍細胞に対する優れた認識・攻撃性からガン治療応用、ビスホスホネート関連顎骨壊死の診断応用、骨折治癒の促進効果などが報告されており、近年その機能が注目されている。これまで我々は、T細胞が骨髄中にホーミングし破骨細胞分化を強力に抑制すること、OCpの融合が抑制された状態において骨芽細胞の分化を抑制することを確認している(BBRC 2016)。更に、T細胞が様々な条件下で骨リモデリングに関わる様々なサイトカインを産生する結果を得ており、これらはT細胞が産生するサイトカインやケモカインが生理的骨リモデリングと病的骨吸収に異なるメカニズムで関与し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は不明である。

2. 研究の目的

マクロファージ遊走阻止因子(MIF)が誘発する病的骨吸収において、骨吸収と骨形成の両方をコントロールするT細胞が関与するメカニズムの解明を行うこと、生理的骨リモデリングを阻害することなく病的骨吸収のみをターゲットにした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が本研究の目的の目的である。

3. 研究の方法

・ T細胞サブセットの機能確認： T細胞をセルソーターでサブセットごとに分離した。野生型(WT)マウスと TCR ノックアウト(KO)マウス由来それぞれの T細胞を回収し、産生するサイトカインの確認、OCpとの共培養による細胞機能を確認した。

T細胞の混入を防ぐために、KOマウスより骨髓細胞を回収し、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。T細胞は磁気分離法によりWTマウスおよびTCR KOマウスより回収し、フローサイトメーターにて純度が95%以上であることを確認して使用した。共培養はRANKLで刺激した骨髓細胞と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。

・生理的状态と病的骨吸収惹起状態サンプル中のT細胞比率：生理的状态と病的骨吸収惹起状態それぞれのT細胞、T細胞の比率変化、およびT細胞サブセットの確認を行った。また回収したT細胞とOCpとの共培養による影響を確認した。

・抗T細胞抗体、抗MIF抗体による病的骨吸収抑制効果：歯周炎惹起マウスから抽出したT細胞と破骨細胞前駆細胞との共培養による破骨細胞分化および、抗TCR抗体と抗MIF抗体による影響を検討した。

・マウスモデルに抗体投与し、分子標的薬の可能性の検討：病的骨吸収状態では、MIF産生が上

昇している。抗 MIF 抗体を以下に示す病態マウスに投与し、生理的骨リモデリングへの影響と分子標的薬の可能性を検討した。

(1) 顎骨壊死モデル：顎骨壊死組織には Sema4D 産生 T 細胞が集積している。Sema4D 産生 T 細胞認識抗原に対する抗体を投与し、顎骨壊死の予防・治療効果の可能性を検討した。また、抗 MIF 抗体を投与し、顎骨壊死の予防・治療効果の可能性を検討した。

(2) 歯周病モデル：マウス第二臼歯に絹糸を結紮し歯周病を誘発する。歯周病治療の可能性を検討した。さらに歯肉溝滲出液を回収し、診断応用の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型(WT)マウス由来の T 細胞を脾臓、骨髄および歯肉よりセルソーターにて回収した。脾臓、歯肉では約 2~5%、骨髄では約 10%の T 細胞が存在していた。さらに、T 細胞を IFN- 産生型と MIF 産生型が存在することを確認した。生理的状态ではいずれの組織においても MIF 産生型 T 細胞より IFN- 産生型 T 細胞の方が有意に多く存在していた。これらは TCR KO マウスにおいても同様の結果が得られた。

OCp と IFN- 産生型 T 細胞との共培養では破骨細胞分化が抑制され、抗 IFN- 抗体投与でコントロールレベルに回復した。一方、MIF 産生型 T 細胞との共培養では破骨細胞分化が促進され抗 MIF 抗体投与でコントロールレベルに回復した。これは T 細胞が骨髄中に遊走していること、T 細胞が産生するサイトカインが OCp 分化に参与している事を示唆している。

(2) 生理的状态と病的骨吸収惹起状態サンプル中の T 細胞の変化を検討した。歯周炎を惹起したマウス歯肉組織から回収した T 細胞と OCp との共培養では破骨細胞分化が促進されたが、抗 MIF 抗体投与でコントロールレベルに回復した(図1)。

また、歯周炎惹起群はコントロール群に比べ歯肉組織中の MIF 産生量が増加していた。さらに、MIF 産生型 T 細胞が有意に増加していたことをセルソーターで確認した。

(3) 歯周炎惹起マウスの歯肉組織中の MIF mRNA 発現量がコントロール群に比べ有意に増加していた。また歯周炎惹起マウスにおいて抗 MIF 抗体の投与により骨破壊が抑制され、抗 TCR

抗体の投与でも骨破壊が抑制されていた(図2)。一方、非歯周炎惹起群に抗 MIF 抗体および抗 TCR 抗体を投与した場合、骨量に変化は認められなかった。

また、顎骨壊死モデルマウスに抗 MIF 抗体および抗 TCR 抗体を投与したが、今回の投与方法では十分な効果は認められなかった。投与時期、投与量を今後再検討する予定である。

以上の結果より、生理的状态と病的骨吸収惹起状態における T 細胞のサブセットが異なっており、異なる役割をしている可能性が考えられた。炎症性骨吸収下では MIF 産生型 T 細胞が関与し、抗 MIF 抗体、抗 TCR 抗体で骨破壊を抑制できる可能性があり、生理的骨リモデリングを阻害することなく病的骨吸収のみをターゲットにした分子標的薬として応用できる可能性が示唆された。

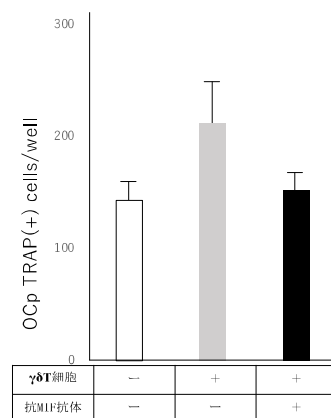


図1 OCpとγδT細胞の共培養における抗MIF抗体の影響

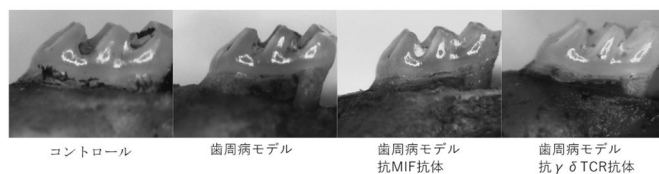


図2 歯周病マウスモデルにおける抗体投与の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tomohisa Ootake, Takenobu Ishii, Kenji Sueishi, Akira Watanabe, Yoichi Ishizuka, Katsuhiko Amano, Masashi Nagao, Kazuaki Nishimura, Yasushi Nishii	4. 巻 29
2. 論文標題 Effects of mechanical stress and deficiency of dihydrotestosterone or 17 β -estradiol on Temporomandibular Joint Osteoarthritis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 1575-1589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.joca.2021.08.005.	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 Satomi Kazuaki, Nishimura Kazuaki, Igarashi Kaoru	4. 巻 57
2. 論文標題 Semaphorin3A protects against alveolar bone loss during orthodontic tooth movement in mice with periodontitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 991-1002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.13038.	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 Tsurumi Yoko, Nishimura Kazuaki, Shimizu Megumi, Imai Yoshimichi, Igarashi Kaoru	4. 巻 122
2. 論文標題 Pilot study of factors contributing to canine impaction after secondary alveolar bone grafting in unilateral cleft lip and palate patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12565-y	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福田翔平, 田原麻梨江, 中村健太郎, 石河睦生, 西村壽晃
2. 発表標題 口腔内超音波振動子への適用を目的とした シリコーン印象材の音響特性評価
3. 学会等名 日本音響学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Satomi, Kazuaki Nishimura, Marie Tabaru, Kentaro Nakamura, Takenobu Ishii, Kaoru Igarashi
2. 発表標題 Impact of ultrasound therapy on medication-related osteonecrosis of the jaw
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原麻梨江, 福田翔平, 中村健太郎, 平田慎之介, 里見和紀, 西村壽晃
2. 発表標題 口腔用超音波デバイスへの適用を目的としたシリコーン印象材の音響特性評価
3. 学会等名 電子情報通信学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 里見和紀, 西村壽晃, 五十嵐薫
2. 発表標題 セマフォリン3Aが歯周炎マウスの歯の移動時の病的骨吸収を抑制する
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会&第9回日韓ジョイントシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村壽晃, 里見和紀, 田原麻梨江, 中村健太郎
2. 発表標題 超音波を用いた骨吸収抑制薬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会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Marie Tabaru, Kazuaki Nishimura (Edited by Akihiro Miyauchi, Yuji Miyahara)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Taylor & Francis Group	5. 総ページ数 19
3. 書名 Biomedical Engineering : Chapter11 Ultrasonic Transducers and Non-Contact Measurement Technique for Medical and Agricultural Application/Flexible Acoustic Force Sensor	

〔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	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・准教授 (32650)	

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
---------	---------