

機関番号：34408

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791834

研究課題名（和文） 骨組織に存在するマクロファージの骨免疫学的検討
—顎骨壊死メカニズムの解明—研究課題名（英文） A novel osteoimmunological approach to identify the role of bone
resident macrophages and the osteonecrosis of the jaw

研究代表者

堂前 英資 (DOMAE EISUKE)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50454559

研究成果の概要（和文）：各種ビスホスホネートの添加により分化過程の破骨細胞前駆細胞の接着強度に変化があったため、破骨細胞分化過程に接着分子が関与するかどうかを検討した。中和抗体添加により破骨細胞分化に変化が見られたため、そのメカニズムを検討するため細胞内シグナル伝達分子を検索した。破骨細胞分化と関連が示されているチロシンキナーゼ Syk、Fyn が免疫沈降によりインテグリンと共沈したため破骨細胞分化過程においてインテグリンからの outside-in シグナルにこれらのキナーゼが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this experiment bisphosphonates reduced the adherent strength of osteoclast precursors which are in the process of osteoclast differentiation. Because antibody against adhesion molecules altered osteoclastogenesis, I tried to find the signaling molecules which integrate adhesion molecules and osteoclastogenesis. Syk and Fyn, tyrosine kinases known to be important for osteoclastogenesis, were co-immunoprecipitated with integrins in the process of osteoclastogenesis. These results suggest that outside-in signals from integrins are important for osteoclast-precursor function and differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生化学、免疫学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：マクロファージ、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

Chang MK らは、マクロファージ特異的なマ

一カーを用いた詳細な実験で、骨芽細胞と接して骨表面に存在するマクロファージの存在を明らかにした。

ビスホスホネート (BP) 関連顎骨壊死は、多発性骨髄腫や乳癌、骨粗鬆症などの治療としてBP を投与されている患者に、抜歯や歯内治療などの歯科治療をきっかけとして生じる疾患として、2003 年に初めて取り上げられた。顎骨壊死はBP を中心として、局所性、全身性の因子の複合の結果として生じるものと考えられる。

このような背景の下、骨における破骨細胞前駆細胞としてのマクロファージの役割とその機能の解明が求められている。

2. 研究の目的

ビスホスホネート製剤は破骨細胞を抑制して骨粗鬆症の進行を抑制する。この破骨細胞の抑制は骨吸収抑制作用が主であり、破骨細胞数にはあまり影響がないと考えられている。近年、ビスホスホネートの経口投与と巨大破骨細胞形成の関連を示唆する結果が報告された (N Engl J Med 2009)。この報告ではアレンドロネートの長期間投与により破骨細胞数が増加し、骨面から遊離した巨大な破骨細胞が観察された。この報告により顎骨壊死とビスホスホネート投与による破骨細胞数への影響および骨面に接着していない破骨細胞形成との関連を検討すべく、本年度は以下の研究を行った。

3. 研究の方法

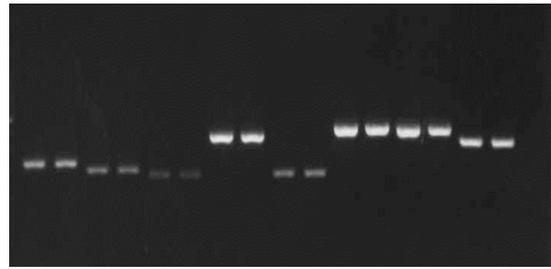
(1) ビスホスホネート添加の破骨細胞前駆細胞への影響：各種ビスホスホネート添加による破骨細胞前駆細胞の増殖、形態的变化、破骨細胞への分化の影響を検討した。

(2) 破骨細胞分化に及ぼす細胞接着分子の影響：接着分子への中和抗体および遺伝子ノックダウンによる破骨細胞分化への影響を検討した。

(3) ビスホスホネートおよび抗細胞接着分子抗体が破骨細胞前駆細胞のシグナル伝達に及ぼす影響を検討した：ビスホスホネート添加および中和抗体、遺伝子ノックダウンを用いて破骨細胞分化過程におけるシグナル伝達を検討した。

4. 研究成果

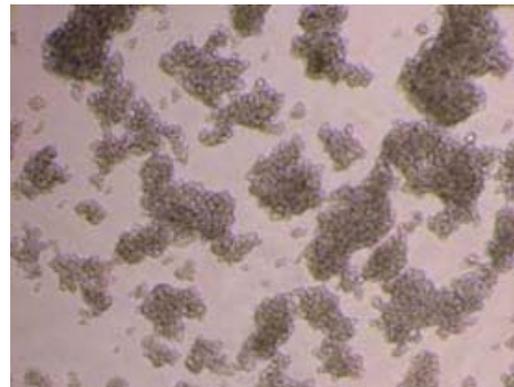
(1) 接着分子中和抗体による破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現には変化が見られなかった。



Lane 1,2: NFATc1A
Lane 3,4: NFATc1B
Lane 5,6: NFATc1C
Lane 7,8: TRAP
Lane 9,10: cSrc
Lane 11,12: ATP6v0d2
Lane 13,14: DC-STAMP
Lane 15,16: Cathepsin K
Lane1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15: RANKL, ctrl IgG
Lane2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16:RANKL, anti-CD18

(2) ビスホスホネート添加による破骨細胞前駆細胞の形態的变化

コントロール

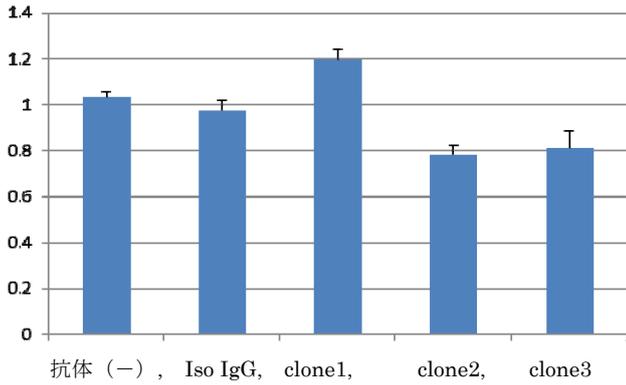


アレンドロネート添加



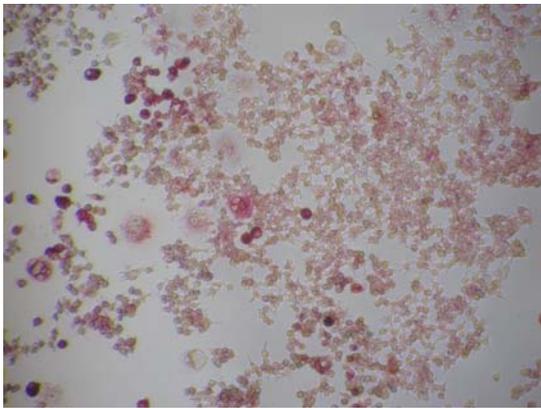
(2) 抗接着分子抗体による破骨細胞分化への影響は中和抗体のクローンによ

り異なる結果が得られた。

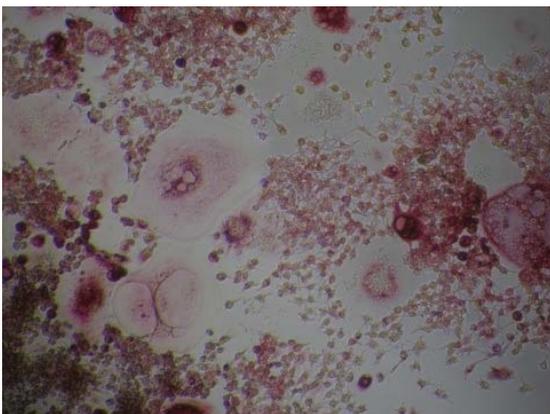


(3) 破骨細胞分化の写真を示す

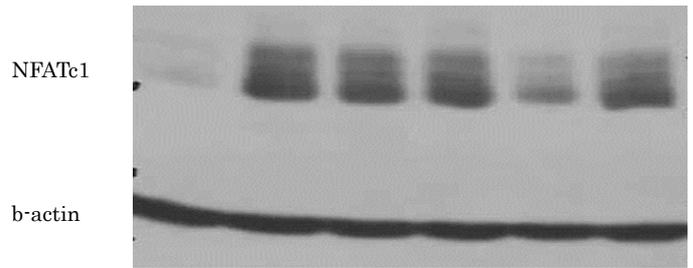
抗体 clone2 添加: TRAP 陽性単核細胞が多くみられ、多核細胞は少ない



抗体 clone1 添加: TRAP 陽性多核細胞が多く形成され、また大きさ・核の数も多い

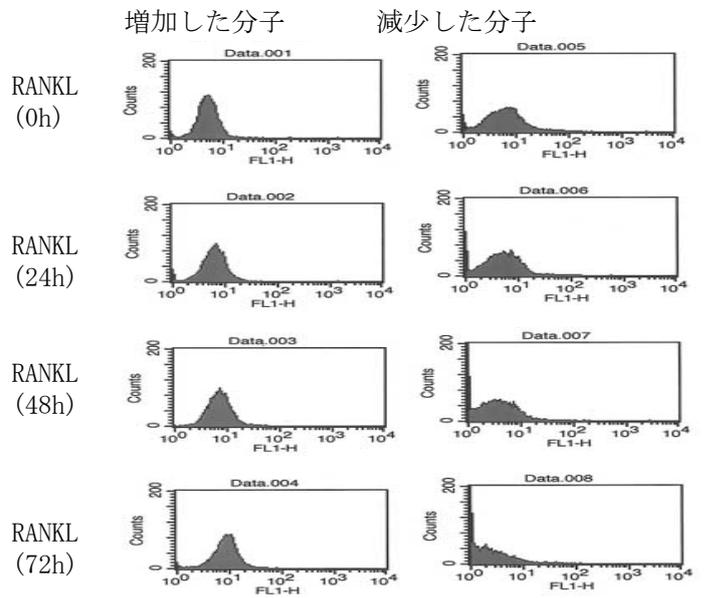


(4) また NFATc1 の発現も同様にクローンにより異なる結果が得られた。

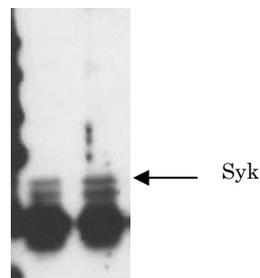


RANKL(-), 抗体(-), Iso IgG, clone1, clone2, clone3

(5) 細胞接着分子の発現の変化
分化過程で細胞表面での発現が増加する分子と、減少する分子があることが明らかとなった



(5) 抗 CD18 抗体による免疫沈降により、Syk と Fyn が共沈した。



RANKL (-) (+)

(5) 以上の結果よりビスホスホネートが破骨細胞前駆細胞の接着へ影響を及ぼすこと、および、破骨細胞分化と関連が示されているチロシンキナーゼ Syk、Fyn が免疫沈降によりインテグリンと共沈することなどから、破骨細胞分化過程においてインテグリンから

の outside-in シグナルにこれらのキナーゼが何らかの関与している可能性が示された。またピスホスホネートがこれらの過程に影響を及ぼすことが示唆された。

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1件)

① Tamura I, Wato M, Kamada A, Goda S, Yoshikawa Y, Domae E, Tanaka A, Ikeo T, Kinetics of p120-catenin in a human gingival cancer cell line treated with ZD1839, J Osaka Dent Univ、査読有、44、2010、169-175.

〔学会発表〕(計2件)

① 堂前 英資. ライセニンが破骨細胞分化に及ぼす影響、第8回日本再生歯科医学会、平成22年10月30日、名古屋

② Domae E. Lipid rafts regulate RANKL signaling pathways in RAW264 cells、第8回日本歯科骨粗鬆症研究会、平成22年4月4日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂前 英資 (DOMAE EISUKE)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50454559