

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17098

研究課題名(和文)新規チェルビズムモデルマウスの確立と顎骨病変の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Cherubism-like Jawbone Expansion in Mice Reveals Unrecognized Contributions of Neutrophils to Cherubism Pathogenesis

研究代表者

藤居 泰行(Fujii, Yasuyuki)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：90829748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：チェルビズム(CBM)は両側性に生じる顎骨の膨隆と炎症性骨破壊を特徴とする遺伝性骨系統疾患であり、SH3BP2遺伝子のGain-of-function変異の関与が報告されている。本研究では、CBMの最大の特徴である自発的な顎骨膨隆までの時間と発症部位に関して再現性が得られるSh3bp2KI/KIマウスを用いた新規CBMモデルを作製した。

Sh3bp2KI/KIマウスは下顎大白歯露髄後14日顎骨膨隆を認めた。また、組織免疫染色にてSh3bp2KI/KIマウスでは好中球の集積とNETsの代用マーカーの発現の上昇を認め、好中球関連イベントが顎骨膨隆の発症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不明な点が多い希少遺伝性疾患の発症メカニズムの解明に繋がる基礎的な知見を得ることができた。本研究の成果はこれまで不明であったCBMのバイオマーカーや新規治療ターゲットの発見に繋がり、CBMの診断や治療にパラダイムシフトをもたらす可能性が高いと考えている。また、本研究の成果は他の炎症性骨疾患の理解や治療への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cherubism (CBM), characterized by expansile jawbones with multilocular fibrocystic lesions, is caused by gain-of-function mutations in SH3 domain-binding protein 2. We hypothesize that bony inflammation of an unknown cause triggers jawbone expansion in CBM. Bacterial invasion from the exposed pulp resulted in jawbone expansion in Sh3bp2KI/+ and Sh3bp2KI/KI mice. CBM-like lesions developed exacerbated inflammation with increased neutrophil, and these lesions displayed excessive neutrophil extracellular traps. Our study reveals a previously unrecognized role of neutrophils that may play a vital role in promoting CBM lesions

研究分野：骨代謝学

キーワード：遺伝性骨疾患 骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チェルビズム (CBM) は両側性に生じる顎骨の膨隆と炎症性骨破壊を特徴とする遺伝性骨系統疾患である。発症時期は幼児期に多く、顎骨の骨破壊と同時に腫瘍様に増殖した炎症性組織が充満し顎骨膨隆を引き起こす。CBM は常染色体優性遺伝を示す疾患であり、SH3BP2 遺伝子の Gain-of-function 変異の関与が報告されている (Nat Genet 28(2),125-6,2001; Cell 147(6),1324-39,2011)。SH3BP2 は、好中球をはじめ様々な細胞の免疫反応やシグナルに必須、もしくは正の調節因子のタンパクである (J Immunol 189(5),2138-50,2012)。CBM 患者では、炎症の指標となる顎部や顎下リンパ節の腫脹を認める報告はあるが、CBM 発症メカニズムの詳細は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、顎骨感染によって CBM 様顎骨膨隆をきたす新規 CBM マウスモデルを確立し、その CBM マウスモデルの解析によって CBM の発症機序の解明を目指すことである。

3. 研究の方法

以下の2項目を行う。

項目1: CBM 発症における顎骨感染の影響に関する検証と顎骨膨隆モデルの確立

露髄により誘発された顎骨の細菌感染が、CBM 発症の引き金や増悪因子となっているのか検証をするため、Sh3bp2+/+, Sh3bp2+/KI、Sh3bp2KI/KI マウスを以下の4条件で飼育し比較する。無菌条件下での作製・飼育群、PAMPs と DAMPs の代表的な受容体である Tlr2/Tlr4 ダブルノックアウト (KO) マウス群、抗生剤含有滅菌水投与群 (経口投与)、通常飼育群 (対照群)。露髄操作を行うのに十分な体格を有しており、ヒトの思春期前から思春期に相当する6週齢のマウス (雄雌各8匹) の右側下顎第一大臼歯を歯科用ラウンドバーで露髄処理を行う。露髄後14、42日で下顎骨を採取し、 μ CTによる骨量計測、NIMPR14、CD68、Cathepsin K 抗体による免疫組織染色を行い、好中球、M、破骨細胞の細胞数を Image J にて計測を行い、CBM 発症と顎骨感染の相関関係について検証する。

項目2: CBM の発症機序における免疫学的検討

これまでの CBM の病態研究は、M の機能に焦点を当てたものが多い。応募者は、これまで報告されていない好中球関連イベントが CBM 発症に関与しているのではないかと仮説を立て、下記の3項目の検証を行う。Sh3bp2+/+ と Sh3bp2KI/KI マウス間で認める結果の違いは、Sh3bp2+/KI マウスでも認めるがその差は少ないことが予想されるため、Sh3bp2+/+, Sh3bp2KI/KI マウスの露髄群 (組織学的検討では健側・患側の比較も行う)、未露髄群の比較を行う。

A マウス末梢血と顎骨病変における NETs マーカーの測定

NETs マーカーの測定には、citH3 と好中球に存在する myeloperoxidase もしくは neutrophil elastase (MPO/NE) の抗体を使用する。目的1の項と同様の露髄処理後、0 (露髄前)、3、7、14、21日の末梢血 (血漿) と下顎骨採取を行う。血漿は ELISA による MPO/NE 濃度測定を行う。下顎骨は、免疫組織染色を行い citH3 と MPO/NE の両抗体陽性の細胞数と面積を定量する。

B マウス末梢血と顎骨病変における各種サイトカインの測定

下顎骨切片内の根尖病巣部位から mRNA を回収する。回収した mRNA は、RNAseq による解析を行う。LCM-RNAseq と ELISA の解析結果を基に、免疫組織染色で組織中のサイトカイン発現を確認する。

C CBM 病変の発症における NETs の影響に関する検討

NETs が CBM 発症に与える影響を検証するため、NETs 阻害薬の中でも H3 シトルリン化酵素 Peptidylarginine deiminase 4 の特異的阻害剤であり off-target 効果の報告がない GSK199 (30mg/kg/day) の皮下投与を14日間行う。露髄後3、7、14日での血漿中の MPO/NE と各種サイトカインの測定を行う。また、露髄後14日に下顎骨を採取し、目的1の項で述べた方法で骨量と M 数の計測を行い、GSK199 非投与群との比較を行う。

4. 研究成果

露髄処理を行い、発症までの時間と発症部位に関して再現性が得られる Sh3bp2KI/KI マウスを用いた新規 CBM モデルを作製した。さらに、PAMPs と DAMPs の代表的な受容体である Tlr2/Tlr4 ダブルノックアウト Sh3bp2KI マウスの作製を行った。レントゲン画像、マイクロ CT 画像にて、顎骨膨隆の確認と定量を行った。Sh3bp2KI/KI マウスは露髄後14日で、Sh3bp2+/KI では露髄後42日で顎骨膨隆を認めた。さらに、このモデルの解析を行うため、顎骨から RNA を抽出したところ、各種サイトカインの発現の上昇を患側のみならず、健側でも認めた。Tlr2/Tlr4 ダブルノックアウト Sh3bp2KI マウスや Ly6G 抗体を投

与した Sh3bp2KI/KI マウスでは、顎骨膨隆を認めなかった。また、組織免疫染色にて Sh3bp2KI/KI マウスでは好中球の集積と NETs の代用マーカーの発現の上昇を認め、好中球関連イベントが顎骨膨隆の発症に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Fujii Yasuyuki, Monteiro Nelson, Sah Shyam Kishor, Javaheri Homan, Ueki Yasuyoshi, Fan Zhichao, Reichenberger Ernst J, Chen I Ping | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Tlr2/4-Mediated Hyperinflammation Promotes Cherubism-Like Jawbone Expansion in Sh3bp2 (P416R) Knockin Mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 JBMR Plus | 6. 最初と最後の頁 e10562 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm4.10562 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|