

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06993

研究課題名(和文)BRONJモデルマウスにおけるT細胞分画ならびに幹細胞の動態解析

研究課題名(英文)Study of the influences on T lymphocyte subset and stem cells in BRONJ model mice

研究代表者

松井 裕一(MATSUI, Yuichi)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：50783776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ビスフォスフォネート系製剤(BP)に起因する顎骨壊死(BRONJ)は難治性でありその病態、治療法は未だ解明されていない。病因として免疫系の異常を疑い、正常マウスとBRONJモデルマウスに対し、大腿骨、胸腺、脾臓、末梢血での免疫細胞の動態解析と末梢血血清の生化学的解析を行い比較検討した。その結果、BRONJモデルマウスでは T細胞などのTリンパ球の分画の一部に変動に伴う各種変化が認められ、BP投与により顎骨内が免疫抑制状態を呈している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：BRONJ (Bisphosphonate[BP]-related osteonecrosis of the jaw) is intractable disease, and the etiology and treatment are not elucidated yet. Hypothesis; BRONJ is influenced by the abnormality of the immune system. I performed immunocytic analysis of femur, thymus, spleen and peripheral blood and biochemical analysis of the blood serum in normal model mouse and BRONJ model mouse. As a result, various change with the change of T lymphocyte subset such as gamma-delta T cells was observed. This study suggests the possibility that BP treatment brought about the immunosuppression in jawbone.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯学 顎骨壊死 骨代謝 免疫学

### 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症に代表される骨代謝系疾患あるいは悪性腫瘍の骨転移に対してビスフォスフォネート系製剤(BP)は幅広く応用されており、それに伴いビスフォスフォネート系製剤関連顎骨壊死(Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: BRONJ)は口腔外科領域において頻繁に経験する疾患のひとつとなっている。BRONJは進行性かつ難治性の顎骨壊死/骨髄炎であり、現在も未だ有効な治療法が見つかっておらず、姑息的に保存療法または外科療法が検討される場合が多い。本疾患の病態についてはいくつかの検討がなされているが、免疫系に対する検討はほとんど行われていない。免疫系の主体をなすTリンパ球のうち、T細胞は獲得免疫系の主体をなすTリンパ球の一分画でありながら、自然免疫系ならびに獲得免疫系の両者の側面を有する非常にユニークな細胞集団であり、両者の橋渡しとして免疫機能上重要な役割を担っている。申請者はBPのTリンパ球分画のひとつであるT細胞への関与を疑い、過去に、骨粗鬆症モデルマウスにおいてBP投与により末梢血中のTリンパ球ならびにT細胞の減少が生じることを証明し、その原因としてBPが胸腺のTリンパ球分化を抑制する可能性を報告した(岡山歯学会雑誌)。

また、顎骨内には骨髄間葉系幹細胞(Bone marrow Mesenchymal Stem Cell: BM-MSC)が存在する。BM-MSCは多分化能を有し、顎骨内では骨芽細胞に分化し骨形成に関わる。さらに骨芽細胞は造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cell: HSC)のニッチとしての機能を果たしており、HSCから分化した破骨細胞は骨芽細胞とともに顎骨の骨代謝を調節している。顎骨壊死の病態を呈するBRONJでは顎骨の骨代謝に異常が生じていることは容易に推測され、その原因として骨代謝の基礎となるBM-MSCならびにHSCについても何らかの異常が生じていると考えられることから、本研究を申請するに至った。

### 2. 研究の目的

本申請研究の目的は、BRONJモデルマウスにおけるT細胞を含むTリンパ球分画ならびに幹細胞の機能的変化を明らかにすることで、BRONJがBPによるこれらの変化に起因することを証明し、BRONJの根治療法の究明にあたりその研究基盤を確立することである。

### 3. 研究の方法

実験動物にはC57BL/6雌性マウス(8週齢、平均体重30g)を使用した。対照群には生理食塩水200mLを、BRONJ誘発群にはZoledronate(以下Zol)200 $\mu$ g/kgをそれぞれ1週間ごとに腹腔内投与し計4回投与した。全身麻酔下に右側大腿骨の骨開削を行い、さら

に各薬剤を1週間ごとに8回投与した。骨開削直後、2週間後、4週間後に顎骨後方よりアニマルランセットにて穿刺、採血を行い、血清を分離後、IL-1、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ についてマルチプレックスアッセイにて経時的に生化学的解析を行った。計12回の薬剤投与終了後、両群全個体から両側大腿骨、末梢血、胸腺、脾臓を採取した。右側大腿骨はパラフィン包埋を行い、4 $\mu$ m厚の切片を作成し、HE染色による形態学的評価を行った。また、抗CD3抗体、抗Th-Pok抗体、抗RUNX抗体による免疫組織学的染色を行い、各群での対象細胞の数的変化について解析した。胸腺、脾臓、末梢血から得た細胞は抗CD45/CD3e/CD4/CD8/TCR抗体でラベルしTリンパ球分画をフローサイトメトリーにて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腿骨の組織学的観察 (HE染色)

対照群と比較し、BRONJ誘発群では大腿骨近位骨端部で骨梁の増加ならびに皮質骨の肥厚を認めた。(図1)一方、骨開削部においては双方とも完全な骨性治癒を得ており、正常な治癒過程を示した。

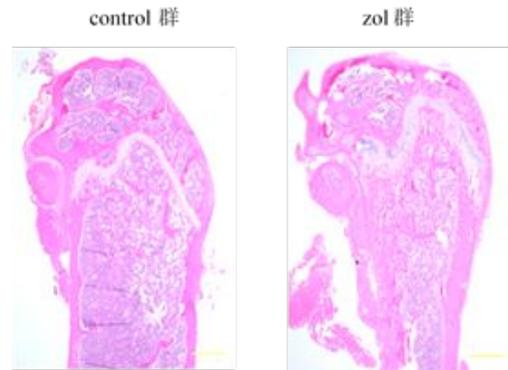


図1

#### (2) 大腿骨の組織学的観察

対照群と比較し、BRONJ誘発群では抗CD3抗体、抗Th-Pok抗体陽性細胞が増加し、抗RUNX抗体陽性細胞は減少した。(図2)

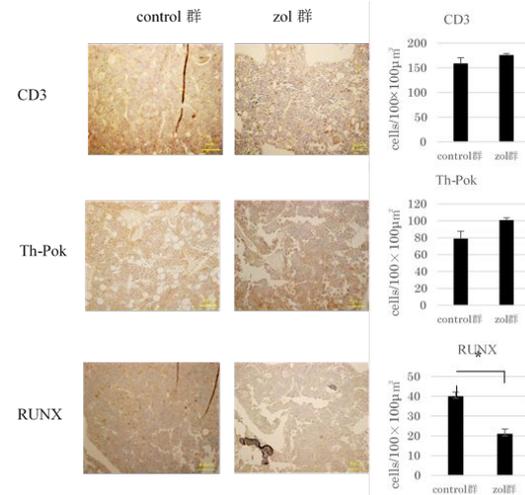


図2

### (3) 胸腺・脾臓・末梢血のフローサイトメトリー

#### 胸腺細胞

対照群と比較し、BRONJ 誘発群は CD4Single positive(SP) 細胞、CD8SP 細胞、CD4/CD8 double negative(DN)DN 細胞、 $\gamma$  T 細胞で増加傾向を示し、DP 細胞で有意な減少を認めた。(図 3)

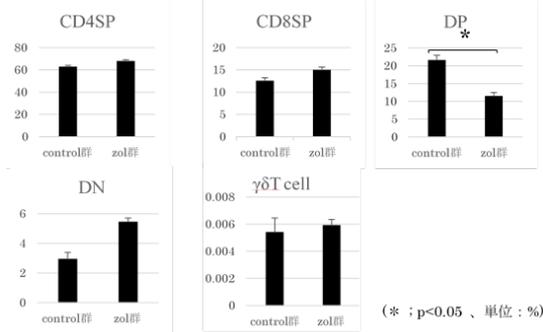


図 3

#### 脾臓細胞

対照群と比較し、BRONJ 誘発群は CD4SP 細胞、DN 細胞、 $\gamma$  T 細胞で増加傾向を示し、CD8SP、CD4/CD8 double positive(DP) 細胞で有意な減少を認めた。(図 4)

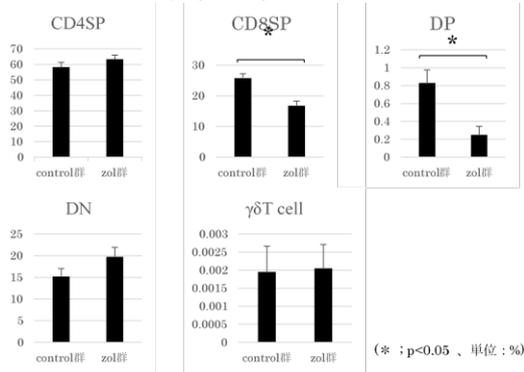


図 4

#### 末梢血血液細胞

対照群と比較し、BRONJ 誘発群は CD4SP 細胞で増加傾向を示し、CD8SP 細胞で有意に減少し、DN 細胞、 $\gamma$  T 細胞で減少傾向を示しました。DP 細胞は両群ともに測定されなかった。(図 5)

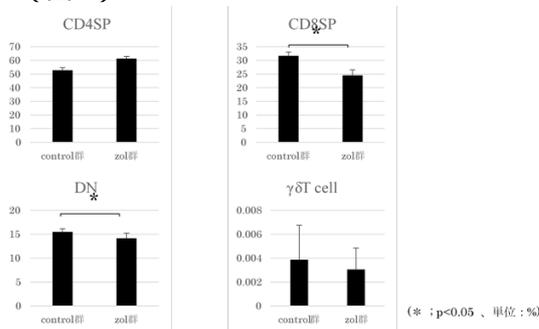


図 5

### (4) 血清生化学的解析

変化を認めたものは IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-17A の 4 項目であった。(図 6)

#### IL-1

経時的には両群ともサイトカイン濃度に変

化はなかった。いずれの時点においても対照群と比較し BRONJ 誘発群で減少した。

#### TNF-

骨開削直後は対照群と比較し BRONJ 誘発群は低濃度であったが、対照群は経時的に減少、BRONJ 誘発群は経時的に微増し、骨開削 4 週後には BRONJ 誘発群で増加傾向を示した。

#### IL-10

対照群は経時的な変化に乏しかったのに対し、BRONJ 誘発群では経時的な減少を示した。その結果、骨開削直後では BRONJ 誘発群の方が増加傾向であったが、2 週後では対照群が増加傾向を示し、4 週後ではその差が拡大した。

#### IL-17A

対照群は骨開削 2 週後で増加し、4 週後で骨開削直後と同レベルに減少したのに対し、BRONJ 誘発群では経時的に減少傾向を示した。両群を比較すると、骨開削直後では BRONJ 誘発群が増加傾向であったが、2 週後・4 週後では減少傾向であった。

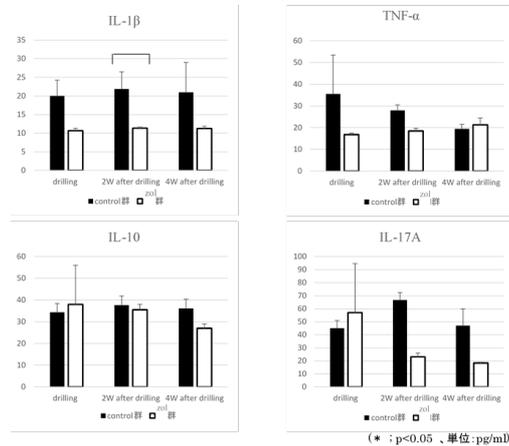


図 6

T リンパ球は一次リンパ組織である胸腺で分化・成熟した後にリンパ系を循環し、末梢組織および脾臓などの二次リンパ組織に分布する。本研究で検討した骨髓ならびに末梢血は末梢組織に相当する。本研究では Zol 投与により末梢組織である骨髓において Th-Pok の増加ならびに RUNX の減少を認めており、骨髓内での T リンパ球の増加は CD4SP 細胞の増加に起因していると推測された。また、一次リンパ組織である胸腺においては Zol 投与により DP 細胞が減少し CD4SP 細胞および CD8 細胞が増加したのに対し、同様に二次リンパ組織である脾臓ならびに末梢組織である末梢血では CD4SP 細胞は増加し CD8SP 細胞は減少した。これは成熟し胸腺外へリリースされるべき CD8SP 細胞が何らかの理由で胸腺に留まっていると考えられる。CD8SP 細胞は細胞障害性 T 細胞へ分化し獲得免疫系の主軸を担う。また、末梢血では  $\gamma$  T 細胞の減少も認められた。T 細胞は他の T リンパ球分画と同様に獲得免疫系として機能する一方、自然免疫系のように抗原提示を受けることなく直接ターゲット抗原を認識することで早期の感染防御機構としての機能も有する。すなわ

ち、Zol 投与により末梢組織の CD8SP 細胞および T 細胞が減少することで、末梢組織における細胞性免疫の機能低下を生じている可能性が示唆された。

また、Zol 投与により末梢血血清中のサイトカインにも変動を生じた。骨開削直後では炎症を誘導し感染制御に働く IL-1 の減少、CD4SP 細胞から Th1 細胞への分化を促進する TNF- の減少、免疫抑制性に機能する IL-10 の増加を生じ、末梢組織が免疫抑制状態を呈していると考えられた。しかし経時的にその状況は変動し、骨開削 4 週間後には TNF- と IL-10 のレベルが逆転するとともにそれらを誘導する IL-17A が減少するため、末梢組織は炎症が遷延化しやすい状況にあると推測された。この変化は骨髓においても同様に生じる可能性がある。すなわち、破骨細胞や単球、マクロファージに Zol が結合することで各細胞の活性が抑制され、それに付随し IL-1 および TNF- の産生が減少し、骨開削直後の免疫抑制状態を惹起しうると考えられた。このことは、弱病原性である口腔内常在菌を感染源とする BRONJ の病態や発生機序の解明の一助となる可能性がある。また、BRONJ の治療ならびに発症予防を究明するに際し、免疫機能に焦点を置くことの重要性を示唆している。

本研究では正常マウスから BRONJ 誘発モデルを作成することから開始したが、両群ともに正常な骨性治癒過程を示した。この原因として、切片作製までの期間が骨開削から 8 週間後と他の報告と比較して長期間であったこと、正常モデルに対する Zol 単独投与であったために生体内で Zol 投与以外の免疫学的異常をきたす因子がなかったこと、外来性の感染源を用いなかったこと、などが考えられた。また、本研究開始当初は BRONJ の局所における免疫細胞ならびに幹細胞の動態を解析する予定としていたが、マウスでは顎骨骨髓細胞の採取が困難であったため、やむなく他の組織で代用した。より大型のモデルを用いることで顎骨局所の解析は可能となりえるため、今後の研究課題としたい。

#### 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) Yamachika Eiki, Matsui Yuichi, Matsubara Masakazu, Matsumura Tatsushi, Nakata Naoki, Moritani Norifumi, Ikeda Atsushi, Tsujigiwa Hidetsugu, Ohara Naoya, Iida Seiji, The influence of zoledronate and teriparatide on gamma delta T cells in mice, Journal of Dental Science, 査読有, 2017 Dec; 12(4), 333-39, DOI; 10.1016/j.jds.2017.03.007

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 中辻和樹、山近英樹、松井裕一、松原正和、森谷徳文、吉岡洋祐、飯田征二、ビスフォスフォネート製剤による免疫細胞への影響について- T 細胞を指標として、第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2017 年 10 月 20-22 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

(2) 山近英樹、池田篤司、松原正和、松井裕一、吉岡洋祐、中辻和樹、石田展久、仲田直樹、森谷徳文、飯田征二、テリパラチドを投与した MRONJ 3 例の検討、第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2016 年 11 月 25-27 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

〔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〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松井 裕一(MATSUI, Yuichi)  
岡山大学病院・口腔外科(再建系)・医員  
研究者番号：50783776

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )