

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463003

研究課題名(和文)BRONJにおける骨芽細胞の役割の解明

研究課題名(英文)Analysis of the role of osteoblast on BRONJ

研究代表者

本城 正 (HONJO, Tadashi)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10379844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞(MC3T3)は、BPや炎症性サイトカインにより濃度依存的に細胞増殖が抑制された。C57BL/6Jmiceにゾレドロン酸を腹腔内投与し、Th17とTregをFlow cytometryにて解析した。BP投与後7WのTreg,Th17は、ゾレドロン酸の投与量に関わらず共に上昇が認められ、制御性T細胞の増加による免疫応答の不均衡が示唆された。骨芽細胞は、BP存在下でM-CSFの産生抑制をきたすことが明らかになり、このことは破骨細胞前駆細胞の形成の抑制、さらに破骨細胞への分化抑制を生じることがBRONJ発症機序の一因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The osteoblastic cell line(MC3T3) was cultured with BP and inflammatory cytokines for three days and number of cells were counted. BP inhibited the proliferation of osteoblast in dependence on its concentration. Th17 and Treg were analyzed by flow cytometric analysis after intraperitoneal administration of zoledronic acid to C57BLmice. After 7 week of the treatment of BP, both Treg and Th17 were increased regardless of the dosage. The increase of regulatory T cell suggested that BP induced impairment of immunological response. The osteoblast cell line was cultured with BP and the supernatants were analyzed by ELISA. The result was an attenuation of M-CSF expression. In conclusion, this study revealed that osteoblast inhibited the expression of M-CSF in existence of BP and then preosteoclast expression were decreased. These results implicated in the inhibit of differentiation to osteoclast and were considered as a possible developmental mechanism of BRONJ.

研究分野：外科系歯学

キーワード：BP：ビスフォスフォネート BRONJ：ビスフォスフォネート関連顎骨壊死 骨芽細胞 ELISA Flow cytometry Microradiography 破骨細胞 骨免疫学

1. 研究開始当初の背景

これまでBRONJの発症メカニズムの解明にはビスフォスフォネート(BP)の直接作用と考えられていた破骨細胞に関する研究が重点的になされてきているが、その発生機序に関しては未だ不明である。申請者らは既に骨代謝マーカーの中でも骨形成マーカーであるBAPが高い場合にはBRONJが発症しにくい、もしくは発症しても治癒しやすいことを見いだしており発表してきた。このことから、BRONJ発症メカニズムにおいて骨芽細胞の骨形成作用の抑制があるのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

骨芽細胞がBRONJの発症時に果たす役割を明らかにすると共に、BRONJ発症時の免疫学的調節機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞(MC3T3)に対するAlendronateや炎症性サイトカインの影響

マウス骨芽細胞MC3T3をAlendronate(4 μM, 8.7 μM, 25 μM, 50 μM)で3日間培養し、MC3T3細胞のproliferation assay(PA)を行った。

さらにMC3T3にAlendronateを作用したものに加えIL-6やTNF-αを添加し、MC3T3細胞に対するIL-6やTNF-αの影響を、MC3T3細胞のproliferation assay(PA)を行い解析した。

(2) 骨芽細胞の培養上清のELISA assay

MC3T3細胞をBP(4 μM, 8.7 μM)添加培地で3日間と6日間培養し、その培地上清を骨代謝や骨の免疫応答に関与するサイトカインを網羅的にELISA assayを行い骨芽細胞に関わる骨形成に関する因子の解析を行った。

(3) Flow cytometry

動物はC57BL/6J mice/female/3Wを用い、4W目に卵巣摘出を行い、8Wから14Wまで1W間隔でゾレドロン酸:ZA(0, 125, 250, 500 μg/kg)とメルファラン(7.0mg/kg)を同時に腹腔内投与した。採血は眼窩静脈叢より9W目、12W目、15W目の3回Th17とTregに対しFlow cytometry解析を行った。

(4) ミクロラジオグラフィ

BPの関与しない一般的な顎骨骨髄炎とBRONJの顎骨の研磨標本を軟X線撮影しContact Microradiograph(CMR)を作成した。CMRにより骨組織の石灰化度の違いによる微細構造を検討した。具体的には骨単位、骨小腔、ハバース管を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞(MC3T3)に対するAlendronateや炎症性サイトカインの影響

結果 MC3T3に対するAlendronate(AL)の影響

- ALの投与によるMC3T3のproliferation assay (14日培養)の結果
- IL-6によるMC3T3のproliferation assay
- ALによるTNF-αのproliferation assay
- ALによるIL-6とTNF-αのproliferation assay

※4穴プレート ※3回培養 culture 3 times

測定項目	MC3T3											
	480				480				480			
0ng	0ng	1ng	5ng	10ng	0ng	1ng	5ng	10ng	0ng	1ng	5ng	10ng
480	204 ↓	234 ↓	174 ↓	480	360 ↓	192 ↓	318 ↓	480	112 ↓	204 ↓	318 ↓	318 ↓
0μM	0μM	4μM	8.7μM	0μM	4μM	8.7μM	25μM	0μM	4μM	8.7μM	25μM	50μM
480	180 ↓	140 ↓	140 ↓	480	112 ↓	204 ↓	204 ↓	480	112 ↓	204 ↓	204 ↓	204 ↓
1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng	20ng
208 ↓	184 ↓	120 ↓	318 ↓	216 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓
1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng	20ng
252 ↓	228 ↓	228 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓
1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng	20ng
252 ↓	228 ↓	228 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓	252 ↓

①ALは濃度依存的にMC3T3の増殖抑制作用を示した

②IL-6, TNF-αはMC3T3の増殖抑制作用を示した

③AL(4 μM, 8.7 μM)にIL-6を添加することにより、MC3T3の増殖抑制作用を示した

④AL(8.7 μM)にTNF-αを添加することにより、MC3T3の増殖抑制作用を示した

⑤AL(4 μM)にIL-6とTNF-αを同時添加することにより、MC3T3の増殖抑制作用を示した

(2) 骨芽細胞の培養上清のELISA assay

(表1)

項目	IL-6			TNF-α			IL-1β			IL-17A			IL-6	TNF-α	IL-1β	IL-17A
	ng/ml	pg/ml	pg/ml	ng/ml	pg/ml	pg/ml	ng/ml	pg/ml	pg/ml	ng/ml	pg/ml	pg/ml				
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4μM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8.7μM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
25μM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
50μM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IL-6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TNF-α	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-1β	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-17A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TNF-α	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-1β	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-17A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(表2)

項目	IL-6		TNF-α		IL-1β		IL-17A		IL-6	TNF-α	IL-1β	IL-17A
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml				
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4μM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.7μM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25μM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50μM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TNF-α	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-1β	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-17A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TNF-α	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-1β	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IL-17A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

この頁の図3枚は拡大したものを別途掲載。

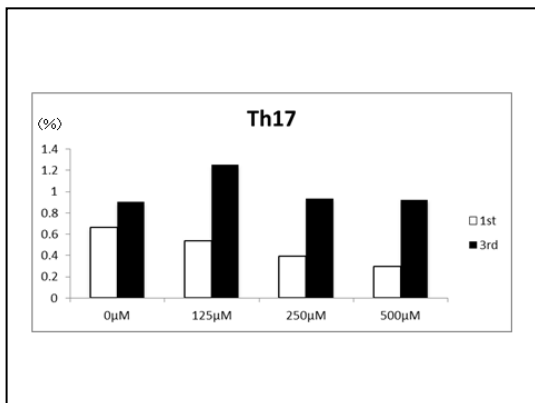
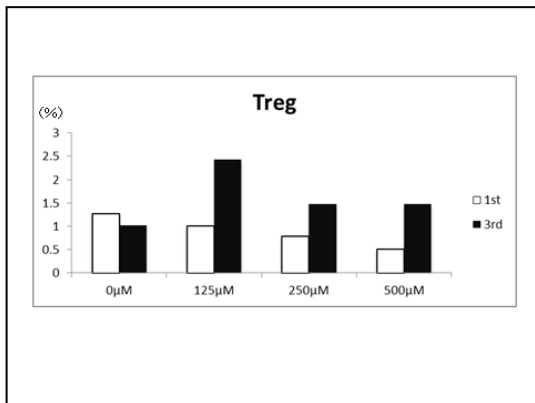
結果

NHOST, MC3T3に対するAL (Alendronate) の添加培養上清からみた骨免疫学的検討

1. NHOSTにAL(2μM,4μM,8.7μM)添加培養(6日目)の上清中のIL-34産生抑制作用がみられた
2. MC3T3にAL(4μM, 8.7μM)添加培養(6日目)の上清中のIL-34産生抑制作用がみられた
3. MC3T3にAL(4μM, 8.7μM)添加培養(3日目)の上清中のM-CSFの産生抑制作用がみられた
4. MC3T3にAL(4μM, 8.7μM)添加培養(3日目)の上清中にRANKLの産生増加がみられた
5. MC3T3にAL(4μM, 8.7μM)添加培養(3日目)の上清中にオステオポンチンの産生抑制がみられた

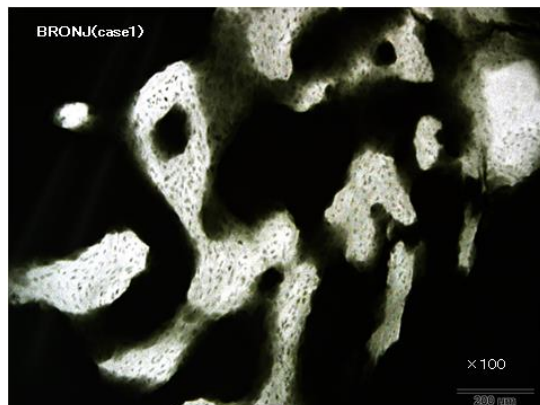
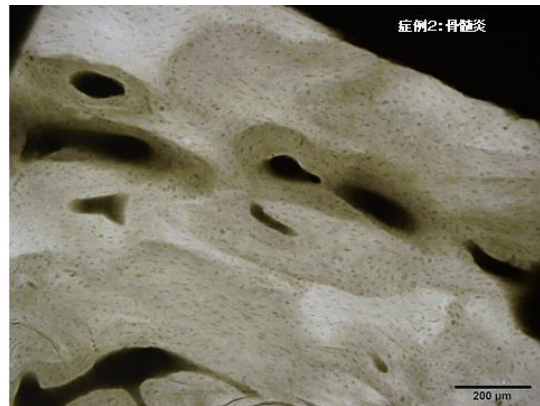
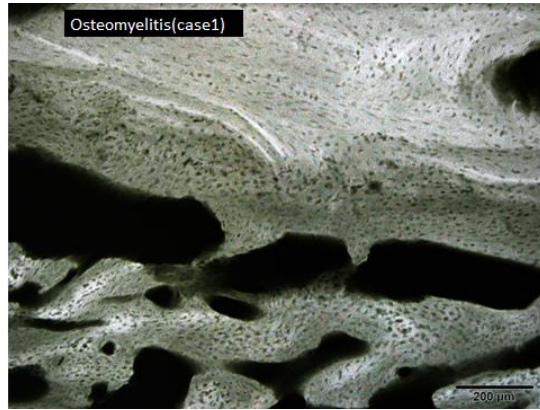
この中で特に M-CSF(macrophage colony stimulating factor)に注目した。骨芽細胞が分泌する M-CSF は、破骨細胞前駆細胞の形成とその後の破骨細胞分化において必須の因子である。本実験の結果は、骨芽細胞が BP 存在下で M-CSF の産生抑制をきたすことが明らかとなりその結果、破骨細胞前駆細胞の形成の抑制。さらに破骨細胞への分化抑制を生じることが BRONJ 発症の機序の一因であることが示唆された。

(3) Flow cytometry



採血の1回目を1st、3回目を3rdの2回の解析を表記した。ゾレドロン酸とメルファランの腹腔内投与の7W後の3rdではゾレドロン酸の投与量に関わらずTreg, Th17共に上昇が認められた。この結果は制御性T細胞の増加を認め免疫応答の不均衡が示唆された。

(4) ミクロラジオグラフィ



BP の関与する BRONJ では、一般的な骨髄炎と比べ全体的な骨硬化像が認められた。さらに

骨小腔の閉鎖も特徴的であった。

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2件)

①領家和男、田村隆行、岡本秀治、藤井信行、奈良井節、吉田優、川崎誠、永見琢真、澤田彩子、木谷憲典、土井理恵子、小谷勇
当科における舌癌に対する浅側頭動脈からの逆行性超選択的持続動注化学療法の臨床統計学的検討
鳥取県歯科医学雑誌 21 (1), 21-28, 2017
査読有

②土井理恵子、吉田優、奈良井節、藤井信行、中力直樹、生田三佳、小谷勇、領家和男
当科における口唇口蓋裂に対するPNAM治療
鳥取県歯科医学雑誌 21 (1), 13-20, 2017
査読有

[学会発表] (計5件)

①原田勇聖、田村隆行、吉田優、谷尾俊輔、川崎誠、宮林秀企、本城正、土井理恵子、小谷勇、著しい開咬に対し外科矯正手術を行った1例(②)、第37回鳥取県臨床歯科医学会、2017.12.17、鳥取県歯科医師会館(鳥取県鳥取市)

②小川修史、神吉けい太、本田耕太郎、友岡康弘、領家和男、渡邊達生、齧歯類の舌T1R3誘導におけるグルココルチコイドの関与(4)、第22回山陰口腔疾患研究会、2017.12.16、米子ワシントンホテルプラザ(鳥取県米子市)

③谷尾俊輔、松下倫子、桑本聡、堀江靖、小谷勇、村上一郎、領家和男、林一彦、口腔顎顔面腫瘍、腫瘍様疾患における少量のメルケル細胞ポリオーマウイルスの低罹患率(3)、第22回山陰口腔疾患研究会、2017.12.16、米子ワシントンホテルプラザ(鳥取県米子市)

④奈良井節、加藤基伸、井上敏昭、小谷勇、押村光雄、領家和男、副甲状腺ホルモン投与によるヒト間葉系幹細胞の骨分化への影響(6)、第46回(公社)日本口腔外科学会中国四国支部学術集会、2017.5.27、Y I Cスタジオ(山口県山口市)

⑤谷口奈緒美、領家和男、奈良井節、田村隆行、土井理恵子、小谷勇、口腔線維芽細胞に対するビスフォスフォネート製剤の影響について(2-P-3)、第71回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2017.4.26~28、ひめぎんホール(愛媛県県民文化会館)、(愛媛県松山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本城 正 (HONJO, Tadashi)
鳥取大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10379844

(2) 研究分担者

領家 和男 (RYOKE, Kazuo)
鳥取大学・医学部・特任教授
研究者番号：20093635

結果 MC3T3に対するAlendronate (AL) の影響

1. ALの投与によるMC3T3のproliferation assay (PA) (トリパンブルー染色法)
2. AL+rm IL-6のPA
3. AL+rm TNF-αのPA
4. AL+(rm IL-6 + rm TNF-α)のPA

※6穴プレート ※※3日間 culture し assay

MC3T3										
cont × 10 ⁴ /well	480									
	0ng	1ng	5ng	10ng	rmTNF-α × 10 ⁴ /well	0ng	1ng	5ng	10ng	
rm IL-6 × 10 ⁴ /well	480	204↓	234↓	174↓↓		480	360↓	192↓↓	318↓	
BP (AL) × 10 ⁴ /well	0μM	4μM			8.7μM			25μM	50μM	
	480	160↓			140↓			112↓	80↓	
+rm IL-6 10 × 10/well		1ng	5ng	10ng	1ng	5ng	10ng			
		208↓	184↓	120↓	318↓	210↓	252↓			
+rmTNF-α × 10 ⁴ /well					1ng	10ng	20ng			
					252↓	228↓	228↓			
+rm IL-6 +rmTNF-α × 10 ⁴ /well	rm IL-6 + rmTNF-α	1ng	5ng	10ng						
		1ng	10ng	20ng						
		282↓	222↓	228↓						

(表1)

	HOB 2日培養		HOB2日	HOB23日	NHOS1	NHOS2	10%FBS+MEM	MC3T3 (3日培養液)		
	P(+)	P(-)						培養液	4μM AL+PD-1懸	8.7μM BP
IL-6(pg/ml)	229.5	264.6	40.1	34.7	0.7	1934.6	0.6	0.7	1.0 →	0.8 →
IL-1 (pg/ml)	10.7	10.1	10.1	9.5	-	-	-	-	-	-
IL-17A(pg/ml)	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-
M-CSF(pg/ml)	450.3	706.7	48.3	62.8	141.5	421.4	141.5	182.7	149.0 ↓	96.4 ↓
P-Selectin(pg/ml)	23.9	19.0	10.1	2.1	-	-	-	-	-	-
IL-33(pg/ml)	-	-	-	-	2.4	3.9	2.4	2.2	2.2	2.4
Osteoprotegerin(pg/ml)	7199.4	8551.5	2132.8	2150.4	1.8	11477.3	-	382.5	386.3	375.9
IL-34(pg/ml)	59.6	54.7	34.7	34.7	109.9	165.7	100.0	102.7	78.0	110.0
TRANCE/RANK L(pg/ml)	7.9	6.8	4.7	3.7	1.0	2.1	1.0	1.0	2.1 ↑	3.2 ↑
Osteopontin(pg/ml)	21002.3	16964.4	8029.0	9309.5	924.7	7181.5	301.4	2901.2	2125.9 ↓	2528.9 ↓
TNF RI(pg/ml)	353.1	388.5	59.1	66.0	-	764.8	-	-	-	-

	NHOST培養2日				NHOST培養4日				NHOST培養6日				NHOST培養8日				0.5%FBS α-MEM	control 6日間 上清MC3T3	8P 4μM 6日間 上清MC3T3	8P 8.7μM 6日間 上清MC3T3
	アレンドロネート				アレンドロネート				アレンドロネート				アレンドロネート							
	0	2	4	8.7	0	2	4	8.7	0	2	4	8.7	0	2	4	8.7				
IL-6	40.1	40.2	42.5	34.4	61.0	56.5	60.9	52.3	113.0	99.8	101.2	102.6	83.7	81.2	76.1	74.7	0.2	0.2	-	-
IL-1 beta	2.7	2.0	3.1	2.3	1.6	2.0	2.0	2.3	2.7	2.0	2.0	2.0	1.6	2.0	2.3	2.7	1.6	2.3	2.0	2.3
IL-17A	3.4	1.1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	-	1.6	1.6	1.6	1.6	-	1.6	1.6	1.6	2.5	0.6	1.6	0.6
M-CSF	182.2	187.7	171.3	187.7	193.2	182.2	179.5	190.5	187.7	193.2	187.7	190.5	182.2	187.7	182.2	179.5	171.2	182.2	176.7	176.7
P-Selectin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-33	10.1	10.1	9.8	9.8	10.1	9.9	9.8	10.4	10.1	9.8	9.8	10.1	10.4	10.1	9.8	9.8	9.8	10.1	10.1	9.8
Osteoprotegerin	228.6	211.0	211.8	201.3	534.3	473.2	504.5	487.1	1018.5	870.4	870.4	878.4	556.9	517.3	502.5	518.0	2.8	108.0	75.1	95.3
IL-34	-	17.4	-	-	-	17.4	-	17.4	49.3	33.8	25.6	8.5	17.4	37.5	25.6	17.4	-	45.3	28.9	21.6
TRANCE/RANKL	-	-	-	-	-	-	2.6	-	-	0	-	2.6	-	2.6	2.6	-	-	1.3	-	-
Osteopontin	4226.6	4074.2	3921.8	4512.6	4512.6	4074.2	4372.4	4300.3	4588.9	4372.4	4648.0	4300.3	3921.8	4372.4	4220.0	4220.0	4446.0	5648.0	5247.7	4372.4
TNF RI	37.7	41.0	41.0	41.0	47.7	44.3	41.0	41.0	57.6	54.3	52.6	51.0	41.0	44.3	31.1	39.4	24.6	27.9	27.9	21.3