

平成 28 年 10 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861793

研究課題名(和文) アレルギーは骨減少のリスク因子か

研究課題名(英文) Do allergies have a risk factor for bone loss

研究代表者

大内 雅博(Ouchi, Masahiro)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：70707182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、『アレルギーは骨減少のリスク因子か』というテーマで研究を行なった。アレルギーモデルマウスを用いて実験を行い、アレルギー惹起による全身的炎症性サイトカインの上昇および、長期にわたるアレルギーにより骨減少が起こることが示唆された。また、アレルギーによる骨減少メカニズム解明に関わるサイトカインや脂質メディエーターについても研究することで、アレルギーと骨との関係へ新しい理解を発展させ、新たな観点からの治療ターゲットを見いだすことにも繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：I researched on the theme of "Do allergies have a risk factor for bone loss" in this challenge. Using the allergy mouse model, an increase of inflammatory cytokine in systematic allergic initiation and long term bone loss has been suggested that caused by allergy. In addition, studied cytokines and lipid mediators involved in bone loss mechanism by allergies, a new understanding to the relationship between allergy and bone to develop, and may find a treatment target from a new point of view.

研究分野：骨

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

これまでアレルギー疾患患者における歯科治療のリスクはほとんど注目されてこなかったが、九州大学病院矯正歯科における歯根吸収を亢進するリスクファクターである可能性を明らかにした(Nishioka, et al. 2006)。さらに、我々の研究では、アレルギーモデルラットに、矯正力を介した炎症を誘発することで、破歯細胞および破骨細胞数の増加が認められた(Murata, et al. 2013)。そこで、アレルギーをバックグラウンドに、炎症を機転に破骨細胞増加が見られたのか、あるいはアレルギー自体に破骨細胞との関与があるのかといった疑問を持った。

2. 研究の目的

喘息やアトピー性皮膚炎などアレルギー疾患罹患患者は、骨粗鬆症の頻度が高いとの疫学的な研究は多い。これまでは、疾患が重篤な場合、ステロイドの投薬を余儀なくされることが多く、骨粗鬆症を併発する因子としてステロイドが強調されてきた。しかし、この骨の減少が真にステロイドによるものなのか、あるいはアレルギーにより惹起される生体反応が直接骨代謝へ影響を及ぼしているのかについては、明確には判断できていない。そこで、アレルギーの惹起が骨へどう影響を与えるか、アレルギー疾患モデルマウスを用いて解明する。

3. 研究の方法

動物実験について

全ての実験は、九動株式会社 (Kumamoto, Japan) より購入した6週齢のC57BL/6Nマウス(雄)を用いた。動物実験は九州大学動物規則実施細則を遵守し、九州大学動物実験委員会の承認を得た。

アレルギー疾患モデルマウスの作製

アレルギー惹起には、卵白アルブミン(OVA, Sigma-Aldrich, St. Louis) をアレルギーゲンとし、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲル(Alum; Sigma-Aldrich, St. Louis) を用いた。実験は以下の4群に分け行った。1), OVA 50 µg と Alum 2mg を 200 µl の phosphate buffer saline (PBS, 0.01M, pH7.4) に溶解し腹腔内に注入した群(OVA + Alum 群)。アレルギーゲンあるいはアジュバントの影響を知るため、2), OVA のみを投与する群(OVA 群) および 3), Alum のみを投与する群(Alum 群) 4), PBS を投与する群(PBS 群) の4群で実験を行った。

各群への投与は毎週行った。試料採取を初回投与から1週目、3週目、5週目、7週目、9週目に行った。試料を採取する週では感作は行わなかった。

肺におけるアレルギー炎症の組織像観察

アレルギー炎症の惹起を確認するため、9

週間のOVA + Alum 群において、ジエチルエーテル(ナカライテスク株式会社, 京都)にて浅麻酔後、マウスの鼻にOVA溶液(OVA 100 µg in 40 µl 0.01M PBS per day) を1日1回5日間吸引させた。対照として、無処置の同種マウス(Non-treat 群) およびPBS 群にPBS を吸引させた。

組織学的検討

ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル; 共立製薬株式会社, 東京)の腹腔内投与にて麻酔後に、ヘパリン(ノボ・ヘパリン, 持田製薬株式会社, 東京)含有0.1M PBSにて脱血し、4%パラホルムアルデヒド0.1MPBS(4°C, pH7.4)にて灌流固定後、大腿骨、肺組織を採取した。同固定液を用いて12時間浸潤固定した後、20%ショ糖含有PBS溶液にて浸漬した。組織はTissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek, 東京)にて包埋し、前頭断にて8 µm凍結切片を作成した。HE染色を行った後、通法に従って脱水透徹を行い、エンテラン(Entellan, MERCK, Darmstadt, Germany)で封入後、デジタル顕微鏡(BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan)を用いて観察を行った。TRAP染色には、前頭断切片を50 µm毎に採取し、成長板の最深部より前後6枚ずつ、合計12切片を観察対象とした。TRAP染色キット(Sigma-Aldrich, St. Louis)を用いて、キットのプロトコールに従い染色を行い、トルイジン・ブルーで対比染色を行った。封入後、デジタル顕微鏡を用いて観察、撮影を行った。成長板直下に660x380 µmの枠を設定し、枠内のTRAP陽性細胞数(2核以上)を付属ソフトウェア(MZ-Analyzer, Keyence, Osaka, Japan)を用いて解析を行った。

血液学的検査

OVA感作による効果を確認するため、1週目、3週目、5週目、9週目にマウス右心房より採血を行い、血漿を分離し、OVA特異的IgE(OVA-IgE) および総IgE量をELISAにより調べた。シバヤギ社製のIgE-ELISAキット(シバヤギ, 東京)、OVA-IgE-ELISAキット(シバヤギ, 東京)を用いて、総IgE濃度、OVA-IgE濃度(ng/ml)を測定した。

Micro Computed Tomography (µCT) による脛骨海面骨骨梁の解析

骨への影響を知るために、PBS群、Alum群、OVA群、OVA + Alum群それぞれを対象に、micro-CT SkyScan1076 (SkyScan, Antwerp, Belgium)を用いて脛骨を撮影し、ならびに測定を行った。

CT撮影は感作開始時、3週目、5週目、9週目に行った。マウスを1%イソフルランにて吸入麻酔を施し、右後ろ足を固定して撮影を行った。撮影は、0.5mm Aluminiumフィルターを用いて、電圧50kV、電流200 µA、空間分解能9 µm、ローテーション角度0.7°、力

メラ解像度 4000x2672 にて行った。撮影されたデータは InstaRecon software (InstaRecon, Inc. Champaign, IL, USA) を用いて、4000x2672 ピクセルにて再構成した。さらに CTan (Skyscan, Belgium) を用いて、脛骨近位の成長板直下より 0.5mm 離れた部分から遠位に 1mm の部位の海面骨を計測領域とし解析を行った。CTan を用いて骨三次元解析パラメータである単位面積あたりの骨単位 (bone volume/total tissue volume: BV/TV)、骨梁の幅 (trabecular thickness: Tb.Th)、骨梁数 (trabecular number: Tb.N)、骨密度 (bone mineral density: BMD) の解析を行った。また、同ソフトを用いて、計測領域から水平断 50 スライス (450 μ m 分) の最大輝度投影画像を作成、厚さ 500 μ m の前頭断 3D 画像を作成した。

三点曲げ試験

各群のマウスをペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与にて麻酔後に脛骨を採取し、液体窒素で凍結した。三点曲げ試験は東京歯科大学口腔科学研究センター口腔インプラント学研究部門にて静的材料試験機 (AG-1 20kN; 島津製作所) を用い行った。曲げ応力の解析は「日本金属学会編 材料試験法」(1976 仙台) をもとに行われた。

定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量解析

1、3、5、7、9 週目における各群の脛骨を取り出し、液体窒素下にて粉碎後、TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) にて total RNA を回収し、DNase 処理 (DNase, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を行った。cDNA 合成は totalRNA と Random Primer 及び逆転写酵素 ReverTra Ace (Toyobo Co.Ltd., Osaka, Japan) を含む反応液を混和し、30 で 10 分のプレインキュベーション後、42 で 20 分逆転写反応を行い、99 で 5 分加熱して不活性化を行った。標的遺伝子の PCR プライマーは、MacVector (Ceres Bioscience, Saitama, Japan) を用いて、増幅サイズが 50-250bp となるよう設計した。PCR 反応には、SYBR Premix EX Taq kit (Takara Bio Inc.) を用いた。キット中の 2xSYBR Premix Ex Taq (10 μ l)、Rox Ref Dye (0.4 μ l)、10 μ M PCR Forward Primer (0.5 μ l)、10M PCR Reverse Primer (0.5 μ l)、H₂O (7.6 μ l) および cDNA を混和後、増幅反応を行った。増幅反応には、Rotor Gene3000 (QIAGEN, Valencia, USA) を用いて、95 で 15 秒、57 で 30 秒、72 で 60 秒の加熱をサイクルとし、35 サイクル行った。結果は、それぞれの遺伝子の発現強度を内部標準である Atp5f1 にて補正を行った。

ロイコトリエン量の測定

大腿骨を液体窒素下にて粉末状にすり潰し、1%蟻酸含有メタノール 1ml に混合することで脂質を抽出した。脂質濃度は leukotriene B₄

(LTB₄), leukotriene C₄ (LTC₄) ELISA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) を用い、プロトコールに従い測定した。組織の重量をあらかじめ測定しておき、骨単位重量あたりの脂質量を算定した。

4. 研究成果

本研究では慢性的な OVA アレルギーマウスモデルを用いた。最初の感作時のマウスは 6 週令であり、週令を重ねるごとに体重の増加が認められた。また、OVA 群、OVA+Alum 群では、それぞれ投与後数日は体重の減少がみられたが、その後回復し、実験期間を通じて、各実験グループ間では、統計学的有意差は認められなかったが、OVA + Alum 群において体重が多群よりも減少する傾向にあった。アレルギー炎症の惹起を確認するために、OVA + Alum 群に経鼻的に OVA 溶液を吸引させた。OVA 溶液の吸入により、気管支周囲への炎症性細胞の浸潤が顕著で、組織の線維化も認められた。PBS を吸引させた群では、無処置群と比較して、血管周囲にわずかな炎症性細胞の浸潤を認めるのみであった。

次に、血漿中の IgE 濃度を調べた。OVA + Alum 群における総 IgE 濃度は、感作 5 週目にて、PBS 群、Alum 群よりも有意に上昇していた。統計的有意差はないが、OVA 群においても、上昇傾向がみられた。感作 9 週目において OVA + Alum 群、OVA 群共に PBS 群や Alum 群に比べ、有意に上昇してしていた。

OVA 特異的 IgE においては、感作後 3 週目より OVA + Alum 群がその他の群に比べ、有意に上昇していた。その後、OVA + Alum 群における OVA 特異的 IgE は減少傾向を示したが、9 週目においても、PBS 群、Alum 群と比べ、有意に上昇している事が確認された。OVA 群の特異的 IgE は、実験期間を通じて、その他の群と有意差を認めなかった。

脛骨の骨解析

0 週、3 週、5 週、9 週目の各群における脛骨をマイクロ CT にて撮影し、解析を行った。9 週目において、OVA + Alum 群の BV/TV は PBS 群および Alum 群に比べ有意に減少していた。骨梁の厚さでは、OVA + Alum 群と PBS 群の間および OVA 群と PBS 群の間で 5 週目、9 週目に有意差が見られた。また、骨梁の数は、9 週目の OVA + Alum 群において、その他の群に比べ、有意に減少している事が認められた。さらに BMD は OVA + Alum 群では Alum 群と有意な差が見られた。どの項目においても PBS 群と Alum 群との間に有意差は認められなかった。OVA 群は BV/TV、Tb.N、BMD において、その他の群とは有意差はなかったが、PBS 群、Alum 群と比較して X 線画像からは骨梁が減少しているように見えた。

また、骨の実質的な強度を調査するため、三点曲げ試験を行った。7 週において OVA 群と OVA + Alum 群は、PBS 群に対し有意に曲げ強さが減少した。また、9 週目において OVA

群はPBS群に対し有意に曲げ強さが減少していた。

組織レベルでの変化を観察するために、HE染色およびTRAP染色を行った。5週目、9週目において、成長板の厚さには各群で変化は見られなかった。9週目におけるH-E染色では大腿骨の骨端部の骨梁がOVA + Alum群、OVA群でPBS群、Alum群と比べて細くなっていた。また、2核以上のTRAR陽性細胞数を計測した結果、3週目ではOVA + Alum群はその他の群に比べ、有意に増加していた。5週目では、OVA + Alum群とOVA群がPBS群、Alum群よりも有意に増加していた。9週目において、いずれの群間にも有意差は認められなかった。

RANKL、炎症性サイトカインの mRNA 発現量変化

アレルギー炎症に関わるサイトカイン、および骨代謝調節に関わる遺伝子発現量を解析した。炎症に強く関わることで知られるIL-1は、1週目から5週目においてOVA + Alum群がその他の群よりも有意に増加していた。しかし、7週目以降は各群に有意差は認められなかった。また、IL-4、IL-10、RANTESは、OVA + Alum群は、1週目から5週目にその他の群と比較して有意な増加が認められた。OVA + Alum群のTNF- α は、3週目から7週目において有意に発現上昇が認められた。一方、RANKLのmRNA発現量は1週目から5週目までOVA + Alum群において有意に増加していた。最近、破骨細胞分化を促すとされているHMGB1 (Scaffidi, Misteli, & Bianchi, 2002; Wang et al., 1999; Yang et al., 2008)は、今回の実験期間を通じて、各実験群の間に有意差は認めなかった。骨形成マーカーであるALP mRNAの発現量は実験期間では、各群に有意差は見られなかった。

脂質メディエーター-メディエーター関連因子群の発現量変化

近年、5-L0が、破骨細胞形成の鍵となるRANKLを誘導することが報告されている (Lee et al., 2012; Traianedes, Dallas, Garrett, Mundy, & Bonewald, 1998)。脂質合成酵素である5-L0、5-L0の活性化分子である5-lipoxygenase activation protein (FLAP)、LT合成酵素であるLTA4h、LTの受容体であるCysLT1、CysLT2、BLT1、BLT2のmRNA発現量を調べた。OVA + Alum群の5-L0 mRNA発現量は5週目、9週目で増加していた。また、OVA + Alum群におけるFLAP mRNAはその他の群と比べ、3週目で増加に有意差があったが、実験期間を通じ他群と比較して統計的有意差は見られなかった。さらに、LTA4h mRNA発現量はAlum群、OVA群、OVA + Alum群で1、3週目でPBS群よりも増加していた。さらに、7、9週目では、OVA + Alum群はPBS群よりも有意に増加していた。

LTC4レセプターであるCysLT1,2とLTB4レ

セプターであるBLT1,2のmRNA発現量を測定した。CysLT1mRNAは、統計学的有意差はなかった。CysLT2mRNAは、5週目、9週目においてOVA + Alum群がOVA群よりも有意に増加しており、7週目ではOVA + Alum群はその他の群よりも有意に増加していた。BLT1mRNA発現量は9週目にOVA + Alum群がその他の群よりも有意に増加していた。BLT2mRNA発現量は統計学的有意差はなかった。

LTB₄ および LTC₄ の骨中の濃度は、5週目ではどちらも有意な差は認められなかったが、9週目では、OVA + Alum群でPBS群やAlum群よりも増加が認められた。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：

6. 研究組織

(1)研究代表者

大内雅博 (Ouchi Masahiro)
九州大学・歯科矯正学分野・後期研修医
研究者番号：70707182