

| | |
|---------|--|
| 氏名 | 中辻 和樹 |
| 授与した学位 | 博士 |
| 専攻分野の名称 | 歯学 |
| 学位授与番号 | 博甲第5709号 |
| 学位授与の日付 | 平成30年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当) |
| 学位論文の題目 | 骨治癒過程におけるビスフォスフォネート系製剤によるTリンパ球への影響の検討 |
| 論文審査委員 | 岡元 邦彰 教授 上岡 寛 教授 苔口 進 准教授 |

学位論文内容の要旨

【緒言】

ビスフォスフォネート製剤 (BP) は骨粗鬆症の治療の第一選択薬であり、乳癌や前立腺癌の骨転移、変形性骨炎、その他骨吸収性病態に対する治療薬として広く使用されている。2003年、Marxらにより、BP内服の副作用として抜歯後の顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw:BRONJ) が報告された。それ以来、BRONJに関して様々な研究が行われているが、未だ発生機序が不明である。しかし、これらの研究により、BRONJ発生には骨代謝回転異常、血管新生抑、創傷治癒遅延、口腔内細菌の関与が示唆されている。また、近年、BPは破骨細胞だけではなく様々な細胞にも影響を与えることが明らかとなっている。一方、BP投与時の急性期反応の出現に際し、末梢血中のT細胞の一種である $\gamma\delta$ T細胞が関与するとの報告があり、骨治癒過程においては、 $\gamma\delta$ T細胞が骨芽細胞の成長に関与していることが明らかとなり、骨粗鬆症では、閉経に伴う末梢血や骨髓中のTリンパ球の減少が示されている。このことから、BP投与が、免疫系に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。

本研究では、骨治癒過程におけるBPのTリンパ球分画への影響を明らかにすることを目的とし、野生型マウスを用いて、ゾレドロネート投与後に大腿骨を削合し、骨髓、末梢血、胸腺、脾臓におけるTリンパ球分画への影響、さらにリンパ球分画に影響する関連因子として、血清中サイトカインの濃度の変化を検討した。

【対象および方法】

実験動物には12週齢 C57BL/6J 雌性 Wild マウスを使用し、control として生理食塩水

(200 μ l/body/day,3days/week) を腹腔内投与した control 群とゾレドロネート

(200 μ g/kg/day,3days/week) を投与した zol 群とし、各群ともに12週間薬剤投与した。薬剤投与開始4週後に右側大腿骨近位骨端下部に、直径1.4mmのラウンドバーを用いてドリリングを行った。ドリリング直後、2週後、4週後に血清生化学的解析のため、アニマルランセットを用いて、顎骨後方より穿刺し採血を行った。12週間の薬剤投与終了後、三種混合麻酔による全身麻酔を行い、後大静脈より血液を採取し、脱血後に大腿骨、胸腺、脾臓を採取した。大腿骨はH-E染色、抗CD3、抗Th-Pok、抗

RUNX 免疫組織化学染色を行い、組織学的観察を行った。末梢血血液細胞、胸腺細胞、脾臓細胞は CD45、CD3e、CD4、CD8a、TCR γ/δ でラベルし、フローサイトメトリー解析を行った。

【結果】

1. 大腿骨の組織学的観察

H-E染色による組織学的観察の結果、control群と比べてzol群では海綿骨の骨梁の増加を認め、皮質骨の肥厚を認めた。各免疫組織化学染色における結果は、Control群と比べてZol群ではCD3陽性細胞数は増加傾向を示した。CD4陽性細胞の転写因子であるTh-Pokは増加傾向を示し、CD8陽性細胞の転写因子であるRUNXは有意な減少を認めた。

2. フローサイトメトリー解析

胸腺細胞では、control群と比較してzol群はCD4SP細胞、CD8SP細胞、DN細胞、 $\gamma\delta$ T細胞で増加傾向を示し、DP細胞で有意な減少を認めた。脾臓細胞では、control群と比較してzol群では、CD4SP細胞、DN細胞、 $\gamma\delta$ T細胞で増加傾向を示し、CD8SP細胞、DP細胞で有意な減少を認めた。末梢血において、control群と比較してzol群はCD4シングルポジティブ（SP）細胞で増加傾向を示した。CD8SP細胞、CD4CD8ダブルネガティブ（DN）細胞では有意に減少し、 $\gamma\delta$ T細胞では減少傾向を示した。末梢血においては、いずれの群もCD4CD8ダブルポジティブ（DP）細胞は測定されなかった。

3. 血清生化学的検討

IL-1 β はcontrol群と比較してzol群の方がいずれの場合も減少傾向にあり、ドリリング2週後は有意な減少を認めた。IL-10とIL-17は、ドリリング直後はzol群の方が増加傾向を示したが、ドリリング2週後、4週後はzol群の方が減少傾向を示した。TNF- α はドリリング直後、ドリリング2週後はzol群の方が減少傾向を示したが、ドリリング4週後はzol群の方が増加傾向を示した。

【考察】

本研究結果から、BP投与により胸腺でのT細胞の分化は促進されるが、末梢血や脾臓におけるTリンパ分画の動態とは一致しないことが明らかとなった。さらに、BP投与によって生じた血清中のサイトカインの変化は破骨細胞、骨芽細胞ともに抑制する方向に働いていることから、骨代謝サイクルに異常をきたしている可能性があることが示唆された。BP投与によるTリンパ球動態の変化が正常な免疫恒常性の維持を困難にさせ、また血清サイトカインの変化によって、骨代謝サイクルに異常をきたしている可能性が考えられ、骨への感染防御を困難にしている可能性が示唆された。このことはBRONJの病因や発生機序の解明の一助となる可能性があり、免疫系の改善がBRONJ予防につながる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

骨粗鬆症治療の第一選択薬であるビスフォスフォネート系製剤（BP）は、悪性腫瘍の骨転移等にも広く用いられている。一方、ビスフォスフォネート系製剤関連顎骨壊死（BRONJ）の発症が問題となっており、BP 以外にも、抗 RANKL 抗体、血管新生阻害薬でも同様の顎骨壊死が起こることが報告されている。BRONJ の発症に関しては、骨代謝回転異常、口腔内細菌の関与などが報告されているが、未だ発生機序は不明である。骨組織はさまざまな組織や細胞によって制御され、なかでも骨と免疫系は密接に関係しており、骨と免疫系の融合領域である骨免疫学が近年注目されている。BP 投与初期に起こる急性期反応には、 $\gamma\delta$ T 細胞が関与していることが明らかとなり、また骨治癒過程においては $\gamma\delta$ T 細胞が産生する IL-17 が治癒促進に関わっていると報告があることから、BP 投与による T リンパ球への影響を明らかにすることを目的に、大腿骨をドリリングした野生型マウスを用い、ゾレドロネート（zol）投与による骨髄、末梢血、胸腺および脾臓における T リンパ球、さらに T リンパ球分画に影響する関連因子として、血清中サイトカイン濃度への効果を検討した。

その結果、大腿骨骨髄における CD3 陽性細胞、すなわち T リンパ球数は zol 投与により増加傾向を認め、CD4 転写因子である Th-Pok 転写因子は増加傾向、CD8 転写因子である RUNX 転写因子は有意な減少を認め、BP 投与が T リンパ球の分化過程に影響を与えている可能性が示唆された。

フローサイトメトリー解析の結果においては、末梢血および脾臓では、骨髄における免疫組織化学染色の結果を支持する結果を得たが、胸腺では成熟した分画である CD4 シングルポジティブ（SP）細胞、CD8SP 細胞への分化を促進する結果を得た。これらは、一次リンパ組織である胸腺での T リンパ球の分化は zol 投与により促進されるが、二次リンパ組織である末梢血、脾臓での T リンパ球の変動とは異なる動きをすると考えられた。

血清中サイトカイン濃度の測定では、IL-1 β 、IL-10、IL-17A、TNF- α で変化を認めた。zol 投与により、IL-1 β は減少傾向を認め、IL-10 と IL-17A は、ドリリング直後は zol 投与により増加傾向を認めたが、2 週間後、4 週間後は減少傾向を認めた。TNF- α はドリリング直後、2 週間後は zol 投与により減少傾向を認めたが、4 週間後は増加傾向を認めた。IL-1 β 、TNF- α は破骨細胞の分化・形成を起こすサイトカインであり、IL-10 は TNF- α を抑制する働きがあり、IL-17A は骨芽細胞を活性化させるサイトカインである。今回の結果から、BP 投与が破骨細胞、骨芽細胞の活性を抑制させる可能性が示唆された。

以上の結果から、BP 投与により正常な免疫恒常性の維持を困難にしていることが推測され、また骨代謝サイクルに異常をきたしている可能性があり、骨での感染防御機構を障害している可能性が示唆された。これらの知見は、BRONJ の病因や発生機序の解明に際し、大きく貢献するものと考えられる。

本学位論文は、BP の骨代謝系に及ぼす影響に加え、免疫系特に T リンパ球系への影響について考察されている。また BRONJ の発生機序解明に関して、骨免疫学の観点から言及しており今後の研究に新たな方向性を示唆する結果を含んでいる。よって審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。