

“Deficiency of chemokine receptors CCR1, CCR5 and CX3CR1 causes defective osteoclast differentiation and defective bone remodeling.” *Bone*. 2009 June; 44(S2):215-216.

2. 学会発表

1. Hoshino A, Ueha S, Imai T, Matsushima K, Yamamoto K. "DEFICIENCY OF CHEMOKINE RECEPTORS CCR1, CCR5 AND CX3CR1 CAUSES DEFECTIVE OSTEOCLAST DIFFERENTIATION AND DEFECTIVE BONE REMODELING" *36th European Symposium on Calcified Tissues 2009* May 23-27,2009. Vienna, Austria.
2. Hoshino A, Kanaya F, Yamamoto K "Role of chemokine receptor CCR1 and CCR5 in maturation of osteoclasts and osteoblasts." *2009 Gordon Research Conference, Bone and Teeth*. July 15 2009, Biddeford, Maine, USA
3. Hoshino A, Ueha S, Imai T, Matsushima K, Yamamoto K. "The Roles of Endogenously-produced Chemokines in the development of Tissue-specific Myeloid-lineage Cells and Macrophages" *The 9th World Congress on Inflammation 2009* Jul 6-10,2009. Tokyo, Japan.

4. Hoshino A, Ueha S, Matsushima K, Yamamoto K "Role of chemokine receptor CCR1 and CCR5 in bone homeostasis." *39th Japanese Society for Immunology Research Conference*. Dec 3 2009, Osaka, Japan.
5. Kanaya F, Hoshino A, Maruoka Y “Bone metabolism regulated by CCR5 signaling and potential adverse effects by CCR5 blockers” *Charles University First Faculty Stomatology Department Seminar Series*. Mar 10 2010, Prague, Czech Republic

3. その他の業績 書籍等

なし

H:知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)分担研究報告書

進行性下顎頭吸収の診断基準策定とその治療に関する研究

(H21-難治-一般-097)

基礎班：炎症性骨代謝異常の機序解明

分担研究者:松島綱治 東京大学大学院医学系研究科・分子予防医学 教授

分担研究者:上羽悟史 東京大学大学院医学系研究科・分子予防医学 助教

研究要旨

進行性下顎頭吸収 (Progressive Condylar Resorption: PCR)の病態形成機序については物理的な要因に加え、骨および軟骨の代謝異常の関与も示唆されている。近年、関節リウマチをはじめとして、炎症性免疫応答が骨代謝の異常とそれに伴う骨病変を誘導することが明らかにされ、炎症制御に基づく分子標的薬が臨床応用されている。本研究では、PCRの病態を炎症性免疫応答の観点から検討する事を目的とし、臨床的に骨粗鬆症と相関が報告されている造血幹細胞移植の併発疾患、移植片対宿主病 (GVHD) のマウスモデルにおいて、骨代謝異常の発症機序を解析した。骨組織の病理学的解析により、GVHD発症マウスでは骨芽細胞が完全に消失し、また骨サンプルの RT-PCR 解析により、骨芽細胞分化に関わる各種転写因子の発現が著減することが明らかとなった。さらに骨形態計測の結果、骨芽細胞の消失と一致して GVHD マウスでは骨形成が完全に抑制されていることが明らかとなった。一方で破骨細胞の数、分布に著明な差を認めなかったことから、GVHDモデルにおける骨代謝異常は骨芽細胞の障害による骨形成抑制に起因することが示唆された。また骨芽細胞の障害機序を検討したところ、移植片に含まれる CD4⁺ T細胞の関与が明らかになり、抗 CD4抗体投与により GVHDマウスから CD4⁺ T細胞を除去することにより、骨芽細胞障害が治療可能であることを見出した。これらの結果は、活性化 CD4⁺ T細胞による骨芽細胞障害の誘導という、新たな炎症性の骨代謝異常機序を示すものであり、PCRの臨床病態解明の中で検索すべき指標を提供する物である。

A:研究目的

進行性下顎頭吸収(Progressive Condylar Resorption: PCR)は、進行性の下顎頭の形態吸収変化とそれに伴う著明な同部の体積の減少と定義される。その病態形成機序については物理的な要因に加え、骨および軟骨の代謝異常の関与も示唆されている。近年、関節リウマチをはじめとして、炎症性免疫応答が骨代謝の異常とそれに伴う骨病変を誘導することが明らかにされ、炎症制御に基づく分子標的薬が臨床応用されている。

我々はこれまでに同種造血幹細胞移植(allogenic hematopoietic stem cell transplantation: allo-HSCT)患者で問題となっている骨粗鬆症の危険因子に、移植片対宿主病(Graft-versus-Host disease: GVHD)があげられることに注目し、マウスGVHDモデルを解析した。GVHDは、移植片に含まれるドナーT細胞が宿主細胞を異物と認識して排除応答を示すことに起因する、腸管、肝臓、皮膚、骨髄の障害を特徴とする炎症性疾患である。予備的検討を行ったところ、マウスGVHDモデルにおいても臨床GVHDと同様に骨代謝異常が認められることが明らかになった。

本研究では、炎症性骨代謝異常の病態形成機序を解明することを目的として、マウスGVHDモデルにおける骨代謝異常の詳細と発症の細胞学的機序について検討を行った。

B:研究方法

- (1). GVHDモデル：致死量放射線照射 BDF1 マウス(H2^{bxd})に致死量 X 線照射を施した後、C57BL/6 マウス(B6, H2^b)の T 細胞除去骨髄細胞 (TCD BM)と T 細胞を移入し、MHC 完全不適合 GVHD モデルを作成した。また B6 由来 TCD BM と CD4⁺ T 細胞を、致死量 X 線照射を施した bm1 (H2^{bm1})マウスに移植し、CD4 依存的な MHC class II 不適合 GVHD モデルを作成した。TCD BM のみを移植したマウスを非 GVHD コントロールとした。
- (2). 病理学的解析：allo-HSCT 後経時的に GVHD マウスまたはコントロールマウスの骨サンプルを採取し、HE 染色および酵素発色法による alkaline phosphatase (ALP)陽性骨芽細胞の検出を行った。
- (3). RT-PCR：凍結破砕した骨サンプルより RNA を抽出し、cDNA へ逆転写後、骨芽細胞の分化に関わる遺伝子 (Runx2, Twist, Msx2, Osterix, Dlx5, Osteocalcin) 発現を RT-PCR により解析した。
- (4). 骨形態解析：allo-HSCT 後 14 日目の GVHD マウスおよびコントロールマウスの骨代謝を、骨形態計測により定量的に評価した。骨サンプル採取の 24 時間および 96 時間前にマウスへカルセインを投与することにより骨組織の成長割合を定量的に算出した。
- (5). 抗 CD4 抗体治療実験：MHC 完全不適合 GVHD モデルにおいて allo-HSCT 後 4

日目および6日目に抗 CD4 抗体を 200ug/mice 投与し、CD4⁺ T 細胞を除去し、28 日目における骨芽細胞の回復について組織学的な評価を行った。

C:研究結果

組織学的解析により、MHC 完全不適合 GVHD モデルにおいて allo-HSCT 後 14 日目の時点で骨芽細胞が消失していることが明らかとなった。また allo-HSCT 後の骨芽細胞の推移を経時的に解析したところ、allo-HSCT 後 4 日目から 8 日目にかけて急速に減少し、8 日目の骨サンプルでは骨内膜表面の ALP 陽性骨芽細胞を認めなかった (図 1)。

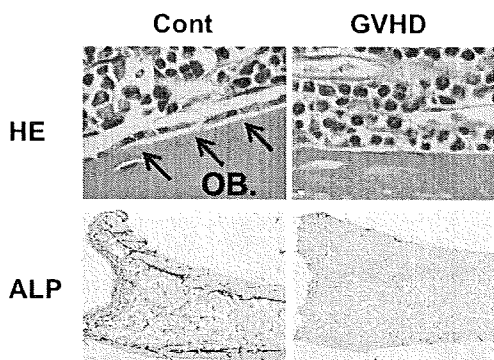


図 1 : Allo-HSCT 後 8 日目の骨サンプル。GVHD 群では上段矢印で示す骨芽細胞 (OB) および、下段赤で示す骨内膜表面の ALP 陽性細胞が認められない。

一方、破骨細胞については著明な変化を認めなかった。CD4⁺ T 細胞依存的な MHC class II 不適合 GVHD モデルにおいても同様の結果が得られたのに対し、MHC class I 不適合 GVHD モデルでは骨芽細胞の消失を認めなかった。これらの結果から、骨芽細胞

は GVHD 誘導早期に消失すること、また GVHD 発症に伴う骨芽細胞障害には CD4⁺ T 細胞が重要な役割を果たすことが示唆された。

RT-PCR により HSCT 後 14 日目の骨サンプルにおける骨芽細胞マーカーを解析したところ、骨芽細胞の分化過程(前駆細胞 → 未成熟 → 成熟)において、前駆細胞以降に発現する Runx2, Twist, Msx2, 未成熟以降に発現する Osterix, Dlx5, 成熟骨芽細胞に発現する osteocalcin 等の遺伝子発現が著明に抑制されていることが明らかになった。これらの結果から、GVHD は骨芽細胞分化の極めて早い段階を抑制することが明らかとなった。

さらに骨芽細胞の障害を機能的にも検証するため、骨形態計測により GVHD 誘導時の骨代謝を解析した。未処置マウスおよびコントロールマウスでは骨形成を示す骨へのカルセイン沈着が認められたが、GVHD 発症マウスではカルセインの沈着を認めず、骨形成が完全に抑制されていることが明らかとなった (図 2)。

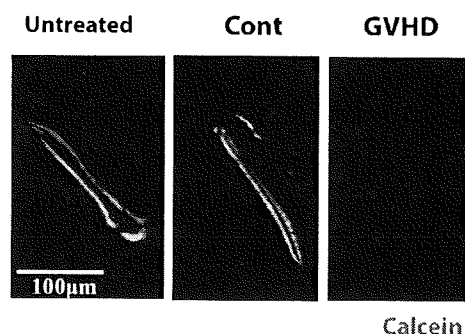


図 2 : Allo-HSCT 後 14 日目の骨サンプル。GVHD 群では未処置 (Untreated) および非 GVHD コントロール (Cont) で認められるカルセイン沈着 (緑) が認められない。

以上の結果より、GVHD 発症時には CD4⁺ T 細胞依存的に骨芽細胞障害が誘導され、骨形成が阻害される事が明らかになった。次に GVHD 発症マウスから CD4⁺ T 細胞を除去することにより、骨芽細胞障害を治療することが可能か検討した。allo-HSCT 後 28 日目に抗 CD4 抗体投与群から採取した骨サンプルの組織学的解析を行ったところ、骨内膜表面に骨芽細胞を認め、また骨芽細胞近傍に膠原線維の増成を認めた。これらの結果から、GVHD を発症した後であっても、CD4⁺ T 細胞除去により骨芽細胞障害を治療できることが明らかとなった。

D:考察

1) 達成度について

炎症性の骨代謝異常を呈する GVHD マウスモデルを解析し、活性化 CD4⁺ T 細胞が骨芽細胞の分化過程を極めて早い段階で抑制することで、骨形成が抑制される事を明らかとした。さらに骨芽細胞障害に決定的な役割を果たす CD4⁺ T 細胞を除去することにより、骨芽細胞障害を治療可能であることを示した。本研究成果は炎症性の骨形成抑制の発症機序に関する細胞学的基盤を確立するものであり、炎症性の骨代謝異常の診断、予防、治療法を開発する上で重要な知見を与えるものと考えられる。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

関節リウマチをはじめとして、炎症性の骨代謝異常に起因する疾患の多くが骨吸収の観点から解析されてきた。本研究では活性化 CD4⁺ T 細胞が骨芽細胞分化を抑制することにより骨形成抑制が発症することを示すものである。近年免疫システムと骨代謝が密接な関連を持っていることが明らかにされ、“骨免疫学”という新たな学術分野が発展する中で、国際的にも独創性の高い本研究成果は大きな貢献をなすものと考えられる。

PCR が炎症性疾患であるか、臨床病態のさらなる解明が必要などころではあるが、本研究成果は活性化 CD4⁺ T 細胞が骨形成を抑制していることを示しており、PCR の臨床病態を解明する上で検索すべき指標を提供するものと考えられる。また PCR 以外の炎症性疾患においても病態形成の過程で同様の機序が働くことが想定され、より広範な骨代謝異常の治療法につながる可能性がある。

3) 今後の展望について

本研究により炎症性の骨代謝異常について、活性化 CD4⁺ T 細胞が骨芽細胞の分化を抑制するという、細胞学的機序を明らかにした。一方で、活性化 CD4⁺ T 細胞による骨芽細胞障害にどのような分子が関与するのか、その詳細は不明である。今後骨芽細胞障害の分子機序を明らかにすることにより、炎症性骨形成抑制の診断法および選択的な予防、治療法の確立につながる事が期待される。

E:結論

活性化 CD4⁺ T 細胞が、骨芽細胞の分化過程を極めて早い段階を抑制することで、骨形成を抑制する、炎症性骨代謝異常の新たな機序を明らかにした。

F:健康危機情報

なし

G:研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Shono Y, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Wang Y, Imamura, M, Matsushima K. “Bone marrow GVHD” : Early destruction of bone marrow hematopoietic niche mediated by donor CD4⁺ T cells. *The 9th World Congress on Inflammation 2009* Jul 7,2009. Tokyo, Japan.

2. Shono Y, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Wang Y, Imamura, M, Matsushima K. “Bone marrow GVHD” : Early destruction of bone marrow hematopoietic niche mediated by donor CD4⁺ T cells. *The 39th Annual meeting of the Japanese Society for immunology*. Dec 3, 2009. Osaka Japan

3. その他の業績 書籍等

なし

H:知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)分担研究報告書

進行性下顎頭吸収の診断基準策定とその治療に関する研究

(H21-難治-一般-097)

中枢神経系で CCR5 を転写する細胞の分離と同定

分担研究者：

馬目佳信

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター共用研究施設・教授

藤岡宏樹

東京慈恵会医科大学DNA医学研究所分子細胞生物学研究部・助教

星野昭芳

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センターME研究室・ポスドク

研究要旨

進行性下顎頭吸収は進行性の下顎頭の形態吸収変化とそれに伴う著明な体積の減少をきたす疾患であるが原因についてはまだ明らかではない。本症では発症とケモカインレセプターの一形である CCR5 との関連が疑われており診断基準策定や治療法を検討する上で CCR5 やそのリガンドの引き起こす病態との関連を調査する必要があると思われる。これらのケモカインやリガンドは炎症を体に引き起こすが特に CCR5 は HIV 感染とも密接に関連するため骨以外にもクリティカルな臓器、例えば中枢神経系にどのような影響を及ぼすかを解析することは重要である。今回マウスの中枢神経系細胞を分画化して解析することにより CCR5 を転写する細胞集団を同定し CD11b 陽性ミクログリアと推定した。この分子を

発現する細胞は比較的均一な集団であり、今後脳内のケモカインの解析が本症の解明に役立つと思われた。

A:研究目的

進行性下顎頭吸収 (Progressive Condylar Resorption: PCR) は進行性の下顎頭の形態吸収変化とそれに伴う著明な同部の体積の減少と定義され、下顎枝高径の短縮・下顎後退・下顎時計回転による前歯部開咬を呈する病態である。この病気の原因は不明だが我々のグループはケモカインレセプター、特に CCR5 が本症の発生に大きく関与しているのではないかと考えている。このレセプターはヒト免疫不全ウイルス (HIV) がヒトの T 細胞に感染する際の機序の解明によりクローズアップされてきたレセプターである。HIV のメインレセプターとして T 細胞上の CD4 の存在が良く知られているが、感染しても長期末発病患者がいることや危険因子がありながら感染しない個体が存在することからウイルスのコ・レセプターの存在が明らかとなった。このケモカインレセプターに変異がある個体では HIV 感染にある種の耐性が認められることから CCR5 のノックアウトマウスを使って盛んに実験がなされている。この時ノックアウトマウスは野生型に比べて骨密度の低下など骨粗鬆症を呈することが我々のこれまでの研究から明らかになってきた。このように PCR の発症にはケモカインや対応するケモカインレセプターの関与を念頭に置き原因の解明をすすめる必要がある。このような状況の下、PCR の診断基準を作成するにあたり HIV 感染で一次的に脳症として損傷を受ける中枢神経系でも進行性下顎頭吸収に関連してケモカイン関連因子攪乱が起

きていることが予想される。そこで中枢神経系での変化を見つけるためのマーカーを調査するために、まず頭蓋内のどの細胞に CCR5 が発現しているのか？また発現している細胞は他にどのような遺伝子やタンパクを発現しているのか？などについて解析を行うこととした。中枢神経系での病変の有無と進行性下顎頭吸収との関連を明らかにするため CCR5 を発現している細胞を同定、解析することを本研究の目的とした。

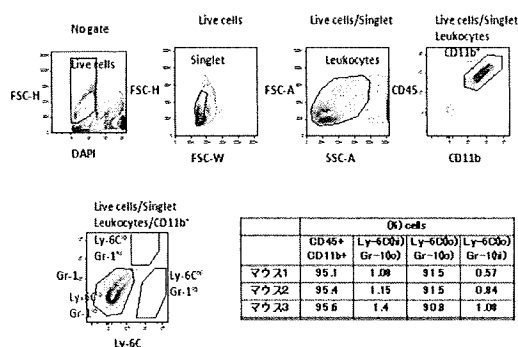
B:研究方法

CCR5 ノックアウトマウスの頭蓋内の細胞と比較するために野生型 C57BL マウスの脳内の細胞を分画化してそれぞれの細胞から RNA を抽出、逆転写酵素で相補鎖 (c)DNA を合成してケモカインおよびケモカインレセプターの mRNA の転写を定量的 PCR で定量した。具体的には全身麻酔下にマウスの脳を灌流洗浄し、氷冷下に大腦を摘出、その後パイン存在下に脳実質から単離細胞を得た。これらの細胞を個々の細胞に分離して単一の細胞とし、GFAP, Prominin-1, PSA-NCAM, CD11b, CD44 抗体を用いてそれぞれの抗原が陽性の細胞を磁気ビーズで分画化した後、各細胞より RNA を酸性グアニジン-フェノール-クロロホルム法 (AGPC 法) で抽出、ランダムプライマーを用いて cDNA を得た。mRNA の定量はサイバークリーンを用いたリアルタイム PCR 法で行い CCR5 を発現している細胞を同定した。本研究では動物実験を行うため国立国際医療センター (番号: 21-Tg-1 平成 21 年 4 月 1 日～平成 22 年

3月31日) および東京慈恵会医科大学 (21-062, H22.1.29-H24.12.31) での動物実験委員会の認可を受けている。

C:研究結果

マウス脳から分離された細胞はそれぞれのマーカー別に解析を行い再現性の確認を行ったが CCR5 を転写しているのは CD11b 陽性の細胞であった。次にこの CD11b 陽性細胞がどのような分子を発現しているか確認するためにフローサイトメトリーによりその他の抗原について解析を行った。mRNA の解析を行った細胞はごく少量のモノサイトとも思われる CD45⁺CD11b⁺Ly-6C^{hi}Gr-1^{lo} のポピュレーション、および好中球とも思われる CD45⁺CD11b⁺Ly-6C^{lo}Gr-1^{hi} のポピュレーションを含むものの、生細胞の 90% 以上が CD45⁺CD11b⁺Ly-6C^{lo}Gr-1^{lo} の免疫表現型を持つ均一な細胞集団で、おそらくミクログリアと推定された。



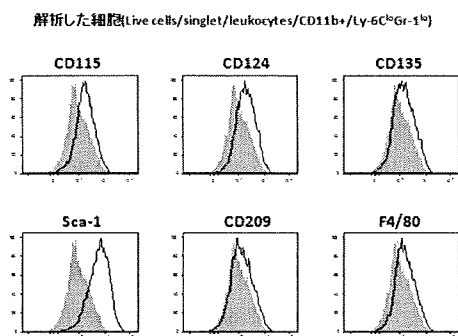
またこれらの細胞で他にどのような分子を発現しているかについて調べた。CD45⁺CD11b⁺Ly-6C^{lo}Gr-1^{lo} の免疫表現型を持つ細胞を解析したところ Sca-1 が比較的高発現しており、その他 CD115, CD124, CD135, CD209, F4/80 等も若干発現していることが判明した。ただし CCR5 はフローサイトメトリーで解析した結果では陰性であり、抗体

で検出した場合タンパクの発現としてはほとんど認められないことも分かった。

D:考察

結果から頭蓋内の細胞で CCR5 を発現しているのは CD11b 陽性ミクログリアであると推定された。他のアストロサイトやオリゴデンドロ細胞、神経前駆細胞では CCR5 の発現は低く、また CD11b 陽性細胞から見るとこの集団は比較的均一なポピュレーションであり他に Sca-1 などの表面マーカーも陽性だった。ミクログリアは HIV 感染で脳症の発生に関わるウイルスのリザーバーとしての役割が疑われている。進行性下顎頭吸収において CCR5 の関与が疑われることに続き、頭蓋内でミクログリアのみが CCR5 を転写していることが判明した。ミクログリアは脳内での炎症に際して大きな役割を担う。そのため本症では頭蓋内のケモカインの異常が引き起こされている可能性も考えられた。

E:結論



進行性下顎頭吸収に関連する病態としてケモカイン、特に CCR5 の関与が考えられている。脳の炎症をつかさどるミクログリア

が CCR5 を転写していることが判明したため本症では脳内でのケモカインレセプターやリガンドの検索が疾患の解明のために有用であろうと予想される。

F:健康危機情報

なし

G:研究発表

1. 論文発表

Manome Y, Mizuno S, Akiyama N, Fujioka K, Saito H, Hataba Y, Kobayashi T, Watanabe M. Three-dimensional cell culture of glioma and morphological comparison of four different human cell lines. *Anticancer Research, in press.*

Akiyama N, Ohno Y, Fukuda T, Manome Y, Saito S. Enhancing activity of N-glycosylation for constitutive proteins secretions in non-polarized cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 381:612-618,2009.

Manome Y, Furuhashi H, Hashimoto A, Funamizu N, Suzuki R, Ishizawa S, Akiyama N, Kobayashi T, Watanabe M. Application of Therapeutic Insonation to Malignant Glioma Cells and Facilitation by Echo-contrast Microbubbles of

Levovist. Anticancer Research 29: 235-242, 2009

2. 学会発表

馬目佳信 脳腫瘍治療における超音波分子生物学的技術 特別企画 [基礎技術研究会共催セッション] 日本超音波医学会関東甲信越地方第 21 回学術集会 2009 年 11 月 7 日 東京ファッションタウン (TFT) ビル 東京

稲葉宣晴、石澤将、木村真規、柴崎敏昭、馬目佳信 グリオーマ細胞の増殖に対する ROCK アイソフォームの関与 第 126 回成医会総会 2009 年 10 月 1 日-2 日 東京慈恵会医科大学 東京

Manome Y, Kobayashi T, Mizuno S. Three-dimension cell culture and comparison of morphology of four different glioma cell lines, 15th Congress of the European Cancer Organisation, 21, Sept, 2009. ICC Berlin, Berlin, Germany.

Inaba N, Ishizawa S, Kimura M, Watanabe M, Shibasaki T., Manome Y. Different roles of ROCK isoform in malignant glioma cells The 15th Annual Meeting 2009, Japan Society of Gene Therapy 10, July, 2009 Osaka University Convention Center

藤岡宏樹、星野昭芳、真鍋法義、花田三四郎、昼岡正樹、佐藤慶介、Richard D Tilley、平栗健二、山本健二、馬目佳信 蛍光ナノ粒子 QD を使った医療応用 Cell Biology Summer Meeting 2009 平成 21 年 7 月 12 日、つくば市 つくばグランドホテル

馬目佳信、小林寿光、幡場良明、渡辺美智子 三次元培養脳腫瘍細胞の形態学的変化 日本顕微鏡学会 第 65 回学術講演会 平成 21 年 5 月 29 日 仙台

3. その他の業績

なし

H:知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成21年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）分担研究報告書
進行性下顎頭吸収の診断基準策定とその治療に関する研究
(H21・難治・一般-097)

生物統計・臨床データ管理班：進行性下顎頭吸収の診断基準策定を

目的とした国際共同研究協力体制基盤整備

研究分担者：叶谷 文秀 国立国際医療センター研究所・国際臨床研究センター 特任研究員
研究分担者：星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・国際臨床研究センター 協力研究員
東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所・分子細胞生物 博士研究員
研究分担者：山本 健二 国立国際医療センター研究所・国際臨床研究センター センター長

A. 研究目的

難治性疾患研究では、発現機序を解明する基礎・臨床研究の連携と、新診断法・治療法開発の速やかな医療現場への応用が課題となる。本計画は進行性下顎頭吸収 (Progressive Condylar Resorption, 以下 PCR) 検討に当たり、Translational Research の概念を重視し、有限な患者数と研究資源・期間で効力のある国際共同研究協力体制基盤を立ち上げ、日本の国立病院がサイト参加型翻訳研究の国際拠点として整備可能かフェーズビリティ評価を試みる。

HIV がヘルパーT 細胞に侵入する際にコ・レセプター（共受容体）として使用する CCR5 は、ヒト血球細胞広汎に発現する分子であり、マクロファージ系細胞の機能にも関係している可能性が考えられる。山本らは、マクロファージ系細胞に起源を持つ破骨細胞の機能にもケモカイン CCR5 が関与しているという仮説に基づき、CCR5 欠損(CCR5KO)マウスを用いてケモカイン

受容体の破骨細胞ならびに骨芽細胞における機能を解析した。動物実験データでは、CCR5KO マウスは骨密度が薄く骨減少症的な骨構造、PCR 的な下顎部構造を呈していることが判明し、少なくともマウスにおいては CCR5 などケモカインが生理的骨代謝に機能を有することが示唆された。しかしマウスなど齧歯動物とヒトでは、ケモカイン受容体の遺伝子には対応関係が認められるものの、ケモカインリガンドの遺伝子構成に大きな違いがあることが知られている。

なお、白色人種には CCR5 レセプターのうち 32 アミノ酸が欠損している CCR5 Δ 32 多型が一定の割合で存在することが知られているが、成長は正常であり問題ないとされている。従ってこの情報をもとにヒト骨代謝における CCR5 の影響について検討することが PCR バイオマーカー診断法・患者テーラーメイド治療開発に翻訳可能と判断し、PCR 患者における骨代謝マーカーについて検討することを目的とする。

B. 研究方法

国立国際医療センター・戸山病院歯科口腔外科における通常の外来・入院診療において、PCR の診断、あるいは疑いのある患者の骨代謝指標の変化を継続的に観察する。これをプロトタイプにして以下の、協力体制基盤整備を行う。

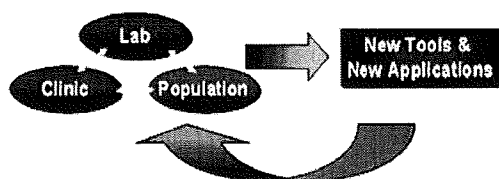


図1 難治性疾患研究における連携

難治性疾患研究では、疾患の発現機序を動物モデルやヒト in vitro モデルで解明する基礎研究、実際の患者の状態を研究する臨床研究の連携と、さらに新診断・治療開発の速やかな臨床現場への応用を検討するトランスレーショナルリサーチとの連携が課題となる。

1) Population 参加型研究

・どの海外機関に PCR 疑いのある Population が存在すると思われるか、当該機関での CCR5 リガンド検査能力等のフィージリティー調査を行う。

・本ネットワーク立ち上げの説明を行い、プロトコルを共有する。

2) 研究協力者国際ネットワーク立ち上げ

・国立国際医療センター・ICC チームによる CCR5 プレゼンテーションを申し出、PCR 診断開発必要性への賛同が確認された場合、国際コンソリウムへの参加を依頼、本人の意思にて所属機関の研究参加同意を得る。

・所属機関での骨密度評価のための依頼、

採血・採尿の調整を行う。

3) 段階別倫理委員会支援・研究参加調整

・当該国の臨床研究倫理基準に基づく倫理審査を行えるよう大使館、他コンサルタントを通じてプロトコル翻訳のコーディネートを行う。

・世界中からの第一線の共同研究者（結果参照）の日本招聘、検査項目については謝金の生じる人件費等の当該機関負担を共有することで、本計画による拠点としてのリーダーシップを発揮すると主に、各サイトの研究パートナーシップ基盤支援を行う。

<検査および評価>

●基本

1) 患者情報

- ・年齢、性別
- ・主訴（顎痛、咬合違和感など）
- ・初診時判定（顎関節症、顎変形症など）
- ・既往歴（自己免疫疾患既往歴）
- ・内服歴（抗生剤、抗凝固剤、抗血小板剤、NSAID、副腎皮質ステロイド剤の有無）

2) 項目

- ・感染症項目(HIV、HCV、HBV、性感染症)
- ・治療状態のマーカー

●特殊検査項目

骨粗鬆症検査、ならびに血中ケモカイン測定する。

(倫理面への配慮)

臨床研究における倫理指針に基づき臨床研究を計画し、国立国際医療センター倫理審査委員会の許可を得た。このプロトコルを翻訳し、参加国毎の倫理審査に携わっている。そのため倫理面への配慮は協力サイトの事情と法整備を踏まえて行われている。

C. 研究結果

国立国際医療センター・戸山病院患者では、PCR 患者 8 名(平成 22 年 3 月現在)の参加同意者を得て、現在、鋭意研究進行中である。8 名の検査解析から骨折リスク示唆のアウトライナー・データも検出され、今後モニターを続けることが非常に重要である。研究協力者国際ネットワークとしては、アメリカ合衆国 (Harvard 大学、マサチューセッツ総合病院、Stony Brook 歯科大学) に加え、CCR5 Δ 32 が一定の割合で存在し、かつ人類遺伝学上の人口構成が安定しているチェコ共和国を欧州における第一の連携対象国家として選択し、プラハ＝カレル大学第三医学部附属病院矯正歯科、および第一医学部附属口腔病学院にて、当該患者に対する CCR5 と CCR1 の共通リガンドである CCL5 を同病院の検査項目に加える同意を得た。



図 2 チェコ共和国における研究ネットワーク構築

研究協力者国際ネットワークとして、人類遺伝学上の人口構成が安定しているチェコ共和国をフィールドとした。チェコ大使館ならびにチェコ科学アカデミーの協力の元、プラハ＝カレル大学医学部との連携体制を構築した。写真は分担研究者(叶谷・写真右)とチェコ科学アカデミーのアントニー・ホリー博士(中央)(2010 年 3 月撮影)。ホリー博士は、現在共に最も有効とされている抗 HIV 薬 TDF、抗 HBV 薬 adefovir の開発者である。

2009 年度内には以下の国際コンソリウムを確立した。

• 研究拠点分担

1. マサチューセッツ・ジェネラル病院
院内内分泌研究所長 H. クローネンバーグ教授
2. マサチューセッツ工科大学生物学
元学部長 M. フォックス教授
3. メキシコ国立感染症研究所病理検
査部長 M. バレンシア教授
4. プラハ＝カレル大学第一医学部病
理学部解剖学科 S. スナジュド
ル教授
5. プラハ＝カレル大学第一医学部口
腔病学院 J. シェディー教授
6. プラハ＝カレル大学第三医学部矯
正歯科医長 W. ウルバノヴァ博
士

• 研究協力者・機関

1. NIH 分子内分泌部門グラントアド
バイザー R. マグノリス博士
2. Stony Brook 大学歯科大学院病院
3. 中国科学院微生物研究所
4. カンクン・ジェネラル病院病理部
5. 在日チェコ共和国大使館、チェコ
センター所長 P. ホリー一等書
記官
6. チェコ共和国有機化学・生化学研
究所長 A. ホリー教授
7. プラハ＝カレル大学第一医学部附
属病理博物館長 M. グリム教授
8. プラハ＝カレル大学第一医学部附
属病院エイズセンター医長 O.
ベラン博士
9. プラハ＝カレル大学第一医学部口

腔疫学部長 Z. ブロウカル教授

10. チェコ共和国医師会副会長 M. ハシェク博士

11. オーストラリア聖ビンセント医学研究所 T. マーチン教授

12. フォーサイス研究所サイトカイン歯学部 Y. ピン教授

13. ハーバード大学歯科大学院発達生物学 B. オルセン学部長

14. ハーバード大学歯科大学院副学長 R. バロン教授

D. 考察

2010年3月現在まで本研究に対する参加同意者は、国立国際医療センター戸山病院にて8名である。これはPCR診断率の低さを反映しており、わが国のみの臨床研究では参加者数が十分ではないことが容易に想定される。したがって、参加者数の増大と国際比較を目的として、国外における状況を把握する目的の国際共同研究の依頼をおこなっている。

2010年3月までに、アメリカ合衆国 (Harvard 大学、マサチューセッツ総合病院、Stony Brook 歯科大学)、中国科学院感染症研究所、メキシコ (国立感染症研究所病院病理検査部)、チェコ共和国 (カレル大学第一医学部) などで、すでに国際共同研究の同意を得ており、それぞれの国での倫理委員会支援等、国際医療センター戸山病院を拠点とした本新分野の研究基盤の立ち上げ、整備を粛々と推進した。今後も人類の多様な遺伝子型に対応できるよう、国際共同研究を依頼する施設数を増加するよう検討している。

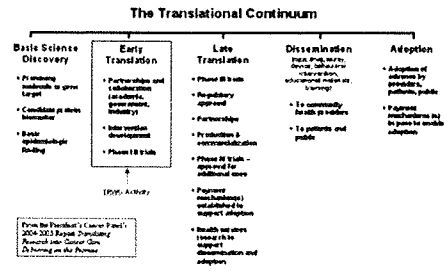


図3 国際翻訳研究コンソリウム基盤

短期間の難病治療開発では、共同研究コンソリウムのネットワーク力が、有限な患者数と研究資源による成果を向上するためのkey factorとなる。本計画は予算執行期間中、枠内に示した早期翻訳モデルを実行し、中期・長期翻訳継続への連携基盤を実現した。

E. 結論

9か月の予算執行期間により、フィージビリティ調査に成果を出した後、本計画のさらなる基盤整備を推進した。国内倫理委員会承認後のボランティア・リクルート、献体分析結果からは、本計画を今後モニターしていく重要性が示された。

国内で患者と健常者の血液マーカーに有意差を検出したことは、国際医療センター・戸山病院を国際拠点として実施した、本計画の中期・長期の国際計画推進の意義を示す。

異なった遺伝子型を持つ患者を海外でも確保したことで、統計上有意味なN数を確保するのみならず、人類遺伝学上非常に重要なCCR5Δ32についての考察も、本国際コンソリウムにより可能になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) Hoshino A, Kanaya F, Yamamoto K "Role of chemokine receptor CCR1 and CCR5 in maturation of osteoclasts and osteoblasts." *2009 Gordon Research Conference, Bone and Teeth*. July 15 2009, Biddeford, Maine, USA

(2) Kanaya F, Hoshino A, Maruoka Y "Bone metabolism regulated by CCR5 signaling and potential adverse effects by CCR5 blockers" *Charles University First Faculty Stomatology Department Seminar Series*. Mar 10 2010, Prague, Czech Republic

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

Ⅲ. 班會議資料一覽

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

進行性下顎頭吸収の診断基準策定とその治療に関する研究

2009(H21)年度 第1回 班会議 プログラム

日時：2009年7月25日 13:00~16:00

場所：国立国際医療センター国際医療協力局3階 第一会議室

13:00~13:10 開会にあたって

国立国際医療センター戸山病院 歯科口腔外科 科長
研究者代表 丸岡 豊

司会：山本 健二（国立国際医療センター研究所国際臨床研究センター長）

13:10~14:30 第一部 臨床研究班

1-1 進行性下顎頭吸収の診断基準策定とその治療に関する研究

・・・丸岡 豊^{1,2,3}, 今井英樹^{2,3,4}, 大塚 亮^{2,5,6}, 森山啓司⁵, 小村 健³

1 国立国際医療センター戸山病院 歯科口腔外科（主任：丸岡 豊 科長）

2 国立国際医療センター研究所 国際臨床研究センター（主任：山本健二 センター長）

3 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎口腔外科学分野（主任：小村 健 教授）

4 日立製作所水戸総合病院 歯科口腔外科（主任：今井英樹 主任医長）

5 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎顔面矯正学分野（主任：森山啓司 教授）

6 ファミリア歯科矯正（主任：大塚 亮 院長）

1-2 ケモカイン総論

・・・東京大学大学院 医学系研究科 分子予防医学分野：教授
松島 綱治

1-3 骨とケモカイン

・・・国立国際医療センター研究所：協力研究員
星野 昭芳

1-4 国際臨床例データ調査

・・・叶谷 文秀¹、モーリス・S・フォックス²、レイ・ウィリアム³

- 1 国立国際医療センター研究所：特任研究員
- 2 マサチューセッツ工科大学生物学大学院名誉教授
- 3 ハーバード大学歯学大学院名誉教授

14:30~14:40 休憩

14:40~15:50 第二部 班員の現在の研究内容と説明（一人 10 分程度）

1-5 生物統計・臨床データ管理、臨床データマネージメント

- ・・・東京大学大学院臨床疫学システム臨床疫学：特任教授
山崎 力

1-6 ケモカインレセプターと下顎骨の成長変異についての研究

- ・・・国立国際医療センター 研究所 国際臨床研究センター：
センター長
山本 健二

1-7 ケモカインレセプターの解析

- ・・・東京慈恵医科大学総合医科学研究センター共同研究施設：教授
馬目 佳信
- ・・・東京慈恵医科大学総合医科学研究センター共同研究施設：助教
藤岡 宏樹

1-8 FGFR2 の Apert 症候群型変異(S252W)が骨芽細胞分化に及ぼす影響について

- ・・・東京医科歯科大学大学院 顎顔面矯正学分野：教授
森山 啓司

1-9 生物統計・臨床データ管理、臨床データマネージメント

- ・・・国立国際医療センター研究所 医療情報解析研究部：部長
新保 卓郎

1-10 各種遺伝子改変マウス、フローサイトメトリー、免疫組織染色を用いて定常状態および炎症状態における白血球動態制御の分子機序の解析

- ・・・東京大学大学院医学系研究科 分子予防医学分野：助教
上羽 悟史

1-11 内科的合併疾患の検討

当科症例データベース 470 例に基づく治療薬最適化の検索
生物製剤使用者における、非結核性抗菌剤のリスク評価
PET/CT を用いた脊椎関節炎の鑑別診断法の評価
関節病巣における B 細胞因子の役割

- ・・・国立国際医療センター戸山病院 膠原病科（第一病棟部長）
三森 明夫

1-12 骨のイメージング生物学

- ・・・東京医科歯科大学大学院 口腔病理学分野：特任准教授
飯村 忠浩

15:50~ 閉会の辞

- ・・・研究者代表 丸岡 豊（国立国際医療センター）