

201024212A

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

(H22-難治-一般-157)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

丸 岡 豊

平成23（2011）年3月

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

(H22-難治-一般-157)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

丸 岡 豊

平成23（2011）年3月

目次

I. 総括研究報告書

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」

(H22-難治-一般-157)

研究代表者

丸岡 豊 (国立国際医療研究センター 歯科口腔外科 科長) 1

II. 分担研究報告書

1. 臨床研究班:

- 1) 全国の医療機関に対する疾患の実態把握調査
血液、および尿検体からのマーカー検索
丸岡 豊 (国立国際医療研究センター 歯科口腔外科 科長) 17
- 2) ケモカイン受容体異常に起因する骨軟骨代謝異常と進行性下顎頭吸収の発症機序に関する研究
小村 健 (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 教授) 41
- 3) 下顎頭吸収を伴う不正咬合に対する矯正歯科外来での対応
森山啓司 (東京医科歯科大学大学院 顎顔面矯正学分野 教授)
川元龍夫 (東京医科歯科大学大学院 顎顔面矯正学分野 講師)
茂木和久 (東京医科歯科大学大学院 顎顔面矯正学分野 専攻生) 45

2. 基礎班:

- 1) 骨組織におけるケモカイン受容体 CCR1 機能の解析
星野昭芳 (国立国際医療研究センター 研究所 協力研究員) 49
- 2) 炎症性骨代謝異常の機序解明
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)
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) 55
- 3) 脳組織マクロファージの Th1 刺激と遺伝子の発現
馬目佳信 (東京慈恵会医科大学 教授)
藤岡宏樹 (東京慈恵会医科大学 助教)
星野昭芳 (国立国際医療研究センター 研究所 協力研究員) 61

3.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

Biostatistics and Clinical Data Management Group Report:Building a Research Consortium for International Diagnostic Guidelines of Progressive Condylar Resorption

叶谷文秀 (国立国際医療研究センター研究所 協力研究員) 73

III.	班会議資料一覧	81
IV.	研究代表者・分担研究者に関する業績一覧	91
V.	研究成果の刊行に関する業績一覧	99
VI.	論文別刷	103

I. 総括研究報告書

平成 22 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)

研究代表者総括研究報告書

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
(H22-難治一般-157)

研究代表者：

丸岡 豊 国立国際医療研究センター病院・歯科口腔外科・科長
同 ・研究所・併任研究員

分担研究者：

臨床研究班：

小村 健 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・教授
森山 啓司 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・教授
三森 明夫 国立国際医療研究センター病院・副病院長
同 ・膠原病科・科長
桂川 陽三 同 ・整形外科・第二整形外科医長
今井 英樹 ひたちなか総合病院・歯科口腔外科・主任医長
国立国際医療研究センター・研究所・研究補助員
大塚 亮 ファミリア歯科矯正・院長
国立国際医療研究センター・研究所・研究補助員

基礎研究班：

山本 健二 国立国際医療研究センター・研究所・副所長
松島 綱治 東京大学大学院・医学系研究科・分子予防医学分野・教授
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
飯村 忠浩 東京医科歯科大学大学院・口腔病理学分野・特任准教授
上羽 悟史 東京大学大学院・医学系研究科・分子予防医学分野・助教
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 国立国際医療研究センター研究所・国際臨床研究センター・協力研究員
東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・ME研究室・博士研究員

生物統計・臨床データ管理班：

新保 卓郎 国立国際医療研究センター・研究所・国際臨床研究センター・
医療情報解析研究部・部長
山崎 力 東京大学大学院・臨床疫学システム・臨床疫学・特任教授
叶谷 文秀 国立国際医療研究センター・研究所・山本センター長室・特任研究員

研究概要

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、結果として咬合異常を呈する病態であるが、その発症原因は全く不明である。そのため臨床的に様々な問題を抱えつつ、長く「忘れ去られてきた概念」であった。歯科口腔外科診療機関に行ったPCRの実態アンケート調査において、意外にもPCRという用語そのものの認知度が低く、さらにその診断基準さえ統一されていないという現状に直面している。

一方、本研究の契機となったケモカイン受容体CCR5遺伝子欠損(KO)マウス、ならびにCCR5とケモカインリガンドを共有するCCR1のKOマウスの骨代謝における影響をヒトにおいて再検討することも重要な課題である。CCR5はHIVの共受容体として機能しているが、将来CCR5拮抗薬がHIVの治療に実用化された際に、AIDS患者の骨折リスク増大などQOLに影響を与える可能性がある。我々は今年度の本研究にてPCR発症患者からの尿中・血中における骨代謝関連項目、並びにケモカインを測定し比較検討した。その結果、PCR患者においては血中RANTES濃度の上昇が病態を認識するバイオマーカーとして有力であるとの知見を得、これはマウスのin vivoの結果と一致した。

昨年度と同様、本研究班をさらに臨床研究班、基礎研究班、生物統計・臨床データ管理班の3班に分け、効率的な研究を進めることとした。

臨床研究班の主な役割は、PCR (もしくは臨床的にPCRが疑われる) 患者の登録と血液・尿などの検体および資料採取、ならびに血液・生化学的・尿による臨床検査である。年齢・性別・顔貌所見・口腔内所見・顎関節の所見(開口閉口時の切歯路、関節雑音の有無、疼痛の有無など)・オルソパントモX線写真などを評価することである。また現在治療中の病気や使用薬、既往歴などを聴取(必要に応じて口腔内の印象採得、MRI撮像、CT撮影などを行う)全身の関節異常も検索する。今年度は新たに9症例の詳細な症状の記載を行った。

また、国内外の医療機関と協力して研究を進める。今後、研究参加機関の増加が見込まれ、多施設にて検体採取を行うこととなるため、各研究機関を調整するコーディネーターをおく。さらに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ため、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ィージビリティ評価を試みた。そしてさらに一步踏み込んだ症例検討・検体提供に関する連携の構築を図った。

基礎研究班は、本疾患のモデル動物として期待されるCCR1、およびCCR5KOマウスに対しての詳細な解析を行った。PCRとは炎症性疾患なのか、非炎症性疾患なのか議論の余地があり、そこに焦点を合わせた研究を行った。

まず、ケモカイン受容体欠損が骨芽細胞の分化・成熟に対しても機能しているかどうか

かについて検討した。その結果、骨芽細胞上に発現する CCR1 が骨芽細胞の分化成熟にも機能していること、またケモカインが RANK-RANKL 系を介して破骨細胞先駆細胞の分化スイッチとして機能していることを発見した。これにより、ケモカインならびにケモカイン受容体系が破骨細胞のみならず骨芽細胞の機能調整にも機能し、骨・軟骨代謝に積極的に関与することが明らかとなった。結論として、ケモカインが骨代謝など生理的代謝活動においても機能を有することが示され、非炎症性の関節疾患と考えられる PCR 発症にも深く関与している可能性が高いという知見が得られた。

一方、関節リウマチのように炎症性の骨代謝異常が原因で関節破壊が生じる事例も報告されていることから、我々は最近、臨床的に骨粗鬆症と相関が報告されている移植片対宿主病 (GVHD) のマウスモデルでは、CD4 T 細胞依存的に骨形成を司る骨芽細胞が重度に障害されることを見出した。そして X 線照射による骨芽細胞障害の影響を排除する目的で X 線非照射 GVHD モデルを作成し、CD4 T 細胞依存的な骨芽細胞障害の発症過程を詳細に解析した。その結果、CD4 T 細胞が骨系前駆細胞から未成熟骨芽細胞への分化を阻害することで、骨芽細胞障害を誘導することを示唆するデータを得、また骨髄キメラマウスを用いた実験により、TCR・MHC II を介した CD4 T 細胞による骨芽細胞の認識は、骨芽細胞障害に関与しないことも明らかになった。この知見は炎症性骨形成不全の新規診断マーカーおよび治療標的の確立に役立つと思われる。

また顎顔面骨に影響を与え得るクリティカルな臓器である中枢神経系がどのような影響を及ぼすかという観点から、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の同定、そして本細胞内で発現する遺伝子の網羅的解析を試みた。そして本症とその病態の進行には、骨および軟骨代謝の異常が関連していることがこれまでも想定されていることより、マクロファージの遊走能を規定する免疫系分子である CC 型ケモカイン受容体のうち CCR1 受容体欠損マウスの再検討を行った。

生物統計・臨床データ管理班は、臨床研究班、および基礎研究班の収集したデータ・検査値を総合し、統計学的な解析を行った。合わせて既に始まっている遺伝子解析研究に関する検討を行った。

本研究の実施に際してはヘルシンキ宣言および厚生労働省の臨床研究・疫学研究に関する倫理指針等の趣旨を尊重し、遵守する。

A:研究目的

進行性下顎頭吸収(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、結果として咬合異常を呈する病態であるが、現在までその発症

原因は全く明らかではないため臨床的に様々な問題を抱えている。

我々が全国の歯科口腔外科診療機関に行ったPCRの実態把握アンケート調査においても、重要な疾患であるにもかかわらず、PCRそのものの認知度が低く、さらにその

診断基準が明確に規定されていないという現状が浮き彫りとなった。

一方、本研究の契機となったケモカイン受容体CCR5遺伝子欠損(KO)マウス、ならびにCCR5とケモカインリガンドを共有するCCR1のKOマウスにおける骨代謝異常とそれに付随するPCRに酷似した下顎頭吸収病変の再検討も重要な課題である。我々はケモカインが骨代謝において重要な機能を果たすことを初めて明らかにした。これは、HIVの共受容体として機能しているCCR5を将来的にHIV治療の標的とした予防的薬剤が実用化された際には、AIDS患者に骨代謝異常やそれに伴う骨折リスクなどのQOLに深刻な影響を与える可能性がある。

PCR発症患者からの試料の採取分析は現時点では非常な困難を伴う。そのため、患者の尿中・血中における骨代謝関連項目(骨吸収・骨形成マーカー)並びにケモカインを測定し比較検討することで、PCR患者における病態とケモカインの関与の有無を把握することを目標とし、その判定技術の確立は、非常に有用である。

しかし、生体内では多くの物質の相互作用が営まれているためタンパクレベルの調査には限界があり、長期的目標としては遺伝子を用いた研究が必要となる。倫理委員会の承認を得て、遺伝子解析研究のための資料収集も現在行っている。

今年度は、患者数の把握と診断基準の策定を最大の目的とし、わが国では初となる本症のアンケート調査を行い、患者数の把握、本症患者への対処法などの実態調査を行った。そして本症において、治療の中核をなす口腔外科、矯正歯科両専門医より詳細な症例に関する記載を加えた。

本来なら難治性疾患研究において代替手段となりうる動物実験に関しても、当該疾患と類似の兆候を示すような適当な病態モデル動物が存在しないため、咬合異常を生じる病態の分子生物学的理解はなされていない。今年度も基礎研究面より2種のケモカイン受容体CCR1、CCR5のKOマウスを骨・軟骨組織の機能・形態学的解析、骨組織の免疫学的解析、および中枢神経系における解析という3つの異なる側面より詳細に検討した。

我々は昨年度の本研究班の基礎研究により、マクロファージの遊走能を規定する免疫系分子であるCC型ケモカイン受容体のひとつであるCCR1が、マクロファージのみならず同じミエロイド系に起源を持つ破骨細胞の機能にも関与していることを見出し、CCR1遺伝子を欠損したCCR1KOマウスの解析により、当該マウスが野生型マウスより低い骨密度を呈すること、および開口傾向をもつことを明らかにした。しかしながらこのマウスの表現系は、ここで観察された破骨細胞の機能抑制だけでは説明できない。そこで本年度、我々はCCR1KOマウスが骨芽細胞の分化成熟にも関与している可能性を検討し、ケモカイン受容体の骨芽細胞における機能を解析した。

一方で、近年炎症に伴う骨代謝異常、特に骨吸収を司る破骨細胞の増加、活性化による骨病変の分子機序が明らかにされ、これを標的とした分子標的薬が臨床応用されつつある。我々はこれまでに同種造血幹細胞移植(allogenic hematopoietic stem cell transplantation: allo-HSCT)の合併症である移植片対宿主病(Graft-versus-Host disease: GVHD)を発症した患者で問題となる骨粗鬆症の発症機序について、マウス

GVHD モデルを用いた解析を行い、活性化ドナーCD4 T 細胞による骨芽細胞障害を見出した。関節リウマチ等にみられる炎症性の関節変形という観点から、CD4 T 細胞依存的な骨形成不全の発症機序解明の基礎を築くことを目的として、X 線非照射 GVHD モデルにおける骨芽細胞障害の発症過程を詳細に解析した。

破骨細胞に限らず組織マクロファージは全身に存在し、ケモカイン-ケモカインレセプターによる信号伝達を介してその組織に特有な機能を発揮している。我々は進行性下顎頭吸収のような頭蓋や顔面の形成に影響する病態が、頭蓋骨内の脳にどのような作用を及ぼすのかについて中枢神経系に存在する組織マクロファージであるミクログリアを対象に解析を行った。CCR5 は Th1 リンパ球に特徴的なケモカインであるため、免疫系、特に T リンパ球細胞を Th1 ヘシフトさせる代表的な刺激である結核菌を用い、この細菌の感染によるミクログリアへの影響を調査することとした。

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ため、本計画の検討に当たり、**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ィージビリティ評価を試みた。

B:研究方法

1. PCR 実態調査：

全国の大学、病院を中心とした歯科口腔外科診療施設約 500 施設にアンケート依頼用紙を送付し、回答を得る方式とした。

2. 血液、および尿検体からのマーカー検索：

国立国際医療研究センターにおいて、当科に来院し PCR と診断された患者からインフォームドコンセントを得たのち、血液および尿の検体を採取した。PCR 患者の尿中の骨粗鬆症のバイオマーカー分子と、血中の典型的骨代謝マーカー、同じく血中のケモカイン基質数種の濃度についても測定した。

また当センター倫理委員会（遺伝子）の承認を得、遺伝子の機能変化が予測される遺伝子多型（欠損、フレームシフト等）を想定した配列解析を計画し、遺伝子解析研究を開始した。

3. CCR1, CCR5KO マウスの顎関節の微細構造解析：

検体数を増やすことを目的とした。ホルマリンにて固定後、顎関節周囲を切り出し、光学顕微鏡的に観察した。

4. チェコ・カレル大学所蔵近世チェコ人の頭蓋骨分析：

チェコ共和国プラハ市のカレル大学医学部には多数所蔵されている 16 世紀以降の頭蓋骨標本の形態学的分析を行った。なおスペースと時間の関係で、写真を撮影し、後日その画像を分析するという方法で行った。

5. PCR 患者の詳細な経過分析：

歯科口腔外科、および矯正歯科を受診し、PCRが疑われた9例の症例の詳細な調査を行った。

6. 骨形態解析：

CCR1欠損マウスならびに対照群となる野生型マウスの骨密度ならびに骨微細構造の変化について、bone morphometric analysisにより定量的に評価した。また、カルセイン投与によりマウス骨組織の成長割合を定量的に算出した。マウス血清においてコラーゲンテロペプチドNTxなどの骨粗鬆症マーカーを測定し、マウス個体における骨代謝回転について比較検討した。同時に、骨組織から直接RNA抽出を行い、リアルタイムPCR法にて骨気質タンパク質の骨組織における発現量を定量的に解析した。

7. 培養骨芽細胞解析：

CCR1KOマウスならびに対照群となる野生型マウスより骨髄由来mesenchymal stromal細胞を採取、骨芽細胞分化因子の添加条件で培養し、骨芽細胞へ分化させた。骨芽細胞分化に応じて賛成される骨特異的アルカリフォスファターゼ産生を指標に分化度を判定し、分化過程における骨芽細胞特異的マーカーならびに転写因子群の発現の時間的変化をリアルタイムPCR法にて定量解析した。また骨ミネラル沈着をVon Kossaアッセイにて測定した。破骨細胞機能におけるケモカインの機能について、CCR1KO骨芽細胞と野生型破骨細胞先駆細胞との混合培養実験により解析した。

8. 破骨細胞分化解析：

CCR1欠損マウスならびに対照群となる野生型マウス骨髄よりミエロイド系細胞を分離回収し、破骨細胞分化に必要な増殖因子M-CSFならびにRANKL存在下で破骨細胞先駆細胞を誘導した。フローサイトメトリーによりCD11b, CD115, およびRANKなど細胞表面マーカーを指標にミエロイド細胞から破骨先駆細胞の分化について定量的・定性的に検討した。また分化成熟過程における破骨細胞関連分子の発現変化をリアルタイムPCR法にて定量解析した。

9. X線非照射GVHDモデルの作成とCD4 T細胞依存的な骨芽細胞障害の発症過程の解析：

まずMHC完全不適合X線非照射GVHDモデルを作成した。致死量X線照射を施したB6またはbm12にB6由来T細胞除去骨髄細胞(TCD BM)を 5×10^6 個/マウス移植した。移植2か月後、同骨髄キメラマウスに再度X線照射を施した後、bm12マウス由来TCD BMのみ、またはTCD BM+T細胞を移植し、GVHDを誘導した、骨髄キメラマウス：(bm12→[B6→bm12]モデル)を作成した。レシピエントのリンパ節、末梢血、骨髄より細胞懸濁液を調整し、蛍光標識した抗マウスCD4, CD8, CD44, CD62L, CD45.1, CD45.2抗体で染色した後、ドナーT細胞の増殖および骨髄浸潤をLSR IIフローサイトメーターを用いて解析した。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い、病理学的に解析した。

さらに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*, *Osterix*, *Osteocalcin*) 発現を RT-PCR により解析した。

10. マウス中枢神経系細胞より単離したミクログリアに結核菌を感染させた後に発現する mRNA の網羅的解析：

13 週 C57BL 野生型および CCR5 ノックアウトマウスの脳からミクログリア細胞を濃縮した。これらの細胞に *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) (1.7×10^8 CFU/ml (原液)) を MOI=10 で感染させ、24 時間培養、ミクログリア内に結核菌が感染していることを位相差顕微鏡で確認した後、細胞から RNA を抽出、相補鎖 DNA を合成、増幅し、得られた配列の塩基配列を決定した。またそれぞれ非感染群を対照にどのような RNA が発現されているのかについて確認、また同時に得られた RNA からそれぞれのケモカイン・ケモカイン受容体の転写量についても半定量 PCR 法で測定を行った。

11. 研究協力者国際ネットワーク立ち上げ：

国立国際医療研究センター・国際臨床研究センターのチームによる CCR5 プレゼンテーションを申し出、PCR 診断法の開発の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た。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を行う。

C:研究結果

1. PCR 実態調査：

(グラフ等は分担研究報告書を参照)

実態把握は、全国の歯科口腔外科診療施設 546 施設にアンケートを行い、最終的に 93 施設から回答を得、回収率は 17%であった。

男性 9 例、女性 91 例、そして資料が古く詳細が確認できない症例、担当医の転出等の理由で詳細が不明な症例、記録照合中の症例なども含め、性別不明の 64 例を加え、合計 164 症例が登録された。患者年齢分布は 20 代が最も多く、次いで 10 代、30 代となり、40 代では少ないが 50 代以上は再び増加する二相性の分布を示した。50 代以降では 21 症例中 12 例が関節リウマチ等の自己免疫疾患に罹患しており、ステロイドを服用していた。

咬合の違和感・不調和を主訴に受診した患者は 70 例 (63%) と最も多く、ついで顎関節の疼痛が 23 例 (21%)、開咬、その他 (審美障害や顎関節の違和感)、あるいは不明の患者が 6 例 (5%) であった。罹患側は、両側が 78 例 (48%) と最も多く、次いで左側が 13 例 (8%)、右側 7 例 (4%) であり、前述のごとく資料が古すぎたりして記録に残っていないという不明例が 67 例 (41%) であった。

初診時診断は顎関節症としたものが 51 例 (44%)、ついで顎変形症 39 例 (33%)、不正咬合 12 例 (10%)、PCR14 例 (11%)、感染症やびまん性硬化性骨髄炎などの「その他の診断」が 8 例 (7%) であった。患者がもつ他の疾患については、基礎疾患なしが 99 例 (74%)、自己免疫疾患が 16 例 (12%)、その他の疾患が 19 例 (14%) であった。治

療法は、顎関節症に準ずる治療 29 例 (26%)、顎矯正手術を行ったものが 26 例 (24%)、歯科矯正のみが 24 例 (22%)、その他の治療が 14 例 (13%)、特に治療を行わなかったものが 17 例 (15%) であった。

2. マーカー検索：

診断基準に関しては、少数患者からの血液検体を解析した結果、骨粗鬆症を示唆する NTX や DPD が高値の傾向を示し、またケモカインの一種である RANTES が基準値から大幅に変動していた。

本年度は検体数が少なく、遺伝子検体の収集は行ったものの、解析は費用対効果を考慮して行わなかった。

3. 顎関節の微細構造解析：

モデルマウスにおける骨組織・関節の微細構造の解析をさらに進めることを試みたが、マウスの顎関節は小さい上、適切な標本作製を行うことが非常に困難であり、新しいデータを出すことは難しい状況であった。

4. チェコ・カレル大学所蔵近世チェコ人の頭蓋骨分析：

頭長幅指数では測定できた 51 検体のうち、超短頭型が 9 検体、過短頭型が 22 検体、短頭型が 13 検体、中頭型が 5 検体、長頭型が 1 検体、過長頭型はなく、超長頭型は 1 検体であった。

Condylar inclination は、下顎頭矢状後方傾斜角と意識されるが、平均値は 26.9°であり、標準偏差は 16.6°であった。

また、下顎角は平均値が 117.4°、標準偏差は 7.5°であった。

FMA は 15.4°で、標準偏差は 9.2°であった。

5. PCR 患者の詳細な経過分析：

顎関節の疼痛等の症状を併発した症例 2 症例、下顎頭吸収の進行が疑われたが経過観察した 3 症例、5 年の経過観察後に外科的矯正治療を行った 1 症例と下顎頭吸収の進行はないと判断し、顎矯正治療を行った 2 症例、歯科矯正治療を行った 1 症例などの合計 9 症例の詳細な記載を行った。

6. 骨形態解析：

CCR1 欠損マウスでは対照群となる野生型マウスに比して頭蓋骨など骨格形状がやや変化しており、CCR1 欠損マウスでは対照群となる野生型マウスに比して、海綿骨領域における骨密度が低く、骨梁構造が未発達であった。また骨組織の成長速度が極めて遅いことから、CCR1KO マウスが典型的な骨組織の低形成であることが判明した。この骨密度低下は、野生型マウスにケモカインリガンドの中和抗体を投与した実験系でも確認された (図 1)。このことから、ケモカインの欠損は海綿骨密度を低下させることが明らかとなった。

7. 培養骨芽細胞解析：

培養骨芽細胞においては、CCR1KO マウス由来骨芽細胞では、骨分化に必要な転写因子の発現レベルが極めて低く、細胞の成熟末期に産生されるオステオカルシンが産生されない状態であった。このことより CCR1 が骨芽細胞の成熟段階の調整に関与している可能性が示唆された。また、CCR1KO マウス由来骨芽細胞と正常破骨先駆細胞とを混合培養しても、正常破骨先駆細胞の多核融合を誘導できないことが判明した。この破骨細

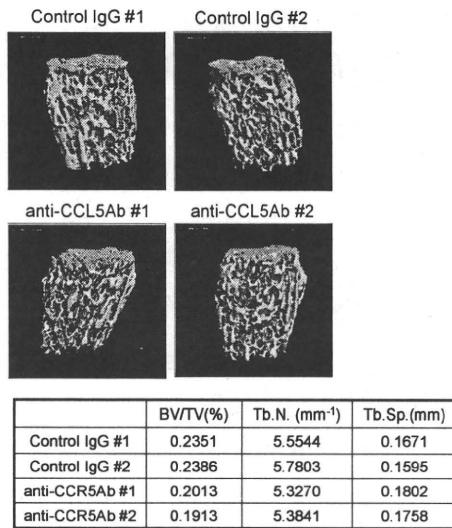


図1 ケモカイン中和抗体投与マウスにおける骨密度の変化 C57BL/6 マウスにケモカイン CCL5 の中和抗体を 500 μ g/mouse 濃度で投与し、2週間後の海綿骨密度を micro CT にて解析した。

胞の成熟不全の主因は、RANK-RANKL 系のうち、骨芽細胞におけるリガンド RANKL の発現レベルがきわめて低くなっているためであることが判明した。

8. 破骨細胞分化解析：

培養破骨細胞においても、CCR1KO マウス由来細胞では RANK-RANKL 系のうち受容体 RANKL の発現が低下しており、ミエロイド先駆細胞から、CD115⁺、CD11b^{dull}、CD265^{lo} の表現形をもつ単核破骨先駆細胞への分化が抑制されていることが判明した(図2)。したがって CCR1KO マウスでは、必須の骨形成因子である RANK-RANKL 系の発現が抑制されることで破骨細胞ならびに骨芽細胞機能がともに低下し、典型的な骨代謝回転の低形成、つまり「造れない、壊せない」という状況に陥っていることが明らかとなった。

9. X線非照射 GVHD モデルの作成と CD4 T 細胞依存的な骨芽細胞障害の発症過程の解析：

(図に関しては分担研究報告書を参照)

X線非照射 GVHD モデルにおいて、ドナー T 細胞の骨髄浸潤と骨芽細胞障害を経時

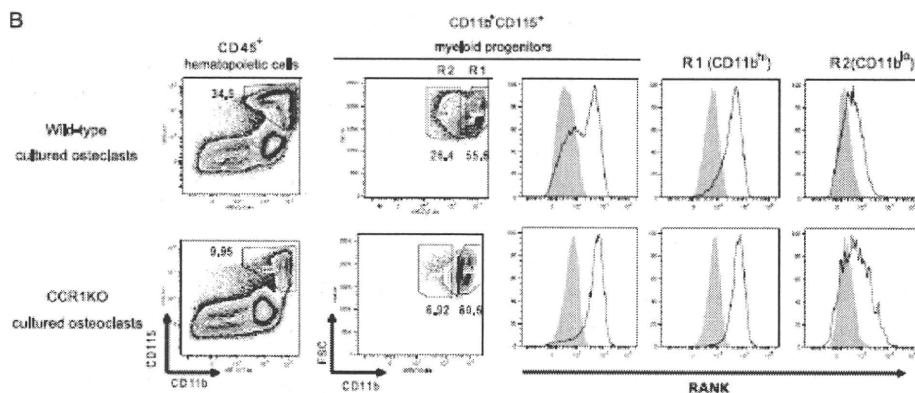


図2 CCR1KO マウス破骨先駆細胞の表面マーカー解析 CCR1KO ならびに野生型マウス骨髄よりミエロイド系先駆細胞を回収し、増殖因子 M-CSF ならびに破骨細胞分化誘導因子 RANKL 添加条件下で培養した。培養 4 日後に CD45⁺、CD115⁺、CD11b⁺ ミエロイド先駆細胞における発現をフローサイトメトリーにて検討した。CCR1KO 細胞では、CD115⁺、CD11b^{dull}、CD265^{lo} の表現形をもつ単核破骨先駆細胞が減少している。

的に解析した。フローサイトメトリーにより、リンパ節では移植後 2 日目から CD45.1⁺ ドナー CD4 および CD8 T 細胞の増加を認め、10 日目をピークとして減少した。骨髄では 7 日目から 10 日目にかけてドナー T 細胞が増加し、14 日目をピークとして減少した。骨髄の組織学的解析により、移植後 10 日目に ALP 陽性骨芽細胞の減少を認めたが、14 日目を以降では回復していた。

Real-time RT-PCR により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、未成熟以降に発現する *Osterix*, 成熟骨芽細胞に発現する *Osteocalcin* の発現は減少していたが、前駆細胞以降に発現する *Runx2* の発現は亢進していた。これらの結果から、T 細胞依存的な骨芽細胞障害は、骨芽細胞前駆細胞から未成熟骨芽細胞への分化を抑制することが示唆された。

bm12 → [B6 → bm12] モデルを作成し、ドナー T 細胞にとって骨芽細胞などの組織細胞が syngenic になる移植条件下で骨芽細胞障害が発症するかを検討した。本モデルでは、ドナー T 細胞はレシピエントの BDF1 由来血球系細胞を認識し、エフェクター T 細胞へと増殖、分化する。フローサイトメトリーにより脾臓および骨髄における細胞数を解析したところ、X 線照射 B6 → BDF1 モデルと同様に GVHD 誘導群において脾臓、骨髄におけるドナー T 細胞の増加を認めた。また、同時に骨髄 GVHD の指標となる B 細胞の回復を解析したところ、GVHD 誘導群では B 細胞の回復が完全に抑制されていた。

また、骨芽細胞障害について検討したところ、RT-PCR により骨芽細胞マーカー遺伝子の発現低下を認めた。これらの結果から、骨

髄 GVHD による骨芽細胞障害には、ドナー T 細胞による直接の骨芽細胞認識は不要であることが示唆された。

10. マウス中枢神経系細胞より単離したミクログリアに結核菌を感染させた後に発現する mRNA の網羅的解析：

野生型マウスのミクログリアが転写している RNA を cDNA の形で配列を決定、シーケンズが明らかとなった遺伝子の相同解析を行った。

結核菌感染によって転写が認められた遺伝子や一方、CCR5 ノックアウトマウスで発現している野生型マウスで発現があまり認められなかったもの、CCR5 ノックアウトマウスのミクログリアに結核菌が感染して発現が亢進した遺伝子などが明らかになった。

11. 研究協力者国際ネットワーク立ち上げ：
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、CCR5Δ32 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。

D: 考察

PCR 実態調査について：

実態把握は、全国の歯科口腔外科診療施設にアンケートを実施した。しかし有効回収率は17%にすぎず、20%にも満たなかった。アンケートの項目や回答方法等を可能な限り簡便化したにもかかわらず、このように低い回収率になったのは、いくつかの原因が考えられる。

これは、下顎頭に変形をきたす疾患として様々な名称や定義が混在していることである。また患者自身が無自覚のことも多く、歯科医の中でも診断基準がまちまちであり、認識度が決して高くないことが原因であろう。

しかし本アンケートにおいて得られたことは多くの示唆を含む。患者年齢分布は二相性の分布を示した。若年例は合併疾患もなく特発的であるのに対し、50代以降は自己免疫疾患などの併発例が多くステロイド等薬剤の長期服用例も目立つ。

この結果に関してはなぜ40代から50代の患者が少ないのか考える必要がある。前述のごとく、この年代は仕事や家庭等様々なことで多忙な年代であり、よほど困らないと医療機関を受診しない年代であるとも考えられる。この「二相性の分布」が本当になのかは現状では確かめるべくもないが、諸外国等のデータが蓄積され、発表されるのを待とうと思う。

医療機関受診時の主訴で最も多かったのは、咬合の違和感・不調和であり、70例(63%)を占めた。ついで顎関節の疼痛が23例(21%)と続いた。顎関節に変形がみられ、疼痛を伴うものは日本顎関節症学会の分類では顎関節症IV型に分類されることになる。このような診断の複雑さがこの疾患の難しさを端的に表している。この事実はアン

ケートにおいて無回答、もしくは症例なしとの結果を寄せた医療施設にもPCR患者が存在していた可能性を示唆している。

また前歯が出ている、という審美的要求に基づく受診もあった。

罹患側は両側が78例(48%)であり、この結果から、PCRは両側性に発生すると考えてよく、局所的な要因ではなく、やはり全身的な因子からの影響を受けていることが示唆された。

本症に関する治療では、最も多かったのは顎関節症の治療に準ずる治療29例(26%)であった。すなわち機能訓練やスプリント治療などがおもに行われたと思われる。スプリント使用などによる咬合の安定はPCRの治療、もしくは進行停止に一定の効果があると言われており、ほぼこの原則に沿った治療と言える。

顎関節症などとの区別が明確に付けられないことが多く、この疾患概念の曖昧さ、さらにわが国独特といわれる顎関節症の概念、つまり具体的には変形性顎関節症の診断にも議論を投げかけ得る。また多くの医療機関で、咬合の違和感等のため顎関節症や顎変形症と診断されるも、本症に対し系統的な診断や治療が示されていないため、各医療機関がとり得る「最善の治療」がなされているということがわかった。

しかし、アンケートに回答していない医療機関の中には、単なる顎関節症や顎変形症、不正咬合などと診断し、結果として不適切な治療がなされている国民がいることは想像に難くない。

今後、まずはPCRという病態があることを広く認知されるよう周知を図る必要があると思われた。

血液・尿検体を用いたマーカー検索

今年度には検体数が極めて少なく、新たなデータは少ない。

診断基準に関しては、少数患者からの血液検体を解析した結果、骨粗鬆症を示唆する値を示し、またケモカインの一種である RANTES が基準値から大幅に変動する等、本病態を特徴づける検査値を見出し、PCR の病態を判定する有力なバイオマーカーとなり得る。若年例では骨形成・骨吸収の両指標とも高値を呈する高回転型を示すが、50 代以降の患者は双方ともに低い、いわゆる低回転型を呈す。これら疫学調査において得られた二相性の分布を骨形成・骨吸収マーカーの解析によりほぼ再現し得た。このきわめて客観的な所見は PCR のプロファイリングを行う上で重要な成果といえる。また、ケモカイン遺伝子 KO マウスにおいて確認されていた顎関節異常と、ヒト PCR との病態を関連付けることができる可能性があるデータが得られたことの意義は非常に大きい。

顎関節の微細構造解析：

モデルマウスにおける骨組織・関節の微細構造の解析をさらに進めることを試みたが、マウスの顎関節は小さい上、適切な標本作製を行うことが非常に困難であることがわかった。

チェコ・カレル大学所蔵近世チェコ人の頭蓋骨分析：

カレル大学医学部所蔵の頭蓋骨標本の 64 検体の写真からの分析を行った。

頭長幅指数分析等の結果より白人であれば長頭型であるので、上顎前突が多く、その中には前歯部開咬で、PCR を疑わせる検体があるかもしれないという単純なものではなかった。

PCR 患者の詳細な経過分析：

過去の報告と同様、下顎頭の吸収、変形を認める症例では、開咬を伴う下顎後退症が多かった。これらの顎態に対する治療計画の立案には、下顎頭の再吸収のリスクも考慮し、顎関節に対して負担の少ない術式を選択する必要がある。

近年では新しいアプローチもなされており、歯科矯正用インプラントアンカーを用いることで、積極的に臼歯部を圧下し、下顎の反時計方向の回転による下顎の後退感、開咬の改善を図る治療も行われ、良好な結果を得ている。長期的な予後をみる必要があるが、現時点では有効なオプションの一つと思われる。

骨組織におけるケモカイン受容体 CCR1 機能の解析：

免疫系細胞の遊走を制御するケモカインが、マウスの生理的な骨代謝回転において、破骨細胞機能の調整のみならず骨芽細胞の分化成熟に対しても機能していることを、*in vitro* ならびに *in vivo* において証明することができた。ケモカイン受容体 CCR1 が骨代謝において重要な破骨細胞ならびに骨芽細胞の両細胞の分化に重要な機能を有することを明らかにした。すなわちケモカインは破骨細胞ならびに骨芽細胞において生理的

な骨代謝回転を維持する調節因子、すなわち骨代謝においてその存在が予見されていた「骨カップリング因子」のひとつとして機能していることを解明したことは、骨代謝回転を理解する上で重要な発見である。

今後、咬合異常を生じる病態の分子生物学的な理解を進める上で、これらマウスを上述の疾患のモデル動物として提唱することが可能であるという学術的意義は非常に大きい。

X線非照射 GVHD モデルの作成と CD4 T 細胞依存的な骨芽細胞障害の発症過程の解析：

これまでに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にしてきた。この骨芽細胞障害には X 線照射と CD4 T 細胞による骨芽細胞の分化抑制という、2 つの機序が関与する。本研究では、X 線非照射 GVHD モデルにおける骨芽細胞障害を解析する事により、CD4 T 細胞による骨芽細胞障害が、Runx2 陽性骨芽細胞前駆細胞から Osterix 陽性未成熟骨芽細胞への分化抑制であることを明らかにした。骨系前駆細胞から未成熟骨芽細胞への分化に関わる分子機序として、BMP ファミリーおよび Wnt ファミリーの関与が考えられる。今後、各ファミリーおよびそれらの受容体の発現と意義を詳細に検討することにより、CD4 T 細胞依存的な炎症性骨形成不全の分子機序が明らかになり、診断マーカーおよび治療標的の同定に繋がる事が期待できる。

また、骨髄キメラマウスを用いた実験により、CD4 T 細胞による骨芽細胞障害には、骨髄間質系細胞に発現する MHC II は必要でない、すなわちエフェクター期には抗原特異性が無いことが示唆された。これらの結果は、感染症や自己免疫疾患などでエフェクター・メモリー CD4 T 細胞が誘導され、骨髄に集積した場合に、同様の骨芽細胞障害が発症する可能性を示唆するものである。今後、PCR とエフェクター・メモリー CD4 T 細胞の形成に関わる感染症、自己免疫疾患との関連を解析する必要がある。

これらの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。

マウス中枢神経系細胞より単離したミクログリアに結核菌を感染させた後に発現する mRNA の網羅的解析：

実験では CCR5 の発現を抑制するため、siRNA をミクログリアに導入して遺伝子変調を行う方法についても当初検討をしたが、イン・ビトロでもマーカーの siRNA の導入効率が著しく低いことが判明したため解析には CCR5 ノックアウトマウスを用いることとした。今回の結果では相同性の高い検索でかかった cDNA のみを表示した。すなわちマイクロ RNA 等については検索の対象に含めていない。何回か同じシーケンスが認められるがこれは転写されているメッセンジャー RNA の数が多いため、基本的には転写因子やリボゾーム RNA、チトクロームなど代謝に影響

する重要な遺伝子の発現が多かった。ミクログリアは比較的特徴のない細胞で、活性化されていない状態では、あまり遺伝子を発現していない。主立っているのは中枢神経系で発現している基本的な遺伝子程度であった。この細胞ではまだ機能が不明な遺伝子もいくつか発現していることもわかり、脳内での免疫反応との関係に興味を持たれた。上記リストには載せられていないが配列の中にはミエリンなど希突起膠細胞のみで発現されているものが含まれていた。これは均一だと思われた細胞集団にわずかに混在していた希突起膠細胞由来のものと思われる。このポピュレーションの混入はフローサイトメトリーによる結果からごく僅かなので、示された遺伝子は広い範囲のほとんどの発現遺伝子を網羅していることが期待される。

結核菌の感染では Heat Shock Protein などのストレス関連の遺伝子や caspase などのタンパク分解因子などの発現が上昇した。

CCR5 ノックアウトマウスよりの細胞でも同様な遺伝子が発現していた。ノックアウトマウスでは正常マウスに比べてリポゾームタンパク関連の転写が多い印象があったが特徴のあるパターンとはなっていない。一方、両者とも各種ケモカインや受容体の転写の亢進は認められず、この結果は半定量 PCR でも支持された。

研究協力者国際ネットワーク立ち上げ:

2011年3月現在まで本研究に対する参加同意者は、国立国際医療研究センター病院にて8名、東京医科歯科大学にて2名である。これは PCR 診断率の低さを反映しており、

わが国のみでの臨床研究では参加者数が十分ではないことが容易に理解される。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きた。

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)、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、国際医療研究センター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。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 CCR5 Δ 32 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。

今後も人類の多様な遺伝子型に対応できるように、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。

世界的にも本疾患に対する診断・治療法は明確なエビデンスをもって示されていない。われわれの調査でも白色人種の調査にて報告されていた PCR の病態と類似の結果を黄色人種においても得た。またわれわれをネットワークの中心として、米国・欧州等国外の複数の研究機関と研究協力する体制を確立させた。本研究によって示されたデータを基に、PCR はわが国から再定義・再発信された新たな疾患概念として国際的に認知されつつあることは、国際的意義が大きいと考える。

E:健康危機情報

特になし。

F:研究発表

論文発表一覧および学会発表は分担者の
項を参照。

G: 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