

図 4. bm12→[B6→bm12]GVHD モデルにおけるドナーT細胞の増殖、骨髄浸潤とB細胞の回復

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。

#### D:考察

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CD4T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CD4T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、CD4T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、CD4T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と期待している。

また、骨髄キメラマウスを用いた実験により、CD4T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MHCII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CD4T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CD4T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。

## E:結論

活性化 CD4 T 細胞が、骨前駆細胞から未成熟骨芽細胞への分化を抑制することで、骨形成を抑制することをあきらかにした。またこの抑制が抗原非特異的であることも明らかにした。

## F:健康危機情報

なし

## G:研究発表

### 1. 論文発表

1. Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, Sugiyama T, Nagasawa T, Imamura M, Matsushima K. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115(26):5401-11, 2010.

### 2. 学会発表

1. UEHA Satoshi, SHONO Yusuke, MATSUSHIMA Kouji. Destruction of Bone Marrow Osteoblastic Niche for Hematopoiesis Mediated by Donor CD4 T Cells after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 3<sup>rd</sup> International Conference on Osteoimmunology. Jun 20, 2010. Santorini, Greece.

2. 庄野雄介、上羽 悟史、松島 綱治、同種造血幹細胞移植における CD4 T 細胞の除去は骨髄造血幹細胞ニッチを保護し移植片対腫瘍効果を保存する. 第 19 回日本癌病態治療研究会. 2010年6月30日、東京

3. UEHA Satoshi, SHONO Yusuke, MATSUSHIMA Kouji. Depletion of allo-CD4 T cells protects hematopoietic niche while preserves graft-versus-tumor effects after allo-HSCT. *14<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology*. Jul 22, 2010. Kumamoto Japan.
4. Y. Wang, S. Ueha, Y. Shono, J. Abe, M. Kurachi, K. Matsushima. Bone marrow graft-versus-host disease does not require allogeneic MHC class II expression on host bone marrow stroma. *14<sup>th</sup> International Congress of Immunology*. Aug 26, 2010. Kobe Japan.
5. UEHA Satoshi, Yusuke Shono, Makoto Kurachi, MATSUSHIMA Kouji. Depletion of allo-CD4 T cells protects hematopoietic niche while preserves graft-versus-tumor effects after allo-HSCT. *The 69<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer Association*. Sep 22, 2010. 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

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)

脳組織マクロファージの Th1 刺激と遺伝子の発現

分担研究者：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・東京慈恵会医科大学・ポスドク

研究要旨

進行性下顎頭吸収（Progressive Condylar Resorption: PCR）は下顎頭に進行性の形骨の吸収変化がおきる原因不明の疾患である。この病態にはケモカインレセプターCCR5 との関連が疑われており診断基準を策定する上で CCR5 やそのリガンドの引き起こす病態との関連をあらためて調査する必要がある。この受容体は HIV 感染や発症とも密接に関連が知られており骨以外にも例えば中枢神経系のようなクリティカルな臓器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破骨細胞同様、組織マクロファージの一員であるミクログリアを単離、Th1 へ免疫系をシフトさせる結核菌を感染させ、反応性に上昇してくる mRNA を網羅的に解析した。その結果、中枢神経系では結核菌感染によって発現する遺伝子にケモカインに特徴的なものは認められず CCR5 ノックアウトマウスについても特徴的なケモカイン・ケモカインレセプター系の発現は認められなかった。中枢神経系のマクロファージは骨などの組織に存在する組織マクロファージと反応性が異なっている可能性があるため今後の進行性下顎頭吸収の診断基準策定ではもっと直接的に関連している細胞との関連性を見ていく必要があることが推察された。

A:研究目的

骨代謝には骨芽細胞による骨の新生と破骨細胞による骨の吸収が関与しておりこの 2 つの細胞の活動バランスによって平衡が維持される。進行性下顎頭吸収で

は骨吸収が優位となるため徐々に顎の変性に傾いていく。骨芽細胞と破骨細胞は骨代謝に於いて互いに刺激によるシグナル伝達を行うことが知られてきており、特にケモカイン、ケモカインレセプター

を介して特徴的な反応を相互に行っていることを分担研究員星野らは明らかとしてきた。破骨細胞についてはケモカインの放出様式や骨を吸収するという活動様式から骨に存在する組織マクロファージの一員と考えることができる。組織マクロファージはケモカイン等のシグナルを介して組織反応、この場合は骨形成を促進する骨芽細胞へのシグナルの制御を誘導することが知られている。

特に進行性下顎頭吸収では組織マクロファージの一員である破骨細胞のケモカイン、例えば CCR5 等の産生が重要であり、本疾患とケモカイン・ケモカインレセプターの反応の異常とを考察していく必要がある。これまでの研究で本疾患では CCR5 分子の遺伝子的異常が関与する可能性が示されてきた。この遺伝子の変異では致死となることはなく、他に疾患を持たないヒトにおいても CCR5 遺伝子に変異や部分欠損を持つ者が存在する。これらのヒトの骨では破骨細胞等の活動に影響を与えていることなどが想定されている。

一方、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うこととした。

CCR5 は Th1 リンパ球に特徴的なケモカインである。そこで免疫系、特に T リン

パ球細胞を Th1 へ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。

## B:研究方法

生体内での組織マクロファージに活性化が起きると様々なサイトカインが2次的に分泌され第一義的な活性化が区別できなくなる可能性があったため結核菌による刺激はイン・ビトロで行うこととした。また CCR 分子の異常が反応の差に関わっているかどうか調べるため、野生型および CCR5 ノックアウトマウスを用いた。

13 週 C57BL 野生型および CCR5 ノックアウトマウス（東京大学上羽・松島両先生より提供）をリン酸緩衝液で灌流し脳内の血球細胞を除去した後、氷冷下に脳を摘出、無菌的に細胞を遊離・回収、脳実質から単離細胞を得た後マグネットビーズによりミクログリア細胞を濃縮した。昨年度の成果からも得られた生細胞の殆どが CD45 陽性、CD11b 陽性の細胞であり、全体の 90%以上が Ly-6C<sup>lo</sup>、Gr-1<sup>lo</sup> のミクログリアと思われる比較的均一な集団であることが示されている。これらの細胞に *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) ( $1.7 \times 10^8$  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、細胞から酸性グアニジン-フェノール-クロロホルム法 (AGPC 法) で 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 (結核予防会結核

研究所山田、御手洗先生との研究成果)。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。

(倫理面への配慮) 本研究では動物実験を行うため国立国際医療研究センターおよび東京慈恵会医科大学での動物実験委員会の認可を受けている。また結核菌の感染実験は結核予防会結核研究所の山田博之先生らが所定の手続きを経て行った。

### C:研究結果

野生型マウスのみクログリアが転写している RNA を cDNA の形で配列を決定、シーケンスが明らかとなった遺伝子の相同解析を行った結果のうち主なもののみ、以下に示す。(データベース、遺伝子名、スコア、E 値 (expected value))

gb BC043013.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) lbeta subcomp...	285	6e-76
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (EC 1.9.3.1)	115	8e-25
dbj AK151059.1	translationally-controlled 1, full insert seq...	268	6e-71
gb BC086648.1	Mus musculus peroxiredoxin 1, mRNA (cDNA clone...	56.5	5e-07
gb BC158040.1	Mus musculus lipoprotein lipase, mRNA (cDNA cl...	54.7	2e-06
dbj AK131578.1	NADH dehydrogenase subunit 1(NADH-ubiquinone ...	135	6e-31
gb BC037026.1	Mus musculus ribosomal protein S27, mRNA (cDNA...	110	4e-23
gb GU332589.1	Strain BALB/c clone 1 antisense RNA, mitochond...	172	5e-42
gb BC026791.1	Mus musculus cytochrome b-245, alpha polypepti...	148	8e-35
dbj AK129401.1	Mus musculus premature mRNA for mKIAA1590 pro...	289	4e-77
gb BC080837.1	Mus musculus basic transcription factor 3, mRN...	590	1e-167
gb BC085171.1	Mus musculus prothymosin alpha, mRNA (cDNA clo...	542	3e-153
gb BC040206.1	Mus musculus cAMP-regulated phosphoprotein 19,...	145	1e-33
gb BC050124.1	eukaryotic translation elongation factor 1 all...	641	0.0
dbj AK136262.1	Cytochrome oxidase subunit 1 (Cytochrome c o...	219	6e-56
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (EC 1.9.3.1) (Cy...	359	3e-98
gb BC028779.1	Mus musculus GTPase, IMAP family member 6, mRN...	195	1e-48
gb GU332588.1	Mus musculus strain BALB/c clone 3 antisense R...	158	1e-37
gb BC100603.1	Mus musculus ribosomal protein S23, mRNA (cDNA...	268	6e-71
gb BC036990.1	Mus musculus metallothionein 1, mRNA (cDNA clo...	163	3e-39
gb BC002095.1	Mus musculus topoisomerase (DNA) I, mRNA (cDNA...	351	5e-96
dbj AK004673.1	Mus musculus calmodulin 1, mRNA, RIKEN full-1...	148	8e-35
gb BC008093.1	eukaryotic translation initiation factor 5A, m...	228	1e-58
gb BC099377.1	Mus musculus ribosomal protein S12, mRNA (cDNA...	137	2e-31

gb BC024339.1	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F...	291	1e-77
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (EC 1.9.3.1)	518	5e-146
gb BC012020.1	Mus musculus Cytochrome oxidase sununit 3 (EC...	614	6e-175
gb BC125642.1	Mus musculus ribosomal protein L23a, mRNA (cDN...	470	1e-131
dbj AK136262.1	Mus musculus Cytochrome oxidase subunit 1 (E...	340	1e-92
gb BC031824.1	Mus musculus FK506 binding protein 2, mRNA (cD...	91.6	1e-17
gb BC004627.1	Mus musculus ras homolog gene family, member C...	172	5e-42
dbj AK136262.1	Mus musculus Cytochrome oxidase subunit 1 (EC...	193	3e-48
gb BC011078.1	RNA-binding protein FUS (Pigpen protein), full...	303	2e-81
gb GU332589.1	Mus musculus strain BALB/c clone 1 antisense R...	99.0	8e-20
gb BC012314.1	Mus musculus ferritin heavy chain 1, mRNA (cDN...	387	1e-106
gb BC114997.1	phosphoribosylformylglycinamide synthase (FG...	246	3e-64
gb BC016557.1	Mus musculus apolipoprotein O, mRNA (cDNA clon...	196	3e-49
gb BC046801.1	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like, mRNA co...	379	2e-10
gb BC050124.1	eukaryotic translation elongation factor 1 alp...	785	0.0
gb GU332589.1	Mus musculus strain BALB/c clone 1 antisense R...	499	2e-140
gb BC054463.1	Mus musculus lysozyme 2, mRNA (cDNA clone MGC:...	305	4e-82
dbj AK131587.1	ATPase subunit 6 (Atpase6) mRNA, mitochondria...	222	4e-57
dbj AK131578.1	NADH dehydrogenase subunit 1 (EC 1.6.5.3) (NA...	405	4e-112
dbj AK160244.1	Mus musculus immune-associated nucleotide 6 mR...	351	5e-96
dbj AK156621.1	Mus musculus cyclin T2 full insert sequence	265	7e-70
gb GU332589.1	Mus musculus strain BALB/c clone 1 antisense R...	215	7e-55
gb BC032069.1	Mus musculus transthyretin, mRNA (cDNA clone I...	307	1e-82
gb BC027010.1	Mus musculus proteolipid protein (myelin) 1, m...	130	3e-29
dbj AK154498.1	Mus musculus Protein FAM3C precursor, full in...	213	3e-54
dbj AK136262.1	Cytochrome oxidase subunit 1 (EC 1.9.3.1) (Cy...	204	2e-51
gb BC096656.1	eukaryotic translation initiation factor 1, mR...	99.0	8e-20
gb BC065806.1	Biogenesis of lysosome-related organelles compl...	228	1e-58
gb BC046754.1	Mus musculus I-kappa B alpha chain mRNA, compl...	324	1e-87
gb BC054473.1	insulin-like growth factor binding protein 2, ...	137	2e-31
gb BC055952.1	similar to ATP-binding cassette, sub-family C...	248	7e-65
gb BC031781.1	SIMILAR TO D.MELANOGASTER CG5986 PROTEIN (FRAG...	673	0.0
gb BC106146.1	Mus musculus ferritin light chain 1, mRNA (cDN...	573	1e-162
dbj AK141672.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 homolo...	95.3	1e-18
gb AY248756.1	Mus musculus 18S ribosomal RNA-like mRNA, part...	73.1	5e-12
gb BC056922.1	sterol regulatory element binding factor 1, fu...	363	3e-99

gb BC021748.1	cDNA 2900010J23 gene, mRNA hypothetical protei...	534	5e-151
gb BC094437.1	alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit, mRN...	248	7e-65
dbj AK009703.1	mitochondrial ribosomal protein S21, full ins...	267	2e-70
gb BC025600.1	Mus musculus transmembrane protein 119, mRNA (...)	689	0.0
dbj AK138272.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6 (EC 1...	374	1e-102
dbj AK136262.1	Cytochrome oxidase subunit 1 (EC 1.9.3.1) (C...	436	1e-121
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (EC 1.9.3.1) (Cy...	340	1e-92
gb BC086926.1	Mus musculus transthyretin, mRNA (cDNA clone M...	566	2e-160
gb BC023812.1	Mus musculus ubiquitin specific peptdiase 1, m...	82.4	8e-15
dbj AK131578.1	NADH dehydrogenase subunit 1 (EC 1.6.5.3) (N...	497	7e-140
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (EC 1.9.3.1) (C...	377	9e-104
gb BC012020.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (EC 1.9.3.1) (Cyt...	737	0.0
gb GU332589.1	Mus musculus strain BALB/c clone 1 antisense R...	459	3e-128
gb U93864.1	MMU93864 Mus musculus ribosomal protein S11 mRNA,...	154	2e-36
gb BC085157.1	G protein-coupled receptor associated sorting...	390	1e-107
gb BC086786.1	Mus musculus ribosomal protein L7, mRNA (cDNA ...)	739	0.0
dbj AK136262.1	Cytochrome oxidase subunit 1 (EC 1.9.3.1) (Cy...	313	3e-84
dbj AK168952.1	tumor rejection antigen gp96, full insert seq...	335	5e-91
dbj AK131592.1	cytochrome b, mitochondrial, full insert sequen...	671	0.0
gb BC058726.1	Mus musculus cofilin 1, non-muscle, mRNA (cDNA...	453	1e-126
dbj AK146198.1	RNA-binding protein FUS (Pigpen protein), fu...	374	1e-102
dbj AK136262.1	Cytochrome oxidase subunit 1 (EC 1.9.3.1) (Cy...	292	3e-78
gb GU332589.1	Mus musculus strain BALB/c clone 1 antisense R...	267	2e-70
dbj AK205579.1	Mus musculus thymosin, beta 4, X chromosome, m...	440	1e-122
gb BC053451.1	Mus musculus leucine zipper protein 1, mRNA (c...	701	0.0
gb BC024938.1	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 3...	551	5e-156
dbj AK131586.1	cytochrome c oxidase subunit II (Cox2) mRNA, co...	715	0.0
dbj AK148733.1	neonate sympathetic gangl hypothetical gene...	852	0.0
gb BC054463.1	Mus musculus lysozyme 2, mRNA (cDNA clone MGC:...	656	0.0
gb BC012314.1	Mus musculus ferritin heavy chain 1, mRNA (cDN...	505	4e-142
gb BC010468.1	Mus musculus pyrophosphatase (inorganic) 1, mR...	676	0.0
dbj AK082072.1	neonate cerebellum cDNA, unclassifiable produ...	457	1e-127
gb AF362574.1	Mus musculus ribosomal protein L31, mRNA (cDNA	553	1e-156
gb BC069918.1	Mus musculus BCL2-associated athanogene 1, mRN...	697	0.0
gb BC106146.1	Mus musculus ferritin light chain 1, mRNA (cDN...	206	4e-52
dbj AK136519.1	Mus musculusbeta-glucuronidase, full insert s...	686	0.0

gb BC054435.1	Mus musculus ribosomal protein S23, mRNA (cDNA...	372	4e-102
gb BC055952.1	cytochrome b, mitochondrial, full insert seque...	634	0.0
dbj AK082928.1	MICROSOMAL SIGNAL PEPTIDASE 12 KDA SUBUNIT ...	606	1e-172
gb AY101177.1	Mus musculus extracellular sulfatase SULF-2 mR...	392	3e-108
gb GU332589.1	Mus musculus strain BALB/c clone 1 antisense R...	540	1e-152
gb BC012314.1	Mus musculus ferritin heavy chain 1, mRNA (cDN...	747	0.0
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (Cytochrome c oxi...	835	0.0
gb BC054805.1	Mus musculus calmodulin 1, mRNA (cDNA clone MG...	507	1e-142
dbj AK159630.1	Mus musculus glutathione synthetase, type AlmRN...	604	4e-172
gb BC044779.2	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B...	593	8e-169
gb BC085171.1	Mus musculus prothymosin alpha, mRNA (cDNA clo...	110	4e-23
gb BC049967.1	Mus musculus exocyst complex component 5, mRNA...	163	3e-39
gb BC018286.1	Mus musculus thymosin, beta 4, X chromosome, m...	542	3e-153
gb BC004671.1	Mus musculus FK506 binding protein 1a, mRNA (c...	529	2e-149
gb AF093677.1	AF093677 Mus musculus ATPase subunit 6 (Atpase6...	191	1e-47
gb BC083340.1	nascent polypeptide-associated complex alpha p...	470	1e-13
gb BC011154.1	Mus musculus SLAM family member 7, mRNA (cDNA ...	507	1e-142
dbj AK141672.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 (EC 1...	401	5e-111
gb BC125656.1	Mus musculus ribosomal protein L35, mRNA (cDNA...	292	3e-78
gb BC002072.1	Mus musculus cystatin C, mRNA (cDNA clone MGC:...	270	2e-71
gb BC018286.1	Mus musculus thymosin, beta 4, X chromosome, m...	172	5e-42
gb BC026454.1	Mus musculus DAZ associated protein 1, mRNA (c...	819	0.0
gb BC055952.1	cytochrome b, mitochondrial, full insert seque...	326	3e-88
dbj AK133489.1	Generic methyl-transferase/SAM binding motif/...	392	3e-108
gb BC126942.1	iroquois homeobox protein 4 (Irx4) mRNA, comple...	200	2e-50
dbj AK012993.1	cDNA product:unclassifiable, full insert seque...	787	0.0
gb BC106146.1	Mus musculus ferritin light chain 1, mRNA (cDN...	150	2e-35
dbj AK136262.1	Cytochrome oxidase subunit 1 (Cytochrome c ox...	593	8e-169
gb BC020459.1	RNA for labial-like homeobox-containing gene H...	394	9e-109
gb BC022674.1	HYPOTHETICAL 8.2 KDA PROTEIN homolog [Homo sap...	505	4e-142
dbj AK131587.1	ATP synthase 6, mitochondrial, full insert seq...	182	8e-45
dbj AK173067.1	Mus musculus mRNA for mKIAA0935 protein	791	0.0
gb BC019725.1	Mus musculus ribosomal protein S10, mRNA (cDNA...	577	8e-164
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (Cytochrome c oxi...	719	0.0
gb BC086882.1	Mus musculus ribosomal protein S24, mRNA (cDNA...	778	0.0
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (Cytochrome c oxi...	719	0.0

gb BC034787.1	Mus musculus NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1...	568	5e-161
dbj AK144509.1	clone:G630085E17 product:hypothetical protein...	121	2e-26
dbj AK205579.1	Mus musculus thymosin, beta 4, X chromosome, m...	582	2e-165
dbj AK159630.1	glutathione synthetase type A1 mRNA, complete...	588	4e-167
gb BC058795.1	eukaryotic translation elongation factor 2, mRNA...	769	0.0
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (Cytochrome c oxi...	728	0.0
dbj AK152414.1	cytochrome b-245, alpha polypeptide, full ins...	580	6e-165
emb AJ566113.1	Mus musculus mRNA for ISG12a protein (ISG12a ...	726	0.0
gb BC026454.1	Mus musculus DAZ associated protein 1, mRNA (c...	438	4e-122
dbj AK139376.1	purine rich element binding protein B, full i...	484	5e-136
gb BC003419.1	Mus musculus splicing factor 3b, subunit 1, mR...	523	1e-147
gb BC018286.1	Mus musculus thymosin, beta 4, X chromosome, m...	219	6e-56
gb GU332589.1	BALB/c clone 1 antisense RNA, complete sequenc...	604	4e-172
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (EC 1.9.3.1) (Cy...	673	0.0
gb BC065173.1	solute carrier family 3 member 2 (activators o...	741	0.0
gb BC062180.1	Mus musculus thioredoxin domain containing 15,...	588	4e-167
dbj AK136262.1	Cytochrome oxidase subunit 1 (EC 1.9.3.1) (Cy...	712	0.0
gb BC003902.1	glycerophosphodiester phosphodiesterase 1, mRN...	508	3e-143
gb BC096392.1	Mus musculus ribosomal protein S27A, mRNA (cDN...	580	6e-165
dbj AK131578.1	NADH dehydrogenase subunit 1 (EC 1.6.5.3) (NA...	276	3e-73
dbj AK168550.1	ribosomal protein L37, full insert sequence	95.3	1e-18
gb BC010755.1	Mus musculus hexosaminidase A, mRNA (cDNA clon...	680	0.0
dbj AK077259.1	avian erythroblastosis virus E-26 (v-ets) rel...	418	5e-116
gb BC081465.1	Mus musculus ribosomal protein S8, mRNA (cDNA ...	569	1e-161
gb BC042939.1	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J...	676	0.0
gb BC086685.1	proteasome subunit, alpha type 6, mRNA (cDNA c...	678	0.0
dbj AK053973.1	GNF expression: similar to JG0193 G protein-c...	708	0.0
gb BC096656.1	eukaryotic translation initiation factor 1, mR...	782	0.0
gb BC012314.1	Mus musculus ferritin heavy chain 1, mRNA (cDN...	671	0.0
gb BC086926.1	Mus musculus transthyretin, mRNA (cDNA clone M...	715	0.0
dbj AK078119.1	2,3-bisphosphoglycerate mutase, full insert s...	695	0.0
gb BC010604.1	Mus musculus ribosomal protein S6, mRNA (cDNA ...	135	6e-31
gb BC054758.1	Mus musculus cathepsin D, mRNA (cDNA clone MGC...	172	5e-42
gb BC055013.1	Mus musculus RAD52 motif 1, mRNA (cDNA clone M...	475	3e-133
dbj AK132140.1	Mus musculus transcription factor 4, mRNA (cDN...	246	3e-64
gb BC053395.1	Mus musculus TBC1 domain family, member 15, mR...	795	0.0

gb BC106146.1	Mus musculus ferritin light chain 1, mRNA (cDN...	267	2e-70
gb BC026454.1	Mus musculus DAZ associated protein 1, mRNA (c...	582	2e-165
gb GU332589.1	Mus musculus strain BALB/c clone 1 antisense R...	335	5e-91
gb BC060636.1	DiGeorge syndrome critical region gene 2, mRNA...	647	0.0
gb BC058685.1	Mus musculus ribosomal protein, large, P1, mRN...	763	0.0
gb BC106146.1	Mus musculus ferritin light chain 1, mRNA (cDN...	573	1e-162
dbj AK151985.1	Mus musculus ribosomal protein 2, full insert s...	643	0.0
gb AY248756.1	Mus musculus 18S ribosomal RNA-like mRNA, part...	843	0.0
dbj AK051610.1	CCHC type Zn-finger containing protein, full ...	411	9e-114
gb BC106146.1	Mus musculus ferritin light chain 1, mRNA (cDN...	250	2e-65
gb BC096656.1	eukaryotic translation initiation factor 1, mRN...	715	0.0
dbj AK146772.1	ribosomal protein L39, full insert sequence	436	1e-121
dbj AK011558.1	mitochondrial ribosomal protein 63, full ins...	418	5e-116
gb BC086926.1	Mus musculus transthyretin, mRNA (cDNA clone M...	676	0.0
gb DQ167195.1	acupuncture-induced 1-L (Aig11) mRNA, complete...	313	3e-84
dbj AK148009.1	caldesmon 1, full insert sequence	854	0.0
gb BC106146.1	Mus musculus ferritin light chain 1, mRNA (cDN...	774	0.0
gb BC086901.1	Mus musculus ribosomal protein S17, mRNA (cDNA...	712	0.0
gb BC012314.1	Mus musculus ferritin heavy chain 1, mRNA (cDN...	523	1e-147
gb BC061497.1	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxyge...	202	6e-51
dbj AK136262.1	Cytochrome oxidase subunit 1 (EC 1.9.3.1) (Cy...	401	5e-111
gb BC003833.1	Mus musculus ribosomal protein, large, P0, mRN...	710	0.0
gb AY941793.1	eIF2 alpha kinase associated protein mRNA ...	680	0.0
dbj AK151985.1	ribosomal protein S2, full insert sequence	800	0.0
gb BC083131.1	Mus musculus ribosomal protein L19, mRNA (cDNA...	630	6e-180
dbj AK131579.1	Cytochrome oxidase sununit 3 (EC 1.9.3.1) (Cy...	730	0.0
gb BC086926.1	Mus musculus transthyretin, mRNA (cDNA clone M...	645	0.0
dbj AK138995.1	NADH dehydrogenase subunit 1 (EC 1.6.5.3) (NA...	444	9e-124
dbj AK131586.1	Cytochrome c oxidase polypeptide II (EC 1.9.3...	658	0.0
gb BC025600.1	Mus musculus transmembrane protein 119, mRNA (...)	599	2e-170
gb BC021786.1	Mus musculus integral membrane protein 2B, mRN...	737	0.0
gb BC099471.1	Mus musculus C-type lectin domain family 4, me...	150	2e-35
dbj AK163440.1	NADH dehydrogenase subunit 2 homolog [Mus mus...	551	5e-156
gb BC086926.1	Mus musculus transthyretin, mRNA (cDNA clone M...	697	0.0
dbj AK131578.1	NADH dehydrogenase subunit 1 (EC 1.6.5.3) (NA...	856	0.0
dbj AK136262.1	Cytochrome oxidase subunit 1 (EC 1.9.3.1) (Cy...	704	0.0

dbj|AK160039.1| cDNA 2410018G23 (BBP-like protein 1 homolog)... 695 0.0  
 gb|BC027412.1| Mus musculus acyl-Coenzyme A dehydrogenase, lo... 453 1e-126  
 dbj|AK131579.1| Cytochrome oxidase sununit 3 (EC 1.9.3.1) (Cy... 545 2e-1  
 (注: E値が低いほどより“有意”となる。すなわち0は完全一致したものを表わす)

結核菌感染によって転写が認められた遺伝子のうち主なものは以下の通りであった。

gb|BC082593.1| splicing factor, arginine/serine-rich 5 (SRp40, HRS) 154 2e-36  
 gb|BC009165.1| thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus), 196 3e-49  
 gb|BC049955.1| caspase 8, mRNA (cDNA clone MGC:59027 IMAGE:4208824), 750 0.0  
 gb|J04633.1|MUSHSP86A heat shock protein 86 mRNA and 28S ribosomal 259 4e-68  
 gb|BC046825.1| zinc finger and BTB domain containing 8 opposite str 747 0.0  
 gb|BC010249.1| coactosin-like 1 (Dictyostelium), mRNA (cDNA clone M 660 0.0

一方、CCR5 ノックアウトマウスで発現していて野生型マウスで発現があまり認められなかったものでは以下のような配列が主なものであった。

gb|BC020487.1| vav 1 oncogene, mRNA (cDNA clone MGC:11710 IMAGE:3 63.9 3e-09  
 gb|BC028437.1| cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha, 156 5e-37  
 gb|BC028547.1| hepatitis B virus x interacting protein, mRNA (cDNA 774 0.0  
 gb|BC046766.1|esterase D/formylglutathione hydrolase, mRNA (cDNA c 468 2e-131  
 dbj|AK009109.1| HUNTINGTIN INTERACTING PROTEIN HYPK (FRAGMENT) hom 424 1e-117

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ものは以下のものであった。

dbj|AK145391.1| sperm specific antigen 1, full insert sequence... 344 3e-9  
 gb|AY036118.1| Mus musculus ETS-related transcription factor ... 466 7e-131  
 gb|BC049124.1| Mus musculus heat shock protein 90, alpha (cyt... 381 3e-105  
 gb|BC070415.1| histidine triad nucleotide binding protein 1, mRNA 433 7e-12  
 dbj|AK030335.1| ATPase, H<sup>+</sup> transporting lysosomal (vacuolar proton p 743 0.0  
 dbj|AK168491.1| Similar to ubiquinol-cytochrome c reductase complex, 472 1e-132  
 dbj|AK081100.1| DBC2 PROTEIN homolog [Mus musculus], full insert se 305 2e-82  
 dbj|AK150024.1| hypothetical Arginine-rich region profile/Serine-ric 734 0.0  
 gb|BC039917.1| RNA binding motif protein 42, mRNA (cDNA clone IMAGE: 425 1e-118  
 gb|BC003707.1| Mus musculus Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae), m 455 1e-127  
 dbj|AK140762.1|macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific 182 3e-45  
 dbj|AK162423.1|Mus musculus DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 50, 527 3e-149  
 gb|BC068152.1| Mus musculus stromal cell derived factor 4, mRNA (cD 623 4e-178

gb|BC099479.1| Mus musculus lectin, galactose binding, soluble 1, mR 749 0.0  
dbj|AK135348.1|elongation of very long chain fatty acids -like 1, 673 0.0  
gb|BC108394.1| Mus musculus tubulin, alpha 1B, mRNA (cDNA clone MGC: 207 5e-53  
同 1A、同 1C その他 ribozomal proteins 多数

#### D:考察

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ボ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。

#### E:結論

単離したミクログリアでは結核菌を感染させてもケモカイン系の遺伝子の発現変化が認められなかった。これは、ミクログリアを単離してから感染させたためである可能性は除外できない。しかし結核菌の直接作用でケモカイン系、ケモカイン受容体系の遺伝子の転写が上昇せず CCR5 のノックアウトの影響も大きな変化で捉えることができなかったため、脳の組織マクロファージであるミクログリアは骨の組織マクロファージである破骨細胞と別な機序で機能が制御されている可能性もある。別の刺激や中枢神経系全体の細胞を刺激する方法などを検討する必要があると思われた。

15-19, 2010. Toronto, Canada.

F:健康危機情報

特になし。

G:研究発表

1. 論文発表

1 Hoshino, A. Iimura, T. Ueha, S. Hanada, S. Maruoka, Y. Mayahara, M. Suzuki, K. Imai, T. Ito, M. Manome, Y. Yasuhara, M. Kirino, T. Yamaguchi, A. Matsushima, K. Yamamoto, K. Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes defective bone remodeling due to impaired osteoclasts and osteoblasts. *J Biol Chem* 285:28826-28837,2010.

2. 学会発表

1 星野昭芳、山本健二、馬目佳信 骨代謝とケモカイン Cell Biology Summer Meeting 2010 細胞生物学から再生を考える 平成22年7月3日、足柄郡箱根町 神奈川

2 星野昭芳、飯村忠浩、山本健二、山口朗 骨代謝におけるケモカイン受容体 CCR1 の機能解析 日本骨代謝学会学術集会 2010年7月、京王プラザホテル 東京

3 Hoshino A, Iimura T, Yamamoto K, Yamaguchi A. "Deficiency of Chemokine Receptor CCR1 Causes Osteopenia Due to Impaired Functions of Osteoclasts and Osteoblasts." *American Society for Bone and Mineral Research Oct*

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

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）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  
(H22-難治-一般-157)

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**

Fumihide Kanaya<sup>\*1), 2)</sup>, Akiyoshi Hoshino<sup>2) 4)</sup>, Yutaka Maruoka<sup>2) 3)</sup> and Kenji Yamamoto<sup>2)</sup>

**Abstract**

This group provides the second-year blueprint to the already existing Japanese research network of Progressive Condylar Resorption with facilitating diagnostic guidelines in international medical community of bones and teeth. Its novel approach investigating both conventional bone markers and CCR5 related markers collected researchers' high interests in the first two international regions with six agencies this year. This project takes its informatics lessons learned and international facilitation developed into its third year of the study.

**A: Purpose**

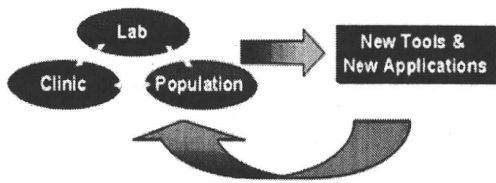
Prompt translation of novel basic research knowledge for mechanisms of

diseases into its clinical application in diagnostic and treatment procedures is essential, especially in overcoming rare disorders due to their low incidents. In investigating Progressive Condylar Resorption (PCR), this project evaluates feasibility for a Japanese clinical facility to be a center of an effective site-participatory global consortium of PCR translational research network in dealing with the limitation of patient volunteers'

---

\* Research Fellow at

- 1) AIDS Clinical Center, National Center for Global Health and Medicine (NCGM)
- 2) Research Institute, NCGM
- 3) National Center for Global Health and Medicine Hospital
- 4) Jikei University School of Medicine



**Fig 1. Translational Research Design**

numbers and its research resource.

CCR5, known as a co-receptor for HIV entry to T cells, is expressed on various human blood cells including macrophages and considered for possible regulatory roles in tissue macrophages and monocytes. One of such macrophage cells, osteoclast was investigated by Yamamoto, *et al* in CCR5 knockout model mice (*Ccr5*<sup>-/-</sup>) for a hypothesis that chemokine-CCR5 has regulatory roles in mineral absorption and formation function. Data obtained in osteoclast and osteoblast from the mouse model for the chemokine receptor's functions indicated that CCR5KO mice had low bone mineral density presenting osteopenia bone structure and PCR-like condylar, and that CCR5 plays an integral role in bone metabolism physiology. Although rodents such as mice have similarities and correlations in chemokine genes with humans, they do not share the exact set of chemokine ligands and genetic composition.

Among general Caucasian population,

a CCR5 allele, CCR5 $\Delta$ 32 with 32-aminoacid deletion, is known to exist in sizable rate and believed to have no significant obstacle in normal growth and development. With all the information above, we designed that it is translatable to investigate CCR5's function in human bone metabolism into the development of PCR diagnostic biomarkers and tailor-made treatment for the patients, thus this project explore CCR5's roles in bone metabolism of PCR patients in the world.

#### B: Methods

Establish an international consortium, investigating bone metabolism biomarkers of patients with diagnosis of or suspected of PCR in respective agencies, applying a protocol developed at National Center for Global Health and Medicine (NCGM) by the following cycle:

1. Dissemination of NCGM's latest various basic and clinical outcomes into internationally comparable format.
2. Taking our approaches to international forums, engaging in proposal facilitation for feasibility investigation to integrate our novel methods into different networks.
3. Utilizing several international feedbacks as result, bringing the new network into a higher level

consortium.

For the step 1, we research which population and international agencies of interest have PCR cases and biomarker testing capacity and can participate, accordingly which we develop a clinical research protocol that can be examined by the outside agencies.

For the step 2, we propose a model for envisioned consortium by NCGM investigators, and when an agreement for the necessity to establish international guidelines for PCR is obtained, we request the participation in the consortium, facilitate the institutional process to start the research in respective agencies and coordinate the blood and urine collection and testing procedures for bone metabolism evaluations.

The step 3 entails international support for Institutional Review Board (IRB), in which each country has different set of process of conduct; we gather help from its nation's embassy, ministry of foreign affairs and other outside consultant for fine tuning and customizing international protocols for each country. By allocate our MHLW's grant for international collaborative works such as inviting world's top investigators in this field who are willing to be a research partner and testing and transporting the study samples, NCGM plays a leadership role

in this consortium and continues to offer strategic support.

#### <Testing and Evaluation>

##### 1. Basic patient information

- Age and Sex
- Main complaint (pain in jaws, discomfort in occlusion, etc.)
- Intake diagnosis (TMD temporomandibular joint disorder, prognathism and etc.)
- Medical history (history of autoimmune disorders)
- Medication (antibiotic, anti-inflammatory, NSAID, anticoagulant, antiplatelet, corticosteroid drugs)
- Infectious diseases (HIV, HBV, HCV infections)
- Treatment markers

##### 2. Special values

- Osteoporosis testing
- Blood and urine chemokine markers

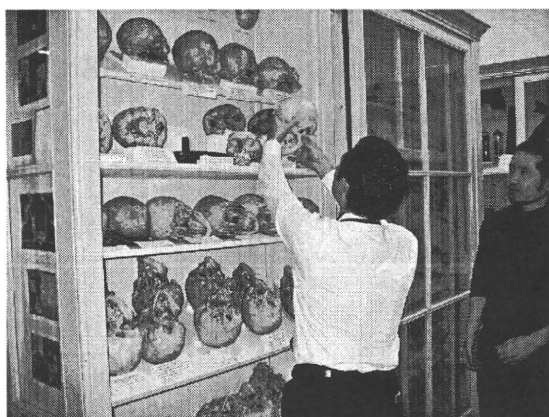
#### <Ethical Consideration>

Because of the human subject study phase of this clinical trial, we have past NCGM IRB and its human genetics ethics committee during the fiscal year 2010. We initiated our involvement in other county's regulatory procedures and international protocol registry process this year as well. We continue to stay alert and mindful on the universal ethical nature of the study procedures.

#### C: Results

1. A. Hoshino, Y. Maruoka and F. Kanaya disseminated the outcomes

of PCR studies from our group. It consisted of CCR5KO model mice experiment, their imageries, *in vitro* investigation of human macrophages, clinical data of eight NCGM patient volunteers' osteoporosis blood markers, especially with some outliers of elevated risks of bone fracture that requires continuous monitoring and following up, and their statistical analysis.



**Fig 2. Establishing an International Research Consortium at Institute of Anatomy and AIDS Center of First Faculty of Medicine, Charles University in Prague**

2. Based on the results obtained in the above, this group revised the

PCR clinical study protocol, passed NCGM IRB and its human genetics ethics committee and succeeded to include inflammation marker investigation as well. After the successful submission Y. Maruoka is serving as a new NCGM human genetics ethics committee board member subsequently this year. F. Kanaya revised and translated the protocol for standardized international registry and fine tuned the disseminated outcomes and tweaked out effective discussion points that should endure international investigation. The NCGM group sought, reached out to different networks of key personnel and brought its presentation of these outcomes to those who would be interested in the potential collaboration development in various international geographical regions in a) basic research and human genetics b) dentistry and oral surgery and c) foreign diplomacy. This year that included:

- Czech Embassy of Japan (Ambassador Katerina Fialkova),
- Massachusetts General Hospital Endocrine Research Unit (Director Henry Kronenburg)
- Massachusetts Institute of

Technology, Department of Genetics and Molecular Biology (former Head of the Department Maurice Fox)

- Charles University in Prague First Faculty of Medicine, Institute of Anatomy (Professor Pavel Snajdr and Director Grim)
  - Charles University in Prague First Medical Faculty, Department of Infectious and Tropical Diseases, Bulkova University Hospital AIDS Center (Dr. Ondrej Beran)
  - Charles University in Prague First Faculty of Medicine, Department of Stomatology Oral Surgery Clinic (Professor Jiri Sedy).
3. As result, the NCGM group further developed collaboration with each agency, received integral feedbacks for the next phase of both *in vitro* and *in vivo* studies and was invited this group back to the respective agencies in the next year. It was especially important to secure Czech PCR patient population participation where CCR5 $\Delta$ 32 allele is evenly distributed among historically stable population in human genetics and where their CCL5, mutual ligand for CCR5 and CCR1, can newly be added for this project with their participation. F.

Kanaya worked with Dr. Hal Bratt of the United States Department of Health and Human Services (DHHS) Office of Human Research Protections (OHRP), updated NCGM's regulatory registration for the United States National Institute of Health (NIH) and Food Drug Administration (FDA)'s federalwide assurance (FWA), registered NCGM IRB and its human genetics ethics committee to NIH, obtained NCGM's clinical trial protocol registry network ID on behalf of Dr. Takaaki Kirino, President of NCGM, using this grant during 2010 in order to further advance this international collaboration.

#### D: Discussion

Through the active facilitation in international community of basic, clinical and translational research and their regulatory process, this year the group learned valuable lessons:

1. Universal standardized guidelines for evaluation and assessment of PCR diagnosis and treatment are in the starting phase and there has not been much effective networking effort out of Japan other than independent clinical and endocrinal evidences. Because of this study and participant agencies, we succeeded in digging

up and capturing the already exiting needs for PCR research within the clinicians and researchers into this united effort for the first time within the international clinical research community.

2. We found it a very effective way to tweak and fine tune our results for international discussion to make case and have our presence well-known. As result in this process, we learned our original CCR5 related ligands collecting and detecting trials and results received and won very effective argument especially among international scholars. Through the new colleagues from our international counterparts' subsequent networking effort this year, Harvard School of Dentistry and Harvard Medical School AIDS Center are already expressing their interests in adding more volunteers and controls to this clinical trial effort.
3. International community wants validation of *in vitro* results by *in vivo* studies; an internationally coordinated informatics system would enable realistic analysis of dose-response data for the translation, clinical application and tailor-made treatment for PCR patients. Charles University

proposed adding 50 more patient volunteers in the coming year.

#### E: Conclusion

The current international tendency we discovered this year in basic and clinical research interests is realistic CCR5 blood and urine testing, especially RANTES analysis and comparison for Caucasian and Asian populations. Informatics of PCR related bone mineral metabolism markers would be the next phase of this development and this group should advance this international movement during the third year of this study.

#### F: Heath Safety Information

Not applicable this year.

#### G: Publications and presentations

##### 1. Publication

None

##### 2. Conference Presentation

1 Kanaya F. "New topics, HIV: Entry co-receptor and its novel functions and implications." *International Convention of AA 2010*, July 2, 2010. San Antonio, USA.

##### 3. Others

Not applicable

#### H: 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得