

201128117A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

丸 岡 豊

平成24 (2012) 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

丸 岡 豊

平成24（2012）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) 血液、および尿検体からのマーカー検索
PCR 患者の治療過程の報告
CCR5 ノックアウトマウスの解析
丸岡 豊 (国立国際医療研究センター 歯科口腔外科 科長) 19
- 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) 33
- 3) 東京医科歯科大学歯学部附属病院顎顔面矯正学分野を受診し下顎頭変形を認めた不正咬合患者に関する臨床統計学的検討
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) 35
- 4) 当科データベースに基づく関節リウマチ適正治療の調査研究
三森明夫 (国立国際医療研究センター 副院長)
高橋裕子 (同 膠原病科 医員) 39

2. 基礎班:

- 1) 炎症性骨代謝異常の機序解明
松島網治 (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) 41

2) 進行性下顎頭吸収の発症・進展のメカニズム解明に関する研究	
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)	47

III. 論文別刷	53
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行に関する業績一覧	57
-------------------------------	----

I . 総括研究報告書

平成 23 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
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
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

研究協力者：

臨床研究班：

川元 龍夫 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・講師
樺沢 勇司 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・助教
茂木 和久 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・専攻生
高橋 裕子 国立国際医療研究センター病院・膠原病科・医員

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。その発症原因は全く不明である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。

本研究班が歯科口腔外科診療機関に行った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が明らかになった。

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マウスの骨軟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、すでに本邦でもHIVの治療に実用化されたCCR5拮抗薬がその長期投与により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ているが、同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た。これはマウスのin vivoの結果と一致することから、この知見をベースに今後さらなる検体数の増加と診断基準の策定に努めた。さらに受容体・リガンドも含めた遺伝子レベルでの検索を行う予定を立てた。

本研究の目標は、さらに国内外の症例を集め一元的に解析する研究を進め、PCRという用語の改称も含めて、その発症のメカニズムの解明と合理的な診断分類を提唱し、またそれぞれに対する治療法を提案し、かつ予見性を含めてひろく議論を求めることにある。

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。また現在治療中の病気や使用薬、既往歴なども聴取する。今年度は新たな症例の詳細な症状の記載を行うとともに治療経過も追跡した。

本研究にて示されたケモカインリガンドであるRANTESは非常に有力なマーカーではあるが、症例の蓄積に伴いRANTESの値にいくつかのパターンがみられ、それは本症発症のメカニズムの中のある過程を反映していると考えるのが適切であると思われた。

すなわち、現状では複合概念であるPCRを臨床所見と検査所見とを併せると

1. 低形成であるもの
2. 自己免疫疾患やそれによる薬剤投与等による二次的な吸収変化
3. その他（関節円盤等の障害等に起因するもの）

と分類するのが適切と考えられた。加えて、「進行性」かどうか疑わしい症例もあるため、特発性下顎頭吸収(Idiopathic Condylar Resorption: ICR)の名称を提案し、その検証を行う必要があると考えた。

基礎研究班は、本疾患のモデル動物として期待されるCCR5KOマウスに対しての詳細な解析を行った。PCR患者から採取した検体のデータより、TNF- α が若干高い傾向が見られたことから、本症は炎症性疾患なのか、非炎症性疾患なのか議論の余地が再燃した。また研究を行った。また関節円盤等にかかる機械的刺激の影響も考慮した基礎実験を行った。

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について検討した。その結果、CCR5は骨代謝において重要な破骨細胞の機能低下に関係し、その数を減少させるだけでなく、軟骨の成熟過程に影響を及ぼしていることが示された。また軟骨内骨化の過程を障害することから、骨・軟骨減少症と皮質骨の肥厚化を起こしている可能性が示唆された。

一方、本症の病態形成には、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。我々は以前、臨床的に骨粗鬆症と相関が報告されている同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)後の移植片対宿主病(GVHD)のモデルマウスでは、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。CD4 T細胞依存的な骨芽細胞障害の発症機序が明らかになれば、炎症性の骨形成不全の診断マーカーならびに治療法の確立につながる可能性があるため、MHC不適合マウスallo-HSCTモデルにおける、CD4 T細胞による骨芽細胞の障害過程を詳細に検討するとともに、活性化ドナーCD4 T細胞による骨芽細胞抑制機序について、in vitroでの共培養系を用いて解析した。その結果、移植後の骨芽細胞障害にはT細胞依存的な骨芽細胞の分化抑制と、X線照射依存的な非特異的障害が関与することが明らかになった。

また、炎症性のケモカイン産生の原因として下顎頭の運動による機械的刺激にも注目し

た。そこで、関節内面を形成している硝子軟骨組織から細胞を得て初代培養し、機械的刺激である圧力を負荷して応答性を調査した。その結果、圧負荷により RNA の量は急増し 72 時間で約 3 倍程度に転写が上昇することが判明した。そして得られた RNA について相補鎖 DNA を合成して塩基配列を決定し、得られた配列をヒト染色体とマッピングさせてコンティグ配列とアノテーションを得、最終的に代表とする非加圧群 22655 本、加圧群 54611 本についての解析を行い、成長因子受容体やタンパク輸送関連の遺伝子、転写因子や転写因子制御因子、リン酸化関連遺伝子など多数のシグナル伝達に関連するものが含まれていた。

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、動物実験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。

我々がわが国で初めて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に酷似した下顎頭変形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・軟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がすでにHIV治療の標的とした実用化され、長期使用が予想される現状では、AIDS患者に骨軟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。

我々は本研究にて、PCR発症患者において発現上昇するRANTES等のケモカインが、PCR病態を判定する有力なバイオマーカーとなり得るとの知見を得た。これはマウスのin vivoの結果を初めてヒトPCRの病態に関連づけた新知見であった。

本年度は、臨床面からは引き続き患者から採取したサンプルのデータ解析、および本症

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。

一方、基礎研究の側面よりケモカイン受容体 CCR5KO マウスの骨・軟骨組織の機能・形態学的解析、炎症性の骨形成不全という観点から骨芽細胞の分化抑制機構、および下顎頭の軟骨傷害という3つの異なる側面から詳細に検討した。

また国内外の症例を集め、解析する研究を進め、PCRという用語の改称も含めて合理的な再定義を提唱し、また発症のメカニズムを解明する端緒を作り、それぞれに対する治療法を提案し、かつ予見性を含めて広く議論を求めることを目的とした。

B:研究方法

1. 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病院歯科口腔外科、および東京医科歯科大学歯学部附属病院口腔外科外来に来院し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DPD、NTX、CTXなど骨粗鬆症のバイオマーカー分子と、血中TRACP、NTX、CTX、骨型アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンなど典型的骨代謝マーカーを測定する。骨代謝マーカーについては、骨折リスクなど、骨粗鬆症において保険適応されている一般的な骨量減少・骨折リスクのカットオフ値と比較検討、また同じく血中のケモカイン基質であるMIP-1 α 、およびRANTESの濃度についても測定した。こちらの指標については検査標準値が規定され

ていないことから、健常人ボランティアを募り、その血清を採取し、この平均値と比較した。

また今回から諸文献を参考にして、TNF- α や $\beta 2$ エストラジオール ($\beta 2$ -Est) も調査の対象に加えた。

2. 血液からの DNA 採取：

しかし上述KOマウスの形態変化と患者の血中ケモカイン変動とを結びつける直接的な証拠はなく、患者で確認されたケモカイン変動は、疾患の原因かあるいは病態進行の結果に付随するものなのかの判別はできていない。

この問題点を解決するため本研究では、PCR・骨軟骨代謝異常患者のケモカイン変動を根拠に、ケモカイン分子群と当該疾患との関連性を、血中タンパクレベルに加え遺伝子レベルでも詳細に検討することを試みた。

前述のごとく、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。本研究はまだ緒に就いたばかりであるが、CCR5に関する異常が最も疾病状態に近いと考えている。すでにCCR5については、CCR5- $\Delta 32$ という遺伝子多型が知られているが、現在CCR5異常がどのような疾病に関係するのかは未解明である。よって本研究ではCCR5- $\Delta 32$ を含め患者・コントロール共に、公共のヒトゲノムシーケンスデータベースからの相違を検討することを目的とする。またCCR5とリガンドを共有するCCR1も骨・軟骨代謝に重要であることから、これらの当該リガンド (MIP-1 α 、RANTES など) も含め、それらの遺伝子配列を解明することにより、本疾病が遺伝子疾患であるか

どうか判別できるであろう。該当する責任遺伝子を同定することによって、たとえば受容体・リガンドの阻害、あるいは亢進させる薬物治療等が実現できる可能性がある。

本研究では高血圧症の解析のように量的形質を見るものではなく、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ている。PCR患者・コントロール共に年間約10名、サンプルサイズそれぞれ30名を最終目標として設定している。そのために、前述のいわゆる骨形成マーカー、骨吸収マーカー、ケモカイン受容体リガンド等のタンパク分析と併せ、遺伝子採取のための「研究用」として採血、採尿をそれぞれ一回10ml行うよう説明した。

3. PCR 患者、または下顎頭に変形のみられた患者に関する報告：

当センターを受診し、サンプル回収が可能であった12例の患者の症例登録、およびそのうち1名の治療経過について詳細な記載を行った。

また今年度は2施設の協力を得た。

2007年4月から2011年2月までに東京医科歯科大学歯学部附属病院矯正歯科外来 (顎顔面矯正学分野) を受診した829名 (男性279名、女性550名) のうち、矯正診断時に下顎頭変形を認めた61名について、パノラマX線写真、CT等を用いて下顎頭の平坦化、短小化、骨棘の有無、非対称性を評価した。さらに性別、初診時年齢、不正咬合の分類、治療法についても検討を行った。なお先天異常を伴う症例は本研究から除外した。

また同大学口腔外科外来を受診した PCR 患者の詳細な症状の記載も寄せられた。

4. 炎症性骨代謝異常の機序解明：

(1).GVHD モデル：

11Gy または 3Gy の X 線を移植前日に照射した(C57BL/6 x DBA2)F1 マウス(BDF1: H2^bx^d)に、C57BL/6 マウス(B6: H2^b)から調整した T 細胞除去骨髄(TCD BM)のみ(BMT 群) または TCD BM とともに脾臓 T 細胞を移入し、X 線照射 GVHD モデルを作成した。また、未処置 BDF1 マウスに B6 脾臓細胞を移植し、X 線非照射 GVHD モデルを作成した。

(2). フローサイトメトリー：

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。

(3). 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。

(4). 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*, *Osterix*,

Osteocalcin) 発現を RT-PCR により解析した。

(5). In vitro 共培養系：

X 線非照射 GVHD モデルにおいて、脾臓細胞移植後 7 日目のレシピエント脾臓からドナー T 細胞を磁気分離法により純化し、種々の比率で前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞と骨芽細胞誘導培養条件下で共培養した。また、共培養の際に transwell を使う事で、細胞間接触依存性を検討した。

5. 硝子軟骨初代培養細胞への機械的刺激への応答性：

細胞に培養下で圧力を負荷する装置についてはこれまで報告したシステムを一部改変して使用した (Manome Y, et al. *Cells Tissues Organs*, 2003.)。

軟骨細胞は膝関節のものをモデルとして使用、手術時に摘出した硝子軟骨をチャンバー内で予備培養した後、システムの圧力負荷培養装置の中で 6 時間加圧した。細胞を並行してそれぞれ加圧群、非加圧群に分けて培養、後培養を行った後、試料から抽出して、得られた total RNA から相補鎖 DNA を合成、さらに 2nd 鎖の DNA 鎖を合成した後、DNA/RNA ハイブリドプライマーを使用して RNA 分解酵素の存在下で cDNA を増幅し、得られた配列をロシュ 454 ジュニア型シーケンサーで決定した (ハーバード医科大学整形外科学水野秀一氏との研究成果)。

6. CCR5 ノックアウトマウス(KO)の解析：

本疾患のモデル動物として期待される CCR5KO マウスに対して PCR とは炎症性疾患なのか、非炎症性疾患なのかに焦点を合わせた研究を行った。また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について検討した。

7. データベースに基づく関節リウマチ適正治療の調査:

国立国際医療研究センター病院膠原病科の、RA 診療データベースを用いた。2006 年から作成を開始し、通院者全員の病歴情報（発症日・DMARDs 投与開始日・合併症発症）の入力システムを確立した。2011 年までの登録は 694 人であった。

8. 国際共同研究協力体制基盤整備:

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、我々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。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言、および厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針等の趣旨を尊重し、医学倫理に配慮している。

- ① 研究の対象とする個人の人権の擁護:
- ② 被験者に理解を求め同意を得る方法:
- ③ 研究によって生じる個人の不利益と医学上の利益または貢献度の予測:
- ④ 検体提供の任意性と撤回の自由及び対価、検体使用の制限:
- ⑤ 第三研究機関への試料の提供の可能性:

等について文書を用い説明し、インフォームドコンセントを得た。本研究は各施設の倫理委員会、およびハーバード大学治験審査委員会で承認を受けた手術の廃棄サンプルを用いた。また遺伝子について組み換え等の実験は行われていない。

C:研究結果

1. 血液、および尿検体からのマーカー検索:

協力施設における検査も含め、複数のサンプル採取が可能だった患者を含め 15 例（のべ 18 例）のサンプル収集を行った。一方、9 名の女性の健常者ボランティアからもサンプルの収集を行った。それらを解析した結果、骨粗鬆症を示唆する NTX や DPD が高値の傾向を示し、また CCR1, CCR5 のヒトリガンドである RANTES が健常人ボランティアから得られた値より大幅に変動していた。また途中から調査に加えた TNF- α や β 2 エストラジオール (β 2-Est) の値も若干高い傾向を示した。尿中 CTX も若干の差がみられたが、世界的に検査試薬が不足しており、検査データの蓄積が進まなかった。

本研究の周知が進み、各医療機関より調査を依頼された症例で、症状の進行を自覚している患者に RANTES 値が健常人とほとんど差のない症例もみられた。一方、顎関節について長期にわたる治療とか経過観察が可能であった 2 例では顎関節の違和感や疼痛、運動障害などの軽減に伴って RANTES 値の下降が確認されている。

2. 血液からの DNA 採取：

依然として検体数が少ないうえに、遺伝子検体の収集は行ったものの、遺伝子の解析に難色を示される例も少なくなく、解析を行うにはいたらなかった。

3. PCR 患者、または下顎頭に変形のみられた患者に関する報告：

当センターを受診し、サンプル回収が可能であった 14 例の患者の症例記載、およびそのうち 1 名の治療経過について詳細な記載を行った。

当科受診時より上顎歯列にスタビライゼーション型スプリントを装着したところ、その 2 週間後には疼痛は消失し、開口量の増大もみられた。その後も概して順調に経過し、その後一度も疼痛の再発は起きておらず、またスプリントに対する大きな咬合位の変化は起こっていない。1 例のみから治療の有効性を声高に叫ぶことはできないが貴重な症例として記載されるべきであると思われた。

また東京医科歯科大学歯学部附属病院矯正歯科外来、および口腔外科外来を受診し、下顎頭形態の異常が認められた 62 例の症例の概要、及び集計の結果が報告され

た。

詳細は分担研究の項を参照されたい。

4. 炎症性骨代謝異常の機序解明：

X 線照射 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的に解析した。フローサイトメトリーにより、GVHD 群ではドナー CD4 T 細胞の骨髄浸潤は移植後 4 日目から認められ、その後 14 日目にかけて増加した。

骨髄の組織学的解析では、BMT 群、GVHD 群、いずれも移植後 4 日目にかけて ALP 陽性骨芽細胞の著減を認めたが、BMT 群では 7 日目にかけて回復する一方、GVHD 群では観察期間を通じて ALP 陽性細胞の回復を認めなかった。Real-time RT-PCR により移植後 14 日目における骨芽細胞マーカーの遺伝子発現を解析したところ、GVHD 群では特に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* の発現が減少している一方、前駆細胞以降に発現する *Runx2* の発現は BMT 群と同程度であった。また、X 線照射線量の骨芽細胞マーカーへの影響を検討したところ、*Runx2* の発現は GVHD の有無に関わらず、X 線照射線量が多いほど抑制されていたが、*Osterix*、*Osteocalcin* については GVHD 群において著明な減少を認めた。

これらの結果から、X 線照射 all-HSCT モデルにおける 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抑制であり、重症度には X 線照射量が関与することが示唆された。

GVHD 発症マウスにおける T 細胞依存的

な骨芽細胞の分化抑制を *in vitro* で検証するため、X線非照射 GVHD モデルにおいて誘導されたドナーT細胞または未処置T細胞を前骨芽細胞株 MC3T3-E1 と種々の細胞比率で共培養した。T細胞: MC3T3-E1 = 60:1 の比率において、骨芽細胞分化マーカーの発現がドナーT細胞の添加により未処置T細胞に比較し有意に抑制されていた。この分化抑制は transwell を使用した条件下では解除されていた。

5. 硝子軟骨初代培養細胞への機械的刺激への応答性:

軟骨への負荷が最も高いと考えられる関節内面の軟骨細胞を試料とし、0.5~3.5 MPa, 0.001 to 1 Hz の変動圧を負荷し、細胞で転写される産物の解析を行った。

細胞への圧力負荷を行った後RNAを抽出して遺伝子の転写がどの程度変動するのかについて調べたところ、圧負荷によりRNAの量は急増し72時間で約3倍程度に転写が上昇することが判明した。

次に得られたRNAについて相補鎖DNAを合成して塩基配列を決定し、得られた配列をヒト染色体とマッピングさせてコンティグ配列とアノテーションを得、最終的に代表とする非加圧群22655本、加圧群54611本についての解析を行った。

得られた配列を解析したところ成長因子受容体やタンパク輸送関連の遺伝子、転写因子や転写因子制御因子、リン酸化関連遺伝子など多数のシグナル伝達に関連するものが含まれていた。

6. CCR5 ノックアウトマウス(KO)の解析:

CCR5KOではCCR1KOと同様、対照群となる野生型マウス(WT)に比して頭蓋骨など骨格形状がやや変化しており、顎関節にも低形成や変形が見られ、結果として臼歯部前方位の咬合が開咬状態となっていた。CCR5KOではむしろ厚い皮質骨をもち、その部分の骨塩量も若干高く、骨梁構造も太い反面、骨梁数は少なかった。また骨組織の成長速度にはあまり差がなく、骨端軟骨の成熟の過程に異常がみられた。CCR5KOが骨組織異常を起こさせることが判明した。

骨組織より採取した骨芽細胞のマーカーではWTとほとんど差がないか、osteopontin、osteonectin、osteocalcinなどはむしろWTよりも高い値を示し、MMP-3、MMP-13は低値を示した。RANK-RANKL系のうち、RANKは著しい低値を示した。WTに比べ、血清ALPは差がなく、血清NTXは若干高値であり、血清TRAPは著しく低値であった。

培養骨芽細胞においては、リガンドのCCL4、CCL5(ヒトRANTESに相当)は著しく低産生であり、CCL9、CCL11についてはほとんど変わらなかった。石灰化能ではCCR5KOはやや低値を示したが、BALP活性ではほぼ同等、RANK-RANKL系のうち、骨芽細胞におけるリガンドRANKLの発現レベルはほとんど変わらなかった。

7. データベースに基づく関節リウマチ適正治療の調査:

標準内服薬の使用状況: methotrexate (MTX), sulfasalazine (SSZ):

SSZ・MTXの使用率は75%、77%で、使用薬の殆どを占めた。SSZは、2003年以後

の生物製剤導入により中止例が増えた。MTX 継続率は、Kaplan-Meier 分析で 1 年間で 75%、50%になるのが 8.5 年であった (1387 観察人年)。したがって、内服抗リウマチ薬のみでは、関節リウマチをコントロールできない現状が知られた。

生物製剤の使用状況：

上記の難点を克服するのが、近年導入された抗サイトカイン治療薬である。長期使用成績は、文献報告が少ないので、当科の追跡調査で継続率を検討した。延べ 267 人、観察 505 人年 (infliximab /INF 125 人 etanalcept/ETA 86 人 adalimumab/ADA 20 人 tocilizumab/TCZ 19 人 abatacept 17 人) の Kaplan-Meier 継続率は、薬剤の違いによる有意差がなかった。生物製剤の変更は IFX→ETA (23 人) が最も多く、2 次無効が主因だった(平均 MTX 投与量は 6 mg/W)。

治療に伴う合併症：

ウイルス性肝炎：悪化例はなかった。現在、B 型肝炎の抗体検査を可能な限り多くの症例に実施し、免疫抑制治療による再活性化を警戒する体制をとっている。

結核：2004 年 1 月までに 3 人発症した一方、INH 予防内服を開始した 2004 年 2 月以降の発症はなかった。

非結核性抗酸菌症：発症リスクの高い慢性下気道炎症患者は、RA 患者の 13%を占め、その 25%が喀痰 PCR または培養陽性であることを報告した。以来、発症モニターを続けているが、生物製剤使用者、菌陽性者を含む全 RA において、発症者はない。

ニューモシステイス肺炎 (PCP)：データベース上の RA 患者の PCP 全 9 例の診療情

報を、当科の非関節リウマチ (対照膠原病) 患者の PCP 13 例と比較検討した。

・RA (6/7)：6 例が呼吸不全による紹介搬送

全例に MTX ≤12.5 mg/週投与、うち 4 例に生物学製剤、IFX 2、ETN 1、TCZ 1

・対照膠原病 (13)：ステロイド治療中
RA vs 膠原病での臨床情報

血清 βD グルカン値：289±234 vs 1109±1031
pg/ml、

(p=0.02)

人工呼吸器使用率：4/7 vs 3/13、(NS)

死亡頻度：3/7 vs 0/13 (p=0.03)

RA-PCP では、ニューモシステイス菌体量が少なく、RA 肺の共存と考えられる広範な病変を認め、呼吸不全からの回復が遅れ、続発した細菌性肺炎による死亡が目立った。対照膠原病患者と明確に異なり、MTX および生物製剤の使用者における、重要な監視課題であることが知られた。

8. 国際共同研究協力体制基盤整備：

米国 NIH/FDA clinical protocol に登録を行った。また基礎医学、人類学、歯科学、口腔外科学の各分野に関して外国の研究機関との提携を模索している。引き続き、チェコ共和国カレル大学医学部への働きかけを行っている。

D:考察

1. 血液、および尿検体からのマーカー検査：

PCR 患者にみられる検査値の特徴を評価

するために、より多くの年代でデータを集めることを目標としたが、依然として検体数が少なく、統計学的な処理を行うまでにサンプル数が伸びなかった。

血液検体を解析した結果、またケモカインリガンドである RANTES は n 数が増加しても健常人の値と比べて依然として高値を示す等、本病態を特徴づける検査値であり、PCR の病態を判定する有力なバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。他にも尿中のクレアチニン補正後の DPD や NTX の値が若干高めの値を示すなど、骨粗鬆症を示唆する値を示した。

ケモカインは炎症に関与していることから、TNF- α について調査を行った。コントロール群に比べ、PCR 群は概して高い傾向を示した。とくに 50 代以降のステロイド使用の女性に明らかに高いことがわかった。TNF- α 高値のデータより炎症性疾患の存在は疑う余地はないが、本症への影響の程度について論ずるほどの証拠は得られていない。CCR1, CCR5 双方のノックアウトマウスの顎関節の組織切片からの所見では明らかな炎症が見られなかったことから、この相反する結果を考察することは非常に困難であるが、もしかすると PCR はいくつかのタイプに分かれる可能性もあるのではないかという考察も成り立つ。

また昨今の論文において、 $\beta 2$ エストラジオールは重要な予後判定因子といわれている (Gunson, MJ: Am J Orthodont Dentfac Orthopedics 136: 2009)。本研究においても概して PCR 群に高値を示すケースがみられたが、コントロール群でも高値を示すこともあり、また閉経後の PCR 群や男性では当たり前ではあるが、同値は低値を示す。しか

し、 $\beta 2$ -Est は検体採取時に月経周期をそろえるのが非常に困難であり、海外との経口避妊薬の服用状況の違いなどもありマーカーとして利用するのは困難であるとの印象であった。

また若年例では骨形成・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。

治療に伴う RANTES 値の下降が確認されたことから、同値や NTX, DPD など、そして TNF- α 、 $\beta 2$ -Est などは本症発症のメカニズムの中のある過程を反映していると考えるのが適切であると思われる。

しかし、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、ケモカインと顎関節異常という新たな関連を示唆するデータが得られたことの意義は非常に大きい。

本研究で今までに観察し得た症例より、複合概念である PCR を

1. 低形成であるもの：

すなわち RANTES 値と $\beta 2$ -Est が高い若年者に見られ、高い骨代謝回転型を示す

2. 自己免疫疾患や薬剤投与等による二次的な吸収変化：

RANTES 値と TNF- α が高く、比較的高い年齢層に見られ、低い骨代謝回転型を示す

3. その他（関節円盤等の障害等に起因するもの）：

RANTES が低い傾向にあり、顎関節痛や開口障害など自覚症状が強い。

の 3 型に現時点の知見で分類することが

できると考える。今後各方面からの論議を待ちたい。

また進行性下顎頭吸収 (Progressive Condylar Resorption: PCR) という名称であるが、ICR (Idiopathic Condylar Resorption: 特発性下顎頭吸収) という用語を使う研究者も多く、現在我々の目の前にいる患者の下顎頭が現在進行形で吸収しているケースもあれば、あるいは過去において吸収されたが現在は吸収が止まっているケース、さらに今は無症状であるが、近い将来に下顎頭の吸収が始まってしまう例もあるはずである。原因が特定できない現在の状況では、後者の ICR (特発性下顎頭吸収) の方が実態に即していると考えられる。

本研究で何種類か示された検査値のばらつきもさらに多くの症例を解析できるようになればいくつかのパターンに収束してくるかもしれない。

2. 血液からの DNA 採取 :

依然として検体数が少ないうえに、遺伝子検体の収集は行ったものの、遺伝子の解析に難色を示される例も少なくなく、解析を行うにはいたらなかった。依然として検体数が少ないうえに、遺伝子検体の収集は行ったものの、遺伝子の解析に難色を示される例も少なくなく、解析を行うにはいたらなかった。

顎関節の異常やかみ合わせの異常を調べるための採血、さらには遺伝子検査という一見過剰反応とも思える一連の流れを説明できるように我々も努力しなければならない。

3. PCR 患者、または下顎頭に変形のみら

れた患者に関する報告 :

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治療法・術式を選択する必要がある。

東京医科歯科大学矯正歯科外来からの報告では、

1. 下顎頭変形患者は男性においては 13 ~ 29 歳でのみわずかに認める一方、女性では 13 歳以上の各年齢層で一定して高い割合で認められることから、女性特有の発症要因の存在が示唆された。
2. 下顎頭変形は平坦化、短小化、骨棘、対称性の 4 項目はそれぞれ重複し、多様な変形所見を認めた。
3. 下顎頭変形を認めた症例ではその多くに顎関節雑音が認められた。
4. 外傷の既往や全身疾患の影響が疑われる症例はわずかに認められたが、その関連性は今後さらなる検討が必要である。
5. 不正咬合の分類において、上顎前突を呈した症例が多かった要因として、下顎頭の変形 (特に短小化) が下顎の clockwise rotation を誘発したと推察された。
6. 治療法として外科的矯正治療の施行や矯正用インプラントアンカーを用いた症例が多かった要因として、下顎頭変形による骨格的不調和が大きく関与している可能性が考えられた。

文献的には、下顎前方移動術後に生じる後戻り率は、術後 2 年で 7.5 ~ 36.5 % と報告さ

れ、Eggenespergerらは、術後14か月での後戻り率は29.0%であったのに対し、同一患者の12年後での後戻り率が49.0%に増加していることを示し、術後の長期予後では、下顎頭吸収に起因する後戻りが生じている可能性を示唆している。

当科を受診したPCR患者についてはスタビライゼーション型スプリントを用いた例では患者の主訴にあたる症状の改善がほぼ全員にみられた。これは全歯牙を接触させることで特定の歯牙に咬合力が集中するのを防ぎ、咬合位の安定と顎関節のリラクセスを図ることができるといわれている本スプリントの治療効果が顕著に現れたものと考えられる。また装着時に決定した咬合位は2年以上経ってもほとんど調整の必要がないことから考えるとこのスプリントの装着以降顎関節の新たな吸収変化は起きていない、つまり治癒かどうかは不明であるが、少なくとも下顎頭吸収の進行が停止していることが強く示唆された。

経時的にRANTES値が測定できた2症例においては咬合の安定化や顎関節の違和感、疼痛の軽減ともにその値の低下が観察されている。

一方、東京医科歯科大学口腔外科の症例において、下顎頭への負荷軽減の目的にスタビライゼーション型スプリントを使用したのが、徐々に前歯部開咬を認め、下顎頭の吸収を抑制することは困難であったといい、これは本症の治療の困難さを身近に示した例である。

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、積極的に上顎臼歯部を圧下し、下顎の時計方向の回転による開咬の改善を図

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、現時点ではスタビライゼーション型スプリントの装着とともに、歯科矯正治療中の患者においては有効なオプションの一つと思われる。

4. 炎症性骨代謝異常の機序解明：

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。今回、X線照射GVHDモデルにおける骨芽細胞障害を経時的に解析する事で、allo-HSCTの前処置として行う放射線照射が、Runx2陽性骨芽細胞前駆細胞を重度に障害していることが明らかになった。X線非照射GVHDモデルでは骨芽細胞の減少が一過性であるのに対し、X線照射GVHDモデルでは骨芽細胞の減少は不可逆的であり、X線照射による非特異的な間葉系細胞の傷害が骨芽細胞障害の重症化に重要なステップとなっていることが明らかになった。また、CD4 T細胞依存的な骨芽細胞障害を再現すべく、*in vitro* 共培養系を検討したところ、GVHDマウスから調整したドナーT細胞が骨芽細胞分化を抑制する一方、ナイーブタイプを主体とする未処置T細胞ではこの抑制は認めなかった。*In vitro* 共培養系におけるドナーT細胞による骨芽細胞分化抑制は細胞間接触依存的であることから、これまで骨髄GVHDへの関与が示唆されているFasLが主体となっている可能性がある。一方、FasLをT細胞から

機能的に欠損させても骨髄 GVHD は完全には回避出来ないことから、FasL 非依存的な骨芽細胞障害経路が存在することが示唆されており、今後その分子実態を明らかにする必要がある。CD4 T 細胞依存的な骨形成不全の分子機序の全容を明らかにすることで、免疫異常に起因する骨形成抑制の診断マーカーと治療法を確立し、PCR の機序解明に貢献出来ると期待された。

5. 硝子軟骨初代培養細胞への機械的刺激への応答性：

下顎頭では繰り返し咬合による圧力が関節面に負荷されている。関節面の軟骨について外部からの刺激の影響を調べるため、軟骨細胞に圧力を負荷して培養による *in vitro* の影響を調査した。軟骨にとって圧力の存在は分化や基質の誘導に重要で、単純に圧力を負荷するだけでも collagen type-2, keratan sulfate, や integrin 抗体に反応する軟骨基質が増加する。今回の結果からも6時間という短時間、生理的範囲内の圧力負荷でも RNA の転写量の上昇が認められた。

今回行ったシークエンサーで RNA を解析するいわゆる RNA-seq 法では定量性には欠けるため、上昇した遺伝子量は非負荷時に転写されている遺伝子のリード数のみなのか新規に転写が行われた遺伝子の数なのかを厳密に区別することはできない。しかしマッピングしたコンティグ配列の数が増えているので新たに転写される遺伝子が多く存在することが窺えた。

一般に圧力などの物理的ストレスを細胞に負荷すると多くの細胞で刺激直後からストレス関連の急性相反応タンパクの発現が

上昇する。骨代謝に関してこれらの急性相の反応の影響を除くため、本研究では72時間後の時点で転写量に変化している遺伝子に的を絞って解析を行ったが得られた塩基配列についてはリン酸化タンパクや脱リン酸化タンパク、転写因子などが含まれていた。この点について破骨細胞の組織マクロファージとしての役割を含めた時間経過や細胞間刺激を考慮した解析が必要になる。またリード数が多かった遺伝子の染色体座は非加圧群、加圧群で全体として大きな差が認められなかったが負荷により第4染色体のものが減少するなど若干の変動が認められた。変動するもののなかに Y 染色体のものが少なかったことは男女での反応にあまり差が無いことを示唆しているのかもしれない。ミトコンドリアの遺伝子関与が少なかったがこれは関与が少ないタイミングを図って実験がなされたからである。骨芽細胞や破骨細胞活性化のシグナルについてはまだ十分に解明されていない面もあるが今回の研究から少なくとも破骨細胞の活性化について軟骨への圧力が影響している可能性が示唆された。関節面の軟骨が関節の直下にある破骨細胞や骨吸収に及ぼす影響についてケモカインやケモカイン受容体の発現やシグナル伝達と共にさらに調べていく必要がある。

6. CCR5 ノックアウトマウス(KO)の解析：

免疫系細胞の遊走を制御するケモカイン受容体 CCR1 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* において証明した。