

201128117B

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～平成23年度 総合研究報告書

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22年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者

丸 岡 豊

平成24（2012）年3月

# 目次

## I. 総合総括研究報告書

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. 総合分担研究報告書

### 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  
PCR 患者の治療過程  
CCR1、および CCR5 ノックアウトマウスの解析  
データベースに基づく関節リウマチ適正治療の調査  
丸岡 豊 (国立国際医療研究センター 歯科口腔外科 科長) . . . . . 37
- 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) . . . . . 73
- 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た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と下顎頭吸収を伴う不正咬合に対する対応  
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) . . . . . 77

### 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) . . . . . 83

- 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）・・・・・・・・・・91

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  
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）  
山本健二（国立国際医療研究センター研究所 副所長）  
丸岡 豊（国立国際医療研究センター 歯科口腔外科 科長）・・・・・・105

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する業績一覧・・・・・・・・・・113



# I. 総合総括研究報告書

平成 22・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 総合総括研究報告書  
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 同 ・研究所・兼任研究員

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 同 ・膠原病科・科長  
桂川 陽三 同 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・山本センター長室・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  
名古屋大学・医学部

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  
同 ・エイズ治療 研究開発センター・研究員

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我が国初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、診断基準さえ統一されていず、治療に苦慮している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った。

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。

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。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。また PCR 患者から採取した検体のデータより、TNF- $\alpha$  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を残すこととなった。

基礎研究班は、それぞれ専門分野からのアプローチを行った。

まず、本疾患のモデル動物として期待される CCR1KO マウス、および CCR5KO マウスに対して骨形態等の解析、培養骨芽細胞の解析をおこない、骨芽細胞の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、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。また CCR5 の遺伝子欠損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が障害されていることから、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。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、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。

ケモカインレセプターの異常は中枢神経への HIV 感染にかかる AIDS 脳症の発症と関連していることから、骨以外にも中枢神経系への影響を調べる必要性があった。とくに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。

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。

国内外の医療機関と協力して研究を進める過程で多施設にて検体採取を行うことなるため、各研究機関を調整するコーディネーターをおいた。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。そしてさらに一歩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。

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、遵守した。

## A: 研究目的

顎関節は側頭骨の下顎窩と下顎骨の下顎頭、そして関節円盤などから構成され、それらの協調運動により下顎骨の多彩な動きが可能になる。下顎頭は、その近位末端にある線維軟骨、および骨部そのものが機能的なリモデリングを繰り返し、成長に伴う顎位の変化や咬合の変化に適応している。しかし、様々な原因でそれらの位置、性状や協調の変化が起こると開口障害、疼痛、関節雑音のすべて、もしくはそのいずれかを生じる、いわゆる顎関節症が発症すると考えられている。歯科口腔外科において、顎関節症はう蝕、歯周病に次ぐ三大疾患の一つといわれ、最近受診患者数が急激に増加している。

顎関節症に関する臨床的研究は比較的新しく、例えば、リウマチ性顎関節炎や顎肩腕症候群などと混同して語られることもしばしばである。そして、本研究の主題である進行性下顎頭吸収(Progressive Condylar Resorption: 以下PCRと略す)も現時点では変形性顎関節症の一亜型としての認識が一般的であり、両者を明確に区別し得る診断基準があるわけではない。

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、結果として下顎枝高径の短縮、下顎後退、下顎の時計回りの回転による前歯部開咬などを呈する病態といわれている。現在までのところ、その発症の原因は明らかではないが、リウマチ性関節炎や全身性エリテマトーデスなどの全身疾患との関わりやステロイド剤の服用、外傷の既往との関連が報告されている。これらに加

えて顎矯正手術による一期的な下顎の前方移動に伴う下顎頭への負担過重と関節円盤の転位に伴う下顎頭の avascular necrosis (AVN:無血管性壊死) 変化や関節組織でのTGF- $\beta$ 濃度の減少などによる突発的な骨吸収機転なども発症原因として示唆されている。また若年者発症例においては下顎頭の成長障害という形で病態が現れる。これらの病態の本質は下顎頭の「機能的でない不適切なリモデリング」(dysfunctional remodeling)である。模式図を図1に示す。

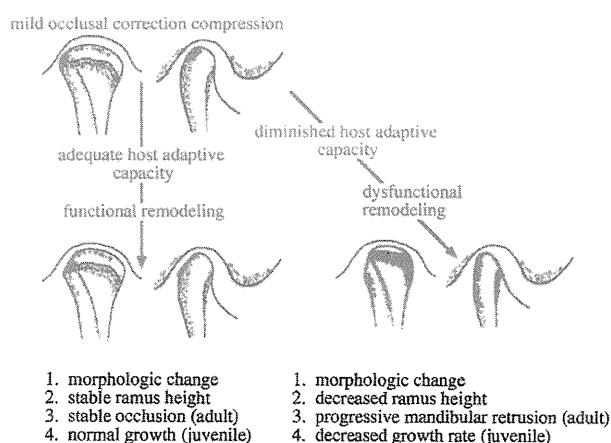


図1：下顎頭の「機能的でない不適切なリモデリング」

(Arnett GW et al. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1996 より引用)

またPCRの患者は相対的に下顎が小さく後退位にあるため、しばしば単なる上顎前突症、もしくは下顎後退症と診断され、歯科矯正治療を受けていることが多い。これらの患者は下顎骨前方移動術により咬合の改善を図るものの、皮膚や付着筋肉などによる後戻り力が加わり、下顎頭にかかる負担増大のためにその吸収が進み、手術

の甲斐なく下顎の後退がさらに進行するばかりでなく、正常な顎運動が営めなくなるといふ悲劇も起こっている。海外においてはこのために数度の手術を繰り返し、結局下顎頭がほぼ全部吸収してしまった例も報告されている。

このようにPCRはその症例数の少なさ、また発症原因の未解明などから、我々歯科医、口腔外科医の間でも認知度は必ずしも高くない。もしPCRの診断を容易にし得るのであれば、またその予後を確実に予想しうるのであれば、不要な手術も避けることができ、またPCRを恐れるあまり本来は必要な手術や処置が行われないという事態を避けることができるであろう。

一方、AIDSに対する化学療法はHAART療法の開発により格段の進歩を遂げたが、薬剤耐性HIVの出現が大きな問題となっている。薬剤耐性変異株にも強力な活性を示し、かつ薬剤耐性発現の起こりにくい新規の薬剤開発の一例としてCD4と共にHIVのレセプターとして機能するケモカインレセプター、CCR5に対するアンタゴニストの研究が進められており、同薬は逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害薬などこれまでの薬とは異なる作用メカニズムで予防と治療に役立つことが期待されている。その1つであるAK602/GW873140は米国におけるphase 2a臨床試験でHIV感染者への短期間投与により良好なHIV抑制効果を示したが、CCR5阻害剤が宿主(生体)側因子であるCCR5を阻害することによる長期的な生体への影響やその機序については現在のところ未知であり、実際そのうちの一つ、apaplavirocは肝毒性のため、

開発が中止されたことから詳細な検討が求められている。

我が国において、以前から炎症という観点から研究されていたCCR5のノックアウト(KO)マウスを再検討したところ、野生型に比べて骨密度は薄く、骨梁空隙が大きく、皮質骨が薄いなどの骨粗鬆症的な特徴を持つことがわかった。またそのマウスの頭蓋骨は、下顎枝長が短く、前歯部開咬を示した。さらにCCR1KOマウスでは骨粗鬆症の傾向に加え、骨端軟骨は明らかな低形成であり、あたかもPCRのごとき外観を示した。全身的に、あるいは少なくとも下顎頭付近において局所的に骨・軟骨代謝異常を起こしている可能性があり、それがPCRのごとき形態学的特徴を表していると考えられる(図2)。

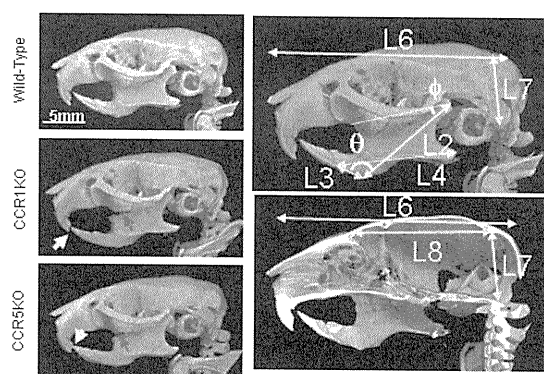


図2: 野生型、CCR1KO、およびCCR5KO各マウスの乾燥頭蓋側面写真。

右側矢印で示されるように臼歯部の開咬、および左側矢印で示される前歯部の浅い被蓋がみられる。右半側は各計測点を示す。

すでに我が国でもCCR5拮抗薬が実用化されているが、HIVの治療は大きく前進することになっても、その代償として骨粗鬆症やPCRが発症してしまったならば、生き物にとって最も基本的な本能である摂食機能に重大なる影響が及んでしまう。もちろん軟骨や骨の代謝に影響が出るKOマウスはCCR5やCCR1に限ったことではない。またヒトと齧歯類とではとくに前歯の発生、性状などに明らかな差があり、マウスにおける表現形がそのまま人間に当てはまるわけではないことは十分に理解している。PCR発症の患者の下顎頭の軟骨や骨のサンプリングは現時点では倫理的にも技術的にも非常に困難であり、現象を直接調べることは不可能である。また顎関節包からの滑液の採取は比較的容易で有用な方法ではあるが、場合によっては著しい疼痛を与えるため、治療目的以外で同意を得られる可能性は低く、PCRとケモカインとの関連が強く疑われてから以降に行うべきであると考えられる。そのため、間接的に血液や尿中のマーカーの値から生体内で起きているイベントを推定するのが現実的な方法と思われる。

前述の如く、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。

本研究においては以前から我々が進めていた研究をさらに深化・発展させ、それぞれの専門分野からの視点で本症を考え、研究を進めることを第一の目標とし、次のように業務を分担した。

臨床研究班：

診断基準・用語などの情報が錯綜しており、それを明確にするのが臨床研究班の最大の目標で、PCR患者の登録と血液・尿などの検体採取である。また本疾患患者の経過、そしてその患者に対して施行した治療方法に関する評価を行う。

必要であれば整形外科や膠原病内科などの専門医との連携をとり、全身状態の精査もを行い、基礎疾患およびその治療から影響を受けていると思われる症例に関しての新たな知見を得る。

また、国内外の研究機関との共同研究を積極的に進めていくために研究のコーディネートを重視する。その際、遺伝子解析研究を安全確実に進めるよう、関係手続きを進めるとともに他機関に的確な情報を与える。

引き続き全国の医療機関に行ったアンケート結果の分析、さらに多くの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などを加えた。

#### 基礎研究班：

基礎研究の側面より本症のモデル動物と目されるケモカイン受容体 CCR5KO マウス、および CCR1KO 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、および下顎頭に隣接する脳頭蓋の研究、さらには下顎頭軟骨への機械的刺激による傷害といういくつかの異なる専門分野からのアプローチで詳細に検討した。

#### 生物統計・臨床データ管理班：

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、検討を行った。

また集まるサンプル数に限界があると思われたため、国内、および報告数の多い海外の症例を集めて、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. 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、国立国際医療研究センター病院のサイトからアクセスし、インターネット上で回答を得る方式を原則とした。アクセス不能の場合はアンケート用紙をプリントアウトし、送付してもらった。

アンケートの設問は、選択式のものを主とし、また最大3例まで記載してもらい、それ以上の症例数がある施設は追加のアンケートファイルを送付することとし、できるだけ回答者のための便宜を図った。

アンケートの内容や記入方法などは分担研究の項に示す。

### 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病院において、歯科口腔外科に来院し 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。また東京医科歯科大学歯学部附属病院顎口腔外科を受診した患者からもサンプル採取を行った。

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(BAP)、オステオカルシンなど典型的骨代謝マーカーを測定した。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 $\alpha$ 、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。

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

### 3. 血液からの DNA 採取 :

現段階では、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クエ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 $\alpha$ 、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

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。

#### 4. 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。

また東京医科歯科大学の協力を得た。2007 年 4 月から 2011 年 2 月までに同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。

さらに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。

#### 5. CCR1 ノックアウト(KO)マウスの解析：

##### (1). 骨形態解析：

CCR1KO 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 法にて骨基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。

##### (2). 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。

##### (3). 破骨細胞分化解析：

CCR1KO 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。

#### 6. CCR5KO マウスの解析：

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も前項と同様に検討した。

#### 7. CCR1, CCR5KO マウスの顎関節の 微細構造解析：

ホルマリンにて固定後、顎関節周囲を切り出し、前頭断にてスライスし、アルシアンブルー、およびヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。

#### 8. チェコ・カレル大学所蔵近世チェコ人の 頭蓋骨分析：

頭蓋骨の頭長幅指数において、白人は長頭型が多く、上顎前突の形態を取りやすいと言われている。かつ PCR の報告はほとんどが欧米からなされている。

今回、チェコ共和国プラハ市のカレル大学医学部には 16 世紀以降の頭蓋骨標本が多数所蔵されていることがわかった。チェコ共和国は人種・民族の交雑が極めて少なく、中世以降におけるペストの大流行を生き延びた、前述の CCR5- $\Delta$ 32 という遺伝子多型をもつ人々が人口の一定数含まれているという。そこで同大学に所蔵されている 16 世紀以降の頭蓋骨の形態学的分析を行い、その特徴の有無を検索した。なおスペースと時間の関係で、その場では写真を撮影し、後日その画像を分析するという方法で行った（図 3, 4, 5）。

下顎角の角度 Gonial angle は PCR などを起こす患者は基準値よりも大きいといわれており、歯牙の有無を問わず測定可能である。

また前顔面高と後顔面高の差が大きいことも知られているが、歯牙の喪失がみられる検体もあるため、臼歯部の歯牙が残り、咬合関係が保たれていると見なされた検体に関しては、下顎下縁平面とフランクフルト平面（眼耳平面）のなす角度、すなわち FMA の角度を測定することを考えた。

分析項目は頭長幅指数、下顎角の角度 (Gonial angle)、condylar inclination（関節突起の傾斜角）、フランクフルト平面と下顎下縁平面のなす角 FMA である。

頭長幅指数は、脳頭骨の最大幅、最大長を測定し、最大幅を最大長で割った数字に 100 を掛け、頭長幅指数を求めた。

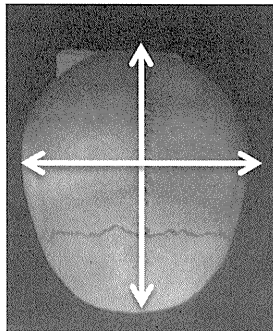


図 3 : 頭長幅指数の算出.

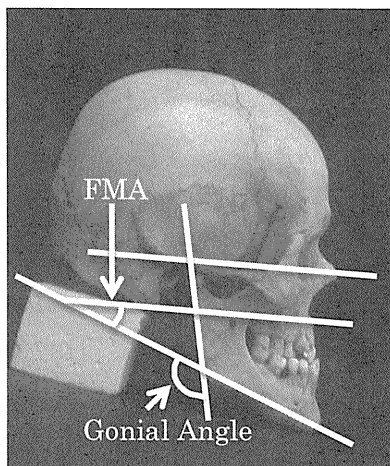


図 4 : 分析項目

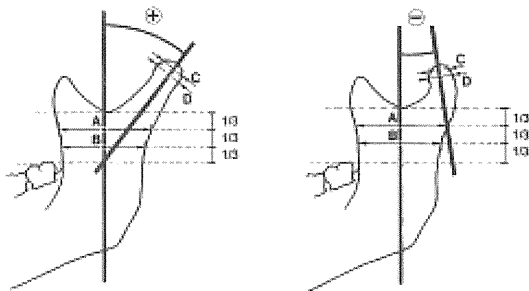


図 5 : condylar inclination の説明

(Hwang et al, Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 32, 103-111, 2004. より引用) Condylar inclination (関節突起の傾斜角: 図参照) を引用し、関節突起の「後方への傾斜度」を測定した。

## 9. 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<sup>bxd</sup>)に、C57BL/6 マウス(B6: H2<sup>b</sup>)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). 骨髄キメラマウス :

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  $5 \times 10^6$  個/マウス移植した。移植 2 ヶ月後、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 (bm12→[B6→bm12]モデル)。

### (3). 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。

### (4). 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。

#### (5). 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。

#### (6). 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。

本研究で行った全ての動物実験は、各種法令および指針を遵守し、動物愛護を十分に配慮した上で遂行した。

#### 10. 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) 。

#### 11. 顎顔面頭蓋に影響を与えうる中枢神経系細胞より単離したマイクログリアに発現する 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マイクログリア細胞を濃縮した。これらの細胞に *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) ( $1.7 \times 10^8$  CFU/ml (原液)) を MOI=10 で感染させ、24 時間培養、マイ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。

#### 12. 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年末までの登録は694人であった。

### 13. 国際共同研究協力体制基盤整備:

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ール翻訳のコーディネートをを行った。

(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。