

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K11357

研究課題名(和文) 歯槽骨改造現象を制御する骨細胞力学情報伝達機構の時空間的・分子細胞学的解析

研究課題名(英文) Spatio-temporal and molecular cytological analysis of the osteocyte signaling mechanism controlling alveolar bone remodeling

研究代表者

江尻 貞一 (Ejiri, Sadakazu)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：40160361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：メカニカルストレスによる歯槽骨改造現象において骨細胞・骨芽細胞が行う力学情報の伝達現象を時空間的に分子細胞学的に解明する事を試みた。その結果、骨細胞は閾値を越えたvon Mises応力を感じることによってsclerostinの産生を抑制することが示された。骨細胞は、メカニカルストレス負荷後6時間でsclerostin産生を停止する一方、メカニカルストレス除去後6時間で骨細胞のsclerostin産生分泌は回復した。また、メカニカルストレスは骨芽細胞の分化を急速に促進し、その過程でOPNとOCNの遺伝子は、正常状態とは異なる発現順を示すことが明らかになった

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体内で骨細胞がどのような方向や強度のメカニカルストレスに対しどのように反応して骨組織を維持・変えているのかを探る世界的に見ても初の研究である。生体内におけるメカニカルストレスの変化によって誘導される制御因子の組織・細胞内動態が解明されることで、骨代謝疾患治療において最も重要な骨改造現象の理解に多大な発展が見込める。本研究は、メカニカルストレスに対して骨細胞が行う骨改造現象制御にどのような力学的条件が最適であるか、その一端を解明することが可能であり、歯科領域においては歯科矯正治療や歯槽骨再生療法における、生体力学的、分子細胞学的基盤を確立するために必要不可欠な研究である

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the osteocyte signaling mechanism controlling alveolar bone remodeling induced by mechanical stress using spatio-temporal and molecular cytological analysis. Osteocytes were able to respond to von Mises stress above the threshold and their sclerostin production was suppressed 6 hours after adding mechanical stress. While the sclerostin-producing and secretion of osteocytes was restored at 6 h after mechanical stress removal. Mechanical stress rapidly promoted the osteoblast differentiation, and in the process, the OPN and OCN genes were shown a different order of expression pattern compared with the normal state.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：メカニカルストレス 歯槽骨 骨細胞 sclerostin SOST mRNA 矯正力

## 1 . 研究開始当初の背景

近年、骨組織のメカニカルストレス感知機構として骨細胞が形成する骨小腔-骨細管ネットワークが関与していることが明らかになってきた。また、メカニカルストレスを感知した骨細胞が sclerostin(SCL)、RNKL、OPG を産生分泌することで骨芽細胞や破骨細胞の活動性を制御している可能性が示唆されている。しかし骨細胞が生体骨組織内でどのような種類や強度のメカニカルストレスに対して応答するかは明らかにされていなかった。また、骨細胞の産生する SCL は骨細管を通じて骨芽細胞へ輸送され、骨形成抑制をされるとされるが、骨細管を介した SCL の輸送過程を微細構造学的に観察した報告は皆無であり、メカニカルストレスによって誘導される骨改造現象と骨細胞による SCL 産生の動態に関する生体内での現象を時空間的に詳細に検索した研究はほとんど報告されていなかった。

## 2 . 研究の目的

本研究課題では、メカニカルストレスによって誘導される歯槽骨の改造現象を制御するために骨細胞および骨芽細胞が行う力学情報の伝達制御メカニズムを時空間的に分子細胞学的に解明する事を目的とし、以下の実験をおこなった。

**(1) 骨細胞が反応する応力の種類・強度に関する解析：**歯の生理的移動が生じるラット歯槽骨を用い、種々の応力分布と強度に関する有限要素解析を行い、その結果とメカニカルストレスに呼応して骨細胞からの産生分泌される SCL の局在分布とを比較検討することで、骨細胞が SCL 産生調節において反応する応力の種類と強度について解析した。

**(2) メカニカルストレスを負荷した際の歯槽骨骨細胞の sclerostin(SCL) 産生能変動の解析：**ラット上顎臼歯部歯槽骨を用いて、矯正力によるメカニカルストレスを加えた後、24 時間以内の骨細胞の *SOST*mRNA の発現状態と骨細胞および骨細胞周囲の SCL 免疫局在の分布を経時的に検索し、メカニカルストレスに対する骨細胞の SCL 産生能の変化と骨基質中の SCL の動態を解明した。

**(3) メカニカルストレスを除去した際の歯槽骨骨細胞の SCL 産生能変化の解析：**ラット上顎臼歯部に挿入したエラスティックを除去し、メカニカルストレスを減少させ、その変動に伴う骨細胞の SCL 産生能の変化と骨基質中の SCL の局在変化を検索し、骨細胞のメカニカルストレスに対する反応機序の解明を試みた。

**(4) 張力刺激により分化促進された骨芽細胞における非コラーゲン性骨基質タンパクの発現過程の解析：**機械的伸展刺激が骨芽細胞の分化過程における骨基質タンパク質の遺伝子発現パターンに与える影響を明らかにするために、頭頂骨矢状縫合部に、*ex vivo* で伸展刺激を加えて骨形成を促進させ、基質形成が始まる 24 時間、石灰化が開始する 48 時間において非コラーゲン性タンパク質の遺伝子発現状態を形態学的に検索した。

## 3 . 研究の方法

**(1) 骨細胞が反応する応力の種類・強度に関する解析：**ラット上顎歯槽骨の  $\mu$ CT 画像よ

り、歯・歯槽骨・歯根膜に物性値を設定した3Dモデルを作成し、歯に18Nの仮想咬合力を荷重した際の歯槽骨内の圧縮応力・引張応力の分布を有限要素法により解析した。次にモデルを作製した試料の同一部位において、骨吸収部位を示すTRAP陽性破骨細胞の分布と骨形成を表わす二重骨標識部位を検索し、骨吸収部位に圧縮応力が、骨形成部位に引張応力が分布するように荷重条件を最適化した。その後、SCLの免疫局在を検索し、同一部位における圧縮・引張応力およびvon Mises応力の分布と比較した。

**(2)メカニカルストレスを負荷した際の歯槽骨骨細胞のSCL産生能変動の解析:**ラットを用い、上顎第一臼歯・第二臼歯間に矯正用エラスティックを挿入し第一臼歯を近心移動させた。無処置を対照群、処置直後を0時間群とし、処置後の時間に応じて3時間群、6時間群、12時間群、18時間群、24時間群の7群に分け、各時間にパラホルムアルデヒド液で固定し、上顎骨を摘出した。μCT撮影後、試料を脱灰、パラフィン切片を作製し、ラットSOSTのジゴキシゲニン標識RNAProbeを用いて*in situ* Hybridizationを、ヤギ抗マウスSCL抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。観察は上顎第一臼歯近心口蓋根(MP)-遠心口蓋根(DP)間の根間中隔歯槽骨を近心部、中央部、遠心部、頬側部、口蓋側部に分けて行った。

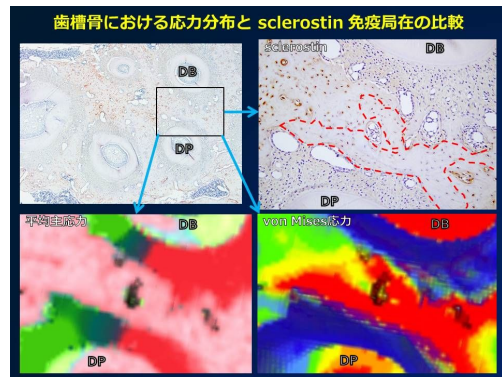
**(3)メカニカルストレス除去時の歯槽骨骨細胞のSCL産生能変化の解析:**ラットを用い上顎第一、第二臼歯間にエラスティックを挿入し、24時間矯正力を負荷した。その後、直ちにパラホルムアルデヒド液で固定した24時間装着群、エラスティックを除去し、6時間後に固定した除去後6時間群および除去後24時間後に固定した除去後24時間群を作製した。未処置群はエラスティックを装着せずに固定した。試料はμCT撮影後、脱灰パラフィン切片を作製し、SOSTmRNAに対する*in situ* HybridizationとSCLに対する免疫染色を行った。観察部位は上顎第一臼歯の近心根(M)と近心口蓋根(MP)間の根間中隔歯槽骨(M-MP)および近心口蓋根(MP)と遠心口蓋根(DP)間の根間中隔歯槽骨(MP-DP)とした。

**(4)張力刺激により分化促進された骨芽細胞における非コラーゲン性骨基質タンパクの発現過程の解析:**生後4日齢マウスの頭頂骨を、矢状縫合部を保存した状態で切り出し、矯正用ワイヤーバネ装置により、縫合部を拡大する方向に持続的伸展刺激0.2gを加えた状態(伸展刺激群)あるいはバネ装置を固定して刺激を加えない状態(対照群)で、24、48時間培養した。また、切り出した直後の組織を0時間群とした。試料はパラホルムアルデヒド溶液で固定しパラフィン連続切片において、bone sialoprotein (BSP)、osteopontin (OPN)、osteocalcin (OCN)の発現局在を*in situ* hybridizationによって検索した。

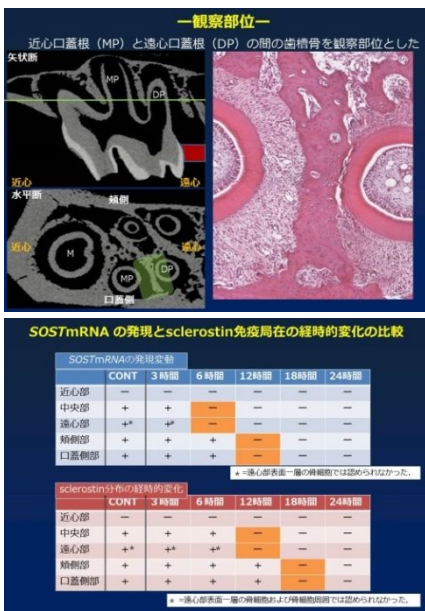
## 4. 研究成果

**(1)骨細胞が反応する応力の種類・強度に関する解析:**最適化した荷重条件下では、圧縮応力が分布する領域の骨表面ではTRAP陽性破骨細胞による骨吸収が認められ、引張応力の分布する領域の骨表面では骨形成を示す骨標識が認められたが、骨細胞が産生・分泌するSCLの免疫局在と圧縮応力・引張応力との間に明瞭な対応は認められなかった。一方、SCL免疫局在はvon Mises応力の分布と対応しており、30MPaを越えるvon Mises応力が分

布する領域では免疫局在は認められなかった。骨細胞は一方向性を有する圧縮・引張応力ではなく、全ての突起に加わるひずみエネルギーの総和としての von Mises 応力に反応していると考えられる。また骨細胞は von Mises 応力に対する反応閾値を持っており、閾値を越える強度の応力を感知することで SCL の産生が抑制されることが示唆された。



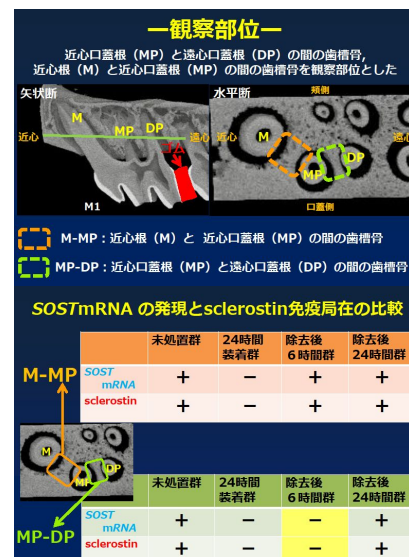
### (2) メカニカルストレスを負荷した際の歯槽骨骨細胞の sclerostin 産生能変動の解析：対照群



の根間中隔近心部歯槽骨では、SOST mRNA の発現も SCL の免疫反応も認められなかったが、根間中隔の中央部、遠心部、頬側部、口蓋側部の骨細胞は SOST mRNA を発現しており、SCL の免疫反応も陽性であった。実験群では、処置 6 時間後に根間中隔中央部と遠心部の骨細胞で SOST mRNA の発現が認められなくなったことより、骨細胞はメカニカルストレスが加わると 6 時間以内に SCL 産生を抑制することが明らかになった。またメカニカルストレスによって骨細胞の SOST mRNA の発現が消失する時期と SCL が消失する時期に部位差が認められたが、いずれの部位でも骨細胞の SOST mRNA の発現が消失してから 6 時間後にその領域の SCL が消失することが明らかとなった。

### (3) メカニカルストレスを除去した際の歯槽骨骨細胞の sclerostin 産生能変化の解析：

未処置群の歯槽骨では殆どの骨細胞に SOST mRNA の発現が認められ、細胞周囲に SCL 免疫陽性反応が認められた。エラスティック 24 時間装着群では、頬側と口蓋側の皮質骨を除き、根間中隔の骨細胞では SOST mRNA の発現と SCL 免疫陽性反応は認められなかった。除去後 6 時間群では近心根と近心口蓋根間の根管中隔の骨細胞において SOST mRNA の発現と SCL 免疫陽性反応が認められたが、近心口蓋根と遠心口蓋根間の根管中隔では SOST mRNA の発現も SCL 免疫陽性反応も認められなかった。除去後 24 時間群では、近心根と近心口蓋根間および近心口蓋根と遠心口蓋根間の根管中隔の骨細胞において SOST mRNA の発現と SCL 免疫陽性反応が認められた。24 時間矯正力を加えることにより消失した骨細胞の SCL 産生能は、矯正力除去

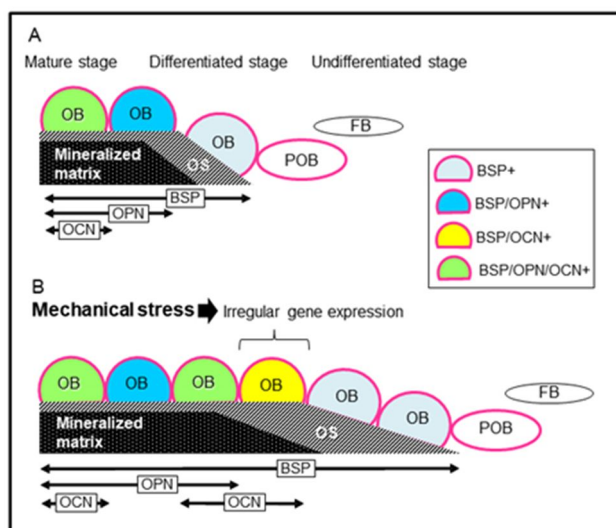


後 6 時間で回復することが示された。しかしながら、歯槽骨の部位による骨細胞の反応性に違いが示されたことから、エラスティック挿入によって生じるメカニカルストレスの部位による強度差によって骨細胞の SCL 産生能の回復時間が異なる可能性が示唆された。

#### (4) 張力刺激により分化促進された骨芽細胞における非コラーゲン性骨基質タンパクの

**発現過程の解析：**頭頂骨縫合部では、骨芽細胞は分化の進行に従い、BSP、OPN、OCN の遺伝子を順番に発現していた。一方、伸展刺激を与えると培養 24 時間後には、頭頂骨縁に、伸展刺激の影響下で新たに分化した多くの骨芽細胞が観察され、それらの細胞の間には多量の類骨が観察された。この類骨表面の骨芽細胞では BSP 遺伝子の強い発現が見られ、一部の骨芽細胞では OPN 遺伝子も発現されていたが、OCN 遺伝子はほとんど発現していなかった。48 時間後、頭頂骨縁には 24 時間よりもさらに多量の類骨が観察され、その一部は硬膜側において石灰化を開始していた。類骨表面の骨芽細胞は BSP 遺伝子を強く発現し、それらの細胞の中で OPN 遺伝子を発現する細胞

は 24 時間よりも多かった。一方、OCN 遺伝子は、伸展刺激の影響下で分化したと考えられる骨芽細胞のなかで、OPN 遺伝子を発現していない細胞にも発現されていた。従って、伸展刺激によって分化を促進された骨芽細胞においては正常であれば OCN の遺伝子が発現しないような分化の早い段階にある骨芽細胞でも OCN の遺伝子が発現されることが明らかになった。以上より、機械的伸展刺激は、骨芽細胞の分化過程における非コラーゲン性タンパク質の遺伝子発現パターンに影響を与えることが示唆された。



## 5. 研究成果のまとめ

(1) 骨細胞は一方向性を有する圧縮・引張応力ではなく、全ての突起に加わるひずみエネルギーの総和としての von Mises 応力に反応することが示唆された。

(2) 骨細胞は、メカニカルストレスが加わったのち 6 時間で SCL 産生を抑制する迅速な応答能を有している。また骨細胞とその周囲の骨基質に存在する SCL は、産生が停止すると 6 時間以内に骨基質中から消失することが明らかとなった。

(3) メカニカルストレスにより消失した骨細胞の SCL 産生分泌は、メカニカルストレス除去後 6 時間で回復することが明らかとなった。

(4) メカニカルストレスは骨芽細胞の分化を急速に促進し、その過程で OPN と OCN の遺伝子発現について、正常状態とは異なる不規則な発現パターンを引き起こすことが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 駒形香菜子、藤原 敦、渡邊竜太、江尻貞一、北井則行	4. 巻 44
2. 論文標題 メカニカルストレスの変動に伴う歯槽骨骨細胞のsclerostin 産生能の変化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 岐阜歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 97-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 藤原敦、青木啓太、渡邊竜太、佐藤和彦、矢野航、江尻貞一、北井則行	4. 巻 44
2. 論文標題 矯正力によって加えられたメカニカルストレスに対するラット歯槽骨骨細胞のsclerostin産生能の変化	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 岐阜歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 11-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 田中みか子, 三上絵美, 江尻貞一	4. 巻 2(3)
2. 論文標題 骨粗鬆症と口腔 基礎的検証 卵巣摘出サルで検証した下顎皮質骨の粗鬆化の実態	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本骨粗鬆症学会雑誌	6. 最初と最後の頁 235-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mika Ikegame, Sadakazu Ejiri, Hirohiko Okamura	4. 巻 67
2. 論文標題 Expression of non-collagenous bone matrix proteins in osteoblasts stimulated by mechanical stretch in the cranial suture of neonatal mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 107-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155418793588.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 駒形香菜子、藤原敦、渡邊竜太、江尻貞一、北井則行
2. 発表標題 メカニカルストレスの変動に伴う歯槽骨骨細胞のsclerostin産生能の変化
3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊竜太、矢野航、佐藤和彦、小萱康徳、江尻貞一
2. 発表標題 骨細胞が反応する応力の種類・強度に関する解析
3. 学会等名 解剖学会第76回中部支部学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 駒形香菜子、藤原敦、渡邊竜太、江尻貞一、北井則行
2. 発表標題 メカニカルストレスの変動に伴う骨細胞のsclerostin産生能の変化
3. 学会等名 解剖学会第76回中部支部学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 田中みか子、三上絵美、櫻井直樹、芳澤享子、荒井良明、山田一穂、江尻貞一、小野高裕
2. 発表標題 ヒト抜歯後歯槽堤における骨改造現象と骨代謝活性の抜歯後期間による違い - 骨形態計測学的・組織学的解析 -
3. 学会等名 第43回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 田中みか子, 三上絵美, 田中 礼, 江尻貞一, 小野高裕
2. 発表標題 高齢女性の顎歯槽骨微細骨梁構造と骨代謝マーカー・アディポサイトカイン・踵骨骨密度との関連性
3. 学会等名 第36回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Watanabe R, Yano W, Satoh K, Kogaya Y, Ejiri S.
2. 発表標題 Histochemical studies with finite element analysis about the type and intensity of the mechanical stress for osteocyte reaction.
3. 学会等名 第57回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 竜太  (Watanabe Ryuuta)  (00586927)	朝日大学・歯学部・助教   (33703)	組織細胞科学的解析担当
研究分担者	北井 則行  (kitai Noriyuki)  (20271025)	朝日大学・歯学部・教授   (33703)	矯正学的解析担当
研究分担者	佐藤 和彦  (Satou Kazuhiko)  (20340078)	朝日大学・歯学部・准教授   (33703)	生体力学的解析担当



## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 みか子 (Tanaka Mikako)  (20361909)	明倫短期大学・その他部局等・教授  (43109)	μCT3D解析担当
研究分担者	池亀 美華 (Ikegame Mika)  (70282986)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授  (15301)	分子細胞生物学的解析担当
研究分担者	矢野 航 (Yano Wataru)  (80600113)	朝日大学・歯学部・講師  (33703)	生体力学的解析担当