

令和元年5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17309

研究課題名(和文) TNF- α の骨細胞刺激に対する破骨細胞形成および矯正学的歯の移動への影響の検討

研究課題名(英文) Study of the effect on osteoclastogenesis and orthodontic tooth movement by osteocyte stimulation by TNF

研究代表者

杉澤 晴紀 (Sugisawa, Haruki)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20792162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：矯正学的歯の移動において、TNF- α が発現し破骨細胞に関与していることが報告されている。一方、生理的な骨吸収に関しては骨細胞がRANKLを発現し、破骨細胞形成を誘導していることが新しくわかった。そこで本研究は、骨細胞へTNF- α を作用させ炎症性の破骨細胞形成がどのような影響を受けるのかin vitroおよびin vivoで検討しそのメカニズムを解明することを目的とする。本研究では、TNF- α が骨細胞に作用するとRANKLの発現が増加することがわかった。さらにin vivoにおいてマウスの頭蓋部にTNF- α を作用させると骨細胞にRANKLの発現を増加させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では骨細胞もTNF- α が作用するとRANKLを発現し、破骨細胞形成を促進するように働くことがin vitroおよびin vivoで確認された。本研究で、様々な炎症性骨疾患に関与する炎症性サイトカインであるTNF- α の骨細胞への影響を解明することは、骨細胞を炎症性骨疾患の標的細胞の一つとして選択でき、Osteoimmunologyの発展に寄与すると考えられる。また、新しい治療薬、治療法などの医療の発展にもつながり、さらには矯正学的歯の移動のメカニズムの解明にも寄与する可能性のある、非常に意義のあることだと考えている。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that TNF- α is expressed and involved in osteoclasts and bone formation in orthodontic tooth movement. It was newly found that osteocytes express RANKL and induce osteoclast formation in physiological bone resorption. Therefore, the purpose of this study is to investigate the influence of TNF- α on osteocytes and how osteoclast formation in inflammatory site is affected in vitro and in vivo and to elucidate the mechanism. In the present study, it was found that when TNF- α acts on osteocyte, the expression of RANKL is increased. Furthermore, it was found that the action of TNF- α increases the expression of RANKL in osteocyte in vivo.

研究分野：矯正歯科

キーワード：骨細胞 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞分化の必須誘導因子として骨芽細胞が発現する RANKL が発見され、破骨細胞の分化・活性化機構の解明が進歩した。また、同じように炎症性のサイトカインである TNF- α でも破骨細胞が誘導されることが報告されている。最近では、骨細胞特異的に RANKL 遺伝子が破壊されるトランスジェニックマウスにおいて、生理的な破骨細胞形成が抑えられ、骨硬化症を呈することが示された。これにより、骨細胞が RANKL を分泌し生理的骨吸収をコントロールしていることがわかった。一方、矯正歯科治療においても骨のリモデリングが起こることが知られている。歯に矯正力を負荷させると歯根膜が圧迫され、圧迫側で破骨細胞が、牽引側で骨芽細胞が出現し骨のリモデリングとともに歯が移動する。骨細胞に特異的 Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) プロモーターを使用し、ジフテリアトキシンレセプターを発現させるトランスジェニックマウス(DTR-Tg マウス)を用いて、ジフテリアトキシンにて骨細胞を特異的に破壊し、矯正学的歯の移動の実験を行ったところ、破骨細胞形成が抑制されマウスの歯の移動量が減少し、矯正学的歯の移動にも骨細胞が関与していることが報告された。また、矯正学的歯の移動には TNF- α が関与していることも TNF 受容体欠損マウスを用いた実験で報告されている。以上のことから、TNF- α が骨細胞に作用して、破骨細胞形成に影響を及ぼしている可能性が予想される。しかし、骨細胞の破骨細胞形成への関与は研究途上であり、破骨細胞形成のみならず、免疫反応や炎症反応で重要な働きをしている TNF- α の骨細胞への影響を解明した研究はいまだ行われていない。

そこで本研究では、TNF- α 刺激による骨細胞の破骨細胞形成に対する関連性を明らかにし、さらに詳細なメカニズムを解明する。

2. 研究の目的

近年、炎症性のサイトカインである TNF- α で破骨細胞が誘導されることがわかってきた。関節リウマチや感染などによる病的骨吸収は、TNF- α が主に関与しているものだと考えられている。また、矯正学的歯の移動においても TNF- α が発現し破骨細胞および骨形成に関与していることが報告されている。一方、生理的な骨吸収に関しては骨細胞が RANKL を発現し、破骨細胞形成を誘導していることが新しくわかった。しかし、TNF- α による破骨細胞形成に対する骨細胞の働きを調べた報告は未だないのが現状である。そこで本研究は、骨細胞へ TNF- α を作用させ炎症性の破骨細胞形成がどのような影響を受けるのか *in vitro* および *in vivo* で検討しそのメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞の単離および TNF- α による骨細胞の RANKL 発現。

生後 5-6 日齢の骨細胞特異的に GFP を発現する C57BL/6-Tg(Dmp1-Topaz)11kal/J マウスより、頭蓋骨を取り出し、付着した軟組織と骨膜の除去を行う。マウスの頭蓋骨は、始めに 37 $^{\circ}$ C で 20 分間振とうさせながらコラゲナーゼ処理を行い、骨芽細胞層を除去する。次に、37 $^{\circ}$ C で 15 分間 EDTA 処理を行い、類骨層を除去する。さらに 37 $^{\circ}$ C で 20 分間コラゲナーゼ処理を 2 回行い、最後に 37 $^{\circ}$ C で 15 分間 EDTA 処理を行い、骨基質を脱灰する。2-5 回目の処理液(フラクション)中には骨細胞及び他の細胞が遊離されているので、2-5 回目の処理液を回収して、これらの細胞を遠心により回収し、培地に懸濁し、孔径 40 μ m のセルストレーナーでろ過する。その後、fluorescence activated cell sorting を用いて GFP 陽性骨細胞のみを単離して回収する。骨細胞の確認は、GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察する事で確認する。単離してきた骨細胞を、TNF- α (100ng/ml) 存在下で D-MEM 10ml 培養液中で 3 日間培養を行い、その後リアルタイム PCR にて RANKL の発現を解析する。

(2) TNF- α による骨細胞の細胞内シグナル伝達の解析。

TNF- α による骨細胞のシグナル伝達に対する影響を調べるため、ウエスタンブロット法にて解析を行う。TNF- α の下流での活性化を解析するため、MAPKs (JNK、p-38、ERK)、NF- κ B、AKT の経路への影響を評価する。C57BL/6-Tg(Dmp1-Topaz)11kal/J マウスから骨細胞を単離して、TNF- α を加えて培養した後、骨細胞を回収する。回収した細胞をからタンパク質を取り出し、その後、ウエスタンブロット法を行い、シグナル経路のリン酸化を検討し、評価する。

(3) 骨細胞と TNFRs 遺伝子欠損マウスからの破骨細胞前駆細胞との共培養による、骨細胞の TNF- α による破骨細胞形成への関与の解明。

TNFRsKO マウスの大腿骨および脛骨より骨髓細胞を採取し、骨髓細胞を M-CSF 100ng/ml の濃度で 3 日間培養し、付着細胞を M-CSF 依存性マクロファージ(破骨細胞前駆細胞)として集め、C57BL/6-Tg(Dmp1-Topaz)11kal/J マウスから単離した骨細胞と、TNF- α を加えたもの、加えないものの 2 種類を 3 日間共培養する。破骨細胞形成を比較して、骨細胞の TNF- α による破骨細胞形成への関与について評価する。

(4) TNF- α による骨細胞刺激に対する破骨細胞形成因子(RANKL)発現の *in vivo* による解析。

WT マウス(C57BL/6/J、8 週齢雄)の頭蓋部に TNF- α (1.5 μ g/100 μ l)を 5 日間連続で注入し、

頭蓋骨のパラフィン切片を作製する。組織切片を抗 RANKL 抗体を使用して蛍光免疫染色を行い、RANKL の発現を解析する。

4 . 研究成果

骨細胞が GFP により蛍光する C57BL/6-Tg(Dmp1-Topaz)11kal/J マウスより頭蓋骨を採取して FACS にて骨細胞を単離し、TNF- α の存在下で培養を行い RANKL の発現をリアルタイム PCR にて解析した。TNF- α の骨細胞刺激により RANKL が増加することがわかった。また、TNF- α による骨細胞刺激に対する破骨細胞形成因子(RANKL)発現の in vivo による解析を行った。WT マウスの頭蓋部に TNF- α を注入し、mRNA を抽出し RANKL の発現をリアルタイム PCR にて解析し、RANKL の発現を確認している。また、TNF- α による骨細胞の細胞内シグナル伝達の解析を行い、TNF- α での骨細胞刺激で MAPKs のリン酸化が進むことがわかった。また、骨細胞と TNFRs 遺伝子欠損マウスからの破骨細胞前駆細胞との共培養を行うと TNF- α を作用させると破骨細胞が誘導され、骨細胞の TNF- α による破骨細胞形成への関与があることがわかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. 木村桂介, 杉澤晴紀, 井田裕人, 石田匡彦, 島和弘, 岸川明子, 小川紗衣香, 北浦英樹: 歯科矯正用 Ni-Ti ワイヤーに対する表面コーティングによる耐食性の解析 東北矯正歯科学会雑誌、[査読有り], 25(1):9-15 (2017)

2. Sugisawa, H., Kitaura, H., Ueda, K., Kimura, K., Ishida, M., Ochi, Y., Kishikawa, A., Ogawa, S., Takano-Yamamoto T: Corrosion resistance and mechanical properties of titanium nitride plating on orthodontic wires. Dent. Mater. J. [査読有り], 37, 286-292 (2018). doi: 10.4012/dmj.2016-348.

3. Shen WR., Kimura, K., Ishida, M., Kimura, K., Sugisawa, H., Kishikawa A, Shima, K., Ogawa S., Qi J, Kitaura H.: The glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption via inhibition of TNF- α expression in macrophages. J. Immunol. Res. [査読有り], Volume 2018, Article ID 5783639, 10 pages (2018). doi: 10.1155/2018/5783639.

4. Kitaura, H., Ishida, M., Kimura, K., Sugisawa, H., Kishikawa A, Shima, K., Ogawa S., Qi J, Shen WR: Role of muramyl dipeptide for lipopolysaccharide-mediated biological activity and osteoclast activity. Anal. Cell. Pathol. [査読有り], Volume 2018, Article ID 8047610, 8 pages (2018) doi: 10.1155/2018/8047610.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Ochi Y, Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Saeed J, Kishikawa A, Qi J, Takano-Yamamoto T., Effect of IL-18 on mechanical loading-induced osteoclastogenesis and bone resorption. The 2017 Japan-NIH joint Symposium. Sendai, Japan. Feb 15th-17th 2017.

2. Shen WR, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Ochi Y, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S., Qi J, Kitaura H., Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, suppresses inflammation-induced osteoclast formation and bone resorption. The 12th International Workshop on Biomaterials in Interface Science. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2017, Sendai, Miyagi, Japan. Aug 4th-5th 2017.

3. Shen WR, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Ochi Y, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S., Qi J, Kitaura H., The effects of diabetic medicine exendin-4 for osteoclast formation and bone resorption. The 76th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. Sapporo, Japan. Oct 18th-20th 2017.

4. 木村桂介、石田匡彦、島和弘、杉澤晴紀、越智由美子、岸川明子、小川紗衣香、斉嘉煒、沈威任、北浦英樹: 脂肪酸受容体 GPR120 の破骨細胞形成および骨吸収との関連性の検討、第 76 回日本矯正歯科学会大会、札幌 (2017)

5. 島和弘、木村桂介、石田匡彦、杉澤晴紀、越智由美子、岸川明子、小川紗衣香、斉嘉煒、沈威任、北浦英樹: 破骨細胞形成および骨吸収に対する脂肪細胞に発現するケモカイン CXCL12 の作用の検討、第 76 回日本矯正歯科学会大会、札幌 (2017)

6. 杉澤晴紀、北浦英樹、上田恭介、木村桂介、石田匡彦、越智由美子、岸川明子、小川紗衣香、

山本照子：TiNコーティングを施した歯科矯正用ワイヤーの摩擦力の検討、第76回日本矯正歯科学会大会、札幌（2017）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。