

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)	
研究期間：2006-2008	
課題番号：18390558	
研究課題名（和文）	歯の萌出不全マウスを用いた異所性骨形成促進機構の解析
研究課題名（英文）	Elucidation of the mechanism of enhancement of ectopic bone formation in osteopetrotic mice.
研究代表者	
宮沢 裕夫(MIYAZAWA HIROO)	
松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・教授	
研究者番号 90147637	

研究成果の概要：破骨細胞の分化障害が認められる op/op マウスにおいては、BMP 誘導性の異所性骨形成の著明な亢進を示している。また、これらの異所性骨には形態学的異常が観察されたことより、骨形成の際に出現する破骨細胞が正常な骨の形態形成に重要な役割を果たしていることが示され、破骨細胞の存在の重要性がさらに深まった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2007 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯の萌出不全マウス、異所性骨形成、大理石骨病マウス、破骨細胞、骨形成、歯の萌出不全

1. 研究開始当初の背景

骨組織においては、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が絶え間なく繰り返されている。成長が停止した後の脊椎動物の骨組織では、骨吸収と骨形成の量が動的に均衡した共役状態に保たれる。しかし、破骨細胞性の骨吸収が亢進することにより骨粗鬆症が惹起される。一方、破骨細胞の分化障害による骨吸収機能不全は、大理

石骨病を惹起することが知られている。

将来、破骨細胞となりうる細胞（マクロファージ系の造血細胞）は全身のいたるところに存在するのに、破骨細胞はなぜ骨組織にしか存在しないのであろうか。その疑問に答える鍵は、骨組織にのみ存在する骨芽細胞が握っているのではないかと推察されていた。こ

の仮説は Rodan G. A. と Martin T. J. によって「骨吸収における骨芽細胞の役割に関する仮説」(Calcif Tissue Int 33:349-351, 1981)として1981年に提案されたが、その正当性は骨芽細胞(畑)と血液細胞(種)に共存培養実験によって証明された(Udagawa et al. PNAS USA 87:7260-7264, 1990)。骨芽細胞と脾臓由来の血液細胞をそれぞれ単独で培養した場合は、骨吸収促進因子の有無にかかわらず破骨細胞は形成されなかったが、各種の骨吸収促進因子の存在下で両者が共存することによって破骨細胞の形質を具備する多核細胞が多数形成された。破骨細胞を形成させるためには、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞(マクロファージ)の直接的な細胞間接触が必要であった。

破骨細胞の分化には、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞の直接的な細胞間接触以外に、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)が必須であることが、破骨細胞形成障害により大理石骨病を発症するM-CSF欠損マウス(op/op)の解析により明らかとなった。op/opマウスの場合、M-CSF遺伝子の262番目に余分なチミジン1塩基の挿入が認められる。そのため、遺伝子の暗号が1つずつずれ(フレームシフト)、すぐ下流に終止コドン(TGA)が出現し、活性のあるM-CSFを産生できない。op/opマウスにM-CSFを連日投与すると、骨組織に破骨細胞が出現する。我々は、op/opマウスから得られた骨芽細胞には破骨細胞形成支持能がなく、op/opマウスに認められる破骨細胞の形成障害は、骨芽細胞系の細胞が発現するM-CSFの産生障害に起因することを明らかにした(Endocrinology 128:1792-1796, 1991)。

現在までの研究により、BMP誘導性の骨形成が行われる際には、常に破骨細胞が出現することが明らかとなっている。しかし、破骨細胞が認められない大理石骨病マウスに対してBMPを移植するという実験は今までに報告がなく、オリジナリティーが大変高いものであると考えている。

骨吸収を司る破骨細胞の分化と機能は、骨芽細胞により厳格に調節されていることが、

破骨細胞分化因子(RANKL)の発見により明らかとなった。骨組織は、破壊と吸収が繰り返されている動的組織であり、このリモデリング(カップリング)を通して骨組織は一生絶えず作り替えられている。また、局所性の骨吸収の亢進が認められる関節リウマチや歯周疾患に対して、BMPペレットを移植することにより骨組織の補填を行う試みも進行している。そのような状況の中、本基盤研究において見出される実験結果は、BMPの臨床応用をサポートする研究にもつながると考えている。

本実験系において明らかにされる“骨形成における破骨細胞の役割”“破骨細胞分化の場所決めメカニズムの解明”“重力負荷の骨カップリングにおける役割”は、新たな骨細胞生物学の研究方向の確立にも直結するものと信じている。更に本研究から得られる成果は、歯の萌出不全や形成障害などの小児患者に対する治療方針の確立にも大いに貢献できると思われる。

2. 研究の目的

局所性の骨吸収の亢進が認められる歯周疾患や口蓋裂等における骨欠損症例に対して、骨誘導因子(BMP)を移植することにより骨組織の補填を行う試みも進行している。そこで、破骨細胞の骨形成における役割を明らかにすることを目的に、大理石骨病マウスであるM-CSF遺伝子欠損マウス(op/op)を用いて、破骨細胞がほとんど存在しない条件におけるBMP誘導性の骨形成についての検討を行う。

本研究は、異所性の骨形成における破骨細胞の役割について、形態学的かつ分子生物学的に解明しようとするものであり、実現可能な学際的な研究と位置付けている。現在までに得られたプレリミナリーな実験結果は、破骨細胞の骨形成における重要性を高く示唆するものであり、骨吸収と骨形成の共役機構を司るカップリング因子の解明にも関与する可能性が高い。

我々の研究グループは、破骨細胞分化因子(RANKL)のデコイ受容体であるオステオプロ

テゲリン(OPG)の遺伝子欠損マウスを用いて、BMP誘導性の異所性骨形成に関する実験を行ってきた(Nakamura et al. Endocrinology 144: 5441-5449, 2003)。OPG欠損マウスにおいては、骨吸収の亢進と共に骨形成がカップルして認められ、骨吸収阻害薬であるビスフォスフォネートの投与によって、骨吸収と骨形成の亢進が共に抑制される実験結果を報告した。さらに、OPG欠損マウスにBMPペレットを移植し、異所性骨形成を観察したところ、移植後3週において骨密度はMaxを迎え、その後は、破骨細胞性の骨吸収が進行した。

さらに、BMP移植時に出現する破骨細胞の分化誘導機構について詳しく解析した結果、破骨細胞の出現部位を規定しているのは、RANKL以外の局所における骨芽細胞が産生する未知の因子であることが示唆された。

以上のように、この実験系を用いて、各種の大理石骨病マウスに対して、BMPペレットを移植し、BMP誘導性の骨形成促進メカニズムについて詳細に解析する予定である。このような各種の大理石骨病を用いた研究は、大理石骨病マウスの繁殖に時間と労力が大変かかることから、国内外においても本申請グループ以外には実現不可能なものであると自負している。

3. 研究の方法

M-CSF 遺伝子欠損マウス(op/op マウス)、c-src 遺伝子欠損マウス、液胞型プロトンATPase 遺伝子欠損マウス(oc/oc マウス)、RANKL 遺伝子欠損マウスおよび、c57BL/6J マウス(正常マウス)に対して、rhBMP-2 を含むコラーゲンペレットを移植する。上記のミュータントマウスは、全て典型的な大理石骨病を呈する。移植後2-4週にかけて経時的にBMPペレットを摘出し、軟X線解析(ソフテックス)、骨密度の測定(SXA, pQCT, μ CT)および組織学的な観察を行う。

4. 研究成果

4 週齢雄の op/op マウスと正常マウス

(C57BL/6J)の背筋筋膜下に rhBMP-2 含有コラーゲンペレットを埋入し、異所性骨形成を誘導した。その結果、BMP 誘導性の異所性骨形成(骨密度)は op/op マウスにおいて正常マウスと比較して、約3倍の促進が認められた。また、op/op マウスにおける異所性骨の外表面は大変粗雑な形態を呈していた。

以上の結果は破骨細胞の分化障害が認められる op/op マウスにおいては、BMP 誘導性の異所性骨形成の著明な亢進を示している。また、これらの異所性骨には形態学的異常が観察されたことより、骨形成の際に出現する破骨細胞が正常な骨の形態形成に重要な役割を果たしていることが示され、破骨細胞の存在の重要性がさらに深まった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- [雑誌論文] (計8件) (全て査読あり)
- ① Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N et al. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. J Cell Biol 184:541-554, 2009
 - ② Koide M, Kinugawa S, Udagawa N et al. Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling. J Bone Miner Res in press, 2009
 - ③ Narita N, Kobayashi Y, Udagawa N et al. Multiwalled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. Nano Lett 9:1406-1413, 2009
 - ④ Yamashita T, Kobayashi Y, Udagawa N et al. MKK6-p38 MAPK signaling pathway enhances survival but not bone-resorbing activity of osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun 365:252-257, 2008
 - ⑤ Asami A, Nakamura M, Nakamura H, Udagawa N, Miyazawa H et al. Effects of heat treatment of hydroxyapatite on osteoblast differentiation. J Hard Tissue Biol, 17:37-46, 2008
 - ⑥ Takaku H, Miyamoto Y, Udagawa N et al. Synthesis and structure-activity relationships of 16-ene-22-thia-1 α , 25-dihydroxy-26, 27-dimethyl-19-norvitamin D₃ analogs having side

chains of different sizes. Bioorg Med Chem 16:1796-1815, 2008

- ⑦ Yamada C, Yamada Y, Udagawa N et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. Endocrinology, 149 : 574-579, 2008
- ⑧ Udagawa N, Sato N et al. Signal transduction of lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation. Periodontology 2000, 43:56-64, 2007

[学会発表] (計1件)

- ① Udagawa N Regulation of RANK ligand production and its signaling in osteoclast formation. 13thInternational Congress of Endocrinology November 9, 2008 (Rio de Janeiro)

[図書] (計1件)

- ① Takahashi N, Udagawa N et al. Principles of Bone Biology, Third Edition in press, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮沢 裕夫 (MIYAZAWA HIROO)
松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・
教授
研究者番号 : 90147637

(2) 研究分担者

中村 美どり (NAKAMURA MIDORI)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号 : 90278177
中村 浩志 (NAKAMURA HIROSHI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号 : 00278178
中村 浩彰 (NAKAMURA HIROAKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 50227930
小出 雅則 (KOIDE MASANORI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号 : 10367617
宇田川 信之 (UDAGAWA NOBUYUKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 70245801

(3) 連携研究者