

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18689046

研究課題名（和文）外来刺激による顎堤骨吸収機構の解明と補綴処置前抑制法の開発

研究課題名（英文） Studies on the mechanisms and on the inhibition before the prosthetic treatments of alveolar bone resorption by outer stimuli

研究代表者

牧平 清超 (MAKIHIRA SEICHO)

広島大学・歯学部・准教授

研究者番号：80304450

研究成果の概要： RANKL 添加に依存して破骨細胞へと分化する RAW264.7 細胞を用いて、TRAF family を中心としたシグナル伝達に関して詳細な検討を行った結果、TRAF1 が破骨細胞の分化を負に調節する分子であることが明らかとなった。次に、様々な阻害剤を RAW264.7 細胞に添加し TRAF1 をマーカーとして骨吸収阻害物質を探究した。Na⁺/K⁺ ATPase 阻害剤である ouabain と vanadate が破骨細胞同士の融合を抑制することを初めて見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2007 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	21,500,000	6,450,000	27,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：骨吸収, 破骨細胞, 補綴処置, TRAF1, TRAF6, ouabain, vanadate

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科補綴治療において歯槽骨の保全是長期的な成功のために非常に重要である。骨吸収という現象では、破骨細胞の活性化が重要である。破骨細胞は、破骨細胞分化誘導因子である Receptor Activator NF- κ B Ligand (RANKL) 分子が破骨細胞前駆体の RANK に結合し、主に TNF Receptor Associated Protein 6 (TRAF6) を介してシグナルが核内に伝わる事が知られている。活性化された破骨細胞は、骨吸収を促進する。

(2) 研究費申請までに予備実験として、マウス破骨細胞のセルラインである RAW264.7 細胞を用いて破骨細胞の調節を正および負に調節している遺伝子群を解析するために以下の3種類の細胞から抽出した RNA を用いてマイクロアレイの解析を行った。

A: 刺激を加えない RAW264.7 細胞 (コントロール細胞)

B: 可溶性 RANKL で刺激し多核の TRAP 陽性細胞が認められた RAW264.7 細胞

C: TRAF6 を最新技術の RNAi でサイレンシングし、可溶性 RANKL で刺激した RAW264.7 細胞

これら A-C 3 種類の細胞から抽出した RNA を用いたマイクロアレイの結果を比較検討し、RANKL 分子に反応し、破骨細胞の分化に関与している遺伝子群の探索を行った。その結果、TRAF ファミリーのひとつである TRAF1 が、TRAF6 下流で破骨細胞の分化調節遺伝子である可能性が示唆された。

(3) 予備実験で TRAF1 をノックアウトした細胞では、RANKL 添加による TRAP 陽性の多核巨細胞の出現が増加した。このことは TRAF1 が破骨細胞の負の調節遺伝子である可能性が示唆された。

以上より、TRAF1 の破骨細胞の分化における役割を解明し、TRAF1 をターゲットもしくは、その動態をマーカーとして骨吸収抑制法または抑制剤の開発が可能であると考え、本研究の申請に至った。

2. 研究の目的

(1) 研究開始当初の背景で記載したように、マイクロアレイの結果と一部の予備実験の解析から、TRAF1 が破骨細胞の負の調節遺伝子であることが示唆された。はじめに、この TRAF6 および TRAF1 を中心とした顎骨吸制機構に関する詳細な検討を継続する。

(2) TRAF1 をターゲットまたは指標として、顎堤吸収抑制法または抑制剤の開発を目的とした実験を行い、補綴治療前に行える顎堤骨吸収抑制法の開発へとつなげる。

3. 研究の方法

(1) ① TRAF1 を RNAi でサイレンシング(ノックダウン)することによって破骨細胞の分化がどのように変化するかを検討する (図 1)。

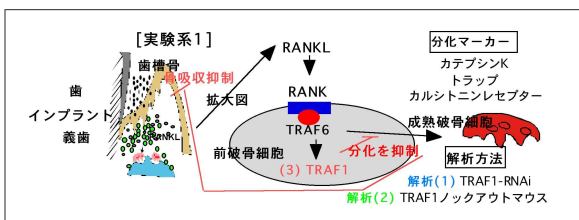


図 1

② TRAF1 に対して、ミミックな作用を持つ TRAF1 抗体、またはアゴニスト様の作用を持つシグナル阻害物質の探索 (TRAF1 活性物質の探索) を行う (図 2)。

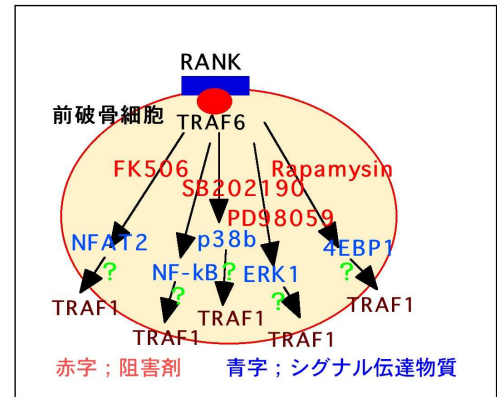


図 2

(2) ① TRAF6 RNAi をマウスに接種し骨または顎堤吸収などを検討する。骨密度の測定も行う。

② TRAF1 活性作用を持つ物質をマウスに接種し (2)-①と同様の測定を行う。

4. 研究成果

(1) 平成 18 年度は、TRAF1 の破骨細胞における詳細な解析を研究協力者 (Toshihisa Kawai, Forsyth Institute, Boston, MA, USA) とともにに行った。TRAF1 の破骨細胞における機能解析は、野生型マウスと TRAF1 ノックアウトマウスの骨髄由来細胞を用いて行った。

MCSF と RANKL 存在下で培養した骨髄由来細胞における、TRAP および Cathepsin K 遺伝子の発現を RT-PCR で、TRAP 陽性多核巨細胞数は TRAP 染色で検討した。

MCSF (5 ng/ml) と可溶性 RANKL (10 ng/ml) 存在下で培養した TRAF1 ノックアウトマウス骨髄由来細胞における TRAP および Cathepsin K 遺伝子の発現量 (データ示さず) および TRAP 陽性多核巨細胞出現数は、同条件下の野生型マウスの細胞と比較して有意に高かった (図 3)。同様に RAW264.7 細胞に対して TRAF1 RNAi を行った場合は、可溶性 RANKL に依存した TRAP 陽性多核巨細胞への分化促進が認められた。以上の結果より、TRAF1 遺伝子は破骨細胞の分化過程において、RANKL-RANK-TRAF6 からのシグナルを TRAF6 とは反対に、負に制御することによって顎堤骨等の骨吸収の調節に深く関与している事が明らかとなった。

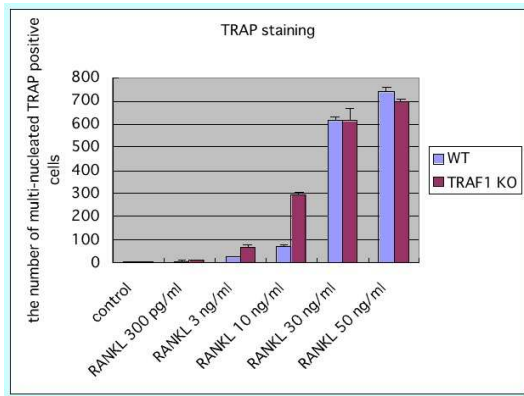


図 3 の説明文: 野生型と TRAF1 のノックアウトマウスから骨髄由来の破骨細胞を分離し、3-50 ng/ml の可溶性 RANKL 存在下で TRAP 陽性多核巨細胞の出現数を比較検討しグラフ化した。さらに統計処理によって有意検定を行った。

(2) 平成 19 年度は、平成 18 年度の結果をもとに破骨細胞における TRAF1 の発現または活性をマーカーとして、破骨細胞の分化を抑制する物質の探究を行った。

可溶性の RANKL 存在下で培養した RAW264.7 細胞にシグナル伝達物質や膜上タンパクに対する様々な既存の阻害物質を添加し、TRAF1 の発現パターンを解析した。つまり TRAF1 の発現を増強することによって破骨細胞の分化を抑制する働きがある阻害物質を探索した。

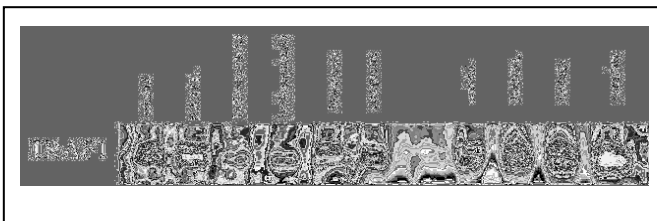


図 4 の説明文 Western blotting によって、様々な阻害剤が TRAF1 の発現に与える影響について検討した。その中で V 型 ATPase 阻害剤 (bafilomycin、compactin、ionomycin) と Na⁺/K⁺ ATPase 型 ATPase 阻害剤 (ouabain、vanadate) が TRAF1 の発現に与える影響を検討した結果を示したもの

図 4 に示すように、Na⁺/K⁺ ATPase に対する阻害剤 (ouabain、vanadate) は RANKL による TRAF1 の発現を著しく増強した。一方、bafilomycin、compactin、ionomycin などの

V-ATPase 阻害剤などは、RANKL による TRAF1 の発現を逆に抑制した。ouabain と vanadate は、RANKL による TRAF1 の発現をさらに増強することから、有望な顎堤の骨吸収抑制剤になりうることが示唆された。

そこで、様々な阻害物質の中でも特に ouabain と vanadate が RANKL に依存した破骨細胞の分化にどのような影響を与えるかについて検討した。その結果、ouabain、vanadate は、可溶性 RANKL によって RAW264.7 細胞が TRAP 陽性多核巨細胞へと分化する (図 5b) ことを抑制した (図 5 c, d)。以上より Na⁺/K⁺ ATPase の阻害剤は、破骨細胞の分化を抑制することが明らかとなり、その抑制には TRAF1 遺伝子の発現増強が深く関与していることが示唆された。

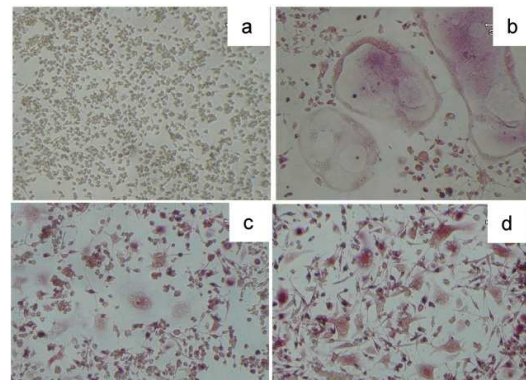


図 5 の説明文: TRAP 染色

- a コントロールの細胞
- b RANKL を添加したもの
- c RANKL と ouabain を添加したもの
- d RANKL と vanadate を添加したもの

(3) 平成 20 年度は、Na⁺/K⁺ ATPase の阻害剤である ouabain と vanadate が破骨細胞の分化をどのようなメカニズムで抑制するかについて詳細に検討した。

高濃度の ouabain と vanadate は RAW264.7 細胞の細胞活性を有意に抑制し、ネクローシスのマーカーである LDH の分泌を有意に促進し、アポトーシスのマーカーである Caspase 3 の活性には影響を与えなかった (データ示さず)。

細胞活性に影響のない低濃度の ouabain と vanadate は、RANKL 添加によって増加する DC-STAMP (細胞融合のマーカー) mRNA の発現を有意に抑制し、ERK1/2 のリン酸化を抑制した (データ示さず)。

加えて、RANKL 添加に依存した TRAP 陽性多核巨細胞の出現数を有意に抑制した。P 型 ATPase family の中で Na⁺/K⁺-ATPase alpha 1 の発現を RNAi 法で抑制した場合、RANKL に依存した DC-STAMP mRNA の発現増強を有意に抑制した (図 6)。

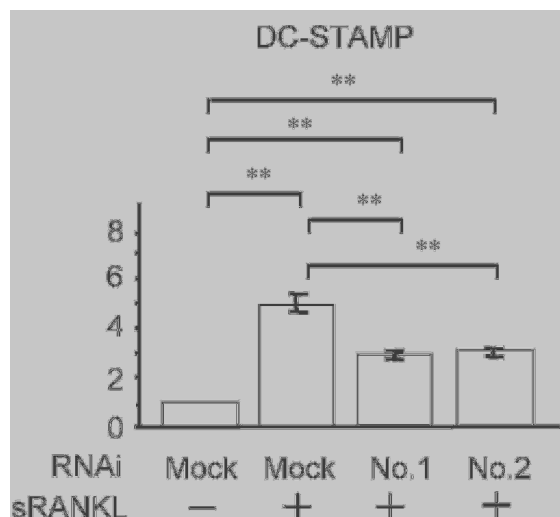


図 6 の説明文: RAW264.7 細胞を Na⁺/K⁺ ATPase alpha1 RNAi 処理したのち、DC-STAMP mRNA の発現量を解析した。

予備実験で、ouabain と vanadate はマウスの骨髄由来の破骨細胞の分化に抑制的に働く同様の結果を得ている。また、当初予定していた TRAF6 RNAi や ouabain, vanadate が実際に *in vivo* の骨密度に与える影響については期間内に解析データを得るまでには至らなかった。今後、継続して行う予定である。

以上より、高濃度の ouabain と vanadate はネクロシスを誘導したが、細胞活性に影響しない低濃度の ouabain と vanadate は破骨細胞の融合に抑制的に作用した。この過程には Na⁺/K⁺-ATPase alpha 1 分子が関与していることが示された (投稿準備中)。

従って P 型 ATPase 阻害剤は顎堤吸収を抑制し、また Na⁺/K⁺-ATPase alpha 1 をターゲットとした新しい顎堤の骨吸収抑制法の可能性が示唆された。

(4) 3 年間の本研究結果をまとめると、最新の RNAi とマイクロレイの手法の組み合わせによって、TRAF1 が破骨細胞の負の調節因子であることを世界で初めて明らかにし、TRAF1 をマーカーとしたスクリーニングによ

って、P 型 ATPase 阻害剤およびその改良物が、新しい顎堤の骨吸収抑制剤となることが示唆された。さらに、Na⁺/K⁺-ATPase alpha 1 をターゲットとした新しい顎堤の骨吸収抑制法の可能性も示唆された。

本研究が示すように TRAF1 をマーカーした場合に骨の吸収を抑制する物質候補が見いだしやすく、本研究結果は非常に有用であり、今後発展する可能性は高いと思われる。さらに、本研究データの一部は H20 年度に特許出願した基礎データとなった。今後さらなる検討を加え、ouabain と vanadate に関連した改良物を考案し、副作用がきわめて少ない、骨吸収抑制作用のある物質の開発さらに実用化に向け研究を継続したいと考えている。

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)

- ① Seicho Makihiro, Wataru Mizumachi, Kae Harada, Saiji Shimoe, Shinsuke Sadamori and Hiroki Nikawa. The Pre-surgical Modification of the Provisional Over-denture through 3-dimensional Image Analysis Supports the Mini Dental Implant Treatment: A Clinical Report. International Chinese Journal of Dentistry, 8: 39-41, 2008. 査読あり
- ② Seicho Makihiro, Yumi Kawahara, Louis Yuge, Yuichi Mine, Hiroki Nikawa. Impact of the Microgravity Environment in a Three-dimensional Clinostat on Osteoblast- and Osteoclast-like Cells. Cell Biology International, 32, 1176-1181, 2008. 査読あり
- ③ Seicho Makihiro, Yuichi Mine, Eduardo Kosaka, Hiroki Nikawa Titanium Surface Roughness Accelerates RANKL-dependent Differentiation in the Osteoclast Precursor Cell Line, RAW264.7. Dental Materials Journal, 26, 739-745, 2007. 査読あり
- ④ 牧平清超 下顎位の偏位を改善した総義歯の 1 症例 日本補綴歯科学会雑誌 50:260-263, 2006. 査読あり

- ⑤ Toshihisa Kawai, Takashi Matsuyama, Yoshitaka Hosokawa, Seicho Makihira, Makoto Seki,, Nadeem Y. Karimbux, Reginaldo B. Goncalves, Paloma Valverde, Serge Dibart, Yi-Ping Li, Leticia A Miranda, Cory W.O. Ernst, Yuichi Izumi, Martin A. Taubman, B and T Lymphocytes Are the Primary Sources of RANKL in the Bone Resorptive Lesion of Periodontal Disease. *American Journal of Pathology*, 169, 987-998, 2006. 査読あり
- ⑥ Hiroshi Egusa Hiroki Nikawa, Seicho Makihira, Hirofumi Yatani, Taizo Hamada. In vitro Mechanisms of Interleukin 8-Mediated Responses of Human Gingival Epithelial Cells to *Candida albicans* Infection. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 301-311, 2006. 査読あり
- ⑦ Hiroki Nikawa, Hiroshi Egusa, Hirofumi Yamashiro, Masahiro Nishimura, Seicho Makihira, Jin Chen, Hitoshi Fukushima, Taizo Hamada. The effect of saliva or serum on bacterial and *Candida albicans* colonization on type I collagen. *J Oral Rehabil*, 33, 767-774, 2006. 査読あり
- ⑧ Hiroki Nikawa, Hiroshi Egusa, Seicho Makihira, Tetsuji Okamoto, Hidemi Kurihara, Hideki Shiba, Hideaki Amano, Takeshi Murayama, Hirofumi Yatani, and Taizo Hamada. An in vitro evaluation of the adhesion of *Candida* species to oral and lung tissue cells. *Mycoses* 49:14-17, 2006. 査読あり

[学会発表] (計 14 件)

- ① 太田耕司, 武知正晃, 平岡美里, 南 正彦, 二宮嘉昭, 西 裕美, 安田雅美, 都留寛治, 牧平清超, 二川浩樹, 石川邦夫, 鎌田伸之. チタン表面粗さが細菌付着に及ぼす影響. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008. 11. 18 (東京).
- ② 赤嶺翠林, 牧平清超, 峯 裕一, 首藤崇裕, 大前侑子, 二川浩樹 血清はチタン上の真菌の定着を促進する 第 4 回国際歯

- 科技工学会 第 30 回日本歯科技工学会学術大会 2008. 10. 21-23, (大阪)
- ③ 峯 裕一, 牧平清超, 首藤崇裕, 大前侑子, 赤嶺翠林, 村田比呂司, 二川浩樹 チタンイオンが骨芽細胞および破骨細胞の分化に与える影響 第 4 回国際歯科技工学会学術大会, 第 30 回日本歯科技工学会学術大会 2008. 10. 21-23, (大阪)
- ④ 首藤崇裕, 牧平清超, 峯 裕一, 大前侑子, 赤嶺翠林, 村田比呂司, 二川浩樹 JH8194 を固定化したチタンが骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に与える影響 第 4 回国際歯科技工学会学術大会, 第 30 回日本歯科技工学会学術大会 2008. 10. 21-23, (大阪)
- ⑤ Seicho Makihira, Eduardo Kosaka, Yuichi Mine, Hiroki Nikawa. Immobilized-OPG-Fc on a Titanium Surface Inhibits RANKL-dependent Osteoclast Differentiation. IADR, 2008. 7. 2-5 (Toronto, Canada)
- ⑥ 牧平清超, 二川浩樹 微小重力環境が骨芽細胞および破骨細胞に与える影響. 第 117 回日本補綴歯科学会学術大会 2008. 6. 6-8 (名古屋)
- ⑦ 峯 裕一, 牧平清超, 村田比呂司, 二川浩樹 チタンイオンが骨吸収関連遺伝子の発現に及ぼす影響 第 51 回日本歯科技工学会学術大会 2008. 4. 26-27, (鶴見)
- ⑧ 峯 裕一, 牧平清超, 下江宰司, 玉本光弘, 里田隆博, 村山 長, 二川浩樹 Osteoprotegerin を固定化したチタンが破骨細胞に与える影響 日本歯科技工学会第 29 回学術大会 2007. 9. 22-23 (仙台)
- ⑨ 牧平清超, 二川浩樹 チタン表面の破骨細胞への影響 日本補綴歯科学会中四国支部学術大会 2007. 9. 2 (徳島)
- ⑩ 峯裕一, 牧平清超, 下江宰司, 玉本光弘, 里田隆博, 村山 長, 二川浩樹 Osteoprotegerin を固定化したチタンが破骨細胞に与える影響 第 40 回広大歯学会 2007. 6. 16 (広島)
- ⑪ 二川浩樹, 牧平清超, 村山 長, 玉本光弘, 里田隆博, 下江宰司, 田口香織, 天野秀昭, 杉山 勝, 竹本俊伸 口腔保健学科の 2 つのプロジェクトセンターの紹介 第 40 回広大歯学会 2007. 6. 16 (広島)
- ⑫ 牧平清超, 二川浩樹 顎堤骨吸収における TRAF1 の関与 第 116 回日本補綴歯科学会学術大会 2007. 5. 19 (神戸)

- ⑬ 牧平清超, 峯 裕一, Eduardo Kosaka, 二川浩樹 チタンの表面粗さが破骨細胞の分化に与える影響 第 49 回日本歯科理工学会学術大会 2007. 5. 12 (札幌)
- ⑭ Eduardo Kosaka, 牧平清超, 尾崎加奈, 下江宰司, 玉本光弘, 里田隆博, 村山 長, 杉山 勝, 天野秀昭, 竹本俊伸, 二川浩樹 P型ATPase阻害剤は成熟破骨細胞への分化を抑制する 第45回広島県歯科医学会・第90回広島大学歯学会例会 2006. 11. 12(広島)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: インプラント用材料及びその製造方法
発明者: 二川浩樹、牧平清超、峯 裕一、阿部義紀、中谷達行、岡本圭司、新田祐樹
権利者: 広島大学 トーヨーエイテック株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2007-316095
出願年月日: 2007. 12. 6
国内外の別: 国内

名称: 骨吸収調整剤
発明者: 牧平清超、二川浩樹
権利者: 広島大学
種類: 特許
番号: 特願 2008-70201
出願年月日: 2008. 3. 18
国内外の別: 国内

[その他]

報道関係 中国新聞
<http://www.chugoku-np.co.jp/education/dot/Ed07120701.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧平 清超 (MAKIHIRA SEICHO)
広島大学・歯学部・准教授
研究者番号: 80304450

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者