

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17142

研究課題名(和文) 力学的刺激に誘導される歯根膜線維の成熟におけるSPARC-DDR2経路の機能解明

研究課題名(英文) Functional elucidation of SPARC-DDR2 pathway on collagen fiber maturation of periodontal ligament which is induced by mechanical stress

研究代表者

井田 貴子 (Ida, Takako)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：60790285

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)：マウスの歯根膜由来細胞を用いて、DDR2阻害剤による経路遮断がコラーゲン線維形成へ与える影響について検討を行っている。具体的には、DDR2阻害剤(AZ628)の存在下で歯根膜由来細胞を培養し、LOX遺伝子発現およびLOXタンパクの酵素活性測定を行うとともに、Picrosirius red染色によるマトリックスの成熟度を評価している。

SPARCはカルシウム結合部位をドメイン内に持つことから、低カルシウムラットモデルを用いることとした。 $\mu$ CTにて得られた3次元画像を用いて骨構造解析を行った結果、通常餌群と比較して低カルシウムラット群では上顎骨の皮質骨および海綿骨において骨密度低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

力学的刺激による歯根膜線維の成熟を司る分子機構の解明は、患者個人によって異なる、力に対する応答の多様性を理解するために重要な知見となる可能性がある。本研究に期待される成果は、力学的刺激による歯根膜恒常性維持機構の解明という観点から歯科医学に貢献するだけでなく、コラーゲンレセプターによる力学的刺激の伝達機構の解明という観点から生命科学の発展に寄与する。

研究成果の概要(英文)：The effect of DDR2 inhibitor on collagen fiber formation has been studied using mouse periodontal ligament-derived cells. The periodontal ligament-derived cells were cultured in the presence of DDR2 inhibitor (AZ628), LOX gene expression and LOX protein enzyme activity were measured, and the maturity of the matrix was evaluated by Picrosirius red staining. Since SPARC has a calcium binding site in its domain, the low calcium rat models were used. As a result of bone structure analysis using 3D images obtained by  $\mu$ CT, bone density was decreased in the cortical bone and cancellous bone of the maxilla in the low calcium rat group compared with the normal diet group.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯根膜 コラーゲン 歯学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯と歯槽骨の結合を担うだけでなく、咬合力に起因する力の緩衝作用、咬合感覚の感知に加えて、歯の萌出や矯正的歯の移動において重要な役割を果たしており、歯根膜組織における恒常性維持機構の理解は、本邦が目指す口腔機能の維持/再生による健康寿命の延長という観点からも重要である。臨床的に見られる咬合性外傷や廃用性萎縮に関する経験的な知見から、歯根膜組織の恒常性維持と力学的刺激の関係は古くから認識されてきた。しかしながら、力学的刺激と歯根膜の恒常性は単なる数値的な荷重量で定義することは困難であり、その背景にある生物学的な作用機序を理解することが、力に起因する歯根膜の多様な病態の理解と天然歯の保存に繋がると考えられる。これまで、研究者らは力学的刺激が歯根膜線維の主な構成要素である型コラーゲンの生合成に及ぼす影響を明らかにするため、ラット過剰咬合モデルを用いて、その影響を組織学的に解析してきた。その結果、力学的刺激によってI型コラーゲン分子間の架橋が促進されることにより、歯根膜基質線維の成熟が誘導されることを明らかになった。また、Lysyl Oxidase (LOX)の阻害剤であるbeta-aminopropionitrile (BAPN)の投与により、過剰咬合に誘導される線維の成熟は阻害された。これらの結果より、力学的刺激による歯根膜基質線維の成熟は、LOXによる分子間架橋形成によって制御されていると考えられた。しかしながら、その詳細な分子メカニズムについては未だ不明である。近年、数多くのコラーゲン受容体がコラーゲンの代謝に重要であることが明らかとなりつつあるが、その中でも、KhosraviらはDiscoidin Domain Receptor 2 (DDR2)がコラーゲンとの結合により、LOXの産生量を増加させることを報告している。また、DDR2とコラーゲンの結合部位は、線維性結合組織に豊富なマトリセルラータンパクであるSecreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC)と競合していることから、SPARCがDDR2の内在性のアンタゴニストとして機能していると考えられている。過去にはShyuら、DurvasulaらがSPARC、DDR2ともに力学的刺激によってその発現が上昇することを報告されていることから、SPARC-DDR2の機能が力学的刺激によって変化する可能性は高いことが推察された。

細胞内外におけるコラーゲンの生合成に関わる詳細な分子メカニズムが次々と明らかとなっているにも関わらず、歯根膜組織における研究は比較的少なく、本研究の学術的意義は高いと考えられた。

### 2. 研究の目的

細胞表面に存在するコラーゲンレセプターの一つであるDDR2と、その拮抗分子であるSPARCによる、SPARC-DDR2経路に着目し、力学的刺激に誘導される歯根膜基質線維の成熟過程におけるSPARC-DDR2経路の機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

4週齢雄性C57BL/6Jマウスより上下顎臼歯を抜歯し、酵素カクテル(Liberase DL, Roche)を用いて歯根膜細胞を採取した。siRNAによりCol5a1遺伝子をノックダウンした後に2週間培養して、コラーゲン線維を得て、コラーゲン修飾酵素であるLOXおよび型コラーゲンと会合体を形成する型コラーゲンの遺伝子の発現をモニターし、Col5a1の阻害がLOXおよび型コラーゲンに及ぼす影響を解析した。

3週齢雄性SDラットに低カルシウム餌(0.05%カルシウム含有)を1週間与え、低カルシウムラットモデルを作製した。上顎骨を採取し4% paraformaldehyde溶液にて浸漬固定後、 $\mu$ CTを撮影し、得られた3次元画像をもとにAnalyze12.0を用いて骨構造解析を行った。現在、上顎骨は10%EDTAにて脱灰途中であり、今後脱灰終了後にパラフィン組織切片を作製し、歯根膜線維におけるSPARCの発現を検討するために蛍光免疫染色を行う予定である。

### 4. 研究成果

マウスの歯根膜由来細胞を用いて、DDR2阻害剤による経路遮断がコラーゲン線維形成へ与える影響についての検討を行っている。具体的には、DDR2阻害剤(AZ628)の存在下で歯根膜由来細胞を培養し、LOX遺伝子発現およびLOXタンパクの酵素活性測定を行うとともに、Picrosirius red染色によるマトリックスの成熟度を評価している。また、コラーゲン架橋に関しては、SDS-PAGEによる解析を進めている。Col5a1遺伝子の発現が抑制された条件下でのLOXおよび型コラーゲンの発現、歯根膜基質線維の弾性率に及ぼす影響を解析することにより、型コラーゲンが細胞外基質の形態と弾性率に及ぼす影響を明らかにする。

SPARCはカルシウム結合部位をドメイン内に持つことから、低カルシウムラットモデルを用いることとした。 $\mu$ CTにて得られた3次元画像を用いて骨構造解析を行った結果、通常餌群と比較して低カルシウム群では上顎骨の海綿骨および皮質骨において骨密度の低下を認めた(図1)。今後は脱灰中のサンプルを用いて通法に従って上顎骨のパラフィン組織切片を作製後、歯根膜基質線維におけるSPARC-DDR2経路の機能解析を行う。

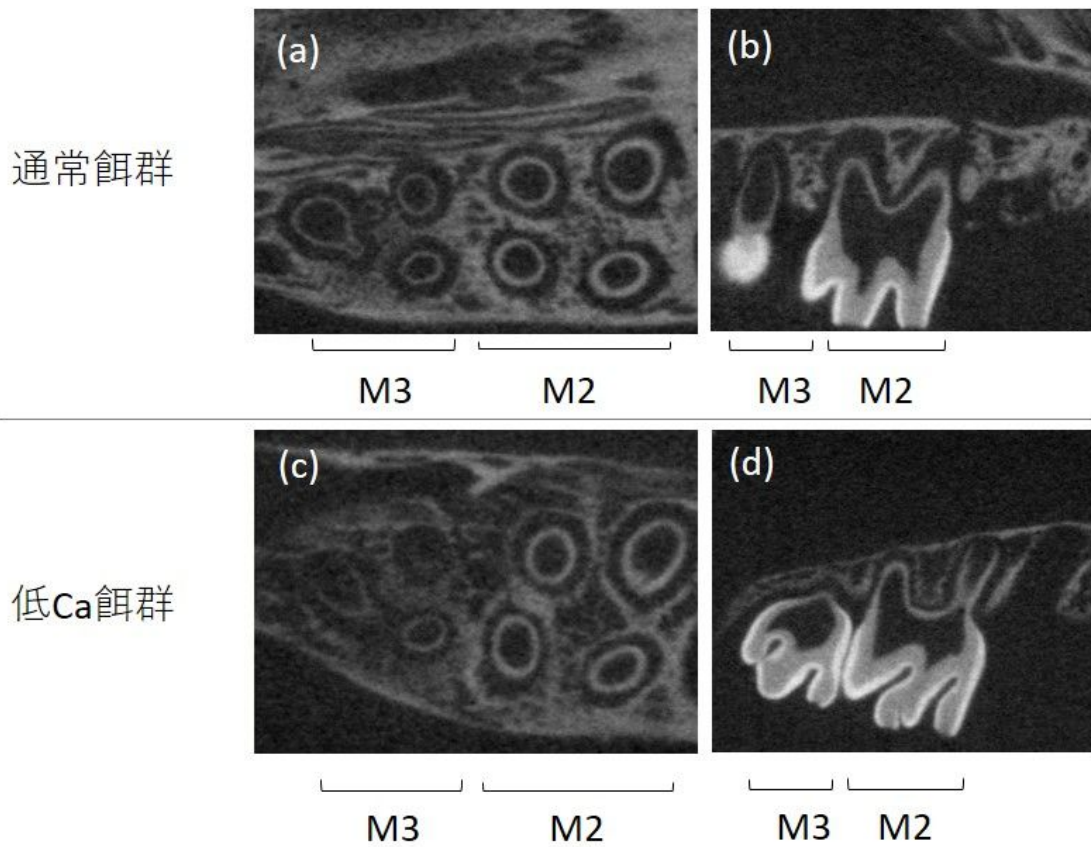


図1 低Caラットモデル上顎骨の $\mu$ CT像  
 低カルシウム餌(0.05%カルシウム含有)を1週間与えて低Caラットモデルを作製した。  
 $\mu$ CTを撮影し、骨構造解析を行った結果、通常餌群と比較して低Ca餌群において皮質骨および海綿骨の骨密度低下を認めた。  
 a,c:水平断  
 b,d:矢状断  
 M2:第2臼歯  
 M3:第3臼歯

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水越 優, 加来 賢, 北見公平, 井田貴子, 魚島勝美, 齋藤 功
2. 発表標題 矯正の歯の移動時のマウス歯根膜における増殖期細胞の局在と特性
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水越 優, 加来 賢, 北見公平, 井田貴子, 新井萌生, 魚島勝美, 齋藤 功
2. 発表標題 矯正の歯の移動時における歯根膜増殖期細胞の特性
3. 学会等名 令和元年度新潟歯学会第2回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井田貴子, 加来 賢, 水越 優, 北見公平, 魚島勝美
2. 発表標題 歯根膜発生過程における細胞周期動態のin vivo解析
3. 学会等名 第128回日本補綴歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ida T, Kaku M, Mizukoshi M, Kitami K, Saito I, Uoshima K
2. 発表標題 In vivo Analysis of Cell Cycle Dynamics During the Course of Periodontal Ligament Development
3. 学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human resources in Practical Oral Health and Treatment
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----