

平成 21年 5月 7日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2007～2008

課題番号：19890219

研究課題名(和文) 骨・歯周組織における Tob2 の機能解明

研究課題名(英文) The function of tob2 in bone and periodontal tissue.

研究代表者

臼井 通彦(USUI MICHHIKO)

昭和大学歯学部・助教

研究者番号：10453630

研究成果の概要：

Tob2 の機能を明らかにするために、Tob2 欠損マウスの解析を行った。骨における表現型を調べるために、大腿骨と頸骨を二次元 μ CT で評価した結果、Tob2 欠損マウスの骨量は野生型マウスに比較して、骨量が約 30%低下していることが明らかになった。

さらにその詳細なメカニズムについて明らかにするために、骨形態計測を行い、骨形成面・骨吸収面の両面から Tob2 の役割について精査した結果、骨形成面の指標である ObS/BS では tob2 欠損マウスと野生型マウスの間に有意な差は見られなかった。次に、骨吸収面の指標である OcS/BS と ES/BS を計測した結果、tob2 欠損マウスの OcS/BS と ES/BS は野生型マウスに比較して有意に上昇していた。よって、tob2 欠損マウスの骨量の低下は破骨細胞による骨吸収の増加により引き起こされていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：骨芽細胞 破骨細胞 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

Tob family の一員である Tob は骨芽細胞において BMP signaling の下流分子である Smad

と結合して核内に移行し、BMP signaling のターゲット遺伝子の発現を抑制することを我々は明らかにしてきた (Yoshida *et. al.*, Cell. 2000 Usui *Met. al.*, Journal of Bone

and Mineral Research, 2002)。しかし、同じTob familyに属するTob2は骨芽細胞、ならびに破骨細胞における発現は認められているが、骨代謝における役割はまったく不明である。そこで、申請者はTob2の骨芽細胞および破骨細胞における機能、並びに歯周病病態における関与を明らかにし、歯周組織再生への応用を検討するために以下の目標(目的)に取り込むことにした。

2. 研究の目的

以下の5項目を研究の目的とした。

1. 骨芽細胞におけるTob2の発現・機能の解明
2. 破骨細胞におけるTob2の発現・機能の解明
3. 骨芽細胞・破骨細胞分化に対するTob2の制御機構の解明
4. 歯周病病態におけるTob2の関与の解明
5. 歯周組織再生に対するTob2の治療手段としての可能性の検討

3. 研究の方法

骨・歯周組織におけるTob2の役割を明らかにすることを目的に以下の項目の実験を行う予定であった。

1. Tob2の強制発現、並びにsiRNA (small interfering RNA)を用いたノックダウンを行うことにより骨芽細胞におけるTob2の機能を解明する。
2. Tob2の強制発現、並びにsiRNAを用いたノックダウンを行うことにより破骨細胞におけるTob2の機能を解明する。
3. 骨芽細胞分化に関連する転写因子、破骨細胞に関連する転写因子との結合を免疫沈降法を用いて明らかにし、骨芽細胞・破骨細胞分化に対するTob2による制御機構を解明する。
4. 免疫染色法、in situ hybridization法を用いて、歯周組織におけるTob, Tob2の発現を確認する。
5. 歯周組織再生に対するTob, Tob2の治療手段としての可能性を検討する。

4. 研究成果

Tob2(Transducer of ErbB2 2)は細胞増殖抑制遺伝子ファミリーTob/BTG1ファミリーの一員であり、Tobと高いホモロジーを持つことが知られている。また、Tob2をNIH3T3細胞に強制発現させると細胞周期G0/G1期からS期への移行を阻害し細胞増殖を抑制することが知られているが、骨代謝並びに歯周組織におけるその発現・機能は不明である。本研究の目的は骨・歯周組織におけるTob2の発現・機能を明らかにすることである。まず、骨代謝に関与する骨芽細胞・破骨細胞におけるTob2の発現を細胞株・頭蓋骨から分離した初代培養細胞においてRT-PCR法にてmRNAレベルで確認した。骨芽細胞株MC3T3E1 cells及び初代培養細胞においてその発現を確認することができた。また、破骨細胞前駆細胞株Raw264.7細胞をRANKLで刺激することにより破骨細胞を形成させ、RNAを抽出しTob2の発現を確認したところ、骨芽細胞同様にその発現を確認することができた。次に骨芽細胞・破骨細胞の分化過程においてTob2の発現量が変化するか否かを観察した。MC3T3E1 cellsを石灰化誘導培地で培養し経時的にその発現を観察したが、上昇傾向はあるものの有意な差は見られなかった。次にRaw264.7 cellをRANKLで刺激し、破骨細胞分化過程におけるTob2の発現を観察したが、有意差は見出すことはできなかった。以上の結果よりTob2は骨芽細胞・破骨細胞に発現しているものの、その分化過程においてup-regulateされる分子ではないことが明らかとなった。さらにin vivoにおけるTob2の機能を明らかにするために、Tob2欠損マウスの解析を行った。骨における表現型を調べるために、大腿骨と頸骨を二次元 μ CT並びに組織切片において評価した結果、Tob2欠損マウスの骨量は野生型マウスに比較して、骨量が約30%低下

していることが明らかになった。

さらにその詳細なメカニズムについて明らかにするために、大腿骨骨組織切片を用いて骨形態計測を行い、骨形成面・骨吸収面の両面から Tob2 の役割について精査した。まず、骨組織切片においても、 μ CT により計測された骨量の結果と同様に、*tob2* 欠損マウスは野生型マウスに比較して有意に骨量が低下していた。さらに、骨形成面の指標である ObS/BS (骨芽細胞が骨面を覆う割合) を調べたところ、*tob2* 欠損マウスと野生型マウスの間に有意な差は見られなかった。次に、骨吸収面の指標である OcS/BS (破骨細胞が骨表面を覆う割合) と ES/BS (破骨細胞により骨面を吸収された割合) を計測した。その結果、*tob2* 欠損マウスの OcS/BS と ES/BS は野生型マウスに比較して有意に上昇していた。以上のデータより、*tob2* 欠損マウスの骨量の低下は破骨細胞による骨吸収の増加により引き起こされていることが示唆された。さらに、東京大学医科学研究所の安島らにより *tob2* は Vitamin D receptor と結合する事と *tob2* が欠失した骨髄細胞において Vitamin D 刺激による receptor of activator of NF- κ B (RANKL) の発現が有意に増加することが明らかにされた。これらの結果より、*tob2* は骨代謝において骨芽細胞の RANKL 発現を Vitamin D receptor を介して抑制し、破骨細胞形成を負に制御していることが示唆された。

今回の研究期間において、歯周組織における *tob2* の発現・機能を解析することはできなかったが、引き続き研究を行い明らかにしていく予定である。

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 5件)

1. Osteoporotic bone formation in mice lacking *tob2*; involvement of Tob2 in RANK ligand expression and osteoclasts differentiation.
Ajima R, Akiyama T, Usui M, Yoneda M, Yoshida Y, Nakamura T, Minowa O, Noda M, Tanaka S, Noda T, Yamamoto T.
FEBS Letter. 査読有 582(9)巻 1313-1318 頁 2008 年
2. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2.
Usui M, Xing L, Drissi H, Zuscik M, O'Keefe R, Chen D, Boyce BF.
Journal of Bone and Mineral Research. 査読有 23(3)巻 314-325 頁 2008 年
3. Regulation of Twist and BMP Antagonists Expression in Human Periodontal Ligament Cells.
Moritaka S, Kobayashi M, Mitsui M, Usui M, Takada T, Takiguchi T, Yamamoto M.
Dental Medicine Research 査読有 28(2)巻 67-76 頁 2008 年
4. Regulation of tendon/ligament markers expression in human periodontal ligament cells.
Mitsui M, Kobayashi M, Moritaka S, Usui M, Koide Y, Yamamoto M.
Dental Medicine Research 査読有 28(3)巻 137-149 頁 2008 年
5. CCL7 and CCL25 promote RANKL-induced osteoclast formation
Hayashi Y, Okamatsu Y, Usui M, Yamamoto M
Journal of the Japanese Society of Periodontology. 査読有 51(4)巻 41 - 51 頁 2009 年

〔学会発表〕(計 4件)

1. BMP2 は軟骨細胞の誘導する破骨細胞形成を RANKL の産生を介して増加させる。
白井 通彦、岡松 良昌、小林 誠、山本 松男。
第 49 回歯科基礎医学会学術大会
2007 年 8 月 30 日 北海道大学
2. ケモカイン CCL7、CCL25 は破骨細胞形成を促進する。
林 幸恵、岡松 良昌、塚本 康巳、矢野 亜希子、白井 通彦、山本 松男
第 20 回歯科保存学会学術大会
2008 年 11 月 6 日 富山国際会議場
3. ヒト歯根膜細胞中のアルカリフォスファターゼ陰性細胞の特徴
鶴見 亜有子、小林 誠、白井 通彦、山本 松男
第 20 回歯科保存学会学術大会
2008 年 11 月 6 日 富山国際会議場
4. 破骨細胞形成における CCL7、CCL25 の役割
林 幸恵、岡松 良昌、白井 通彦、山本 松男
第 26 回日本骨代謝学術大会
2008 年 10 月 30 日大阪国際会議場

〔図書〕(計 1件)

1. M Usui, R Suda, Y Miyazawa, M Kobayashi, Y Okamoto, H Takiguchi, M Suzuki, M Yamamoto
New Frontiers in Lifestyle-Related Diseases (125-131). Tokyo, 2007, Springer

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

受賞

第 49 回歯科基礎医学会学術大会 において最優秀ポスター賞を受賞した。

6. 研究組織

(1)研究代表者

白井 通彦(USUI MICHHIKO)
昭和大学 歯学部 助教
研究者番号：10453630

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

(4)研究協力者

府川有紀子(FUKAWA YUKIKO)
昭和大学 歯学部 大学院生

林幸恵(HAYASHI YUKIE)

昭和大学 歯学部 大学院生