

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23069

研究課題名(和文)免疫受容活性化チロシンモチーフを有する新規分子の骨代謝と矯正学的歯の移動への作用

研究課題名(英文) Effects of novel molecules with immunoreceptor-activated tyrosine motifs on bone metabolism and orthodontic tooth movement

研究代表者

小川 紗衣香 (Ogawa, Saika)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：60882397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：現在までにITAMが破骨細胞分化に必須であることが報告されている。また、ITAMを持つSTAMは、細胞増殖シグナルに関与する機能分子であることが明らかにされている。これまでに、野生型マウスから作製した破骨細胞前駆細胞にSTAM1分子を過剰発現させると、破骨細胞新生が促進されることが確認している。さらに、破骨細胞前駆細胞において、STAM1をノックダウンすると、破骨細胞形成が抑制されることが確認した。破骨細胞前駆細胞にRANKL刺激を行うとMAPKs(ERK、JNK、p38)のリン酸化が起こることを確認した。さらにNFK-Bがリン酸化し、核内へ移行することも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病的な骨破壊を起こす疾患である歯周病、関節リウマチ、骨粗鬆症などでは、破骨細胞により骨吸収が誘導される。このため、破骨細胞の分化・活性化のメカニズムを明らかにすることは、骨疾患の病態の理解や治療のために非常に重要である。破骨細胞形成には、カルシウムシグナリングが必須と言われ、ITAMを有するDAP12またはFcRを介してのシグナル伝達が重要であることが報告されているが、まだ、詳細は分かっていない。本研究では、破骨細胞形成を誘導する細胞内シグナル伝達を明らかにすることで、破骨細胞形成制御の解明し、吸収を伴う疾患の治療や予防につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that ITAM is essential for osteoclast differentiation. In addition, STAM with ITAM has been shown to be a functional molecule involved in cell proliferation signaling. We have previously found that overexpression of STAM1 molecule in osteoclast progenitor cells generated from wild-type mice promotes osteoclastogenesis. Furthermore, we have found that knockdown of STAM1 in osteoclast progenitor cells suppresses osteoclastogenesis. We found that phosphorylation of MAPKs (ERK, JNK, p38) occurs when RANKL stimulation is applied to osteoclast progenitor cells. We also found that NFK-B is phosphorylated and translocated into the nucleus.

研究分野：矯正歯科

キーワード：細胞内シグナリング

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞分化のメカニズムを解明することは、矯正学的歯の移動のメカニズムの解明に重要である。また、歯周病、関節リウマチ、骨粗鬆症など、骨破壊を引き起こす疾患では、破骨細胞による骨吸収が誘導される。したがって、破骨細胞の分化・活性化のメカニズムを明らかにすることは、歯列矯正による骨吸収のメカニズム解明のみならず、骨疾患の病態解明やその治療のために非常に重要である。破骨細胞の分化誘導に不可欠な RANKL は、その受容体である RANK と結合し、TARF6 を刺激して MAPKs (ERK、JNK、p38) のリン酸化や NFκ-B がリン酸化を引き起こす。また、AP-1 の構成要素である c-Fos を誘導する。これらの遺伝子を欠損したマウスでは破骨細胞形成が阻害されることから、これらの因子が破骨細胞形成に必須であることが報告されている。これらの因子は、破骨細胞に必須のマスター転写因子である NFATc1 を活性化することが明らかになった。また、破骨細胞の分化において、NFATc1 の誘導にはカルシウムシグナルが必須であることが示唆される。

免疫担当細胞におけるカルシウムシグナルの活性化には、immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を持つアダプター分子が重要な役割を担っていることが知られている。ITAM をもつアダプター分子 FcR や DAP12 の遺伝子二重欠損マウスは破骨細胞の分化障害を示すことから、ITAM が破骨細胞の分化に必須であることが報告された。一方、細胞増殖のシグナル伝達に関わる機能分子として ITAM を有する STAM が同定されている。また、DAP12 あるいは FcR の ITAM を介したシグナル伝達は、RANKL の共刺激シグナルとして破骨細胞の分化に必須であることが解明された。しかし、この二重欠損マウスでも破骨細胞形成は完全に抑制されず、他の分子の存在が示唆された。従って、ITAM を有する新規アダプター分子の発見と、その受容体からのシグナル伝達機構の解明が望まれる。

細胞増殖のシグナル伝達に関わる機能分子として ITAM を有する signal transducing adapter molecule (STAM) 1 と STAM2 が同定された。DAP12 や FcR などの ITAM を持つ分子は破骨細胞形成に重要な役割を果たすことから、ITAM を持つ STAM1 や STAM2 も破骨細胞形成に影響を与える分子であるかどうかを調べることにした。この ITAM モチーフを持つ STAM は破骨細胞形成に必須なカルシウムシグナルを活性化する新規経路である可能性があるため、本報告では破骨細胞形成に与える影響について検討する。

2. 研究の目的

ITAM を有する STAM に着眼し、破骨細胞形成に STAM が関連していることをすでに突き止めている。この STAM の破骨細胞分化に関する解析は国内外ではいまだなく独創性が高い研究である。解明されれば新しい破骨細胞形成のメカニズムの発見につながると考えられる。本研究では、この ITAM 有する STAM 分子の破骨細胞形成に関わる役割および矯正学的歯の移動への影響を解明することが目的である。

3. 研究の方法

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 存在下で 3 日間培養し、附着細胞を破骨細胞前駆細胞として採取する。破骨細胞前駆細胞において RANKL の下流でのシグナル伝達への影響を解析するため、MAPKs (JNK、p-38、ERK) および NF- B の経路への影響を評価する。

STAM1 および STAM2 の過剰発現および shRNA を用いたのノックダウンによる *in vitro* での破骨細胞形成の解析を行った。我々は、レトロウイルスベクター (pMX-puro) を使用しての破骨細胞前駆細胞への遺伝子導入法を確立している。野生型マウスから骨髓細胞を採取し M-CSF の存在下で 3 日間培養する。その際、作成済みの SATM1 および STAM2 を過剰発現レトロウイルスを加え STAM1 および STAM2 過剰発現破骨細胞前駆細胞を作製する。その細胞を M-CSF の存在下で RANKL を加え破骨細胞形成を行いコントロールと比較する。同様に shRNA にて STAM1 あるいは STAM2 をノックダウンした場合の破骨細胞形成を観察する。shRNA の導入にはレンチウイルスベクターを用いる。

上顎切歯部歯槽骨と上顎左側第一臼歯の間に Ni-Ti クローズドコイルスプリングを装着し、上顎左側第一臼歯を近心移動させる。その後組織切片を作製し、上顎左側第一臼歯遠心頬側根圧迫側の RANKL の発現を免疫染色にて評価する。

4. 研究成果

破骨細胞前駆細胞に RANKL 刺激を行うと MAPKs (ERK、JNK、p38) のリン酸化が起こることを確認した。さらに NFκ-B がリン酸化し、核内へ移行することも確認した。野生型マウスから作成した破骨細胞前駆細胞にレトロウイルスベクターを使用して STAM1 分子を過剰発現して破骨細

胞形成を行ったところ、過剰発現したほうが破骨細胞形成が促進された。一方、破骨細胞前駆細胞に shRNA を使用して STAM1 をノックダウンして破骨細胞形成を行ったところ破骨細胞形成は抑制された。STAM2 をレトロウイルスベクター (pMX-puro) を使用しての破骨細胞前駆細胞への遺伝子導入を試みた。まず、レトロウイルスベクター使用のためレトロウイルスパッケージング細胞である Plat-E 細胞のストックを作成した。次に、STAM2 のレトロウイルスベクター作成するため、つなぎ変えのベクターを作成した。そのベクターより STAM2 遺伝子を切り出し、pMX-puro に STAM2 遺伝子をつないだ発現ベクターを作成した。

マウスの矯正学的歯の移動の RANKL での免疫染色において、矯正学的歯の移動を行ったマウスの顎左側第一臼歯遠心頬側根圧迫側の RANKL の発現が観察された。骨細胞の RANKL の発現が顕著に認められた。矯正学的歯の移動の際、RANKL が圧迫側の破骨細胞形成に影響を与える可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------