

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21592607  
 研究課題名（和文） TNF レセプター欠損キメラマウスを用いた矯正学的歯の移動機序の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of tooth movement mechanism in TNF receptors deficient chimera mouse  
 研究代表者  
 北浦 英樹 (KITAURA HIDEKI)  
 東北大学・病院・講師  
 研究者番号：60295087

研究成果の概要（和文）：TNF レセプター欠損マウスおよび野生型マウスのそれぞれの骨髄細胞をお互いのマウスに骨髄移植することで作製できるキメラマウスを用いて、矯正学的歯の移動時に誘導される破骨細胞形成においてどの破骨細胞形成関連細胞が重要な役割を演じているかを *in vivo* で解明を試みた。キメラマウスの臼歯を NiTi のコイルスプリングを用いて歯の移動の実験を行った結果、キメラマウスで歯の移動が起こる事が確認された。

研究成果の概要（英文）：We generated chimeric mice using wild type (WT) or TNF receptor deficient (KO) marrow, immunodepleted of T-cells and stromal cells. The samples were reciprocally transplanted into WT or KO mice following lethal irradiation to eliminate native marrow. We established an orthodontic tooth movement model in mice by using a Ni-Ti closed coil spring. We found that orthodontic tooth movement was occurred in chimeric mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景  
 近年、矯正用インプラントの開発により、治療期間の短縮が可能となってきた。さらなる、治療期間の短縮を行うには、生体反応（骨吸

収および骨添加）をコントロールすることが必要となってきた。また、矯正治療の問題点に歯根吸収などがある。これらの解決の

ためには、歯の移動のメカニズムを解明することが重要である。我々は、現在までにマウスの歯の移動の実験モデルを確立した (Yoshimatsu, M., Kitaura, H., et. al, J Bone Miner Metab, 2006)。マウスの歯の移動モデルを確立したことによって様々な遺伝子改変マウスの使用が可能になった。破骨細胞による骨吸収には、生体を保つための生理的骨吸収と炎症等が原因で起こる病的骨吸収がある。破骨細胞は、M-CSF 存在下で RANKL あるいは TNF- $\alpha$  によって形成される。我々は、生理的骨吸収は RANKL、病理学的骨吸収は TNF- $\alpha$  が中心的役割をしていると考えている。たとえば、リウマチ性関節炎等の炎症性骨吸収は、TNF- $\alpha$  をブロックすることによって、抑制されることが多く報告されている (Teitelbaum, SL. Arthritis Res Ther, 2006)。我々は、マウスの歯の移動は、TNF- $\alpha$  が関与していることを TNFRs KO マウスを用いた実験で明らかにした (Kitaura, H., et. al, J Dent Res, 2008)。破骨細胞形成に直接関与する細胞として、ストローマ細胞、マクロファージおよび T 細胞が関与していると考えられている (Teitelbaum, SL. Science, 2000)。これらの細胞を *in vivo* の実験で区別できるように WT と TNFRs KO のキメラマウスの使用することを考えた。

## 2. 研究の目的

我々は、現在までに TNF レセプター欠損 (TNF- $\alpha$  receptor 1 and 2 deficient :TNFRs KO) マウスを用いた研究で矯正学的歯の移動は、TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成が重要であることを見いだした (Kitaura, H., et. al, J Dent Res, 2008)。破骨細胞形成に直接関与している細胞として、破骨細胞前駆細胞であるマクロファージ、破骨細胞分化必須誘導因子である RANKL を発現するストローマ細胞および炎症の場で RANKL を発現すると報告され

ている T 細胞がある。我々の目的は、TNFRs KO マウスおよび野生型 (Wild Type :WT) マウスのそれぞれの骨髄細胞をお互いのマウスに骨髄移植することで作製できるキメラマウスを用いて、矯正学的歯の移動時に誘導される破骨細胞形成においてどの破骨細胞形成関連細胞が重要な役割を演じているかを *in vivo* で解明することである。

## 3. 研究の方法

研究の目的を達成するために WT マウスおよび TNFRs KO マウスを使用して、お互いに骨髄移植をすることで、キメラマウスを作製する。さらに T 細胞を除去することで、ストローマ細胞だけが TNFRs を持ったマウスやマクロファージだけが TNFRs を持ったマウスができる。このマウスに矯正学的歯の移動を行い、矯正学的歯の移動に重要な働きをしている細胞を決定する。キメラマウスは、WT マウスおよび TNFRs KO マウスを使用して、それぞれに致死量のラジエーションを行い、それぞれの骨髄細胞を注入し骨髄移植をすることで作製する。致死量のラジエーションを行うとマクロファージを含む骨髄細胞は死滅するが、ストローマ細胞は生き続けるためドナーのマウスの骨髄細胞を移植するとマクロファージはドナー由来でストローマ細胞はホスト由来のキメラマウスができる。例えば、ラジエーションした TNFRs KO マウスに WT マウスの骨髄を移植すると、ストローマ細胞は TNFRs を持っていないが、マクロファージは持っているマウスになる。逆を行うと細胞も逆になる。我々は、これらキメラマウスの作製に関してはすでに確立している (Kitaura et al. J. Immunol., 2004, Kitaura et al. J. Clin. Invest., 2005)。また、T 細胞については、抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体で除去することで除去しないものと比較する。このキメラマウスを用いて、歯の移動を行いその動

向を調べることで TNF- $\alpha$  が関与している矯正学的歯の移動にどの細胞が重要であるかを調べるができると考えている。8 週齢雄の WT および TNFRs KO マウスに致死量のラジエーションを行い骨髄細胞を取り除き、それぞれのマウスに骨髄移植を行い、マクロファージは TNFRs を持っているがストローマ細胞は TNFRs を持っていない(WT $\rightarrow$ TNFRs KO)、逆にマクロファージは TNFRs を持っていないがストローマ細胞は TNFRs を持っている(TNFRs KO $\rightarrow$ WT)キメラマウスを作製する。ポジティブコントロールとしてマクロファージおよびストローマ細胞両方が TNFRs をもっているマウス(WT $\rightarrow$ WT)およびネガティブコントロールとして TNFRs 持っていないマウス(TNFRs KO $\rightarrow$ TNFRs KO)の 4 種類を作製する。さらにこれらマウスの T 細胞は T 細胞ブロッキング抗体である抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体によって除去する。これにより T 細胞が除去された 4 種類のキメラマウスができる。抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体は、抗 CD4 抗体産生ハイブリドーマおよび抗 CD8 抗体産生ハイブリドーマを SKID マウスの腹腔に播種し、腹水を採取しそれより抗体を精製したものを使用する。各キメラマウスの上顎切歯と左側第一臼歯間に 10gf の NiTi クローズドコイルスプリングを装着し、両側第一臼歯を近心移動する。歯の移動量は、歯科用シリコン印象材を用いて経時的に上顎を印象採得し、各印象における第一臼歯と第二臼歯間距離を実体顕微鏡下(VH-7000/Keyence 社)で計測することにより測定する。

#### 4. 研究成果

キメラマウスの作製のため、移植するための骨髄細胞からストローマ細胞および T 細胞を抗体カラムを用いて除去し、イラディエーションを行い骨髄細胞を除去したマウスに骨髄移植した。抗体カラムを用いてストローマ

細胞および T 細胞が除去できたか FACS を用いて確認した。また、マウスより抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体をマウスに注入し、T 細胞を除去した。抗体を注入後、脾臓より細胞を抽出し、FACS にて T 細胞が除去できた事を確認した。WT および TNFRs KO マウスを用いて、マクロファージは TNFRs を持っているがストローマ細胞は TNFRs を持っていない(WT $\rightarrow$ TNFRs KO)、逆にマクロファージは TNFRs を持っていないがストローマ細胞は TNFRs を持っている(TNFRs KO $\rightarrow$ WT)キメラマウスを作製した。このそれぞれのキメラマウスの臼歯を NiTi のコイルスプリングを用いて歯の移動の実験を行った。それぞれのキメラマウスで歯の移動が起こる事が確認された。

#### 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 14 件)

① Masuyama R., Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H., Okabe K, Ohyama K, Komori T. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass. 査読有 J. Bone Miner. Res. (in press).

② Yoshimatsu M., Kitaura H., Fujimura Y., Kohara, H., Morita, Y., Eguchi, T., Yoshida, N.: Inhibitory effects of IL-12 on experimental tooth movement and root resorption in mice. 査読有 Arch. Oral Biol. 57, 1, 2012, 36-43.

③ Kimura, K., Kitaura H., Fujii, T., Hakami Z., Takano-Yamamoto T: Anti-c-Fms antibody inhibits lipopolysaccharide-induced

osteoclastogenesis *in vivo*. 査読有 FEMS Immunol. Med. Microbiol. 64, 2, 2012, 219-227.

④ Bush, JA., Kitaura, H., Ma, Y., Teitelbaum, SL., Ross, FP., Smith JW.: Comparative Proteomic Analysis of a Cytosolic Fraction from  $\beta$  3 Integrin-deficient Cells. 査読有 Cancer Genomics Proteomics. 9, 1, 2012, 1-13.

⑤ Kitaura, H., Aonuma, T., Fukumoto, E., Kimura, K., Fujii, T., Hakami, Z., Takano-Yamamoto T. IL-12- and IL-18-mediated nitric oxide induced apoptosis of adherent bone marrow cells in TNF- $\alpha$ -induced osteoclast formation. 査読無 Interface Oral Health Science 2011., 2012, 125-127.

⑥ Kohara, H., Kitaura, H., Fujimura, Y., Yoshimatsu, M., Morita, Y., Eguchi, T., Masuyama, R., Yoshida, N.: IFN- $\gamma$  directly inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo* and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction. 査読有 Immunol. Lett. 137, 1-2, 2011, 53-61.

⑦ Kitaura, H., Fujimura, Y., Yoshimatsu, M., Kohara, H., Morita, Y., Aonuma, T., Fukumoto, E., Masuyama, R., Yoshida, N., Takano-Yamamoto T: IL-12- and IL-18-mediated nitric oxide-induced apoptosis in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclastogenesis of bone marrow cells. 査読有 Calcif. Tissue Int. 89, 1, 2011, 65-73.

⑧ Moriishi, T., Maruyama, Z., Fukuyama,

R., Ito, M., Miyazaki, T., Kitaura, H., Ohnishi, H., Furuichi, T., Kawai, Y., Masuyama, R., Komori, H., Takada, K., Kawaguchi, H., Komori, T: Overexpression of bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. 査読有 PLoS One. 6,11,2011 e27487.

⑨ 北浦英樹: TNF- $\alpha$  の骨代謝作用 査読無、骨粗鬆症治療、10, 1、2011, 10-14.

⑩ 北浦英樹: 特集カラーレビュー 骨髄細胞での TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成における IL-12 および IL-18 によるアポトーシス誘導、査読無、骨粗鬆症治療、10,1、2011, 8.

⑪ Morita, Y., Kitaura, H., Yoshimatsu, M., Fujimura, Y., Kohara, H., Eguchi, T., Yoshida, N.: IL-18 Inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis possibly via a T cell-independent mechanism in synergy with IL-12 *in vivo*. 査読有 Calcif. Tissue Int. 86, 3, 2010, 242-248.

⑫ Kitaura, H., Fujimura, Y., Yoshimatsu, M., Eguchi, T., Kohara, H., Insan, J., Morita, Y., Yoshida, N.: A M-CSF receptor c-Fms antibody inhibits mechanical stress-induced root resorption during orthodontic tooth movement in mice. Angle Orthod. 査読有 79, 5, 2009, 835-841.

⑬ Fujimura, Y., Kitaura, H., Yoshimatsu, M., Eguchi, T., Kohara, H., Morita, Y., Yoshida, N.: Influence of bisphosphonates on orthodontic tooth movement in mice. Eur. J. Orthod. 査読有 31, 6, 2009,

⑭ Yoshimatsu, M., Kitaura, H., Fujimura, Y., Eguchi, T., Kohara, H., Morita, Y., Yoshida, N. : IL-12 inhibits TNF- $\alpha$  induced osteoclastogenesis via a T cell-independent mechanism *in vivo*. 査読有 Bone. 45, 5, 2009, 1010-1016.

[学会発表] (計 11 件)

①. Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N.: Effect of SHIP on TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis. The 4th International Congress and The 70th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. Oct 17th-20th 2011. Nagoya, Japan.

②. Kimura, K., Kitaura, H., Fujii, T., Hakami Z., Takano-Yamamoto T: Anti-c-Fms antibody inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis *in vivo*. The 4th International Congress and The 70th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. Oct 17th-20th 2011. Nagoya, Japan.

③. Fujii T, Kitaura H, Kimura K, Hakami Z, Takano-Yamamoto T. Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated osteoclast formation *in vivo*. The 4th International Congress and The 70th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. Oct 17th-20th 2011. Nagoya, Japan.

④. Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Aonuma T, Fukumoto

E, Yoshida N, Takano-Yamamoto T. IL-12- and IL-18-mediated nitric oxide-induced apoptosis in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclastogenesis. The 4th International Congress and The 70th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. Oct 17th-20th 2011. Nagoya, Japan.

⑤. Kitaura H, Aonuma T, Fukumoto E, Kimura K, Fujii T, Hakami Z, Takano-Yamamoto T. IL-12- and IL-18-mediated nitric oxide induced apoptosis of adherent bone marrow cells in TNF- $\alpha$ -induced osteoclast formation. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, Mar 7th-8th 2011. Sendai, Japan.

⑥. Morita Y, Kitaura H, Kohara H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Eguchi T, Yoshida N. IL-18 inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis possibly via a T cell-independent mechanism in synergy with IL-12 *in vitro* and *in vivo*, The 6th Japan-Korea conference on cellular signaling for young scientists. Nov 24th-26th 2009. Nagasaki, Japan.

⑦. Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Morita Y, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N. IFN- $\gamma$ -mediated nitric oxide inhibits proliferation of M-CSF-dependent bone marrow macrophages, The 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Denver, Sep 11th-15th 2009. U.S.A.

⑧ .Morita Y, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N. IL-18 inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis in synergy with IL-12 *in vivo*, The 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Denver,. Sep 11th-15th 2009. U.S.A

⑨.Fujimura Y, Kitaura H, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N. Effect of Bisphosphonates on Orthodontic Tooth Movement in Mice, The 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Denver,. Sep 11th-15th 2009. U.S.A

⑩.Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N. IL-12 inhibits TNF- $\alpha$  mediated osteoclastogenesis via a T cell-independent mechanism *in vivo*, The 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Denver,. Sep 11th-15th 2009. U.S.A

⑪. Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N, Takano-Yamamoto T. IL-12- and IL-18-mediated Nitric Oxide Induces Apoptosis in TNF- $\alpha$ -induced Osteoclastogenesis of Bone Marrow Cells, The 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Denver,. Sep 11th-15th 2009. U.S.A

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北浦 英樹 (KITAURA HIDEKI)

東北大学・病院・講師

研究者番号 : 60295087

##### (2) 研究分担者

吉松 昌子 (YOSHIMATSU MASAKO)

長崎大学・医学部歯学部附属病院・助教

研究者番号 : 20420630

増山 律子 (MASUYAMA RITSUKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 60297596

藤村 裕治 (FUJIMURA YUJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 70448504