

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17152

研究課題名（和文）プリン作動性シグナルを介した新たな骨リモデリング促進機構の解明

研究課題名（英文）Novel Mechanism to Promote Bone Remodeling via Purinergic Signaling

研究代表者

穴戸 香 (Shishido, Kaori)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60894053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内のエネルギー通貨であるAdenosine triphosphate (ATP)は、骨吸収と骨形成のカップリングである歯槽骨リモデリングに関与しており、本研究では、矯正歯科治療における役割を検討した。歯周組織においてATP分解酵素であるCD39,CD73の発現が認められ、歯の移動に伴い発現の上昇が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ATPが矯正歯科治療による歯槽骨リモデリングを活性化する新たなターゲットの発見に繋がると考えられる。また、国民病である歯周病においてもATPが骨吸収へ関与することが報告されているため、本研究成果は、歯周病と矯正歯科治療が組み合わさった複合的な病態における治療にも寄与する。

研究成果の概要（英文）：Adenosine triphosphate (ATP), an intracellular energy currency, is involved in bone remodeling, the coupling of bone resorption and bone formation, and this study examined its role in orthodontic treatment. ATP-degrading enzymes were found to be expressed in periodontal tissues, and the expression of ATP-degrading enzymes increased with tooth movement. This may lead to the discovery of a new target for ATP to activate orthodontic treatment-induced alveolar bone remodeling.

研究分野：歯科

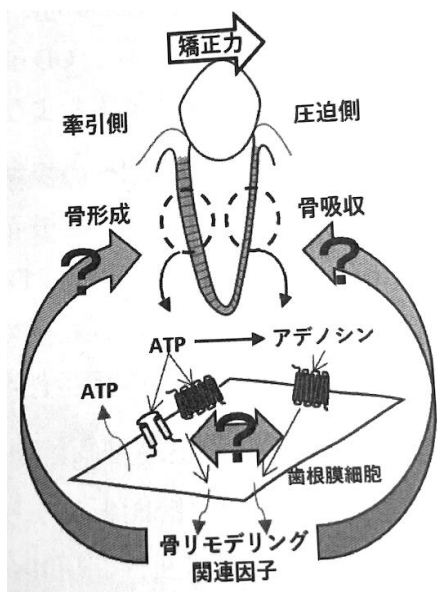
キーワード：ATP

1. 研究開始当初の背景

細胞内のエネルギー通貨である Adenosine triphosphate (ATP) は、細胞外では P2 プリン受容体 (P2R) を介して細胞間シグナル伝達分子としても機能する。P2R は、P2X 受容体と P2Y 受容体に大別される。細胞外 ATP は、CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1) などの ATP 分解酵素により、adenosine monophosphate (AMP) へと分解され、その濃度が厳格に維持されている。さらに、AMP は CD73 (ecto-5' nucleotidase) によりアデノシンへと分解される。アデノシンは P1 プリン受容体とも呼ばれるアデノシン受容体 (AR) を介してシグナル伝達する。AR は A1, A2a, A2b および A3 のサブタイプを有する。ATP やアデノシンはその構造にプリン塩基であるアデニンを有することから、これによるシグナルをプリン作動性シグナルと総称する。矯正歯科治療では、矯正力を負荷することで歯根膜が圧縮力と伸展力の2種類の機械的刺激を感知し、骨吸収と骨形成のカップリングである歯槽骨リモデリングが行われる。機械的刺激による歯根膜細胞から ATP が放出されることが知られており、細胞外 ATP は圧縮力の負荷により P2X7R を介して interleukin (IL)-1 $\beta$  産生や P2Y1R を介したオステオポンチン発現を誘導し、骨吸収へ作用することが報告されている。一方、伸展力の負荷では P2Y1R を介して骨形成タンパク質 BMP9 の発現が促進され、骨形成への関与が示唆されている。また、アデノシンについては、骨芽細胞分化などが報告されている。しかし、矯正歯科治療における歯槽骨リモデリングは骨吸収と骨形成の調和が重要であり、プリン作動性シグナルがその調和をどのように制御しているかは知られていない。さらに、機械的刺激を受けた歯根膜では細胞外 ATP とその分解産物であるアデノシンが共存すると考えられるため、ATP-P2R 経路とアデノシン-AR 経路の相互作用が骨リモデリングを制御している可能性も推測されるが、その詳細は解明されていない。そこで、矯正歯科治療による歯槽骨リモデリングに、プリン作動性シグナルがどのように関与しているかとの着想に至った。

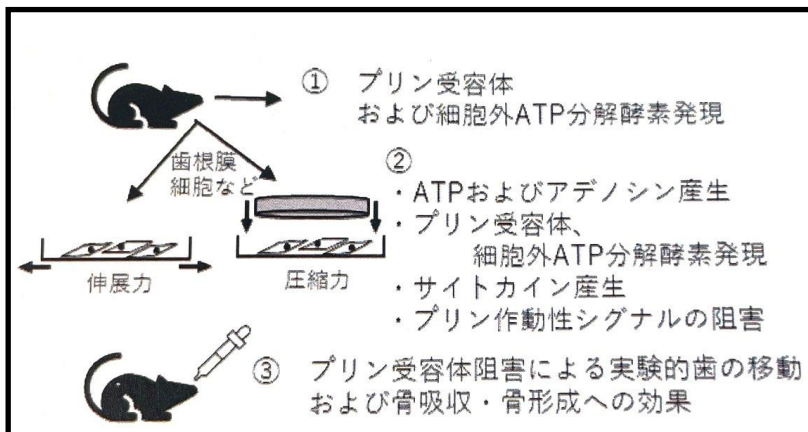
2. 研究の目的

本研究では、歯周組織、特に歯根膜細胞のプリン作動性シグナルに注目し、歯根膜細胞のプリン作動性シグナルにおけるプリン作動性シグナル関連分子の発現と機械的刺激に伴う変化を解析するとともに、ATP-P2R 経路およびアデノシン-AR 経路の骨形成・吸収への影響とその相互作用を解明する(下図)。これにより、矯正歯科治療による歯槽骨リモデリングを活性化する新たなターゲットの発見に繋がると考えられる。



### 3. 研究の方法

(1) 実験的歯の移動マウスモデルにおけるプリン受容体および ATP 分解酵素発現の解析  
C57BL/6 マウスを用いて、歯周組織の P2R および AR のプリン受容体、細胞外 ATP 分解酵素として CD39 および CD73 発現を解析する。また、矯正学的歯の移動時の歯根膜による破骨細胞や骨芽細胞を介した骨吸収・骨形成の検討のため、上顎切歯および上顎臼歯に直径 0.012 インチニッケルチタンワイヤーを装着し、上顎臼歯を舌側へ移動させる実験的歯の移動マウスモデルを用いて CD39 および CD73 発現の変化を解析する。



(2) マウス歯根膜細胞への機械的刺激負荷によるプリン作動性シグナル応答の解析

①マウス上下顎臼歯根面から歯根膜を採取・培養し、歯根膜細胞を調整する。細胞調整方法は、27G 針および鉤付きピンセットを用いて、マウスから上顎臼歯を抜去、PBS で洗浄し、10%FCS 添加  $\alpha$  MEM 培地上で培養した。(37° C, 5%CO<sub>2</sub>) 抜去歯培養の際、コラーゲンゲルの cellmatrix I-P を用いて  $\alpha$  MEM 培地をシャーレ底面に 1 層ゲル化させ、抜去歯を固定した。定常時のプリン受容体発現、CD39 および CD73 発現を解析する。また、培養液中に ATP を添加し、経時的な培養上清中 ATP およびアデノシン濃度を測定することにより、非機械的的刺激下での細胞外 ATP 分解能とアデノシン産性能を解析する。

②マウス歯根膜細胞に機械的刺激を負荷し、プリン受容体発現、CD39 および CD73 発現、細胞外 ATP 分解能とアデノシン産性能を測定することにより、機械的刺激によるプリン作動性シグナルの変化について解析する。機械的刺激として、生化学用細胞伸展装置およびストレッチャンバーによる伸展力、ならびにガラスディスクを用いた圧縮力を負荷する。

### 4. 研究成果

(1) マウスモデルにおけるプリン受容体および ATP 分解酵素発現の解析

マウスの歯周組織で歯肉および歯根膜を回収し、フローサイトメトリー解析を行った。歯肉は採取後、コラゲナーゼ処理をすることで解析可能な細胞数を確保できたが、歯根膜は解析に必要な細胞数を確保できなかったため、歯肉においてのみ解析した。正常状態においてフローサイトメトリーにて CD39 および CD73 発現を確認できた。また、矯正的歯の移動に伴い、これら CD39 および CD73 発現の上昇が確認できた。

(2) マウス歯根膜細胞の培養

2 週間程培養の後、抜去歯歯根周囲に線維芽細胞様細胞の増殖を認めた。細胞を回収し、10%FCS DMEM にて培養を開始したが、細胞の付着が確認できなかった。増殖量および速度は採取量に依存するため、1 度の採取数を増やして、効率的な歯根膜細胞培養プロトコルを検討するため、培養する抜去歯を増やしてみたが、プレートへの定着は認められなかった。また、細胞培地を DMEM から  $\alpha$  MEM へ、プレートをコラーゲンコートプレートへと変更も検討したが、こちらも細胞の定着は確認できなかった。

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
---------	---------