

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22592043

研究課題名（和文） 歯周組織におけるオステオアクチビンの作用機序の解明

研究課題名（英文） The role of osteoactivin on the function of periodontal tissues.

研究代表者

後藤 哲哉 (GOTO TETSUYA)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70253458

研究成果の概要（和文）：歯科矯正で歯を動かす場合、歯が動く方向の圧迫側では歯槽骨が吸収し、牽引側では歯槽骨において骨の増加が生じるが、骨の増加のメカニズムは不明である。我々は牽引側での骨形成の促進にオステオアクチビン(OA)が関与しているのではないかと考え、OA の牽引側での発現や活性化について調べた。その結果、歯根膜線維芽細胞が牽引されることにより細胞表面の OA が切断され骨芽細胞に作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：During the orthodontic tooth movement, on the pressure side bone resorption occurs, while on the tension side bone formation is accelerated. However, the mechanism of the activation for bone formation at the tension side is unknown. We hypothesized that osteoactivin (OA) may be involved in the activation of bone formation at the tension side, we examined the expression or activation of OA at the tension side. The results of this study indicated that ADAMs, which may induce the activation of osteoblastic bone formation on the alveolar bone, sheds the OA expressed in the periodontal ligamental cells at the tension side.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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、形態系基礎歯科学

キーワード：RT-PCR、オステオアクチビン、免疫染色、歯周組織、歯根膜細胞、歯牙移動、破骨細胞、骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

オステオアクチビンは 2001 年に骨硬化症のモデルラットより、その原因遺伝子として分離同定された分子であり、当初は骨芽細胞の骨形成を促進する分子であると考えられていたが、骨組織以外からもホモログ分子が

見つかっておりさまざまな働きがあることが分かって来た。オステオアクチビンと同じ遺伝子配列をもつ分子としては、human HGFIND (hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 type), GPNMB (Glycoprotein (transmembrane) nmb), および mouse DC-HIL

(dendritic cell-associated heparan sulfate proteoglycan-integrin ligand) などがある。オステオアクチビンの働きとしては、骨芽細胞の分化および骨形成促進、破骨細胞の形成促進、ガン細胞の転移抑制、線維芽細胞の増殖抑制などが報告されている。また、無重力状態では骨芽細胞におけるオステオアクチビンの発現増加が報告されており、無重力状態では骨形成が抑制されることを考慮すると、骨芽細胞に対する影響も、状況によって異なることが示唆されている。さらに、オステオアクチビンの構造は細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインからなり、レセプター、リガンド、さらには酵素としても働く。

歯根膜線維芽細胞は線維芽細胞でありながら高いアルカリフォスファターゼ活性をもち、破骨細胞形成支持能をもつように骨芽細胞と近い特徴を有する。メカニカルストレスを歯根膜線維芽細胞に加えたときの遺伝子発現の変化やタンパク産生の変化は我々を含め今まで多くの研究がなされてきた。従って、もし、歯根膜線維芽細胞にオステオアクチビンが発現していれば線維芽細胞として、また骨芽細胞様の細胞としていろいろな働きを生じることが予想された。

一方、以前より歯周組織の骨芽細胞、破骨細胞、歯肉線維芽細胞に知覚神経から分泌される神経ペプチド、サブスタンスPのレセプターであるニューロキニン1レセプター(NK1-R)が存在し、NK1-Rを介して知覚神経は骨代謝に影響を与えていることを明らかにしてきた。オステオアクチビンは別名human HGFIN (hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 type)が示すようにNK1-Rの発現誘導能をもつことは明らかにされているが、骨芽細胞、破骨細胞、歯肉線維芽細胞においてどのようにオステオアクチビンが発現し、それが、どのようにNK1-Rの発現につながるかについては明らかにされていなかった。さらに、オステオアクチビンの細胞外ドメイン、細胞内ドメインのどちらが重要な働きを行っているのか、そのメカニズムについては不明であった。

2. 研究の目的

オステオアクチビンはI型膜蛋白質(N末端側が細胞外に出ている膜貫通型蛋白質で、細胞外ドメインの切断(シェディング)の有無によって膜型、分泌型、C末端側断片という異なる分子形態が存在し、それぞれ異なる働きを行う。従って、オステオアクチビンの発現上昇により骨芽細胞の骨形成が促進さ

れることは分かっているが、その3つのどの機能によるものかは分かっていない。破骨細胞、歯根膜線維芽細胞についてはオステオアクチビンが発現することは分かっているが、それ以上の事は全く分かっていない。そこで、本研究ではin vivoとin vitroで次の点について明らかにすることを目的とした。

(1) ラットの顎の歯に矯正力を付与した場合、どの時期にどの程度のオステオアクチビンが歯周組織の骨芽細胞、破骨細胞、歯根膜線維芽細胞に発現するか。

(2) オステオアクチビンの細胞外ドメインがいつ切断されてどのような働きをしているか。

(3) 骨芽細胞、破骨細胞、歯根膜線維芽細胞において圧迫力、牽引力を使った場合、オステオアクチビンがどのように発現され、細胞外ドメイン、細胞内ドメインが切断(シェディング)されて、活性を持つようになるのかを調べ、それがそれぞれの細胞の機能とどのような関わりを持つのか。

(4) 細胞外ドメインの切断は主に金属プロテアーゼによって生じるので、どのタイプの金属プロテアーゼがシェディングに関与しているかをつきとめ、そのインヒビターを用いシェディングの阻害を行ったときの機能変化を調べる。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色

ラット臼歯に歯科矯正用ゴムを挿入し、4日間負荷をかけ、歯を移動させた。深麻酔下で4%パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行い歯牙を含む上顎骨を取り出した。EDTAで脱灰後凍結切片を作成した。一次抗体として抗オステオアクチビン抗体を用いDABで発色させ観察を行った。

(2) ヒト歯根膜線維芽細胞の分離

矯正治療のため便宜抜去を行った健康なヒトの臼歯を用いた。歯根の中央1/3の部分の歯根膜組織を培養皿に静置し、そこから増殖遊走して来る細胞を回収し、継代を行った。実験には継代3~8代目の細胞を用いた。

(3) メカニカルストレス(伸展刺激)の負荷

ヒト歯根膜線維芽細胞を10%血清含有培養液で3日間培養後、無血清培地に交換し伸展装置に装着し伸展率4%、毎分5回の割合で24時間伸展を行った。

(4) RT-PCR, Real-time PCR, ELISA法

上記伸展を行った細胞から total RNA を回収し、逆転写を行い cDNA を作成した。オステオアクチビン、およびオステオアクチビンの細胞外ドメインを切断する ADAM10, 12, 17 のプライマーを用い半定量的 RT-PCR 法および Real-time PCR 法にて発現量を調べた。

また、伸展後に培養液を回収し遊離して来たオステオアクチビンの量を ELISA 法によって測定した。

4. 研究成果

(1) 免疫染色

圧迫側では、歯根膜腔の狭窄が生じ、牽引側では歯根膜腔の拡大が生じていた。

圧迫側では、歯根吸収が生じている部分に破歯細胞が認められ (図 1、矢印)、強いオステオアクチビン陽性反応が認められた。

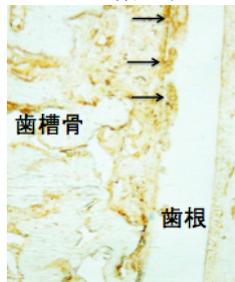


図 1 圧迫側

牽引側では、圧迫側と比較して、歯根膜のオステオアクチビンの免疫陽性反応が強く認められた。また、牽引側の歯槽骨表面に存在する骨芽細胞でも、オステオアクチビン免疫陽性反応が強く認められた (図 2、矢頭)。また、セメント芽細胞でもオステオアクチビン陽性反応が認められた。

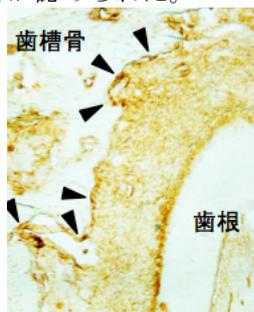


図 2、牽引側

(2) ヒト歯根膜線維芽細胞におけるオステオアクチビン mRNA の発現

オステオアクチビン mRNA はヒト線維芽細胞で発現していた。また、伸展刺激では発現量は変化しなかった。図 3 は半定量 RT-PCR、図 4 は real-time PCR の結果。

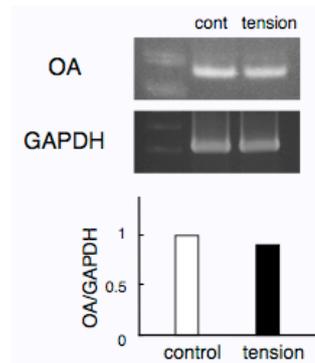


図 3 半定量 RT-PCR 法によるオステオアクチビン発現。GAPDH 発現に体する相対評価。

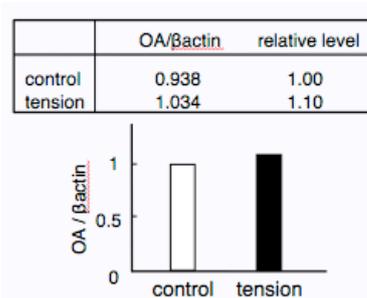


図 4 Real-time PCR 法によるオステオアクチビン発現の評価

(3) 培養液中へのオステオアクチビンの細胞外ドメインの放出

ELISA 法を用いた計測結果により、培養液中へのオステオアクチビンの細胞外ドメインの放出は、伸展群でコントロール群よりも有意に増加することが認められた (図 5)。

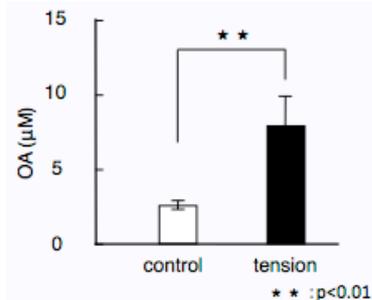


図 5 培養液中のオステオアクチビンの濃度。伸展した方は有意に濃度が上昇した。

(4) ヒト歯根膜線維芽細胞における ADAM mRNA の発現

オステオアクチビンの細胞外ドメインを切断する酵素として ADAM 10, 12, 17 があるが、そのタイプの ADAM が歯根膜線維芽細胞が発現しているか調べた結果、ADAM12, 17 がコントロールに比べ有意に発現が上昇していた (図 6)。

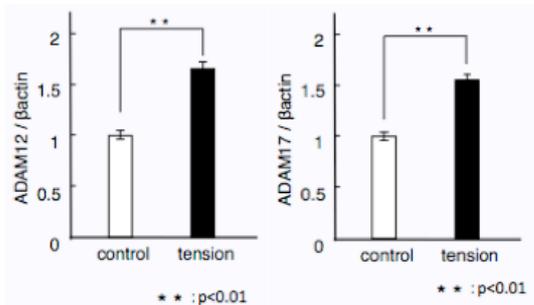


図6 伸展力付与時のADAM12, 17の発現。

(5) ADAM 阻害薬の影響

伸展刺激によって増加した培養液中へのオステオアクチビンの細胞外ドメインの放出は、ADAM 阻害薬によってコントロールレベルまで減少した (図7)。

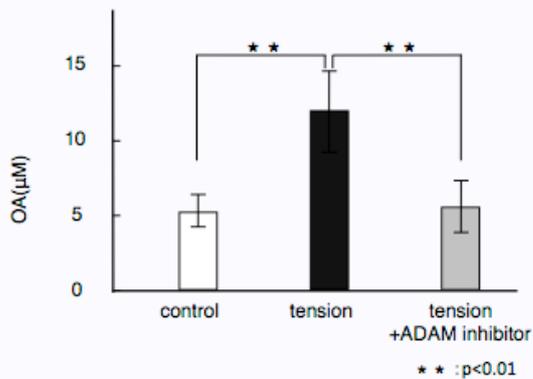


図7 培養液中のオステオアクチビンの濃度。ADAM 阻害薬の添加によって有意に減少した。

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3件)

- ① A. Fukuda, T. Goto, K. N Kuroishi, K. K Gunjigake, S. Kataoka, S. Kobayashi, K. Yamaguchi. Hemokinin-1 competitively inhibits substance P-induced stimulation of osteoclast formation and function. *Neuropeptides*, 2013. (査読あり)
- ② Ichiki T, Kuroishi KN, Gunjigake KK, Kobayashi S, Goto T.: Neurokinin B activates the formation and bone resorption activity of rat osteoclasts. *Neuropeptides* 45:239-244, 2011. (査読あり)
- ③ Gramoun A, Goto T, Nordström T, Rotstein OD, Grinstein S, Heersche JN, Manolson MF. Bone matrix proteins and extracellular acidification: potential co-regulators of osteoclast morphology. *J Cell Biochem*. 2010 Oct 1;111(2):350-61. (査読あり)

[学会発表] (計14件)

- ① K. NAKAO, T. GOTO, K.K. GUNJIGAKE, M. UEDA1, A. FUKUDA1, S. KOBAYASHI2, and K. YAMAGUCHI. Tension Stimulates Osteoactivin Release by Human Periodontal Ligament Fibroblasts. International Association for Dental Research, Seattle, USA, March 20-23.
- ② 小早川美輝、牧角有華、小林 繁、後藤哲哉. Hemokinin 1は substance Pの骨形成促進作用を抑制する. 第54回歯科基礎医学会総会. 郡山市、9月14-16日.
- ③ 黒石 加代子、上田 雅恵、福田 文、後藤哲哉. 伸展刺激はヒト歯根膜線維芽細胞におけるオステオアクチビンの放出を促進する. 第49回日本口腔組織培養学会学術大会, 広島市、11月17日.
- ④ 福田文、後藤哲哉、黒石加代子、郡司掛香織、片岡真司、蔵田清香、小林繁、山口和憲：破骨細胞形成における hemokinin-1の役割について、第71回九州歯科学会総会、北九州、5月28、29日
- ⑤ 後藤哲哉、片岡真司、小林 繁：伸展力は歯根膜線維芽細胞の ADAM10の発現を誘導し、osteoactivinを介して骨形成を促進する。第53回歯科基礎医学会学術大会 長良川国際会議場 9月30日～10月2日
- ⑥ 福田文、後藤哲哉、黒石加代子、郡司掛香織、片岡真司、蔵田清香、小林繁、山口和憲：破骨細胞形成におけるヘモキニン-1の役割について、名古屋国際会議場 10月17日～20日
- ⑦ 後藤哲哉、福田 文：伸展力付与後の ADAM10-oosteoactivin 系による骨形成促進のメカニズムについて、第48回日本口腔組織培養学会総会、明海大学浦安キャンパス、11月19日。
- ⑧ 福田 文、後藤哲哉、黒石加代子、郡司掛香織、山口和憲、小林 繁：破骨細胞形成における hemokinin-1の役割について、第117回 日本解剖学会総会 山梨大学甲府キャンパス 3月26日～28日
- ⑨ Fukuda A, Goto T, Nakao K, Gunjigake K, Kataoka S, Kurata S, Kobayashi S, Yamaguchi K. The role of hemokinin-1 in osteoclast formation. International Association for Dental Research, Barcelona, Spain 2010. 07.14～17
- ⑩ Nakao K, Goto T, Gunjigake K, Fukuda A, Kobayashi S, Yamaguchi K; Osteoactivin expression in human periodontal ligament fibroblasts under mechanical

loading. International Association for Dental Research, Barcelona, Spain 2010.07.14~17.

- ⑪ Kawata K, Kuroishi K, Kobayashi S T. Goto T; Osteoactivin Expression in Periodontal Cells Subject to Orthodontic Forces. JADR, Kokura, Kitakyushu, 2010.11.20, 21.
- ⑫ Kawata K, Kobayashi S T. Goto T; Osteoactivin Expression in Periodontal Cells Subject to Orthodontic Forces. International Association for Dental Research, San Diego, USA 2011.03.14~19.
- ⑬ 福田文、後藤哲哉、黒石加代子、郡司掛香織、片岡真司、蔵田清香、小林繁、山口和憲；破骨細胞形成におけるヘモキニン-1 (HK-1) の役割について。第70回九州歯科学会、北九州、2010.05.23.
- ⑭ 福田文、後藤哲哉、黒石加代子、郡司掛香織、片岡真司、蔵田清香、小林繁、山口和憲；破骨細胞形成におけるヘモキニン-1 (HK-1) の役割について。第47回口腔組織培養学会、高知市、2010.11.13.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 哲哉 (GOTO TETSUYA)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70253458

(2) 研究分担者

小林 繁 (KOBAYASHI SHIGERU)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10118078

片岡 真司 (KATAOKA SHINJI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80364149

黒石 加代子 (KUROISHI KAYOKO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60468303