

## 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 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592298

研究課題名（和文） 矯正力応答性破骨細胞形成における歯根膜細胞、骨芽細胞の役割分担の解明

研究課題名（英文） The elucidation of sharing roles of periodontal ligament cells and alveolar bone osteoblasts in orthodontic-force responsive osteoclast formation.

研究代表者

清水 典佳（SHIMIZU NORIYOSHI）

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：40154299

研究成果の概要（和文）：歯の移動時、歯根膜細胞から産生された PGE<sub>2</sub> が破骨細胞形成に必須の RANKL を誘導するため、PGE<sub>2</sub> の破骨細胞形成に関する歯根膜及び骨芽細胞の機能的な差異を検討した。

ヒトの両細胞に PGE<sub>2</sub> を添加し RANKL の発現を検討したところ、骨芽細胞で顕著に発現が増大し、この系で RAW264.7 細胞を共培養すると、骨芽細胞のみで TRAP<sup>+</sup>破骨細胞様細胞の形成促進があり、RANKL ノックダウンでこの効果は失われた。よって、歯根膜細胞に比べ骨芽細胞が RANKL を介した破骨細胞形成に強く関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Periodontal ligament cells (PDLs) produce PGE<sub>2</sub> during orthodontic tooth movement. PGE<sub>2</sub> is a potent osteoclast-inducing factor that induces RANKL. In this study, we compared the functional difference in osteoclastogenesis between human PDLs (HPDLs) and normal human osteoblasts (HOBs) as a direct effect of PGE<sub>2</sub> exposure.

We examined the expression of RANKL with or without PGE<sub>2</sub> in HPDLs and HOBs. Then, RAW264.7 cells were co-cultured on HPDLs or HOBs pretreated with PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> exposure increased significantly RANKL expression in HOBs compared with HPDLs. The number of tartrate-resistant acid phosphatase staining osteoclast-like cells from RAW264.7 cells increased significantly by PGE<sub>2</sub> pretreatment in HOBs and was reduced by small interfering RNA knockdown of RANKL. These results suggest that osteoblasts strongly influence the stimulation of osteoclastogenesis via RANKL, induced by PGE<sub>2</sub> in periodontal tissues, compared with PDLs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：メカニカルストレス、破骨細胞、RANKL、  
歯根膜細胞、骨芽細胞、PGE<sub>2</sub>

### 1. 研究開始当初の背景

矯正治療における歯の移動に伴う歯槽骨吸収は、矯正力が加わった歯周組織細胞から産生される RANKL、M-csf、OPG 発現に制御されている。今まで、メカニカルストレス (MS) が加わった歯根膜由来細胞 (歯根膜細胞) が RANKL を産生し破骨細胞を形成すると考えられていた。しかし我々は、各年齢層 20 人のドナーから採取した歯根膜細胞に MS を加え RANKL 発現を検討した結果、RANKL 発現は促進していなかった (未発表)。このことから、矯正力応答性破骨細胞形成には歯根膜細胞以外の細胞の関与が必須と考えられた。

### 2. 研究の目的

我々の一連の研究で歯根膜細胞への MS 負荷では RANKL 発現の亢進はなかったが、骨芽細胞への負荷では RANKL 発現の強い促進が認められたため、矯正力応答性破骨細胞形成には、歯根膜細胞より、骨芽細胞が重要な役割を有していると考えられた。しかし、骨との癒着歯では歯の移動は起こらないことから、歯根膜細胞も重要な役割を有していると考えられ、両者は密接に関連して各々の役割を演じていると考えられた。そこで、矯正力応答性破骨細胞形成における歯根膜細胞および骨芽細胞の役割分担の分子メカニズムについて検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯根膜細胞の MS 応答性

矯正治療の目的で抜歯した各年代のドナーの小白歯及から歯根膜を採取し、培養、増殖させヒト歯根膜細胞を得た。歯根膜細胞を培養ディッシュに播種し、円形のスライドガラスを介して重りを載せ、細胞に 2g/cm<sup>2</sup> の MS を 24 時間加えた。MS 負荷後に細胞を採取し COX-2、RANKL、OPG、M-csf の遺伝子発現を測定した。

#### (2) 歯根膜及び骨芽細胞の PGE<sub>2</sub> 刺激による破骨細胞形成能

歯根膜細胞は、加えられた MS に応答して COX-2 発現を介して PGE<sub>2</sub> を産生し、また、PGE<sub>2</sub> は RANKL を強く誘導することが知られている。そこで、MS に応答して歯根膜細胞が産生した PGE<sub>2</sub> が周囲の骨芽細胞を刺激し RANKL を誘導していることを想定し、ヒト歯根膜細胞と骨芽細胞に MS の代わりに PGE<sub>2</sub> 添加を行った。

ヒト歯根膜細胞及びヒト正常骨芽細胞を一定数培養し、PGE<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup>~10<sup>-11</sup>M) を 48 時間、

両細胞に添加して RANKL、OPG、M-csf の遺伝子発現を検討した。また、48 時間 PGE<sub>2</sub> を添加後、新培養液に交換し、破骨前駆細胞 (RAW264.7) と各々の細胞を共培養して、破骨細胞様細胞の形成数を TRAP 染色により検討した。さらに small interfering RANKL を導入したヒト骨芽細胞との共培養を行い、破骨細胞様細胞の形成数の変化を検討した。

#### (3) 歯根膜細胞及び骨芽細胞の MS 刺激による破骨細胞形成能

MS を受けた歯根膜細胞は PGE<sub>2</sub> のみならず、いくつかの局所因子を産生すると考えられる。そこで歯根膜細胞を底面がシリコンゴム製の Flexercell 培養ディッシュに播種し、Flexercell Strain Unit を用い MS (18% 伸展力) を加えた。24 時間 Flexercell Strain Unit で MS を加えた群と静置培養群の conditioned medium (C/M) を同個体の歯根膜細胞及び歯槽骨骨芽細胞に添加し COX-2 と RANKL 発現を検討した。

### 4. 研究成果

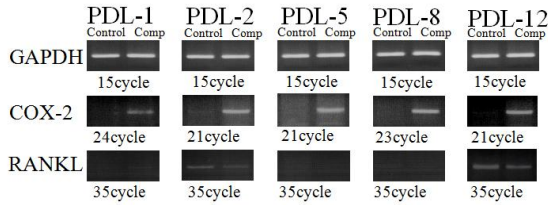
(1) 11 歳から 50 歳のヒト歯根膜細胞についての検討では、COX-2 および RANKL 遺伝子発現はほとんどなく、MS を加えるとすべての細胞で COX-2 の発現が顕著に促進するが、RANKL 発現は影響を受けなかった (図 1, 2)。また、M-csf はほとんど発現がなく、MS の影響も見られなかった。OPG は対照群では強く発現していたが、MS を加えると経時的に減少していた (図 3)。

	HPDL-1 (11Y)		HPDL-2 (16Y)		HPDL-3 (19Y)		HPDL-4 (19Y)		HPDL-5 (25Y)		HPDL-6 (27Y)		HPDL-7 (32Y)	
	non	Comp												
COX-2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
RANKL	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

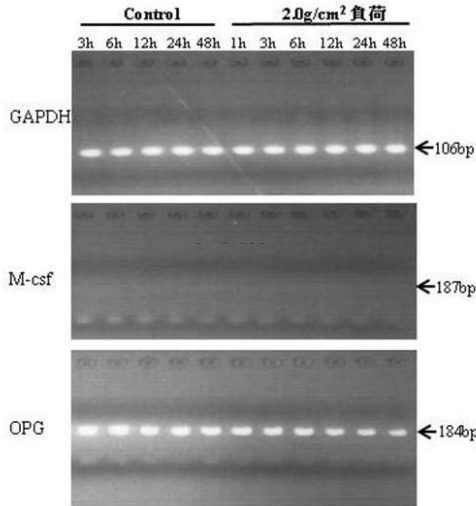
  

	HPDL-8 (34Y)		HPDL-9 (36Y)		HPDL-10 (36Y)		HPDL-11 (40Y)		HPDL-12 (43Y)		HPDL-13 (44Y)		HPDL-14 (50Y)	
	non	Comp												
COX-2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
RANKL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-

(図 1)

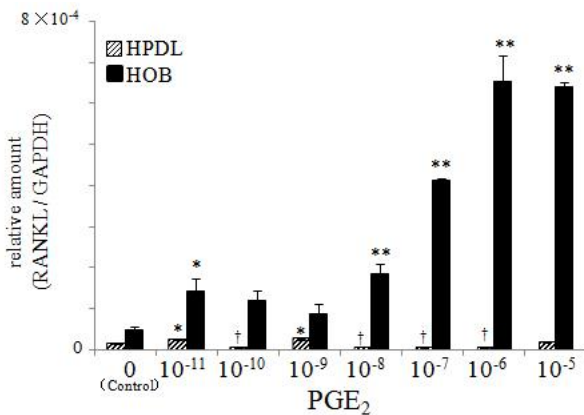


(図 2)

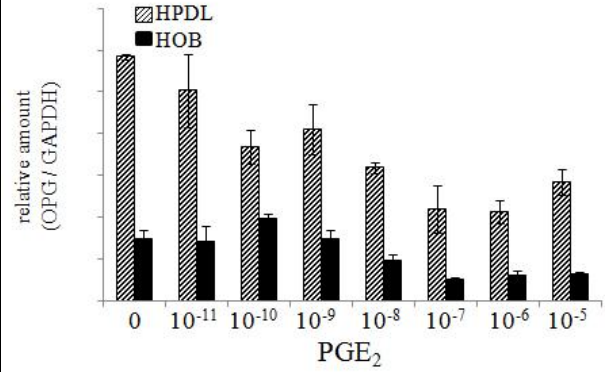


(図 3)

(2) PGE<sub>2</sub> 刺激による破骨細胞形成の実験では、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) に PGE<sub>2</sub> を添加しても MS と同様に RANKL 遺伝子発現はほとんど変化しなかった。しかし、ヒト骨芽細胞 (HOB) では PGE<sub>2</sub> 濃度依存的に増大し、最大で HPDL の 20 倍ほど顕著に発現が亢進していた (図 4)。

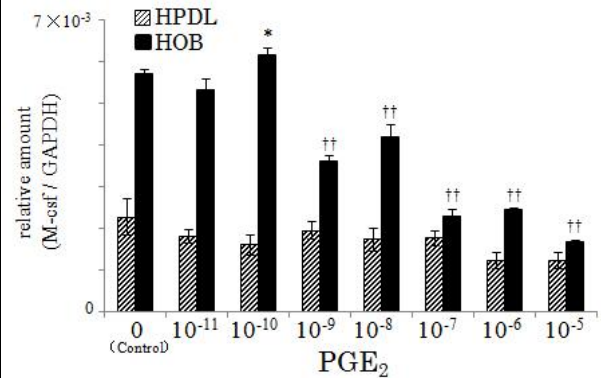


(図 4)



(図 5)

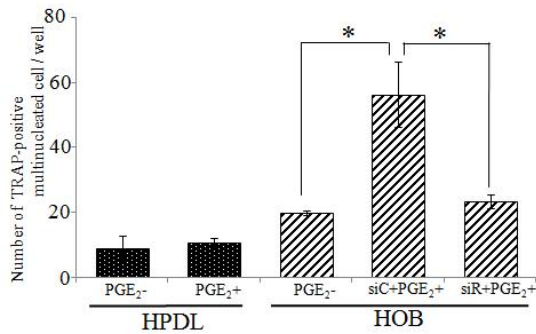
OPG は対照群の HPDL では強く発現していたが、MS を加えると濃度依存的に減少していた。HOB では PGE<sub>2</sub> を添加しても大きな変化はなかった (図 5)。



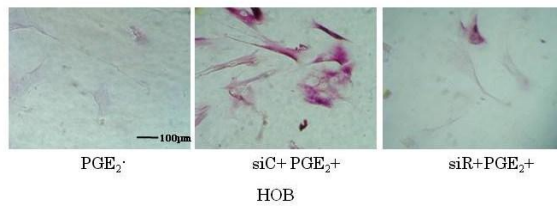
(図 6)

一方、HPDL では M-CSF 発現はわずかであり、PGE<sub>2</sub> を添加による変化もなかった。HOB では HPDL に比べ 2 倍ほどの発現があり、PGE<sub>2</sub> の添加では濃度依存的に減少していた (図 6)。

破骨細胞形成能の検討では、48 時間 PGE<sub>2</sub> を両細胞に添加後新培養液に交換し、破骨前駆細胞 (RAW264.7) と各々の細胞を共培養した。その結果、HPDL では単位面積内の TRAP 染色陽性の破骨細胞様細胞の形成はわずかであり、PGE<sub>2</sub> 添加による影響はなかった。一方、HOB では、PGE<sub>2</sub> 添加により顕著に破骨細胞様細胞数が増加し、HPDL の 5 倍以上であった。この破骨細胞様細胞形成能が HOB の産生する RANKL に依存するかどうかを検討するために、small interfering RANKL (SiR) を導入した HOB との共培養を行った。その結果、増大した破骨細胞様細胞の形成能はコントロールレベルまで減少した (図 7)。HOB を用い各実験群で形成された、TRAP 染色陽性破骨細胞様細胞を図 8 に示す。



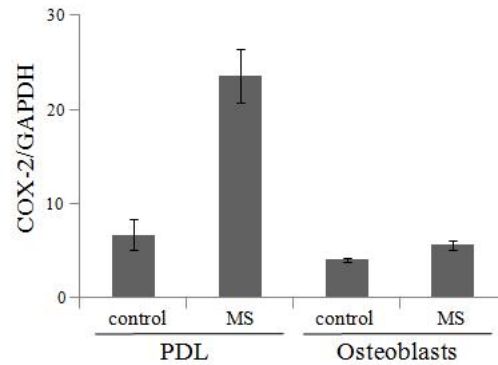
(図 7)



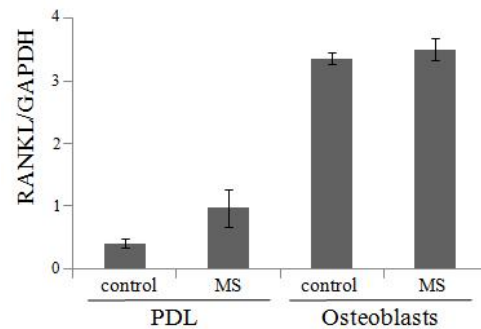
(図 8)

以上の結果から、矯正治療による歯の移動において、MSの加わったHPDLからPGE<sub>2</sub>が産生され、これが周囲のHOBを刺激し多量のRANKLを産生させ、破骨細胞を誘導する可能性が考えられた。そのためMSの加わったHPDLに比べその産物であるPGE<sub>2</sub>刺激を受けたHOBの方が破骨細胞誘導能が顕著に大きいことが考えられた。また、OPGはHOBに比べ、HPDLで多量に発現し、PGE<sub>2</sub>濃度依存的に減少していることから、破骨細胞形成抑制にはHPDLが強く関与していることが考えられた。また、破骨細胞前駆細胞の分化促進に関与する、M-csfはHPDLでは発現が少ないが、HOBでPGE<sub>2</sub>濃度依存的に減少していることから、本実験環境では、M-csfは破骨細胞形成には強い影響を与えていないように思われた。このように歯の移動における歯槽骨吸収は、少なくとも矯正力の加わる歯根膜細胞と周囲の骨芽細胞が互いに影響しながら、それぞれの役割を演じているものと考えられた。

(3) 今までの検討ではMSを加えた細胞を用いておらず、MSにより産生される局所因子PGE<sub>2</sub>刺激を用いて検討した。そこでMSをHPDLに加え、そのC/Mを同個体のHPDLとHOBに添加し検討した。その結果HPDLではMS負荷群のC/M添加でCOX-2は顕著に増大するが、HOBでは変化が見られなかった。よって、HPDLはMSに反応して局所因子を産生しオートクリンに作用しCOX-2を介してPGを産生し続け、HOBのRANKL発現を刺激していると考えられた(図9)。



(図 9)



(図 10)

一方、RANKL発現では、MS負荷群のC/M添加によりHPDLのRANKL発現が2倍になったが、HOBでは静置培養群とMS負荷群のC/M添加で共にRANKL発現がHPDLの4~7倍大きく、MS負荷群との差はなかった。MS負荷群のC/Mによる影響が少なかった原因を検討している。今回の実験では両細胞の条件を合わせるために2種の実験を連続して行えず、C/Mを一度冷凍していることが一因であると考えられた。現在、新鮮なC/Mを用いた実験を準備している。

また、Flexcercell Strain UnitでMSを加えたHPDLに、同個体のHPDLとHOBを8μmのメッシュ底面を有する培養ディッシュを介して共培養してRANKL発現と破骨細胞様細胞形成能を検討する実験を計画している。

##### 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1件)

- ① Mayahara K, Yamaguchi A, Takenouchi H, Kariya T, Taguchi H, Shimizu N: Osteoblasts stimulate osteoclastogenesis via RANKL expression more strongly than periodontal ligament cells do in response to PGE<sub>2</sub>. Archives of Oral Biology 57, 1377-1384, 2012. 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① □ Mayahara K et al. : Osteoblasts stimulate osteoclast- genesis via RANKL expression more strongly than periodontal ligament cells do in response to PGE<sub>2</sub>. 2012 Annual Session of American Association of Orthodontics, March 4<sup>th</sup> 2012, Honolulu, Hawaii, USA
  
- ② 馬谷原琴枝 他 : PGE<sub>2</sub> 刺激による破骨細胞形成は歯根膜細胞でなく骨芽細胞の RANKL 発現による。 第 70 回日本矯正歯科学会大会、2011 年 10 月 18 日、愛知県名古屋国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 典佳 (SHIMIZU NORIYOSHI)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 40154299

### (2) 研究協力者

馬谷原 琴枝 (MAYAHARA KOTOE)  
日本大学・歯学部・助教  
研究者番号 : 60440046