

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 1 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22616009

研究課題名（和文）下肢・下顎・頭蓋骨骨細胞の部位特異的力学刺激応答に基づく骨粗鬆症治療の基礎的研究

研究課題名（英文）Reevaluation of osteoporosis therapies based on the site-specific response of bone cells derived from lower limb, mandibular and calvarial bones to mechanical stimuli.

研究代表者

高垣 裕子 (Yuko Mikuni-Takagaki)

神奈川歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60050689

研究成果の概要（和文）：

本研究は、部位特異的な骨の力学的刺激応答の観点から骨粗鬆症とその治療法を再検討するのが目的で、具体的には下肢・下顎・頭蓋骨の細胞の力学刺激応答の差異、情報伝達経路の異同を明らかにした。力学特性に対応した骨粗鬆症治療法が必要であると考えられる理由は、宇宙滞在やベッドレストの状態では荷重骨である大腿骨は除荷により毎月約1%もの割合で萎縮する一方、非荷重骨が変化しないことから自明である。マウス下肢・下顎・頭蓋骨の細胞を刺激する方法としては、低出力パルス超音波（LIPUS）刺激を選んで細胞膜イテグリンに着目し、アクチン線維を介してリモデリングとアポトーシスを支配するメカニズムを検討した。その結果、下顎骨骨芽細胞が、特異的に $\alpha_5\beta_1$ インテグリン依存性の分化応答並びにアポトーシスの阻止とリモデリング促進を示すことが明らかになったため、その応答の情報伝達経路マップを作成することを優先した。下顎骨の細胞の情報伝達は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとPI3K/Aktに依存し $\alpha_5\beta_1$ の中和抗体でブロックされること、RANKL/OPG、Bcl2/Baxの比率は、それぞれ下顎骨特異的なLIPUS刺激依存性のリモデリング、サバイバルを示すこと、運動負荷のない頭蓋骨では、下顎骨と違いそれらのアナボリックな応答は殆ど見られないことを示すことができた。胚葉性の由来が同様であるにも拘らず、細菌の影響下日常的に大きな力学的負荷を受ける顎骨の結果は全く異なり、進化の過程で顎骨は骨の恒常性を保つため、インテグリンをゲートキーパーとする機能を獲得したとする仮説を報告した。2011・2012年度には、*Porphyromonas gingivalis*を塗布して顎骨壊死のモデルラットを作成し、組織レベルでの検証を行った。Bisphosphonateによる骨壊死も顎骨特異的であるが、抜歯処置後上皮と抜歯窩直下歯槽骨で遅延した修復が、LIPUS照射（3週間）群では病態が正常化され、ラマン分析の結果からも骨質においてLIPUS非照射群との間に有意な差が得られた。

研究成果の概要（英文）：

While astronauts and bed-rest patients lose weight-bearing bone by almost one percent a month, non-weight-bearing bone is insensitive to unloading. It is unclear how bone cells at different sites detect mechanical loading/unloading and how site-specific mechanotransduction affects bone homeostasis. The aim of this study is to re-evaluate our understanding of osteoporosis and its treatment in terms of the response to the mechanical environment by bone cells at different sites. To differentiate the anabolic mechanical response of mandibular cells from those of calvarial and long-bone cells, we isolated mouse osteoblasts and subjected them to therapeutic low intensity pulsed ultrasound (LIPUS). Our results showed the following:

1. While LIPUS-accelerated differentiation is universal among the osteoblasts of different origin, the mandible needs mechanical stimuli for RANKL expression

/remodeling and survival.

2. In mandibular and long-bone osteoblasts, ILK lies upstream of PI3K/Akt but downstream from $\alpha 5\beta 1$ integrin, which is indispensable for the response to LIPUS.
3. In calvaria, the up-regulation by LIPUS is not significant except in β -catenin. While the calvaria shares ectodermal origin with the mandibular bone, it may not need mechanotransduction for such anabolic reactions.
4. In mandible, anti- $\alpha 5\beta 1$ Ab completely blocks the up-regulation of LIPUS.
5. The role of $\alpha 5\beta 1$ integrin as a gate keeper may have evolved to protect jaw bones from unfavorable responses to the inflammatory cytokines arising from periodontal pathology in the absence of mechanical stimuli.

These findings indicate that the cellular environment, in addition to the tridermic origin, determines site-specific bone homeostasis through the remodeling of bone and the survival of osteoblasts. Differentiated cells of the osteoblastic lineage at different bone sites transmit signals through transmembrane integrins such as $\alpha 5\beta 1$ integrin in case of mandibular osteoblasts, whose signaling pathways are influenced by environmental factors such as inflammatory cytokines produced in response to bacteria. To further delineate the unique oral mechanical defense system, which we believe may fail by bisphosphonate administration resulting in osteonecrosis of the jaw (ONJ), we developed a rat ONJ model that was subjected to LIPUS, which provided an alternative mechanical stress for the biting force. As a result, we were able to show the efficacy of LIPUS, which prevented the onset of ONJ in the model system we developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：科研費の分科・細目：メカノバイオロジー・9042

キーワード：骨粗鬆症・顎骨壊死・力学的刺激・LIPUS・アポトーシス・リモデリング・骨芽細胞・神経堤 (neural crest)

1. 研究開始当初の背景
ベッドレスト（寝たきり）は四肢体幹の骨には骨量減少、頭蓋骨には骨量増加という一見反対の影響を与える (Leblancら, *J. Bone Miner. Res.*, 1990)。宇宙飛行士の場合も、血液、体液の上方移動(Cephalad Shift)により頭蓋内圧が上昇する一方で荷重骨は免荷となり、同様の“骨の再分布”が起きると考えられている (Bikkleら, *J. Bone Miner. Metab.*, 1999)。しかし、骨の細胞レベルで力学的刺激応答に“site-specificity (部位特異性)”が

あるという視点からの研究は殆ど見られなかった。

2. 研究の目的

マウスの頭蓋と下顎、下肢皮質骨を構成する細胞の力学的刺激応答の部位特異性が骨形成・骨吸収を部位特異的に制御する機序を明らかにし、不動性骨粗鬆症・顎骨壊死の予防・治療に新しい視点を与えることを研究目的とした。

3. 研究の方法

骨の部位特異的な代謝制御の機序を、単離したそれぞれの骨の細胞に力学刺激（低出力超音波パルス（LIPUS）照射）負荷を与え、細胞の応答をメッセージとタンパク質から解析した。さらに、顎骨の維持における力学刺激の重要性を組織レベルで検証するため、アレンドロネート（ALN）投与後に *Porphyromonas gingivalis* を塗布して顎骨壊死のモデルラットを作成し、3週間のLIPUS照射が顎骨壊死の発症を防ぐことを形態学的並びに骨質により解析した。

4. 研究成果

1) 力学的刺激応答の部位特異性が骨のリモデリングを部位特異的に制御する

文献5 : doi: 10.1016/j.yexcr.2011.07.015 参照.

2) 顎骨壊死のLIPUSによる防止

主にビスフォスフォネート投与により惹起される顎骨壊死の誘因は、抜歯などによる機械的侵襲と口腔内の衛生状態の悪いことが二大要因であるとされる。ところで抜歯は侵襲と同時に咬合力負荷を喪失させると考えることもでき、文献5で述べた「力学刺激存在下でのみ顎骨のリモデリングが正常に行われる」という結論からは、力学刺激を喪失した抜歯窩直下の歯槽骨で想定される骨代謝の異常がLIPUS照射により正常化される可能性がある。そこで、歯周病の原因菌とされる *Porphyromonas gingivalis* を塗布して実験的に病変を誘導した加齢ラット歯周病モデルを用い、抜歯後のLIPUS照射（咬合による力学刺激の代替）の影響を検討した。その結果ビスフォスフォネート（ALN）投与後に *Porphyromonas gingivalis* を塗布したモデルラットでは、抜歯窩直下の歯槽骨において歯槽骨と上皮の修復が遅延した（図2-2 ALN 8R3）。一方、抜歯後に3週間LIPUS照射を行った治療群では病態は正常化され（図2-2 ALN+LIPUS 4R4）、ラマン分析の結果からもALN投与群■とALN投与-LIPUS照射群□の間に有意な差が得られた。

実験1 8-week ♀ Wistar rats

Recovered rats at the end of experiment
Ext* n=4
ALN* n=4
ALN+LIPUS* n=4

6 weeks ± ip ALN (70 µg/kg/week)

↓ upper 1st molar extracted

↓ 3 weeks ± LIPUS 5 times/week

↓ * There was no apparent difference in the healing of sockets.

Killed

若齢のラットでは、創傷治癒にLIPUSは不要

実験2 retired breeder ♀

Recovered rats at the end of experiment
Ext n=7
ALN n=5
ALN+LIPUS n=5

Experimental protocol
7 weeks ± ip ALN (70 µg/kg/week)

↓ 4 weeks ALN alone

↓ 1 week with topical antibiotics on molars

↓ 2 weeks with topical *Porphyromonas gingivalis*

↓ upper 1st molar extracted

↓ 3 weeks ± LIPUS 5 times/week

↓ Killed

Healed wound Open wound

Ext n= 4/7 n= 1/7

ALN n= 0.5/5 n= 4.5/5

ALN+LIPUS n=3/5 n= 1.5/5

2-1 (抜歯良好例) 2-2 (抜歯残根例)

Ext #5 (OK) EXT L3(残根)

* ALNは抜歯困難のため ALN * 8R3(残根)

すべて残根となった ALN +LIPUS 4R4 (残根)

ALN+LIPUS S3R2 (OK)

2-1 (抜歯良好例) Ext 5

2-1 (抜歯良好例) ALN+LIPUS S3R2

従って、顎骨の特異性として日常的に常在菌・歯周病原菌由来の炎症性サイトカインに曝露されることから、正常な力学的刺激存在下の限られた環境下でのみモデリングを行うという、骨を維持するための適応を遂げたと考えられる。顎骨壊死の誘発に力学的刺激の喪失も関与すると考えることができる。

2-2 (抜歯残根例) Ext L3

2-2 (抜歯残根例) ALN+LIPUS 4 R4

2-2 (抜歯残根例) ALN 8R3

抜歯残根例屠殺時における歯槽骨の骨質

ラマン分析

□ EXT ■ ALN+LIPUS

■ ALN

骨質密度

140
120
100
80
60
40
20
0

0 1 P04/amid1 1 P04/amid3 4 P04/amid3 003/P04

100

80

60

40

20

0

100

80

60

40

20

0

100

80

60

40

20

0

100

LIPUS 照射は代替の力学刺激として創傷治癒 過程をも正常化したので、今後LIPUSの抗炎症作用の例として、詳細なメカニズムを検討したい。

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5件)

1. Naruse K, Sekiya H, Harada Y, Iwabuchi S, Kozai Y, Kawamata R, Kashima I, Uchida K, Urabe K, Seto K, Itoman M, Mikuni-Takagaki Y, Prolonged endochondral bone healing in senescence is shortened by low-intensity pulsed ultrasound in a manner dependent on COX-2, *Ultrasound Med Biol*, 査読あり, vol. 36, No. 7, 2010, 1098-1108 doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2010.04.011.
2. Miyagawa K, Kozai Y, Ito Y, Furuhashi T, Naruse K, Nonaka K, Nagai Y, Yamato H, Kashima I, Ohya K, Aoki K, Mikuni-Takagaki Y, A novel underuse model shows that inactivity but not ovariectomy determines the deteriorated material properties and geometry of cortical bone in the tibia of adult rats, *J Bone Miner Metab*, 査読有り, Vol. 29, No. 4, 2011, 422-436, doi: 10.1007/s00774-010-0241-9.
3. Suto K, Urabe K, Naruse K, Uchida K, Matsuura T, Mikuni-Takagaki Y, Suto M, Nemoto N, Kamiya K and Itoman M, Repeated freeze-thaw cycles reduce the survival rate of osteocytes in bone-tendon constructs without affecting the mechanical properties of tendons, *Cell Tissue Bank*, 査読有り, Vol. 13, No. 1, 2012, 71-80 doi: 10.1007/s10561-010-9234-0.
4. Aikawa J, Naruse K, Uchida K, Katano M, Mikuni-Takagaki Y, Kozai Y, Kashima I, Takaso M, Itoman M, Urabe K, Low-intensity pulsed ultrasound promotes the osteogenic effect induced by bone allograft. *Kitasato Med J*, 査読有り, Vol. 41, 2011, 184-192 <http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KMJ41-2/KMJ41-2p184-192.pdf>.
5. Watabe H, Furuhashi T, Tani-Ishii N, and Mikuni-Takagaki Y, Mechanotransduction

Activates $\alpha 5 \beta 1$ Integrin and PI3K/Akt Signaling Pathways in Mandibular Osteoblasts, *Exp Cell Res*, 査読有り, Vol. 317, No. 18, 2011, 12642-12649 doi: 10.1016/j.yexcr.2011.07.015.

[学会発表] (計14件)

1. 古濱貴美, 渡部弘隆, 石井信之, 高垣裕子: C57B6J マウス下顎骨骨芽細胞における力学的刺激応答の特異性. 第28回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2010. 7. 23
2. 渡部弘隆, 古濱貴美, 石井信之, 高垣裕子: 下顎骨骨芽細胞による骨代謝の力学的刺激依存性. 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 2010. 9. 22
3. Miyagawa K, Ozono K, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M and Michigami T: Differential Gene Expression in Osteoblast/Osteocyte Lineage Cells between Hyp Mouse and Wild-type Mouse. 32th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Toronto, Canada 2010.10.16
4. 渡部弘隆, 武藤徳子, 佐藤武則, 石井信之, 高垣裕子: ビスフォスフォネート製剤投与ラットにおける顎骨壊死誘導モデルの作成—歯周炎誘発モデルにおける下顎骨の形態変化—. 第133回日本歯科保存学会秋季学術大会, 岐阜, 2010. 10. 28
5. 渡部弘隆, 古濱貴美, 船山祐太, 石井信之, 高垣裕子: マウス下顎骨骨芽細胞におけるLIPUS刺激依存性の骨代謝. 第14回超音波骨折治療研究会, 東京, 2011. 1. 22
6. Watabe W, Furuhashi T, Tani-Ishii N, Mikuni-Takagaki Y: Mechanical force may be a prerequisite for mandibular bone remodeling. IADR/AADR/CADR General Session, San Diego, California, USA 2011.3.19
7. 渡部弘隆, 古濱貴美, 石井信之, 高垣裕子: 下顎骨骨芽細胞に特異的な、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと PI3K/Akt signaling 伝達経路を介した力学刺激依存性の骨代謝. 第29回日本骨代謝学会学術集会,

- 大阪, 2011. 7. 30
8. Suzuki Y, Takeuchi R, Takagaki, YM, Shiraishi T, Fukui S, Morishita S: Influence of the difference in repetition frequency and intensity of low intensity pulsed ultrasound for cultured chondrocytes. 2011 World Congress on Osteoarthritis, San Diego, California, USA 2011.9.17
 9. Suto M, Naruse K, Uchida K, Yamamoto T, Suto K, Urabe K, Itoman M, and Mikuni-Takagaki Y: Is Alendronate Effective in Improving Material Properties of Frail Cortical Bone in Inactive Model Rats?. 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, California, 2011.9.18
 10. 渡部弘隆、古濱貴美、船山祐太、石井信之、高垣裕子：マウス下顎骨骨芽細胞における LIPUS 刺激依存性の骨代謝，第 14 回 超音波骨折治療研究会，東京，2012.1.22
 11. 高垣 裕子：運動不足・身体的不活動 (physical inactivity) と廃用性の骨粗鬆症モデル. 第 4 回 骨形態フォーラム，道後，2012. 6. 23.
 12. 渡部弘隆，河田亮，船山祐太，田島愛弓，石井信之，高垣裕子：神経堤由来の下顎骨における力学刺激依存性の骨代謝. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会，東京，2012. 7. 21.
 13. Y Mikuni-Takagaki: Mechanotransduction Regulates Metabolism of Mouse Mandible Bone. Exogen Think Tank Meeting, Durham, NC, USA, 2012. 8. 28.
 14. 田中 隆博，渡部 弘隆，河田 亮，佐藤 武則，船山 祐太，田島 愛弓，浜田信城，石井 信之，寺中 敏夫，高垣裕子：顎骨壊死モデルラット作成と LIPUS による防止の試み. 第 16 回超音波骨折治療研究会，東京，2013. 1. 19 .

[図書] (計 2 件, 分担)

1. 高垣裕子：低出力超音波刺激に対する細

胞応答 pp.123-128. 日本生体電気・物理刺激研究会，深田栄一，大橋俊郎，久保俊一：生体電気・物理刺激による 骨・軟部組織修復法，金芳堂，京都，2013

2. 高垣裕子，田中隆博：ナノインデンテーション法 pp.36-44. 山本智章 (遠藤直人監修)：新しい骨形態計測，大樹舎，新潟，2013

[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

高垣 裕子 (Yuko Mikuni-Takagaki)
 神奈川歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号：60050689

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：