

## 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 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792032

研究課題名（和文）乳歯歯根における非生理的吸収の機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of non-physiological root resorption of deciduous teeth

研究代表者

谷口 由実（TANIGUCHI YUMI）

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号：80543503

研究成果の概要（和文）：乳歯の生理的歯根吸収は、破骨細胞が選択的に乳歯歯根を吸収することで進行する。しかし、乳歯では進行性の非生理的な異常歯根吸収を起こす場合があり、どのようなメカニズムが働いているのかは未だ不明である。そこで本研究は、非生理的な歯根吸収の原因について検索した。分化中の破骨細胞前駆細胞に対する免疫担当細胞の作用を調べた結果、免疫担当細胞は破骨細胞前駆細胞に直接作用し、破骨細胞への分化成熟過程を抑制していることが判明した。

研究成果の概要（英文）： Normal root resorption of deciduous teeth is physiological process and caused by osteoclasts. However, non-physiological root resorption of deciduous teeth is sometimes occurred for several reasons. The mechanism of non-physiological resorption is unknown. In this study, I searched for the cause of non-physiological root resorption in the interaction of osteoclast precursor cells and T cells. As a result, it was found that T cells acted directly on osteoclast precursor cells and suppressed differentiation into osteoclasts.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：乳歯歯根吸収、破骨細胞、Treg 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

正常の乳歯の生理的歯根吸収は、後継永久歯との位置関係および後継永久歯の萌出程度と関連して厳密に制御されている。一般臨床において、外傷による損傷や齲蝕・修復物

などによる一次的ならびに二次的な原因によって、歯根に非生理的な異常吸収を生じている症例に遭遇する機会は多い。歯根吸収は、破骨細胞が選択的に歯根を吸収することで進行するが、異常吸収を起こしている歯根では

吸収活動中の破骨細胞が多く観察される。破骨細胞は、骨芽細胞が発現する receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) 因子によって分化が誘導されるが、分化後の破骨細胞がどのようなメカニズムで活性が制御されているかは不明である。つまり、非生理的な歯根吸収においては、破骨細胞の活性亢進を指示している因子が存在している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

破骨細胞は、免疫系細胞と同じ骨髄由来の前駆細胞から分化し、多くの制御因子を共有している。例えば、破骨細胞分化誘導因子である RANKLは、T細胞上に発現する樹状細胞活性因子と同一の分子である。このことから、破骨細胞の活性化はT細胞によって制御されている可能性がある事が推測される。そこで本研究では、非生理的な歯根吸収における破骨細胞の吸収活性が、免疫担当細胞によってどのように制御されているかについて検索を行った。

## 3. 研究の方法

### (1)培養細胞を用いた実験

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞を sRANKL 刺激により破骨細胞に誘導した。また、C3H/HeJ マウスの胸腺から磁気ビーズを用いて特異的に Treg 細胞を分離し、破骨細胞に誘導中の RAW264.7 細胞と Treg 細胞との共存培養を行った。培養6日後に細胞群を固定、TRAP染色を行い、誘導された破骨細胞数を測定した。次に、同じ共存培養条件において、RAW264.7 細胞と Treg 細胞とをインサートメンブレンで隔離し細胞同士の接触を防ぎ、誘導された破骨細胞の数を測定した。また、培養後の培養液を回収し、培養液中に存在している各種サイトカイン量を ELISA キ

ットにて定量した。

### (2)マウスを用いた実験

3週齢雌の C3H/HeJ マウスに対し、非生理的な異常吸収を増悪させるためにマウスの尾静脈に炎症誘導物質の静注を行った。静注1週間後に全身麻酔下にて上顎第一臼歯に外傷を与え、脱臼させた。また免疫担当細胞作用群として、別の C3H/HeJ マウスの胸腺から分離した Treg 細胞を脱臼したマウスの尾静脈に静注を行った。脱臼3週後にマウスの屠殺を行い、上顎骨を取り出し固定、EDTAで脱灰、薄切片を作成して、脱臼歯歯根部の組織学的検索を行った。

## 4. 研究成果

### (1)培養細胞を用いた実験

RAW264.7 細胞を sRANKL によって誘導した破骨細胞像を下に示す。

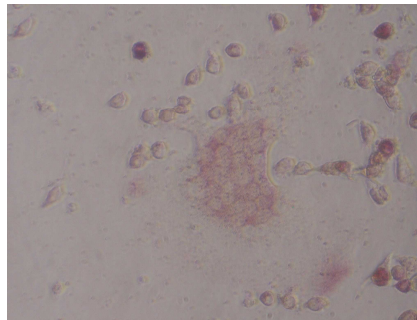


図 1-a RAW264.7 細胞のみの単独培養 6 日後の TRAP 染色

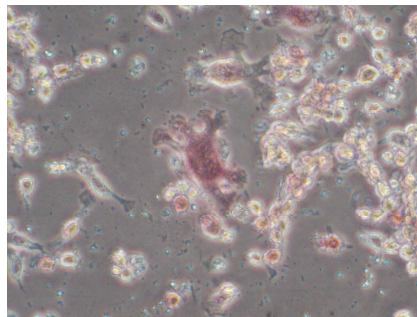


図 1-b RAW264.7 細胞と Treg 細胞の共存培養 6 日後の TRAP 染色

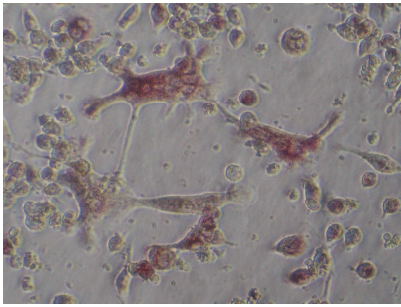


図 1-c RAW 細胞と Treg 細胞の共存培養 6 日後 TRAP 染色。インサート膜を用いて RAW264.7 細胞と Treg 細胞との接触を阻害している

図 1-a は、RAW264.7 細胞単独培養において誘導された破骨細胞である。誘導された破骨細胞の多くは、10 核以上の複数の核を有した巨大な円形状の形態をした細胞であった。一方、RAW264.7 細胞と Treg 細胞との共存培養群において誘導された破骨細胞の典型像は、図 1-b に示した通り複数の核を有しているがその数は 10 個以下と少なく、細胞の大きさも RAW264.7 細胞単独培養において誘導された破骨細胞と比較して明らかに小さかった。図 1-c は、RAW 細胞と Treg 細胞との間にインサート膜を挿入して RAW 細胞と Treg 細胞との接触を阻害し、誘導した破骨細胞の典型像である。数個の核を有した複数の破骨細胞同士が偽足を通じて繋がって一つの細胞を形成している。以上の結果から、RAW 細胞単独培養下において誘導された破骨細胞は典型的な成熟した破骨細胞であるのに対し、Treg 細胞との共存培養下において誘導した破骨細胞はその形態から未成熟な破骨細胞像を示した。一方、RAW264.7 細胞と Treg 細胞との接触を遮断した場合に観察された破骨細胞は、未成熟破骨細胞同士の融合過程と推測された。

下グラフに well あたりに誘導された破骨細胞数について示した。

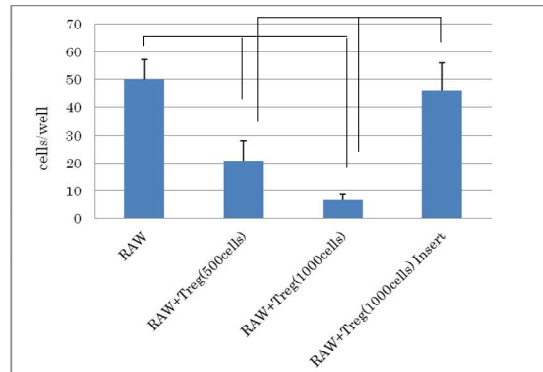


図 2 誘導された破骨細胞数 (bar 間には統計学的に有意差がある)

Treg 細胞との共存培養条件下では、培養した Treg 細胞数に依存して誘導された破骨細胞の数は減少した。しかし、インサート膜によって RAW264.7 細胞と Treg 細胞との直接の接触を阻害したところ、誘導された破骨細胞数は RAW264.7 細胞単独培養と比較して有意差はなかった。Treg 細胞による破骨細胞の分化抑制作用は、Treg 細胞が RAW26.47 細胞に直接接触することが必須条件であると示唆された。

培養後の培養液中に存在する破骨細胞形成抑制因子であるオステオプロテグリン (OPG) の量を ELISA キットで測定したが、実験をおこなったすべての培養群において、検出されなかった。

## (2) マウスを用いた実験

外傷 3 週間後、上顎骨の臼歯部における前頭断面の HE 染色像を下に示す。

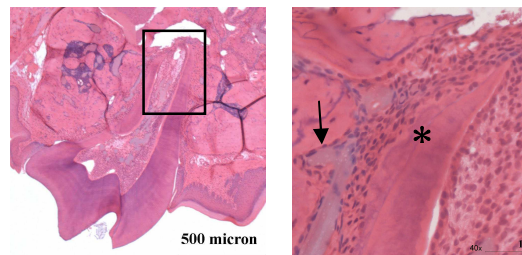


図 3-a, b 歯根先端部の象牙質側面が凹凸に吸収されている (\*). また、歯槽骨の一部

が陥没状に吸収されている (→)。

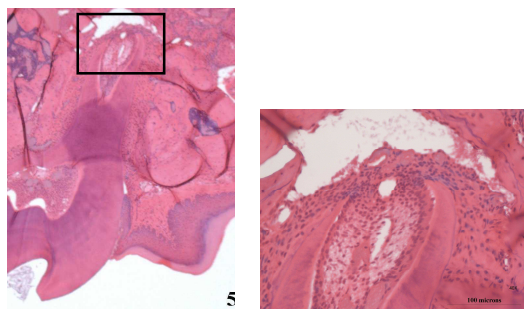


図 3-c, d 脱臼後に尾静脈から Treg 細胞を注入したマウスの脱臼歯部分の HE 染色像。根先部の象牙質の表面は円滑な曲線を示し、非生理的な歯根吸収を起こしていないことが判明した。

以上の結果から、Treg 細胞は破骨細胞へ直接作用し、歯根の吸収を抑制している事が判明した。乳歯の非生理的吸収においても、Treg 細胞の正常に作用しないことから発現している可能性があることが示唆された。

## 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 2 件)

- ① Mayumi Nomura, Yoshitaka Yoshimura, Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa, Yumi Taniguchi, Yoshiaki Deyama, Ken-ichi Koshiro, Hidehiko Sano, Kuniaki Suzuki and Nobuo Inoue (2011) Platinum nanoparticles suppress osteoclastogenesis through scavenging of ROS productions in RAW264.7 cells. Journal of Pharmacological Sciences 117: 243-252. (査読有)
- ② Kenjiro Shibata, Yoshitaka Yoshimura, Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa,

Yumi Taniguchi, Yoshiaki Deyama, Kuniaki Suzuki and Junichiro Iida (2011) Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. International Journal of Molecular Medicine 28(1): 73-79. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 由実 (TANIGUCHI YUMI)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
研究者番号：80543503

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし