

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 6日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792063

研究課題名（和文） 歯の萌出に伴う歯槽骨骨吸収機序の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the alveolar bone bone resorption mechanism with tooth eruption

研究代表者

森川 和政 (MORIKAWA KAZUMASA)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70514686

研究成果の概要（和文）：イノシトール 1, 4, 5-三リン酸（IP₃）の受容体であると共に、細胞内 Ca²⁺ストアに局在する Ca²⁺チャネルであるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体（IP₃R）のサブタイプの一つである IP₃R-III型は、ポドゾームにおいてアクチン細胞骨格の調節に重要な役割を果たしていることが示唆され、また歯槽骨骨吸収においても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) receptors (IP₃Rs) are Ca²⁺ channels that localize to intracellular Ca²⁺ stores. Our data strongly suggest IP₃R type III may be related to regulation of an actin cytoskeleton in podosomes, actin-rich adhesion structures in osteoclasts and may be associated with the alveolar bone bone resorption.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：矯正・小児歯学

キーワード：歯学・骨吸収・破骨細胞・細胞接着・萌出

1. 研究開始当初の背景

小児歯科医療は、小児の口腔領域の健全な発育と健康の維持を目的としている。成長発育期は、顎顔面部の成長発育が盛んな中、乳

歯から永久歯への交換が行なわれる時期である。日常の小児歯科臨床においては、乳歯外傷や齲蝕に伴う感染により永久歯萌出不

全を惹起する症例にしばしば遭遇する時期でもある。この時期のアプローチによっては、不正咬合を防止することが可能であり、永久歯列の咬合関係を確立するために大きな影響を与えることができる。歯の萌出には、萌出経路の形成が重要で、歯を覆っている歯槽骨に破骨細胞の骨吸収がうまく作用しないと歯の埋伏による歯列不正など不正咬合を引き起こす可能性が高くなる。萌出経路の形成には破骨細胞が必須であり、個々の歯の萌出時期にその萌出経路が形成されなければ歯は萌出できない。例えば、破骨細胞のプロトンポンプに非可逆的に結合するバフィロマイシンを萌出中の歯の歯小窩に注入することで萌出を止めたり、大理石病においては破骨細胞の分化を刺激する因子である CSF-1 が欠如して萌出経路の骨を取り除くメカニズムが存在しないため萌出が阻害される、といった報告がある。また、破骨細胞の骨吸収活性には細胞接着、酸分泌、タンパク質分解酵素が深く関わっていることが知られているが、細胞接着については不明な点が多い。

私は、大学院入学時より、ラット破骨細胞におけるイノシトール 1,4,5-三リン酸(IP₃)受容体(IP₃R)の局在についての研究を行ってきた。IP₃は細胞内Ca²⁺ストア(小胞体)からCa²⁺を放出するセカンドメッセンジャーであり、形態変化、分泌、遺伝子発現等の細胞の機能にとって重要な働きを持っている。IP₃RはIP₃の受容体であると共に、細胞内Ca²⁺ストアに局在するCa²⁺チャンネルで、組織や発生時期に特異的な三つのサブタイプ(I型、II型、III型)がある。IP₃Rは、当初、小胞体に存在すると考えられてきたが、現在では形質膜にも認められており、形質膜に発現するIP₃Rは細胞骨格、細胞接着の構築に関与していることが報告されている。

一方、破骨細胞の骨基質への接着は骨吸収の重要なステップの一つであり、接着に関する構造は古くから *in vitro* においてはアクチンを多く含むポドゾームと呼ばれる構造が相当すると考えられてきた。細胞と細胞外基質間の相互作用により、細胞の形態変化、運動、接着が成立し、それらの現象は、アクチン細胞骨格の調節が重要な因子となっている。

2. 研究の目的

研究代表者らは、最近、イノシトール 1,4,5-三リン酸(IP₃)受容体(IP₃R)が破骨細胞の細胞接着に関与している可能性を示唆する報告を行なった。本研究では、歯の萌出経路形成において重要な働きを持つ破骨細胞でのIP₃Rの役割を免疫組織学、生化学的に解明し、歯槽骨の骨吸収による歯の萌出に関わるメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 〈実験1〉ラット破骨細胞様細胞の分離

7週齢ラット脛骨より右の写真のように脛骨骨端部分から α -MEM溶液を注入して骨髓細胞を回収し、FBS、M-CSF、RANKL、活性型VD3を含む α -MEM溶液で一週間培養し、破骨細胞を形成する。

(2) 〈実験2〉Adenophostin Aの添加による細胞骨格、接着構造に対する影響

一週間培養した骨髓細胞にIP₃RアゴニストであるAdenophostin Aの濃度を設定し添加後、時間の経過ごとの細胞変化を観察し、イメージ解析システムによって細胞の面積変化を測定する。また、免疫蛍光染色法を用いて、Adenophostin Aの存在下、非存在下における細胞接着部位であるポドゾームへの影響、変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

(3) 〈実験3〉Adenophostin Aの添加によ

る骨吸収活性への影響

コントロールとして、培養ディッシュ上で骨髄細胞を二日間、FBS、M-CSF を含んだ α -MEM 溶液で培養した後、デンチンスライス上にて五日間、FBS、M-CSF, RANKL を含む α -MEM 溶液で培養する。破骨細胞が形成されていることを TRAP 染色にて確認した後、細胞を剥がし、DAB 発色反応にて吸収窩を観察する。Adenophostin A 添加は、デンチンスライス上での培養三日目に行い、コントロール同様、培養五日後に DAB 発色反応にて吸収窩を観察する。両者の吸収窩の面積を測定し、Adenophostin A の影響を解析する。

また、実験 2・3 においては Adenophostin A 添加を破骨細胞に分化、融合する前の破骨細胞前駆細胞、前破骨細胞の時期にも行い、作用時期による影響も調べる。

(4) 〈実験 4〉 IP_3R -III 型の破骨細胞における細胞接着との関連に関する実験 (in vitro)

ラット骨髄細胞より破骨細胞を形成し (実験 1 参照)、免疫蛍光染色法を用いて破骨細胞のインテグリンの細胞内ドメインに形成される接着複合体を構成する Src や Cas, Pyk2 と IP_3R -III 型との局在について共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

4. 研究成果

萌出不全に伴う埋伏歯、萌出性腐骨といった萌出障害は小児歯科臨床において重要な課題である。しかしながら、その原因の一つである歯槽骨の骨吸収メカニズムは十分に解明されていない。また、破骨細胞の分化についてはかなり研究が進んでいるが、骨吸収活性において重要な過程である細胞接着に関わるポドゾームについては不明な点が多い。最近、私は、 IP_3R -III 型が破骨細胞の細胞接着 (ポドゾーム) に関与している可能性を示唆する報告を世界で初めて行なった。

本研究の結果により、 IP_3R -III 型と破骨細胞

の細胞接着との関わりが局在の面からだけでなく、機能の面からも明らかとなり、 IP_3R -III 型がポドゾームにおいてアクチン細胞骨格の調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、歯槽骨骨吸収メカニズムの解明が大きく発展するものと考えられる。

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 2 件)

- ① Hashiguchi D, Fukushima H, Nakamura M, Morikawa K, Yasuda H, Udagawa N, Maki K, Jimi E. : Mineral trioxide aggregate solution inhibits osteoclast differentiation through the maintenance of osteoprotegerin expression in osteoblasts. J Biomed Mater Res A. Feb;96(2):358-64. 2011. 査読有
- ② Hashiguchi D, Fukushima H, Yasuda H, Masuda W, Tomikawa M, Morikawa K, Maki K, Jimi E. : Mineral trioxide aggregate inhibits osteoclastic bone resorption. J Dent Res. Jul. 90(7):912-7. 2011. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 森川和政、柏谷雅信、梅津哲夫、橋口大輔、佐伯 桂、牧 憲司、歯の萌出に伴う歯槽骨骨吸収メカニズムの解明—特に細胞接着について (第 2 報) —、日本小児歯科学会、2010. 5. 19-20、名古屋
- ② 橋口大輔、福島秀文、森川和政、自見英治郎、牧 憲司、MTA セメントは破骨細胞の分化の抑制と機能抑制により骨吸収を抑制する、日本小児歯科学会、2010. 5. 19-20、名古屋
- ③ 橋口大輔、福島秀文、森川和政、藤田優子、自見英治郎、牧 憲司、MTA セメントは破骨細胞の分化と骨吸収機能を抑制する、九州歯科学会、2010. 5. 22-23、北九州

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 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 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

森川 和政 (MORIKAWA KAZUMASA)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70514686

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：