

平成 2 6 年 6 月 3 日現在

機関番号 : 1 2 6 0 1

研究種目 : 基盤研究(C)

研究期間 : 2011 ~ 2013

課題番号 : 2 3 5 9 3 0 1 6

研究課題名 (和文) 歯の移動と骨改造現象における W n t シグナルと副甲状腺ホルモンの相互作用の解明

研究課題名 (英文) The mechanism of interaction with parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signals and Wnt/b-catenin in osteo-remodeling tooth migration model

研究代表者

大久保 和美 (Ohkubo, Kazumi)

東京大学・保健・健康推進本部・講師

研究者番号 : 1 0 3 9 6 7 1 5

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要 (和文) : 骨形成作用を持つPTHシグナルとその受容体に結合する カテニンとの相互作用による骨代謝調節機構を解明するためにPTHシグナルとWnt/ β -cateninシグナル相互作用とPTHシグナルの下流の調節機構の解析を行った。 カテニンとPTH受容体はPTHのC末10アミノ酸内に結合し、 カテニンとPTH受容体が結合することでGqシグナルを活性化させていることが明らかとなった。現在はOsx - Creマウスと カテニンfloxマウスを交配させたマウス (骨組織特異的 カテニンノックアウトマウス) の骨芽分化発生の異常の解析と実験的歯の移動モデルを用いて、PTH間歇投与の効果の検討を行っている。

研究成果の概要 (英文) : To investigate the underlying mechanisms of action and functional relevance of b-catenin in osteoblasts, by examining the role of b-catenin as a novel protein that interacts with the intracellular C-terminal portion of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor type 1 (PTHR-1). b-catenin physically interacted and co-localized with the cell membrane-specific region of PTHR-1 (584-589). Binding of b-catenin to PTHR-1 caused suppression of the Gs/cAMP pathway and enhancement of the Gq/Ca²⁺ pathway, without affecting the canonical Wnt pathway. Now, to analyze the mechanism of osteogenic differentiation in vivo, OsxCre:b-catenin flox mice model is treated intermittently with PTH and will be investigate these histological analysis.

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 : 歯科矯正学 骨改造現象 カテニン PTH受容体

1. 研究開始当初の背景

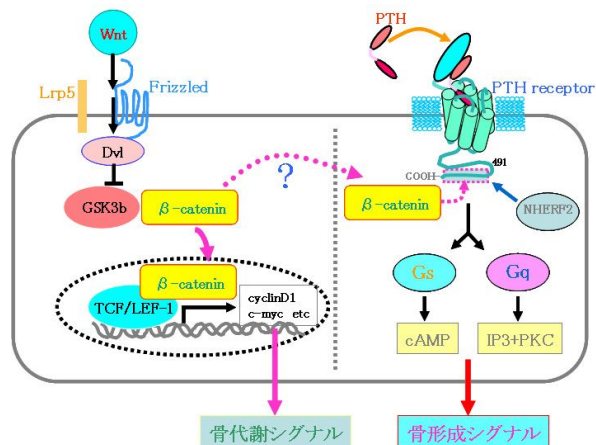
成体の骨組織は、骨基質の吸収と形成というダイナミックな現象（骨改造現象 - 骨リモデリング）により常に再構築され、その形態と機能の恒常性を維持している。骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞が、骨組織を取り巻く環境・骨組織に加わる種々の刺激に応答して、時間的・空間的に協調することで骨リモデリングが起こる。骨リモデリングに影響を与える重要な刺激の一つに機械的刺激（メカニカルストレス）が挙げられる。至適なメカニカルストレス条件下では、骨折治癒や骨延長時の骨形成などが促進されることが知られている。同様に、歯科矯正治療による歯の移動も、メカニカルストレスに応答して促進された骨リモデリングを積極的に利用したものである。矯正力というメカニカルストレスに応答して、歯槽骨内においては圧迫側の骨吸収と牽引側の骨形成が繰り返される。このように、歯の移動は骨代謝回転が亢進した骨リモデリングの結果として達成されることから、骨リモデリングは歯科矯正治療の根幹をなす生体現象である。したがって、その詳細な分子メカニズムを明らかにすることは、骨代謝学のみならず、歯科矯正学においても急務であると考えられる。

近年、副甲状腺ホルモン（PTH）に強力な骨形成促進作用があることが明らかとなり、米国ではヒト組み換え PTH(1-34)が既に FDA の承認を得て臨床の現場で用いられている。PTH の作用の大きな特徴は、強力な骨形成促進作用そのものに加えて、骨リモデリングの亢進を誘導する点である。この PTH の薬理機序の解明は骨リモデリングの分子メカニズムの解明につながると期待されるものの、殆ど解明されていないのが現状である。

PTH は PTH 受容体に結合後、受容体の細胞内部位に G 蛋白が結合し活性化されることによって細胞内にその主なシグナルを伝えられると考えられている。この G 蛋白には G_s と G_q の 2 種類があることが知られており、それぞれが独立したシグナル伝達経路を有している。しかし PTH の骨組織に対する多彩な作用は、2 種類の G 蛋白を介するシグナルが単に流れるというのみでは説明がつかず、他の分子によっても調整を受けていることが示唆されている。特に PTH 受容体は 7 回膜貫通型の受容体の一つで、受容体細胞内 C 末端が長く、G 蛋白質以外のシグナル分子が結合することが解明されてきている。実際、PTH に結合する新たな蛋白質として NHERF-2(Sodium-Hydrogen Exchanger Regulatory Factor-2)が近年同定され、PTH のシグナルを G_q 蛋白へ選択的に伝達させるように受容体と相互作用をしていることが報告された(Mahorn ら、*Nature* 417, 2002)。

申請者らのグループは先行研究で、NHERF-2 が同定された方法と同様のイーストツーハイブリッドシステム実験系を用いて、PTH 受容

体の細胞内 C 末端に結合する新たな蛋白質をすでにいくつか同定しており、その中に骨代



謝関連因子として近年注目を浴びている - カテニンが PTH 受容体に結合することを見出した。 - カテニンは細胞間接着の形成に寄与するだけでなく、主要な骨形成シグナルのひとつである Wnt/ -catenin シグナルにおいて中心的な働きを担っている。また近年、Wnt/ -catenin シグナルが骨細胞への作用を介して、成体の骨リモデリングに関与することが明らかとなっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨形成作用を持つ PTH シグナルとその受容体に結合する - カテニンとの相互作用による骨代謝調節機構を解明し、歯科矯正治療におけるその役割を明らかにすることである。これにより、歯科矯正治療の根幹をなす生体現象である骨リモデリングの分子メカニズムを PTH シグナルと Wnt/ -catenin シグナルに着目して明らかにし、その知見を歯科矯正治療に応用する基礎的知見を収集したいと考えている。

具体的には、

骨芽細胞における PTH 受容体への - カテニンの結合の確認とその部位の同定

- カテニンによる PTH シグナル伝達調整機構の解析

変異体 - カテニンおよび変異体 PTH 受容体による骨芽細胞の増殖・分化への影響

実験的歯の移動モデルを用いた、Wnt/ -catenin シグナルと PTH シグナルの相互作用に関する歯科矯正学的・分子生物学的評価の 4 点を行う。

3. 研究の方法

本研究に先立ち、研究代表者と研究分担者らは内在性蛋白あるいは変異体を用いて、イーストツーハイブリッドシステム実験系を用いて、PTH 受容体の細胞内 C 末端に結合する新たな蛋白質をすでにいくつか同定しており、その中に骨代謝関連因子として近年注目を浴びている - カテニンが PTH 受容体に結合することを見出している。この知見をも

とに、本研究では

- (1) 骨芽細胞における PTH 受容体への カテニンの結合の確認とその部位の同定
 - (2) カテニンによる PTH シグナル伝達調整機構の解析
 - (3) 変異体 カテニンおよび変異体 PTH 受容体による骨芽細胞の増殖・分化への影響
- を行って分子レベルでの詳細な検討を行い、
- (4) 実験的歯の移動モデルを用いた、Wnt/-catenin シグナルと PTH シグナルの相互作用に関する歯科矯正学的・分子生物学的評価
- を行うことにより、in vivo での検証をする。

4. 研究成果

- (1) 骨芽細胞における PTH 受容体への カテニンの結合の確認とその部位の同定
- 骨芽細胞系細胞株 MC3T3 細胞に PTH 刺激後膜たんぱく質を分離回収し、PTH 受容体特異的抗体および カテニン抗体を用いて、免疫沈降法およびウェスタンブロッティング法により蛋白-蛋白結合を検討した。
- PTH 刺激後に内在性受容体と内在性 カテニンが結合していることが示された。

ヒト PTH 受容体に GFP (Green Fluorescence Protein) を結合させたコンストラクトおよび カテニンに rhodamine 蛋白を結合させたコンストラクトを組み込んだ発現ベクター (hPTH-GFP 受容体、カテニン-rho) を用いて、解析したところ、細胞膜上に共局在することが示された。しかしながら、PTH 投与の有無によつての細胞膜上でのこれらのタンパクの動きは確認できなかった。

C 末端欠損型 PTH 受容体コンストラクトの作成：PTH 受容体の細胞内 C 末端は 463 番目から 593 番目までのアミノ酸より構成されている。これら 126 個のアミノ酸のうち C 末端のアミノ酸から 583 アミノ酸まで 1 ずつ欠失させ GFP を結合させた C 末端変異体-GFP 受容体を作成し、Mammalian two-hybrid assay を行い、カテニンとの結合部位を見出した。その結果、589 番目までのアミノ酸に カテニンが結合していることが示唆された。さらにアミノ酸変異体を作成することでこの結合部位を再確認することができた。

- (2) カテニンによる PTH シグナル伝達調整機構の解析

カテニンは細胞内においてユビキチン化を受け、シグナルが無い場合には常に分解されている。このユビキチン化を受ける部位に変異を加えることで恒常活性型 カテニンの発現コンストラクトを作成した。

さらに、カテニンが内因性にノックアウトされた状態をみるために カテニン siRNA を作成し、カテニンのノックダウン効率を確認したところ、90%程度の高いノックダウン効率を得る事ができた。

これら、2 つの恒常活性型とノックダウン型の発現ベクターを用いて、

カテニンによる PTH シグナル伝達調整機構の解析を行った。

PTH の下流のシグナルである Gs もしくは Gq シグナルへの調節を調べるために恒常活性型 カテニン、siRNA カテニンを 293 細胞に導入し、PTH 刺激により活性化される細胞内サイクリック AMP (cAMP) およびカルシウムリリースの蓄積量を測定した。

まず、C 末端 10 アミノ酸欠損型 PTH 受容体変異体 (カテニン非結合型) のアデノウイルスを作成し、C3H10T1/2 細胞株を樹立した。この細胞株に PTH を投与すると Gs シグナルの指標である cAMP の産生があがり、Gq シグナルの指標である Ca²⁺ のリリースが抑制された。

さらに恒常活性型 カテニンと カテニン siRNA のベクターと上記の C 末端 10 アミノ酸欠損型 PTH 受容体変異体 (カテニン非結合型) 細胞株、PTH 受容体野生型を組み合わせ、シグナルの動きをみたところ、カテニン siRNA 発現の細胞群では Gs シグナルの顕著な活性化がみられ、Gq シグナルは抑制された。これらの現象を再確認するために C 末端欠損型 PTH 受容体変異体と恒常活性型 カテニンを強制発現した系では Gs シグナルの上昇と Gq シグナルの抑制がみられた。これらのことから、カテニンと PTH 受容体が結合することで Gq シグナルを活性化させていることが示された。

- (3) 変異体 カテニンおよび変異体 PTH 受容体による骨芽細胞の増殖・分化への影響

上記の (2) で用いた 4 種のベクター (C 末端 10 アミノ酸欠損型 PTH 受容体変異体 (カテニン非結合型) 細胞株、PTH 受容体野生型、恒常活性型 カテニンと カテニン siRNA) の組み合わせで骨芽分化系への反応をみたところ、Gs シグナルを活性化する組み合わせで骨芽分化が進むことが RT-PCR での骨芽分化マーカーや染色によって示された。

さらに骨芽細胞株の増殖能を細胞増殖曲線を評価したところ、骨芽分化を上昇させる組み合わせで骨芽細胞の増殖を促進させることが示された。

骨芽分化を促進させ、骨代謝回転をあげるシグナルとして、Gs シグナルが重要であることが示唆された。

- (4) 実験的歯の移動モデルを用いた、Wnt/-catenin シグナルと PTH シグナルの相互作用に関する歯科矯正学的・分子生物学的評価

Wnt シグナルを遺伝学的に操作することで、実験的歯の移動モデルに対する PTH 投与の効果が修飾されるかを現在、検討中である。

Osx-Cre マウスと カテニン flox マウスを交配させたマウス (骨組織特異的 カテニンノックアウトマウス) の骨芽分化発生の異常の解析と実験的歯の移動モデルを用いて、PTH 間歇投与の効果の検討を行っている。

実験的歯の移動評価モデルは Yoshimatsu らの方法を用いる（左図、*J Bone Miner Metab* 24: 20-27, 2006）。直径 0.15 mm の Ni-Ti ワイヤによるクロードコイルスプリング（コイル径 0.9 mm）を矯正装置として用いる。生後 8 週齢マウスの上顎切歯 - 左側第一臼歯間に装置を装着する。また、上顎切歯においては歯肉縁から 0.5 mm の位置に形成した溝に固定する。装置装着（PTH 投与開始）後 2 日、4 日、6 日、8 日、10 日、12 日に屠殺後、上顎骨を摘出しシリコン印象材にて印象採得を行う。印象上で左側第一臼歯 - 第二臼歯間の最短距離を実体顕微鏡下で測定し、歯の移動度を検討している。さらに、圧迫側・牽引側について、骨形成の組織学的検討、TRAP 染色による破骨細胞形成の検討を行う予定である。さらに遺伝子・蛋白発現を検討するために、免疫組織化学を行い、この現象が起こっている時点での PTH - カテニン関連タンパクの発現を確認する予定である。

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 16 件）

Ohkubo K, Susami T, Inokuchi T, Okayasu M, Takahashi N, Uwatoko K, Uchino N, Suenaga H, Koga Y, Saijo H, Mori Y and Takato T. Incisor inclination after presurgical orthodontic treatment in patients with mandibular prognathism. *Jpn J Jaw Deform* 2014; 24:16-26.
DOI: 10.5927/jjdd.24.16

Mori Y, Hoshi K, Takato T, Takahashi M, Hirano Y, Kanno Y, Ohkubo K, Saijo H. Submucous cleft palate: variations in bony defects of the hard palate. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2013; 51:e220-223.
DOI: 10.1016/j.bjoms.2013.01.015

Susami T, Okayasu M, Inokuchi T, Ohkubo K, Uchino N, Uwatoko K, Takahashi-Ichikawa N, Nagahama K, Takato T. Maxillary Protraction in Patients With Cleft Lip and Palate in Mixed Dentition: Cephalometric Evaluation After Completion of Growth. *Cleft Palate Craniofac J*. 2013 Sep 6. [Epub ahead of print]
DOI: 10.1597/12-032

Takahashi-Ichikawa N, Susami T, Nagahama K, Ohkubo K, Okayasu M, Uchino N, Uwatoko K, Saijo H, Mori Y, Takato T. Evaluation of mandibular hypoplasia in patients with hemifacial microsomia: a comparison between panoramic radiography and three-dimensional computed tomography. *Cleft Palate Craniofac J*. 2013 Jul;

50(4):381-7.

DOI: 10.1597/11-188

Mori Y, Watanabe M, Nakagawa S, Asawa Y, Nishizawa S, Okubo K, Saijo H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Hollow Fiber Module Applied for Effective Proliferation and Harvest of Cultured Chondrocytes. *Materials Sciences and Applications* 2013; 4:62-67.

DOI: 10.4236/msa.2013.48A008

Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Suenaga H, Okubo K, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Usefulness of Agarose Mold as a Storage Container for Three-Dimensional Tissue-Engineered Cartilage. *Materials Sciences and Applications* 2013; 4:73-78.

DOI: 10.4236/msa.2013.48A010

Saijo H, Kawase-Koga Y, Mori Y, Seto I, Abe M, Ohkubo K, Hoshi K, Takato T. Application of percutaneous zygomatic arch osteotomy for protrusion deformity of the zygoma following facial fracture surgery. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 2013; 26(2):138-141.

DOI: 10.1016/j.ajoms.2012.09.004

仲宗根愛子、須佐美隆史、内野夏子、井口隆人、岡安麻里、上床喜和子、高橋直子、大久保和美、森良之、高戸毅：矯正歯科治療開始前の口蓋裂患者の顎顔面形態 日本口蓋裂学会雑誌 38:113-119, 2013

DOI: 10.11224/cleftpalate.38.113

須佐美隆史、大久保和美、井口隆人、岡安麻里、内野夏子、上床喜和子、高橋直子、高戸毅 東大病院における口唇口蓋裂患者に対する矯正歯科治療 日口蓋誌 38 巻 1 号 54-61, 2013

DOI: 10.11224/cleftpalate.38.54

高戸毅、星和人、藤原夕子、西條英人、菅野勇樹、大久保和美、鄭雄一、森良之：顎顔面領域における骨軟骨再生医療の現状と展望。頭頸部外科 22 巻 2 号 121-124, 2012

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshns/22/2/22_121/_pdf

Sugiyama M, Saijo H, Hoshi K, Ohkubo K, Mori Y, Takato T. Secondary repair of an oblique facial cleft with an absorbable mesh tray and particulate cancellous bone and marrow. *Oral Sci Int*. 2012 Nov; 9(2):63-66.

DOI: 10.1016/S1348-8643(12)00030-4

Abe M, Mori Y, Saijo H, Hoshi K, Ohkubo K, Ono T, Takato T. The efficacy of dental therapy for an adult case of Henoch-Schönlein Purpura. *Oral Sci Int*. 2012 Nov; 9(2):59-62.

DOI: 10.1016/S1348-8643(12)00027-4
Chikazu D, Fujikawa Y, Fujihara H, Suenaga H, Saijo H, Ohkubo K, Ogasawara T, Mori Y, Iino M, Takato T. Cyclooxygenase-2 activity is important in craniofacial fracture repair. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2011 Mar;40(3):322-6.

DOI: 10.1016/j.ijom.2010.10.011.
Saijo H, Kanno Y, Mori Y, Suzuki S, Ohkubo K, Chikazu D, Yonehara Y, Chung U, Takato T. A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2011 ;40:955-960.

DOI: 10.1016/j.ijom.2011.03.018.
Daichi Chikazu, Yuko Fujihara, Hisako Fujihara, Hideyuki Suenaga, Hidetoshi Saijo, Kazumi Ohkubo, Toru Ogasawara, Yoshiyuki Mori, Mitsuyoshi Iino, Tsuyoshi Takato. Cyclooxygenase-2 activity is important in craniofacial fracture repair. J. Oral Maxillofac. Surg. 2011 Mar;40(3):322-6.

DOI: 10.1016/j.ijom.2010.10.011.
Kazumi Ohkubo, Takafumi Susami, Yoshiyuki Mori, Kouhei Nagahama, Naoko Takahashi, Hidetoshi Saijo, Tsuyoshi Takato. Treatment of ankylosed maxillary central incisors by single-tooth dento-osseous osteotomy and alveolar bone distraction. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 May;111(5):561-7.

DOI: 10.1016/j.tripleo.2010.06.026.

〔学会発表〕(計 9 件)

Inokuchi T, Susami T, Okayasu M, Uchino N, Uwatoko K, Ohkubo K, Ogasawara T, Saijo H, Mori Y, Takato T. PALATAL INDEX FOR EVALUATION OF THE PALATAL MORPHOLOGY IN PATIENTS WITH UNIATERAL CLEFT LIP AND PALATE. 12th International Congress on Cleft Lip/Palate and Related Craniofacial Anomalies, May 5 -10, 2013, Florida USA, Hilton Orlando Lake Buena Vista
Susami T, Uchino N, Ohkubo K, Inokuchi T, Okayasu M, Uwatoko K, Ogasawara T, Saijo H, Mori Y, Takato T.: TOOTH ALIGNMENT AT THE ALVEOLAR CLEFT SITE AFTER ORTHODONTIC TREATMENT AND THE NEED OF ORTHOGNATHIC SURGERIES. 12th International Congress on Cleft Lip/Palate and Related Craniofacial Anomalies, May 5 -10, 2013, Florida USA, Hilton Orlando Lake Buena Vista
Okayasu M, Susami T, Inokuchi T, Ohkubo K, Uchino N, Uwatoko K, Ogasawara T, Saijo H, Mori Y, Takato T.: NEED FOR

ORTHOGNATHIC SURGERY AND ITS PREDICTION IN EARLY MIXED DENTITION IN PATIENTS WITH BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE. 12th International Congress on Cleft Lip/Palate and Related Craniofacial Anomalies, May 5 -10, 2013, Florida USA, Hilton Orlando Lake Buena Vista

須佐美隆史、太久保和美、井口隆人、岡安麻里、内野夏子、上床喜和子、高戸毅：東大病院における口唇口蓋裂患者に対する矯正歯科治療（シンポジウムⅠ「こだわりの術式」）。第36回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2012年5月24-25日 国立京都国際会館，京都府京都市
太久保和美，須佐美隆史，森良之，瀬戸一郎，西條英人，長濱浩平，菅野勇樹，岡安麻里，高戸毅：二段階下顎骨延長・上顎骨切り術とオトガイ形成術を行った両側性 hemifacial microsomia の1症例。第21回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会 2011年11月24-25日 グラントプリンスホテル高輪，東京

Susami T, Ohkubo K, Nagahama K, Takahashi N, Uchino N, Okayasu M, Uwatoko K, Seto I, Saijo H, Mori Y, Takato T. :Maxillary Protraction in Patients with Cleft Lip and Palate: Evaluation after Facial . 9th European Craniofacial Congress, September 14-17, 2011, Salzburg, Austria, Salzburg Congress.

Susami T, Mori Y, Ohkubo K, Nagahama K, Saijo H, Takahashi N, Uchino N, Okayasu M, Uwatoko K, Seto I, Takato T. : Outcome of the Surgical-Orthodontic Treatment for Cleft Patients using the Two-stage Maxillary Distraction-Mandibular Setback Osteotomies. 9th European Craniofacial Congress, September 14-17, 2011, Salzburg, Austria, Salzburg Congress.

Takato T, Mori Y, Saijo H, Kanno Y, Kurabayashi K, Sugiyama M, Susami T, Ohkubo K, Okayasu M, Uchino N, Nishizawa S, Fujihara Y, Hoshi K. . :Implant-type tissue-engineered cartilage applied for the nasal correction of the cleft lip and palate patients. 9th European Craniofacial Congress, September 14-17, 2011, Salzburg, Austria, Salzburg Congress.
Takato T, Mori Y, Saijo H, Seto I, Kanno Y, Kurabayashi K, Sugiyama M, Susami T, Ohkubo K, Okayasu M, Uchino N, Nishizawa S, Fujihara Y, Hoshi K 'Implant-Type Tissue-Engineered Cartilage Applied For The Correction

Of The Cleft Lip-Nose Patients', in
Tissue Engineering and Regenerative
Medicine International Society Asia
Pacific Meeting 2011, August 3-5,
Singapore, Waterfront Conference
Centre.

〔図書〕(計 1 件)

須佐美隆史、大久保和美、長濱浩平、高
戸毅 医学部附属病院における矯正歯科
クインテッセンス『臨床家のための矯正
イヤープック '11』p41-44 伊藤学而/
中島栄一郎 編集, クインテッセンス
出版, 東京, 2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/archive.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大久保 和美 (OHKUBO, Kazumi)
東京大学・保健・健康推進本部・講師
研究者番号: 1 0 3 9 6 7 1 5

(2)研究分担者

長濱 浩平 (NAGAHAMA, Kouhei)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 6 0 4 0 1 3 6 1

井口 隆人 (INOKUCHI, Takato)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 8 0 5 8 7 7 7 5

西條 英人 (SAIJO, Hideto)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 8 0 3 7 2 3 9 0

鄭 雄一 (TEI, Yuichi)
東京大学・工学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号: 3 0 3 4 5 0 5 3