

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593054

研究課題名(和文)唇顎口蓋裂児に対する骨再生と口腔インプラントに関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research about bone regeneration and oral implant for craniofacial defect patients

研究代表者

中村 浩志(NAKAMURA, Hiroshi)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00278178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：全身的にRyk遺伝子を欠損するマウスを作製した。その結果、このマウスにおいて口蓋裂を認めた。また、併せて破骨細胞数および骨芽細胞数の減少が認められた。さらに、骨芽細胞特異的Ryk遺伝子欠損マウスと破骨細胞特異的Ryk遺伝子欠損マウスの作製に成功した。骨芽細胞特異的Ryk遺伝子欠損マウスと破骨細胞特異的Ryk遺伝子欠損マウスにおいては、ともに口蓋裂を認めなかった。以上の実験結果から、骨芽細胞および破骨細胞におけるRyk遺伝子の発現は、口蓋裂の発症には関与せず、他の細胞におけるRyk遺伝子の発現が口蓋裂の発症に関わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We generated systemic Ryk signal deficient mice. Ryk deficient mice exhibited a cleft palate and totally decrease of osteoclast number and osteoblast number in bone. Furthermore, we generated osteoclast-specific Ryk-deficient mice and osteoblast-specific Ryk-deficient mice. Interestingly, there are no cleft palate in both osteoclast-specific Ryk-deficient mice and osteoblast-specific Ryk-deficient mice. Osteoclast-specific Ryk-deficient mice have normal bone phenotype. These results suggest that Ryk expression in osteoclasts and osteoblasts is not essential for craniofacial defect.

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：骨芽細胞 破骨細胞 遺伝子欠損マウス 口蓋裂 骨再生 Rykシグナル Wntシグナル 骨誘導因子

## 1. 研究開始当初の背景

顎裂患者は、世界中でも特に中国や日本を始めとするアジアに多く、国内でも毎年約 1 / 500 人の割合で出生するが発症の予防に決定的手段がない。「咀嚼」や「嚥下」など様々な口腔機能が低下しており、その治療は成人してから続き、時間的・物理的・精神的損失は本人ばかりでなく家族を含めた周囲社会にまで影響を及ぼす。現在の顎裂治療は、先天的欠損部に対する対症療法であり、疾患に対する原因療法でないため治療効果が成長に追いつかず、幾度となく手術が繰り返される。

顎裂における軟組織も含めた欠損の乳幼児期の治療では、口蓋と鼻腔の粘膜を形成するのが一般的である。10代で永久歯列の置換が終了する段階で、骨および歯牙の欠損に対する形成術が行われる。この際の骨欠損に対する補填は、健全な腸骨梁からの骨および骨髄組織の移植に頼られており、術後の侵襲や当該部の麻痺や運動障害などのリスクも高い。一方、リスクを回避するためにアパタイト等による人工の骨補填材による補填も行われている。しかし、鰓弓の癒合不全より生じた顎裂部は骨形成能が極めて乏しく、移植骨の吸収や成長による顎骨の成長に補填材の機能が及ばず、一次的に骨が補充されても軟組織の乖離とともに瘻孔の形成などの再発が認められる。特に歯の先天欠損部位に対して自家骨移植や人工骨による骨再生および口腔インプラント埋入を行っても、遺伝子異常による骨形成の低下により良好な結果が得られない。したがって、同疾患に骨再生を行う際には成長期に合わせた宿主の骨質の向上を同時に行うことが必要である。これまでの再生療法の研究は、動物実験や臨床試験も含め、正常な生体における細胞や組織が対象とされてきた。その結果、生体のリスクが見落とされ再生医療を行う際の障害となっていると考えられる。

人体の形成では、発生初期より個々の組織や組織内の細胞の場所を特定する位置情報に従って細胞集団を区切る境界形成が重要なステップとされている。そしてこの過程においては、成人してからも古い細胞が代謝されて新しい細胞に代替わりし、個々の器官を維持する上で継続されているといわれている。これまで、Steinらにより OFC (Orofacial cleft) の原因遺伝子として、レチノイン酸受容体 (RXR) , TGF -2, TGF -3 , ホメオティック遺伝子 (MSX1) などが候補とされ、

様々な解析が行われてきた。それらの因子の下流で働く Wnt や BMP-2 は、未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させる。また、Wnt シグナルの下流には Ryk シグナルが存在する。したがって、Ryk の遺伝子欠損マウスを独自に作製することは、今後の骨再生療法に重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

これまでの骨欠損の補填法は健全組織からの筋、骨や皮膚などの皮弁や、金属、アパタイト・セメントや吸収性ポリマーなど人口材料が適用されているが、成長による形態変化に追いつかない。また、骨誘導タンパク質 (BMP-2) は優れた骨形成効果を示すが、キャリアーの問題があり国内では実用化されていない。さらに、低侵襲な再生治療を期待して ES 細胞や iPS 細胞などの技術応用も研究されているが、倫理的問題や遺伝子の危険性の問題など難題が多い。一方、骨髄間葉系幹細胞を利用した再生療法は、骨髄移植として顎裂形成術や肝臓再生、血管再生などの実用化はされているが、採取量の限界や外科的侵襲のリスクがある。

顎裂患者は、世界中でも特に中国や日本を始めとするアジアに多く、国内でも毎年約 1 / 500 人の割合で出生するが発症の予防に決定的手段がない。「咀嚼」や「嚥下」など様々な口腔機能が低下しており、その治療は成人してから続き、時間的・物理的・精神的損失は本人ばかりでなく家族を含めた周囲社会にまで影響を及ぼす。現在の顎裂治療は、先天的欠損部に対する対症療法であり、疾患に対する原因療法でないため治療効果が成長に追いつかず、幾度となく手術が繰り返される。Ryk 遺伝子欠損マウスは、高率に唇顎口蓋裂を発症する。そこで、全身的に Ryk 遺伝子を欠損させたマウスを独自に作製するとともに、骨芽細胞特異的 Ryk 遺伝子欠損マウスと破骨細胞特異的 Ryk 遺伝子欠損マウスの作製を目指す。

## 3. 研究の方法

既に報告されている Ryk KO マウスは生後 1 日で死亡する。そこで、我々の研究室において独自に、全身的に Ryk 遺伝子を欠損するマウスの他に、骨芽細胞特異的 Ryk 遺伝子欠損マウスと破骨細胞特異的 Ryk 遺伝子欠損マウスの作製を行う。

#### 4. 研究成果

全身的に Ryk 遺伝子を欠損するマウスを作製した。その結果、このマウスにおいて口蓋裂を認めた。また、併せて破骨細胞数および骨芽細胞数の減少が認められた。

さらに、骨芽細胞特異的 Ryk 遺伝子欠損マウスと破骨細胞特異的 Ryk 遺伝子欠損マウスの作製に成功した。骨芽細胞特異的 Ryk 遺伝子欠損マウスと破骨細胞特異的 Ryk 遺伝子欠損マウスにおいては、ともに口蓋裂を認めなかった。

以上の実験結果から、骨芽細胞および破骨細胞における Ryk 遺伝子の発現は、口蓋裂の発症には関与せず、他の細胞における Ryk 遺伝子の発現が口蓋裂の発症に関わっていることが明らかとなった。また、破骨細胞特異的 Ryk 遺伝子欠損マウスについては、なんら骨代謝異常は認められなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Yamashita T(1), Udagawa N(3), Kobayashi Y (7), Takahashi N(8) (他 4 名) : Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways. **PLoS One**, 査読有、9: e85878, 2014  
doi: 10.1371/journal.pone.0085878.

Takahashi N, Udagawa N, Suda T : VitaminD endocrine system and osteoclasts. **BoneKey Reports**, 査読有、3, Article number: 495, 2014  
doi: 10.1038/bonekey.2013.229

Takahashi N(1), Kobayashi Y(4), Nakamura M(5), Udagawa N(6) (他 3 名) : Osteoclast Cell Lineage: Characteristics and behavior of osteoclast precursors *in vivo*. **Encyclopedia of Human Body 3rd Edition**, 査読有、in press, 2014

Horibe K(1), Kobayashi Y(4), Takahashi N(7), Udagawa N(8) (他 4 名) : Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. **Immunology**, 査読有、140: 344-351, 2013

doi: 10.1111/imm.12146.

Koide M(1), Nakamura M(4), Udagawa N(10) (他 7 名) : Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. **Endocrinology**, 査読有、154:773-782, 2013  
doi: 10.1210/en.2012-1928.

Furuya Y(1), Nakamura M(6), Udagawa N(7), Yasuda H(11) (他 7 名) : Stimulation of bone formation in cortical bone of mice treated with a receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-binding peptide that possesses osteoclastogenesis inhibitory activity. **J Biol Chem**, 査読有、288:5562-5571, 2013  
doi: 10.1074/jbc.M112.426080.

Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N : IL-34 and CSF-1 similarities and differences. **J Bone Miner Metab**, 査読有、31: 486-495, 2013  
doi: 10.1007/s00774-013-0476-3.

Yagami K(1), Nakamura M(3), Nakamura H(4), Udagawa N(7) (他 3 名) : Neural-inducing factor Netrin-1 is regulated in chondrogenesis and osteogenesis by BMP or Noggin. **J Hard Tissue Biology**, 査読有、21:141-150, 2012  
<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=dq4hdtib&ye=2012&vo=21&issue=2>

Maeda K(1), Udagawa N(3) (他 13 名) : Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nature Med**, 査読有、18, 405-412, 2012  
doi: 10.1038/nm.2653.

Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N : New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. **World J Orthop**, 査読有、18: 175-181, 2012  
doi: 10.5312/wjo.v3.i11.175.

[学会発表](計 4 件)

中村 浩志 神経成長因子 Netrin-1 の BMP

と Noggin による軟骨細胞および骨芽細胞分化における役割． 第 52 回日本小児歯科学会 2014 年 5 月 17 日 東京都

中村 浩志 低分子ポリフェノールの口腔カンジダ症に対する作用の検討． 第 51 回日本小児歯科学会 2013 年 5 月 24 日 岐阜市

中村 美どり BMP 誘導性異所性骨形成における破骨細胞の役割． 第 51 回日本小児歯科学会 2013 年 5 月 24 日 岐阜市

中村 浩志 Oligonol(R) の Streptococcus mutans および Porphyromonas gingivalis に対する薬理作用の検討． 第 50 回日本小児歯科学会 2012 年 5 月 13 日 東京都

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 浩志 (NAKAMURA, Hiroshi)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：00278178

### (2) 研究分担者

宮沢 裕夫 (MIYAZAWA, Hiroo)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授  
研究者番号：90147637

中村 美どり (NAKAMURA, Midori)  
松本歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：90278177

八上 公利 (YAGAMI, Kimitoshi)  
松本歯科大学・歯学部附属病院・准教授  
研究者番号：00210211

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：70245801

中道 裕子 (NAKAMICHI, Yuko)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号：20350829