

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 23日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659963

研究課題名（和文）リラキシン含有磁気制御型リポソームを応用した新規骨縫合部改造法の開発

研究課題名（英文）Development of new technology for controlling suture remodeling using magnetized liposome with liposome

研究代表者

森山 啓司（MORIYAMA KEIJI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20262206

研究成果の概要（和文）：リラキシンは子宮弛緩因子と呼ばれるペプチドホルモンである。本研究ではリラキシン受容体の頭蓋顎顔面領域の発生過程における発現様相を解析した。胎生 13.5～17.5 日齢マウス頭蓋骨、軟骨、歯胚および舌におけるリラキシン受容体遺伝子（*Rxfp1, 2*）発現様相を明らかにし、リラキシンはこれら受容体を通じて頭蓋顎顔面領域の発生過程において重要な役割を担う可能性を示唆した。また、リラキシンとその受容体の骨芽細胞表現型に対する作用を検討した。リラキシン受容体の抑制実験から、リラキシン受容体 2 は骨芽細胞の骨芽細胞分化と石灰化および細胞外基質代謝重要な役割を担うことが示された。

研究成果の概要（英文）：Relaxin is a pleiotropic hormone of the insulin like peptide hormone family. *Rxfp1, Rxfp2* mRNA were expressed intensely in the developing mouse (E13.5~17.5) brain, bone, tongue muscle, dental lamina, tooth primordia. This finding indicated that Relaxin and its receptor play an important role in the craniofacial development. Additionally, we determined the effect of Relaxin on the phenotypes of osteoblasts. From the results of siRNA targeting experiments, *Rxfp2* was probed to play important roles in differentiation, mineralization, and matrix metabolism of the osteoblasts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：リラキシン、リラキシンレセプター、磁性リポソーム、顎顔面頭蓋発生、骨代謝

1. 研究開始当初の背景 近年、骨代謝を司る骨芽細胞や破骨細胞の分化・機能調節に作用する遺伝子群が同定され、これら遺伝子の発現・機能調節機構に作用するタンパクが数多く報告されている。一方歯科矯正学的観点から、骨代謝調節機構を利用した非侵襲的な治療法の確立は、特に骨格成長の終了した成人骨格性不正咬合患者に対する矯正治療法の発展に大きく寄与すると考えられる。骨縫合部、とりわけ成長終了後の正中口蓋縫合部は石灰化により癒合するため、骨性の側方拡大が必要とされる場合、侵襲の大きな外科的

療法が適応されることもある。そのため、非侵襲的な縫合部の拡大および良好な予後の獲得には、正中口蓋縫合における局所的な骨吸収の促進と矯正力による縫合部の確実な拡大が必要とされる。さらに破骨細胞をコントロールするホルモンとして、エストロゲンや副甲状腺ホルモン、カルシトニンが知られているが、最近、インシュリン様ホルモンとして知られるリラキシンが破骨細胞の分化およびその機能の活性化を及ぼす事が報告され、注目を集めている。研究代表者らは過去において、生体親和性の高いアテロコラー

ゲン (ATCOL) を siRNA キャリアーとして利用し、細胞及び個体レベル (マウス骨格筋) での有用性を報告したが、ATCOL の時間・空間的制御をするに至らなかった。これらを踏まえて、リラキシンの正中口蓋縫合部での破骨細胞活性化機序の解明、および生体親和性磁性リポソームを利用した縫合部の局所的骨代謝調節方法の開発は過去に報告のない斬新な試みであり、歯科矯正学領域におけるナノテクノロジー応用の端緒となることが期待される。

内因性リラキシンおよびその受容体 RFXP1 のマウス口蓋正中縫合部における経時的な発現様相を免疫組織学および分子生物学的手法にて検索する。リラキシン磁性リポソームの *in vivo* 実験に対する予備実験として、マウス胎児口蓋器官培養系においてその安全性と至適条件を決定する。磁性リポソームの集積状況、破骨細胞の分化様相、破骨細胞分化誘導因子の発現様相、骨芽細胞・破骨細胞の細胞死に与える影響について着目する。

これらの予備実験の後、リラキシンを結合させた MCL をウサギ正中口蓋縫合部に注入後、磁気を帯びたステンレススチール線を装着した拡大矯正装置を装着し、至適条件下で縫合部の拡大を行う。拡大部の組織学的検索を行う。また、破骨細胞の分化に必須の RANKL/RNAK シグナリングや、リラキシン受容体の分子細胞学的検索を行うことで、リラキシンの破骨細胞活性化機構の解析を行う。

歯科矯正学分野においては、精巧な硬組織の時間的・空間的制御が重要とされるが、加齢や先天的・後天的骨代謝性疾患等による様々な制約のため、外科的療法を余儀なくされる場合もある。昨今発展めざましいナノバイオテクノロジーを利用し骨縫合部における骨代謝機構の解析、およびその新規調節方法を確立することは、歯科矯正学分野にとどまらず、様々な先天性骨代謝疾患の治療法や予防法の発展に大きく寄与し、多くの患者の QOL 向上に貢献することが期待される。

2. 研究の目的 近年、ナノバイオテクノロジーを利用した安全で効果的な Drug Derivery System(DDS)が開発され、臨床応用に向け盛んな研究が進められている。中でも、磁性ナノ粒子であるマグネタイトを内包するカチオン性リポソーム (Magnetite Cationic Liposome; MCL) は、磁力により生体内の標的部位に集積させることが可能で、糖鎖などによる表面修飾、あるいは薬剤を内包させることにより、より特異的な薬剤作用を発揮させることが報告されている<sup>1)</sup>。一方、矯正歯科臨床においては、良好な咬合の確立に、頭蓋顎顔面構成骨格および歯の三

次元的位置コントロールが必須となるが、骨格の成長が終了した成人に対しては外科的療法を余儀なくされることもある。これらを踏まえて、本研究では、リラキシン含有磁気制御型リポソーム (以下リラキシン磁性リポソームと表記する) を利用した、非侵襲的骨縫合部の効果的な拡大制御法の確立を目指し、MCL の部位 (正中口蓋縫合) 特異的薬剤キャリアーとしての適応の可能性、及びその効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法 内因性リラキシンおよびその受容体 RFXP1 のマウス口蓋正中縫合部における経時的な発現様相を免疫組織学・分子生物学的手法にて検索し、リラキシンの正中口蓋縫合部発生および骨性癒合における機能を検索する。マウス胎児口蓋組織培養系において磁性リポソームを適用し、磁力制御によるリポソームの集積状況、破骨細胞の分化様相、破骨細胞分化誘導因子の発現様相、骨芽細胞・破骨細胞の細胞死に与える影響について着目する。これらの予備実験の後、リラキシンを結合させた MCL をウサギ歯槽骨縫合部に注入し、磁気を帯びたステンレススチール線を装着した拡大矯正装置を装着後、至適条件下で縫合部の拡大を行い、拡大部の組織学的検索を行う。また、破骨細胞の分化に必須の RANKL/RNAK シグナリングや、リラキシン受容体の分子細胞学的検索を行うことで、リラキシンの破骨細胞活性化機構の解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) *Rxfp1*、*Rxfp2* および *GR* mRNA は E13.5~E17.5 の前頭骨、上顎骨および下顎骨においてほぼ同様に高い発現を認めた。メッセル軟骨において、*Rxfp1* は E13.5 および E14.4、*Rxfp2* は E13.5~E17.5、*GR* は E13.5 の軟骨細胞に最も強い発現を認めた。臼歯歯胚においては、*Rxfp1*、*Rxfp2* および *GR* mRNA は、蕾状期では歯堤に、帽状期では歯堤、エナメル器および星状網に、鐘状期では歯堤、内外エナメル上皮および中間層においてほぼ同様の発現を示した。舌において、*Rxfp1*、*Rxfp2* および *GR* mRNA は E13.5~E17.5 の舌筋および E17.7 の舌粘膜上皮に特異的な発現を認めた。今回明らかとなった骨、軟骨、歯胚および舌における *Rxfp1*、*Rxfp2* および *GR* mRNA 発現様相から、リラキシンはこれら受容体を通じて頭蓋顎顔面領域の発生過程において重要な役割を担う可能性が示唆された。

(2) リラキシンとその受容体の骨芽細胞表現型に対する作用を検討した。タンパク質輸送担体としてナノサイズのリポソームを用いリラキシン結合型リポソームを作製した。MC3T3-E1 細胞を分化誘導培地にて培養し対照群およびリラキシンリポソーム群 (20

ng/ml) との間で以下の実験を行った。MTT 法にて細胞増殖能を評価し、ALP 活性の測定、半定量的 PCR による骨芽細胞分化因子遺伝子発現の検索、アリザリンレッド染色による石灰化能の解析を行った。ザイモグラフィにて MMP 活性を、VVG 染色にてコラーゲン生成を評価した。*Rxfp* 遺伝子機能抑制実験として *siRNA* 発現ベクター恒常発現 MC3T3-E1 細胞株を樹立し (MC-*siRxfp1*, 2) その細胞表現型を評価した。リラキシン群は対照群と比較して細胞増殖能に有意な差は示さなかった一方、有意に高い ALP および MMP 活性、*Runx2* mRNA の発現亢進、*Opg* mRNA 発現抑制を示した。MC-*siRxfp1*, 2 は対照群と比較して有意に高い細胞増殖能を示した。MC-*siRxfp1* リラキシン添加群では MC-*siRxfp2* と比較して有意に高い ALP 活性、Erk リン酸化の亢進、MMP 活性の低下、コラーゲン生成の抑制および石灰化能の亢進が認められた。*Rxfp1* は骨芽細胞の細胞外基質代謝に、*Rxfp2* は骨芽細胞分化と石灰化に重要な役割を担うことが示された。以上より、リラキシンは骨芽細胞膜上の *Rxfp* を通じて骨芽細胞分化、細胞外基質代謝に影響を与えることが示され、胎生後期の骨発生に何らかの機能的役割を果たすことが示唆された。

##### 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 13 件)

(1) Tsuji-Takechi K, Negishi-Koga T, Sumiya E, Kukita A, Kato S, Maeda T, Pandolfi PP, Moriyama K, Takayanagi H. Stage-specific functions of leukemia/lymphoma-related factor (LRF) in the transcriptional control of osteoclast development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:2561-6, 2012. doi: 10.1073/pnas.1116042109.

(2) Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J. Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes with marked midface retrusion. *J Hum Genet*. 57:191-6, 2012. doi: 10.1038/jhg.2011.154.

(3) Suzuki H, Suda N, Shiga M, Kobayashi Y,

Nakamura M, Iseki S, Moriyama K. Apert syndrome mutant FGFR2 and its soluble form reciprocally alter osteogenesis of primary calvarial osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology*. 227(9): 3267-77, 2012. doi: 10.1002/jcp.24021.

(4) Qiu L, Haruyama N, Suzuki S, Yamada D, Obayashi N, Kurabayashi T, Moriyama K. Accuracy of orthodontic miniscrew implantation guided by stereolithographic surgical stent based on cone-beam CT derived 3D images. *Angle Orthod*. 82(2):284-93, 2012. doi: 10.2319/033111-231.1.

(5) Komazaki Y, Fujiwara T, Ogawa T, Sato M, Suzuki K, Yamagata Z, Moriyama K. Prevalence and gender comparison of malocclusion among Japanese adolescents: A population-based study. *J World Fed Orthod*, 1:67-72, 2012.

(6) Suda N, Tominaga N, Niinaka Y, Amagasa T, Moriyama K. Orthognathic treatment for a patient with facial asymmetry associated with unilateral scissors-bite and a collapsed mandibular arch. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 141(1):94-104, 2012. doi: 10.1016/j.ajodo.2010.02.042.

(7) Ng IW, Ono T, Inoue-Arai MS, Honda E, Kurabayashi T, Moriyama K. Differential articulatory movements during Japanese /s/ and /t/ as revealed by MR image sequences with tooth visualization. *Arch Oral Biol*. 57(6):749-59, 2012. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.11.002.

(8) Tanimoto Y, Veistinen L, Alakurtti K, Takatalo M, Rice DP. Prevention of premature fusion of calvarial suture in GLI-Kruppel family member 3

(Gli3)-deficient mice by removing one allele of Runt-related transcription factor 2 (Runx2). J Biol Chem. 15;287(25):21429-38, 2012. doi: 10.1074/jbc.M112.362145.

(9)Veistinen L, Takatalo M, Tanimoto Y, Kesper DA, Vortkamp A, Rice DP. Loss-of-Function of Gli3 in Mice Causes Abnormal Frontal Bone Morphology and Premature Synostosis of the Interfrontal Suture. Front Physiol. 3:121, 2012. doi: 10.3389/fphys.2012.00121.

(10)Kawafuji A, Suda N, Ichikawa N, Kakara S, Suzuki T, Baba Y, Ogawa T, Tsuji M, Moriyama K. Systemic and maxillofacial characteristics of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome not treated with glossectomy. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 139(4):517-25, 2011. doi: 10.1016/j.ajodo.2009.07.021.

(11)Ng IW, Ono T, Inoue-Arai MS, Honda E, Kurabayashi T, Moriyama K. Application of MRI movie for observation of articulatory movement during a fricative /s/ and a plosive /t/. Angle Orthod. 81(2):237-44, 2011. doi: 10.2319/060210-301.1.

(12)Suda N, Ogawa T, Kojima T, Saito C, Moriyama K. Non-syndromic oligodontia with a novel mutation of PAX9. J Dent Res. 90(3):382-6, 2011. doi: 10.1177/0022034510390042.

(13)Takada J, Ono T, Miyamoto JJ, Yokota T, Moriyama K. Association between intraoral pressure and molar position and inclination in subjects with facial asymmetry. Eur J Orthod. 33(3):243-9, 2011. doi: 10.1093/ejo/cjq060.

[学会発表] (計 2 件)

(1)Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K. Expression Pattern of Relaxin Receptors During Mouse Craniofacial Development. [90th General Session & Exhibition of the IADR](#), Foz do Iguacu, Brazil, June 20-23, 2012.

(2) ドゥアルテ カロリーナ 小林 起穂 川元 龍夫 森山 啓司 マウス頭蓋顎顔面領域の発生過程におけるリラクシン受容体遺伝子発現様相の解析 第 71 回日本矯正歯科学会大会、盛岡、平成 24 年 9 月 26-28 日。

[図書] (計 2 件)

(1)Kuroda T, Ohyama K, Motohashi N, Moriyama K. Atlas of orthodontic treatment for patients with birth defect. Needham Press, 2012.

(2)Takeda S, Haga N, Moriyama K. Clinical correlate: cleidocranial dysplasia. p59-63, Mineralized tissues in oral and craniofacial science, WILEY-BLACKWELL, 2012.

[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

<http://www.tmd.ac.jp/grad/mort/mort-J.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 啓司 (MORIYAMA KEIJI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20262206

(2)研究分担者

川元 龍夫 (KAWAMOTO TATSUO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・講師

研究者番号：50323704

小林 起穂 (KOBAYASHI YUKIHO)

東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンタ  
ー・特任助教

研究者番号：20596233

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

デュアルテ カロリーナ (DUARTE CAROLINA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・大学院生