

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689081

研究課題名(和文) 免疫系細胞による歯根吸収制御機構の解明

研究課題名(英文) Exploration of regulatory mechanisms of root resorption by immune cells

研究代表者

菅崎 弘幸 (Kanzaki, Hiroyuki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30333826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,500,000円、(間接経費) 4,950,000円

研究成果の概要(和文)：1. マウスにおいて歯根吸収を惹起する矯正力負荷モデルを確立し、歯周組織におけるTreg細胞の存在を遺伝子・タンパク質レベルで探索した。2. マウス脾細胞から分取したTregに破骨細胞分化サイトカイン遊離に関わる酵素TACEの発現を発見し、中和抗体産生ハイブリドーマを樹立し、そのエピトープ配列を明らかとした。3. 歯根吸収を行う破歯細胞や破骨細胞分化にKeap1/Nrf2系が重要な役割を果たしていることを明らかとし、論文報告した。4. 破骨細胞分化はNrf2活性化にて阻止できることを明らかとし、それに関連した特許を出願した。

研究成果の概要(英文)：1. We established the root resorption model in mice by orthodontic wire. Using the model, we explored the Treg in periodontium in mRNA and protein levels. 2. Treg purified from mouse splenocytes express TACE, that play a role in osteoclastogenic cytokine release. We established the hybridoma that produce monoclonal neutralizing antibody against human TACE, clarified the epitope sequence, and applied for patent. 3. Odontoclast is close lineage cells to osteoclast, and we found and reported that Keap1/Nrf2 axis play a role in the regulation of osteoclastogenesis. 4. We found that Nrf2 activation can attenuate osteoclastogenesis in vitro and in vivo, and applied for patent.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯根吸収 破歯細胞 破骨細胞 Treg Keap1 Nrf2 TACE foxp3

## 1. 研究開始当初の背景

歯根吸収は歯科矯正治療の最も大きな副作用の一つであり、約 16%の頻度で 2mm 以上の歯根吸収が観察されたとする報告もある(1)。歯根吸収発症歯は、矯正治療後の安定性が悪化するのみならず、歯を支える歯根長が短縮することにより歯冠・歯根長比が悪化し、咬合力に対応しきれず、十分な咀嚼機能を発揮できない咬合になる。この歯根吸収発症のリスクファクターは、大きく機械的因子と生物学的因子との 2 つに分けられる。機械的因子として過度の歯の移動・トルク負荷・圧下力負荷・長期にわたる治療期間が挙げられ、生物学的因子として遺伝的因子、全身状態が挙げられる(2)。

この全身状態のなかで、免疫系疾患(喘息、アレルギー)と歯根吸収の正の相関が報告されている(3-5)。喘息・アレルギーはともに Regulatory T cell (Treg) 細胞数減少による T 細胞機能制御不全が原因との報告がされている(6)。

歯根吸収は破歯細胞による歯質吸収が行われることで生ずるが、この破歯細胞は破骨細胞と近縁の細胞であり、RANKL や TNF- $\alpha$  による分化・活性化機構が報告されている。矯正学的歯の移動時にもこれらの破骨細胞形成性サイトカイン発現が上昇することが報告されており、過度のサイトカイン発現が歯根吸収を惹起する可能性も示唆されている(7)。上述の Treg は破骨細胞形成を阻害することが報告されており(8)、かつ歯周組織での circulating Treg の存在も報告されていることから(9)、矯正学的歯の移動時にも歯周組織に存在する Treg が破歯細胞活性化を抑制している可能性が考えられる。

本研究は、Treg が破歯細胞活性化を抑制しているという仮説の元、(1)Treg の歯周組織における局在、(2)Treg transgenic (TG), deficient による歯根吸収程度の比較、(3)Treg による歯根吸収制御機構の解明を行うことを目的とする。将来的には歯根吸収リスク判定を矯正治療開始前に診断できるようになることを究極的な研究目的とし、それに必要な歯根吸収制御メカニズムの基礎的知見の収集を目的とする。

(1) Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2005;128(1):57-67.

(2) Med Oral Pathol Oral Cir Bucal. 2007;12(8):E610-3.

(3) Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1999;116(5):545-51.

(4) Angle Orthod. 2006;76(1):103-8.

(5) Angle Orthod. 2008;78(5):793-8.

(6) Curr Allergy Asthma Rep. 2010;10(1):21-8.

(7) J Oral Sci. 2008;50(4):367-76.

(8) Arthritis Rheum. 2007;56(12):4104-12.

(9) J Endod. 2009;35(9):1229-33.

## 2. 研究の目的

### 【研究の全体構想】

本研究では、免疫系疾患が歯根吸収にどのように影響を与えているのかを明らかにすべく、動物実験、細胞培養実験を用いて、免疫系細胞、特に Treg がどのように破歯細胞形成・活性化に影響を与えているのかについて分子生物学的に検索を行う。

### 【研究の具体的な目的】

(1) 最初に矯正学的歯の移動時の歯周組織における Treg の存在を確認する。

(2) 次に Treg TG, deficient, wild type のマウス 3 種類について、中等度から重度の負荷を与える force system を用いて歯の移動を行い、歯根吸収程度の比較を行う。これら Treg TG, mutant mice は Dr. Georg Schett (University of Erlangen-Nuremberg, Germany) より供与予定である。

(3) 最後に Treg による歯根吸収制御機構の解明を、in vitro assay を用いて行う。

### 【当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義】

歯根吸収発症のリスクファクター、とくに生物学的因子として免疫系疾患(喘息、アレルギー)の存在が報告されているが、なぜこの免疫系疾患があることで歯根吸収発症率が上昇するのかについては未だ報告がない。さらに Treg の歯周組織における存在、とくに矯正学的歯の移動時にどの程度 Treg が存在するかについては未だ報告がない。これらの知見を得ることは、免疫系と矯正の関わりを解明する意味で重要と考えられる。また、文献的に Treg が破骨細胞形成を阻害することが報告されているが、その分子生物学的機構の解明も今後の歯根吸収研究に重要な知見になるものと思われる。さらに、本研究は、現在までの臨床報告と基礎的知見との gap を埋める学術的にも有意義な研究であると考えている。

予想される結果としては、(1)矯正学的歯の移動時に歯周組織において Treg の存在が確認され、Treg が破歯細胞形成・活性化になんらかの影響を与えている可能性が考えられること。(2) Treg TG mice において重度の矯正力を負荷しても歯根吸収程度が低く、Treg mutant mice においては中等度の矯正力を負荷しても歯根吸収が重度に観察されること。このことから、Treg が破歯細胞活性化を阻害しているような所見が得られることを予想している。(3)さらに Treg の破歯細胞形成・活性化阻害機構として RANKL, TNF- $\alpha$ シ

グナル阻害や Treg からの他のサイトカイン産生による負の制御機構が考えられる、これら制御機構の解明を in vitro assay を用いて行う予定である。

また本研究遂行により、矯正治療開始前における歯根吸収リスク判定を Treg に着目して行うことが可能となることが予想され、臨床的にも非常に意義があるものと考えている。

### 3. 研究の方法

本研究では最初にマウスにおいて矯正学的歯の移動を行い、歯周組織における Treg の存在を in situ hybridization ならびに immuno-fluorescent analysis, flow cytometry を用いて確認する。次に Treg TG, deficient, wild type のマウス 3 種類について、中等度または重度の矯正力負荷を与える force system を用いて歯の移動を行い、歯根吸収程度の比較を microCT 画像ならびに 100 $\mu$ m 間隔の組織切片像で行う。最後に Treg による歯根吸収制御機構の解明を、in vitro assay を用いて行う。

(1)マウス歯周組織における Treg 存在の確認

- ①本研究を遂行する上での具体的な工夫  
マウス歯周組織における Treg の存在を確認すべく、上顎切歯を固定源として中等度または重度の矯正力を片側上顎臼歯にのみ負荷し、対側は矯正力負荷なしとし、比較検討を行う。さらに矯正力負荷開始後 6, 12, 24 時間, 2, 4, 7, 14 日後での Treg の存在を確認する。Treg 存在の確認方法は、1) in situ hybridization による foxp3 mRNA レベルでの検出、
  - 2) 抗 foxp3 抗体を用いた immuno-fluorescent analysis、
  - 3) マウス歯周組織から collagenase digestion による mouse periodontal mononuclear cells を採取し、抗 foxp3 抗体を用いて flow cytometry 法による検出を予定している。これらの方法で検出が難しい場合、FOXP3/GFP KI mice (Dr M. Oukka, Harvard Medical School, Boston, MA) を用いて、GFP 検出を検討している。さらに、次の研究計画 (Treg TG, deficient, wild type mice 間での歯根吸収比較) における必要な知見として、Treg TG, deficient, wild type mice 歯周組織での Treg 細胞数を比較・定量化しておく。
- ②研究計画を遂行するための研究体制

Forsyth Institute (Boston, MA, USA) 留学中に研究上の相談によくのっていただいた Dr. Kawai, Dr. Sasaki (Forsyth Institute, Boston, MA) は根尖病巣における Treg 存在の検出について論文を出しており (J Endod. 2009 Sep;35(9):1229-33.)、Treg の歯周組織における検出についてノウハウがある。適宜 Dr. Kawai, Dr. Sasaki 両者に助言を請う予

定である。また、各検出方法・手技については、Forsyth Institute 留学中またはそれ以前にすでに習得済である。

(2) Treg TG, deficient, wild type mice 間での歯根吸収比較。

①本研究を遂行する上での具体的な工夫  
Treg の有無ならびに局所における Treg 細胞数の多寡が歯根吸収にどのように影響を与えるかを検索すべく、Treg TG, deficient, wild type のマウス 3 種類について、中等度または重度の矯正力負荷を与える force system を用いて歯の移動を行い、歯根吸収程度の比較を行う。具体的には、microCT 画像から各歯根表面に生じた実質欠損体積の比較、ならびに 100 $\cdot$ m 間隔の連続組織切片像で TRAP 染色による破歯細胞の検出・破歯細胞数計測ならびに HE 染色による歯根セメント質・象牙質欠損面積の比較を行う。

②研究計画を遂行するための研究体制  
Treg TG, deficient mice は Dr. Georg Schett (University of Erlangen-Nuremberg, Germany) より供与予定である。

(3) Treg による歯根吸収制御機構の解明

①本研究を遂行する上での具体的な工夫  
Treg の破歯細胞形成・活性化阻害機構として想定されるものとして、

- 1) RANKL, TNF- $\alpha$  シグナル阻害、
- 2) Treg からの他のサイトカイン産生による負の制御機構、
- 3) Treg・破歯細胞間の cell-to-cell contact による制御機構が考えられる。

1) について、以下のものを検出する予定である。A) RANKL のデコイレセプターである OPG、sRANKL、TNF- $\alpha$ 、soluble TNFR1, II 産生を ELISA で検出。B) Treg と破骨細胞前駆細胞の非直接接触共存培養による、RANK や破骨細胞分化マーカー遺伝子発現の realtimePCR による検出。

2) については、Treg からの IFN- $\gamma$ , IL-1, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 17, 23 などの産生を ELISA を用いて測定する。さらに、Treg が産生した液性因子が骨芽細胞や stromal cell に与える影響、特に OPG 産生促進効果を、骨芽細胞/stromal cell 培養系への Treg 培養上清添加にて比較検討を行う。

3) については、破骨細胞前駆細胞と Treg を直接接触可能な共存培養を行い、破骨細胞形成・活性化への影響を遺伝子・タンパク質レベルで比較検討を行う。

②研究計画を遂行するための研究体制

各種サイトカインの ELISA による検出はすでに手技を習得している。RealtimePCR による RANK や破骨細胞分化マーカー遺伝子発現検出は、Forsyth Institute 留学中にプライマー、PCR 条件、手技、検定方法を習得している。Treg の MACS 単離は、Forsyth Institute 留学中に手技を習得済である。直接接触可

能・不可能な共存培養法は、大学院時代にすでに手技を習得済である。

#### (4) 研究遂行上の pitfall

考え得る研究遂行上の pitfall として次のことが予想され、それぞれ以下に記載するような対処法を考えている。

##### ① Treg 検出感度が不十分。

上述の通り、FOXP3/GFP KI mice を実験系に用い、GFP の蛍光観察または抗 GFP 抗体を用いた免疫学的検出を行うことで検出感度を上げることが可能である。

##### ② Treg が歯周組織に存在しない。

①の、FOXP3/GFP KI mice を用いても歯周組織に Treg の存在が観察されない場合、矯正力を負荷した場合、また、根尖病巣・歯周病モデルでも検出ができないかどうかを検討する。根尖病巣は文献的に positive control となりうる。

##### ③ Treg の歯周組織における細胞数と歯根吸収程度に相関が見られない。

負荷する矯正力を調整し、wild type mice において適度な歯根吸収を生じさせる程度の矯正力を Treg TG, mutant mice に負荷して両群間での歯根吸収程度の比較を行う。

##### ④ Treg 単離回収率の問題。

MACS による Treg 単離回収では十分な Treg 細胞数が得られない場合、1) FOXP3/GFP KI mice の各リンパ節細胞 suspension を GFP をマーカーとしたセルソートを行い、GFP+ の Treg を実験に用いる、2) Treg TG mice からの Treg 単離回収を行う。

##### ⑤ Treg と破骨細胞前駆細胞の共存培養がうまくいかない。

破骨細胞前駆細胞として RAW264.7 cell を検討しているが、増殖速度が非常に速く、長期培養には不向きである。場合により、bone marrow macrophage, peritoneal macrophage を用いる。

#### 4. 研究成果

(1) マウスにおいて歯根吸収を惹起するステンレスワイヤーによる矯正力負荷モデルを確立した。

(2) Treg のマーカー遺伝子である Foxp3 mRNA 発現を、矯正力負荷した歯周組織サンプルから total RNA を抽出し逆転写後、リアルタイム PCR によって検出を行った。同様に歯周組織における Treg 細胞の存在を Foxp3, CD25 の免疫染色によりタンパク質レベルで探索した。

(3) Treg による破骨細胞活性化抑制の分子生物学的機構を解明すべく、マウス脾細胞から Treg を分取し、Treg の産生するサイトカインプロファイルの観察を行った。そのなかで破骨細胞分化サイトカインである RANKL, TNF- $\alpha$  の遊離に重要な役割を果たしている酵素である TACE が Treg に発現していることを

発見し、その酵素活性を阻害することで Treg が産生・遊離する破骨細胞分化促進サイトカインを阻止すべく抗 TACE 中和抗体産生ハイブリドーマを樹立し、そのエピトープ配列を明らかとした。

(4) また、TACE が破骨細胞分化阻害因子であるインターフェロンガンマを分解するデータが得られたため学会発表した。

(5) 歯根吸収を行う破骨細胞や破骨細胞分化に Keap1/Nrf2 系が重要な役割を果たしていることを明らかとし、学会発表・論文報告した。

(6) 破骨細胞分化は Nrf2 活性化にて阻止できることを明らかとし、それに関連した特許を出願した。

#### 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 6 件)

① 菅崎弘幸、篠原文明、加治屋幹人、小玉哲也。細胞膜透過性ペプチド 7R-ETGE による骨破壊性疾患の阻止。第 26 回バイオエンジニアリング講演会プロシーディング 13-69:253-254; 2014. (査読なし)

② Kanzaki, H.; Shinohara, F.; Kajiya, M.; Kodama, T. The Keap1/Nrf2 Protein Axis Plays a Role in Osteoclast Differentiation by Regulating Intracellular Reactive Oxygen Species Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 288:23009-23020; 2013. (査読有) 10.1074/jbc.M113.478545

③ Kawazu, T.; Kanzaki, H.; Uno, A.; Azuma, H.; Nagasaki, T. HVJ-E/importin- $\beta$  a hybrid vector for overcoming cytoplasmic and nuclear membranes as double barrier for non-viral gene delivery. *Biomedicine & pharmacotherapy* 66:519-524; 2012. (査読有) 10.1016/j.biopha.2012.02.005

④ Zhao, N.; Liu, Y.; Kanzaki, H.; Liang, W.; Ni, J.; Lin, J. Effects of local osteoprotegerin gene transfection on orthodontic root resorption during retention: an in vivo micro-CT analysis. *Orthodontics & craniofacial research* 15:10-20; 2012. (査読有) 10.1111/j.1601-6343.2011.01532.x

⑤ Zhao, N.; Lin, J.; Kanzaki, H.; Ni, J.; Chen, Z.; Liang, W.; Liu, Y. Local osteoprotegerin gene transfer inhibits relapse of orthodontic tooth movement. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* 141:30-40; 2012. (査読有) 10.1016/j.ajodo.2011.06.035

⑥Kanzaki, H.; Han, X.; Asami, Y.; Suzuki, M.; Kawai, T.; Taubman, M. Inhibition of T-Cell-Mediated and Infection-Induced Periodontal Bone Resorption by TACE Blockade. In: Sasaki, K.; Suzuki, O.; Takahashi, N., eds. Interface Oral Health Science 2011: Springer Japan; 2012: 173-175. (査読なし) 10.1007/978-4-431-54070-0\_45

(2)研究分担者

(3)連携研究者

〔学会発表〕(計4件)

①菅崎弘幸、篠原文明、加治屋幹人、Nrf2を介した抗酸化ストレス酵素群発現は破骨細胞分化を負に制御する、第35回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会、2014年2月1日、仙台

②菅崎弘幸、篠原文明、加治屋幹人、小玉哲也。細胞膜透過性ペプチド7R-ETGEによる骨破壊性疾患の阻止。第26回バイオエンジニアリング講演会、2014年1月11-12日、仙台

③Hiroyuki Kanzaki, Mikihiro Kajiya, and Tetsuya Kodama. Nrf2 negatively regulates osteoclast differentiation. 国際歯科研究学会、2012年6月20-23日、フォストイグラス(ブラジル)

④Hiroyuki Kanzaki, Mirei Chiba, Maiko Suzuki, Toshi Kawai, and Martin Taubman. TNF-alpha converting enzyme degrades interferon-gamma. アメリカ免疫学会、2012年5月4-8日、ボストン(アメリカ合衆国)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

①名称：TACE ペプチドエピトープ、抗ヒトTACE タンパク質抗体及び当該抗体を産生するハイブリドーマ

発明者：菅崎弘幸

権利者：東北大学

種類：国際特許

番号：PCT/JP2014/58328

出願年月日：2014年3月25日

国内外の別：外国

②名称：細胞膜透過性ペプチドによる破骨細胞活性阻害

発明者：菅崎弘幸

権利者：東北大学

種類：国内特許

番号：特願2013-204248

出願年月日：2013年9月30日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

菅崎 弘幸 (Kanzaki, Hiroyuki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30333826