

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17日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23792434
研究課題名（和文） 新規骨代謝制御分子の歯槽骨リモデリング機構における役割
研究課題名（英文） Roles of a novel protein in alveolar bone remodeling process
研究代表者
村上 絢子（MURAKAMI AYAKO）
九州大学・歯学研究院・特別研究員
研究者番号：10432923

研究成果の概要（和文）：

PRIP (phospholipase C-related but catalytically inactive protein) 欠損マウスは野生型に比べ、骨代謝の亢進により海綿骨の骨量が増加している。そこで歯槽骨リモデリング機構におけるPRIPの役割について解析を行った。

矯正力を加え歯を移動させたマウスの解析では、PRIP欠損（PRIP-KO）マウスは野生型マウスに比べて有意に移動距離が減少した。歯槽骨の圧迫側の破骨細胞と、牽引側の骨芽細胞の分布に相違がみられた。さらにPRIP-KOマウスでは破骨細胞に分化する割合が有意に減少していた。これらの結果より、PRIPは矯正力による歯の移動の歯槽骨リモデリングの制御に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the possible involvement of PRIP in alveolar bone remodeling during orthodontic tooth movement. In PRIP-KO mice, tooth movement appeared to be reduced compare to the WT mice. Histological analysis showed the difference in distributions of osteoblasts on the tension side and osteoclasts on the pressure side of alveolar bones, respectively. Population of differentiated osteoclasts was decreased in KO mice compared with WT mice. These results indicate that PRIP is implicated in the regulation of bone remodeling during mechanical tooth movement.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：PRIP、骨リモデリング、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

矯正治療は、顎顔面の骨格および歯列・咬合の形態的不正を整え、咀嚼、嚥下、発音、呼吸などの機能改善を図ることを目的として行われる。また、正常な咬合は、機能面だけではなく、精神面での健康をもたらす、Quality of Life (QOL) の維持のためには重要である。

矯正力を歯に加えることで、歯根膜腔の未分化間葉細胞が骨芽細胞へと分化し、種々の因子を発現することで歯槽骨のリモデリングが活性化され、歯が移動する。

当研究室では、細胞間情報伝達の一つであるイノシトールリン脂質 (PI) 情報伝達系において、新規の Ins(1, 4, 5)P₃ 結合蛋白質を見いだした (Kanematsu et al., J. Biol. Chem. 267:6518-6525, 1992; Kanematsu et al., EMBO J. 21:1004-1011, 2002)。本分子は、ホスホリパーゼ C- δ 1 (PLC- δ 1) と類似のドメイン構造 (PH ドメイン、EF ハンドモチーフ、活性中心 X, Y ドメイン、C2 ドメイン) を持っているが PLC の酵素活性は持っていなかった。後に、タイプ 2 とも言える類似の分子が発見され (Otsuki et al., 1999 B. B. R. C. 266:97-103, 1999; Takenaka et al., 2003 Mol. Cell. Biol. 23:7329-7338, 2003)、我々はこれらを PRIP [phospholipase C (PLC) related inactive protein], (PRIP-1 と PRIP-2) と名付けた。

PRIP-1 のノックアウトマウスを作製し、その解析過程で、GABA_A 受容体のベンゾジアゼピン系薬剤の感受性に異常が生じていることを明らかにした。これらのことから、PRIP-1 は脳における抑制性シナプス情報伝達機構に重要な役割を担っている事が示唆された。また、PRIP-1 は脳特異的に発現しており、特に大脳では海馬や皮質の神経細胞に、小脳ではプルキンエ細胞や小脳核に発現していた。

さらに、この PRIP-1 の組織特異的な遺伝子発現の制御機構の解明を目的として研究を行ってきた。PRIP-1 遺伝子については殆ど何も分かっていなかったため、まず遺伝子構造や転写 開始点等を明らかにした上で、制御機構について、特定の制御領域や転写因子の関与等、様々な要素を検討しつつ解析を行った (Murakami et al., Gene 382:129-139, 2006)。また比較的普遍的な発現様式を持つ PRIP-2 の発現調節機構についての研究もすることで、厳密な発現の組織特異性を強いられている PRIP-1 遺伝子の発現調節のメカニズムについてさらに詳しく解析を進めてきた。

一方、PRIP-KO マウスは、LH、FSH といった性腺刺激ホルモンの分泌異常を示した。LH、FSH、エストロゲンなどの恒常性が失われると、骨代謝のバランスが崩れて骨粗鬆症などの症状を呈するようになることが知られている。そこで、当研究室において、PRIP-KO マウスの示すホルモン・アンバランスが骨に何らかの異常をきた

す可能性が考えられたため、骨代謝に及ぼす影響について PRIP-KO マウスの解析を行ってきた (Matsuda et al., Biol. Reprod., 81:681-689, 2009)。その結果、野生型に比べ破骨細胞・骨芽細胞が共に多く、海綿骨の骨量が増加している事が明らかになり、骨代謝の亢進により骨量が増加しているということが示唆された。

2. 研究の目的

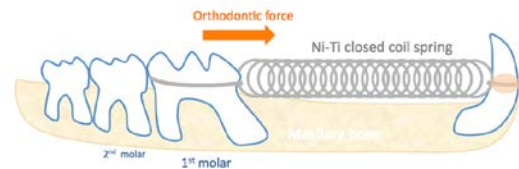
本研究では、骨代謝制御に関わる新規分子 PRIP について、骨リモデリングにおける役割を解明することを目的とした。

野生型および PRIP-KO マウスの歯の移動を行い、矯正力によるメカニカルストレスを通して、これまでの GABA_A 受容体を介したシナプス情報伝達系やイノシトールリン脂質 (PI) 情報伝達系からだけではなく、骨のリモデリングの面からの解析を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 歯牙移動マウスの作製

10 週齢の PRIP-KO マウスおよび野生型マウスの前歯部を固定源として、ニッケルチタニウム製のクローズドコイルを用いて、臼歯部に矯正力を与え近心移動させた。装置を装着した状態で 8 日間飼育し、マウスの第一臼歯を近心移動させ歯牙移動マウスを作製した。



(2) 矯正力を加えたマウスの歯槽骨の形態学的解析

歯牙移動マウスを用いて、高分解能の *in vivo* X 線マイクロ CT スキャナにより解析を行った。3D イメージ解析、骨形態計測、歯槽骨部の解析を行い、野生型および KO マウスにおける差異を解析した。上顎第一臼歯と第二臼歯間の距離を計測し、歯の移動量の比較を行った。

(3) 矯正力を加えたマウスの歯槽骨および歯周組織の組織学的解析

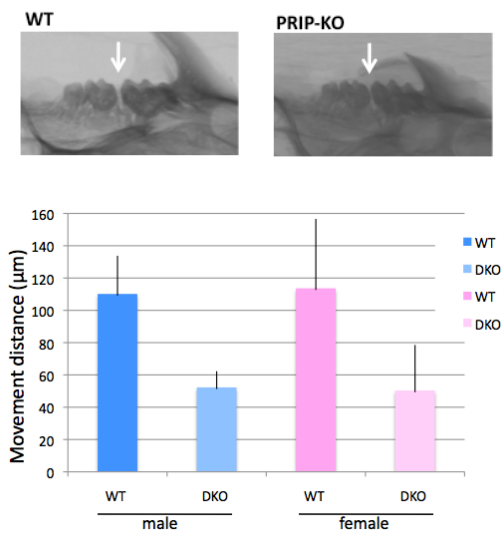
歯牙移動マウスの下顎骨の切片を作製し、アルカリホスファターゼ染色、TRAP 染色を行った。野生型および PRIP-KO マウスにおける骨芽細胞、破骨細胞などの数、分布、酵素活性等の違いを調べた。

(4) 野生型および PRIP-KO マウスにおける破骨細胞の分化や成熟の違い

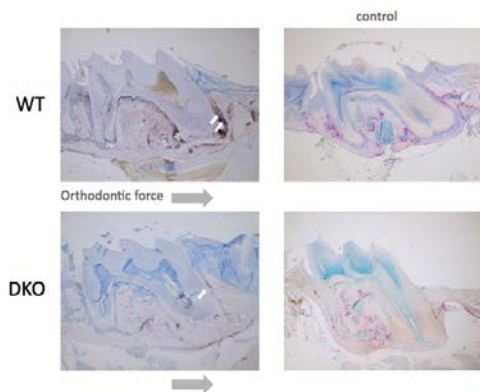
野生型および PRIP-KO マウスにおける破骨細胞の分化・成熟の相違について検討するために、両者の大腿骨から採取した骨髄細胞を用いて、RANK等膜分子の細胞内発現量や膜への発現量、膜上での局在を解析した。未分化、破骨細胞前駆細胞および分化した破骨細胞の各ステージについて、FACS 等で検討した。

4. 研究成果

歯を移動させたマウスを、X線マイクロCTスキャナを用いて形態学的な解析を行った。その結果、PRIP 欠損マウスは野生型マウスに比べ、有意に歯の移動距離が減少した。雌雄で差異はなかった。

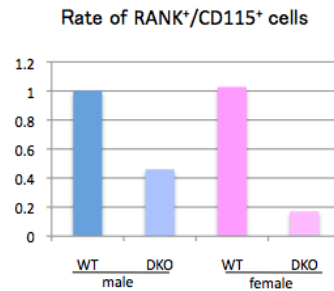


また、組織学的解析においてアルカリホスファターゼ/TRAP 染色を行ったところ、歯槽骨の圧迫側の破骨細胞が、PRIP 欠損マウスに比べ野生型マウスの方が多く見られた。また牽引側の骨芽細胞の分布に相違がみられた。



さらに、野生型マウスと PRIP 欠損マウスの骨髄細胞から破骨へ分化させた細胞を用いて、

Flow cytometric analysis を行った結果、破骨細胞になりうる RANK/CD115 陽性細胞の数が PRIP-KO マウスにおいて減少していることが分かった。



これらの結果より、PRIP 欠損マウスでは破骨細胞の機能に異常があることがわかった。矯正歯の移動において、PRIP が骨のリモデリングに関与していることが示唆された。

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 1 件)

① Tsutsumi K, Matsuda M, Kotani M, Mizokami A, Murakami A, Takahashi I, Terada Y, Kanematsu T, Fukami K, Takenawa T, Jimi E, Hirata M.

Involvement of PRIP, phospholipase C-related, but catalytically inactive protein, in bone formation.

The Journal of Biological Chemistry

査読有

Volume286 Number35 2011 31032-31042

[学会発表] (計 2 件)

① Miho Matsuda, Ayako Murakami, Masato Hirata: PRIP-KO mice exhibit the decreased tooth movement by orthodontic force.

第 35 回 日本分子生物学会年会

2012年12月11～14日 福岡

② Ayako Murakami, Miho Matsuda: Role of a novel protein in alveolar bone remodeling during orthodontic tooth movement.

Congress 22nd IUBMB 37th FEBS

2012年9月4～9日 Sevilla, Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 絢子 (AYAKO MURAKAMI)
九州大学 歯学研究院 特別研究員
研究者番号: 10432923

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号: