

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463166

研究課題名(和文) ナノサイエンスを応用した新規顎顔面領域の縫合部制御法の開発

研究課題名(英文) Development of methods to control craniofacial sutures applied nanoscience.

## 研究代表者

川元 龍夫 (Kawamoto, Tatsuo)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50323704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

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り、妊娠末期に子宮や胎盤等から血中へ分泌され、恥骨結合を弛緩させて分娩を補助する。本研究は上顎側方拡大の実験モデルとしてマウス頭蓋冠矢状縫合部を用い、同部位の側方拡大時のリラキシンの効果を検討することであった。側方拡大開始48時間後ではリラキシンにより矢状縫合部のコラーゲン線維の減少を認めた。側方拡大開始1週間後ではリラキシンにより骨量、骨密度が上昇し、類骨の形成が観察された。結論として、リラキシンは縫合部拡大時の骨リモデリングおよびコラーゲン代謝に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Relaxin (RLN) is an insulin-like hormone associated with extracellular matrix degradation, osteoclastogenesis, and osteoblast differentiation. This study aimed to assess the effect of RLN during and after lateral expansion of murine calvarial sagittal sutures. RLN was injected topically using a nano-sized liposome carrier into the sagittal sutures of mice just before lateral expansion. Less collagen staining was observed in the RLN-treated samples after 48 hours. Increased bone mineral density and volume, and thick well-organised osteoid tissue were observed in RLN-treated samples after 1 week. As conclusions, RLN treatment may modify bone remodelling and collagen metabolism during and after suture expansion.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：歯科 矯正歯科 ナノサイエンス

1. 研究開始当初の背景

ペプチドホルモンの一種であるリラキシン (RELAXIN; Rln) は哺乳類の出産時に卵巣黄体より血中に分泌され、恥骨結合の弛緩と軟化、子宮頸部の軟化等を惹起し、分娩の円滑な進行に大きく寄与している。この作用機序として、リコンビナント Rln 2 がマトリックスメタロプロテアーゼ (Mmp) の発現を誘導し、Mmp の阻害因子である Timp1 発現を抑制する事で細胞外マトリックスの分解を引き起こす事が報告されている<sup>1)</sup>。加えて Rln およびその受容体であるリラキシン受容体 (Rxfp) 遺伝子ノックアウトマウスは、生殖器官の異常のみならず、肺、肝臓、血管等広範囲での線維腫の発生が認められた<sup>2,3)</sup>ことから、内因性リラキシンは細胞外基質の分解に重要な働きを担うことが示唆される。一方、破骨細胞の分化誘導、機能亢進作用があることも報告され、なかでも興味深いことに骨芽細胞の分化・成熟に必須の RANKL-OPG システムを調節することが明らかとなり<sup>3)</sup>、破骨細胞の分化および機能の調節を通じて、骨代謝機構に影響を与える事が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、リラキシンの骨基質分解促進作用と破骨細胞機能亢進機構作用を頭蓋顎顔面領域の縫合部に生体親和性磁性リポソームを用いて適用し、その局所的骨代謝調節作用を利用することで縫合部の拡大を含めた顎顔面骨格の三次元的位置制御を目指すものである (図 1)。

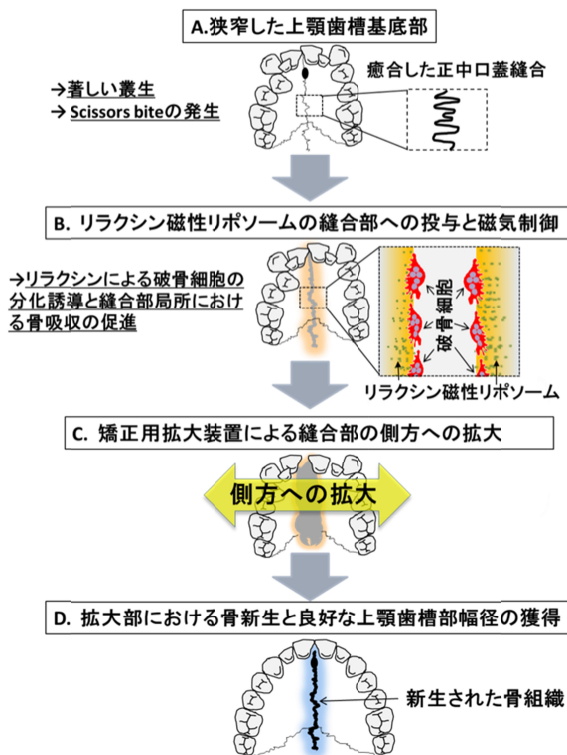


図 1. 研究の概念図

3. 研究の方法

(1) Rln 結合型リポソームの作製

Glycolipo™ (片山科学工業株式会社) に蛍光色素 Cy3-NHS ester (GE Healthcare) と磁性ナノ粒子 (EMG707, Ferrotec) を内包させ、3,3-dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate] (Pierce) を用いて表面に Rln-1 (R&D Systems) を結合させた (図 2)。

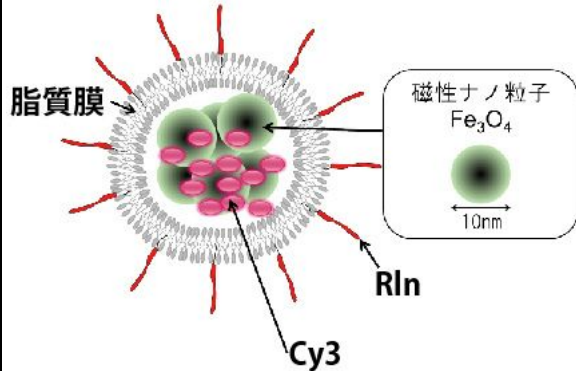


図 2. Rln 結合型リポソーム

(2) 矢状縫合部の拡大

矯正用ワイヤー (.014" Elgiloy®) を屈曲した拡大装置を 8 週齢雄性マウス (C57BL/6J) 頭頂骨に装着し、矢状縫合部を 20 gf の力で側方拡大を行い、次の 4 群を設定した。

- 非拡大群 (拡大なし)
- 拡大対象群 (拡大のみ)
- 拡大 PBS 群 (拡大時、PBS を 20 μl 注入)
- 拡大 Rln 群 (拡大時、Rln 結合型リポソーム 20 ng/ml を 20 μl 注入)

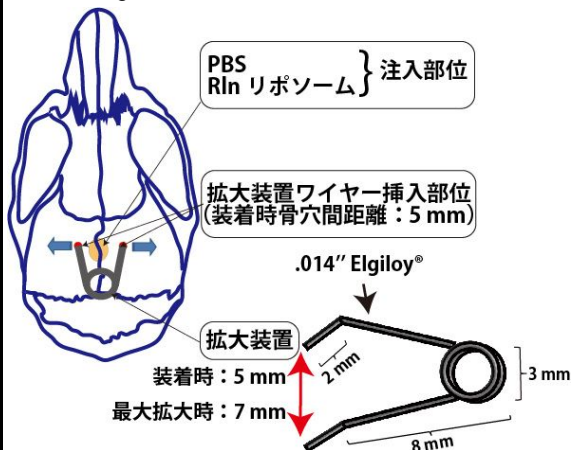


図 3. マウス矢状縫合の拡大

(3) 拡大量計測

歯科用キャリパスを用いて拡大装置を装着した骨穴間距離を計測し、拡大量を求めた。

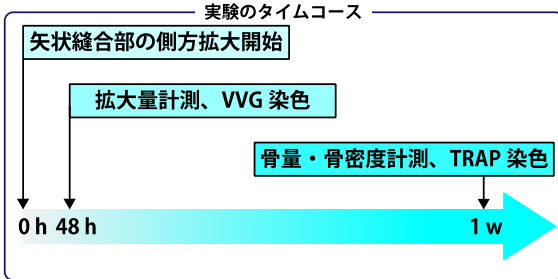
(4) 骨量・骨密度計測

microCT 撮影装置 (inspeXio SMX-100CT、島津製作所) を用い、管電圧 90 kV、管電流 150 μA、解像度 39 μm/Voxel の条件で撮影し、三次元画像分析ソフトウェア (TRI/3D-BON、Ratoc) を用いて矢状縫合部の骨量および骨

密度を計測した。

(5) 組織学的評価

パラフィン包埋連続組織切片の作製を行い、Verhoeff-Van Gieson (VVG) 染色にてコラーゲン線維の走行を、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色にて破骨細胞形成を観察し、組織学的検討を行った。



(6) 統計学的解析

拡大量、骨量、骨密度について、Kruskal-Wallis 検定および Dunn の多重検定を用いた。

4. 研究成果

(1) 拡大開始 48 時間後における矢状縫合部の拡大量

矢状縫合部拡大開始 48 時間後において、拡大対象群、拡大 PBS 群、拡大 RIn 群では拡大された矢状縫合が観察され、非拡大群と比較して、拡大 RIn 群は有意に拡大量が増加していた。また拡大対象群、拡大 PBS 群と比較して RIn 群は拡大量が増加する傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった (図 4)。

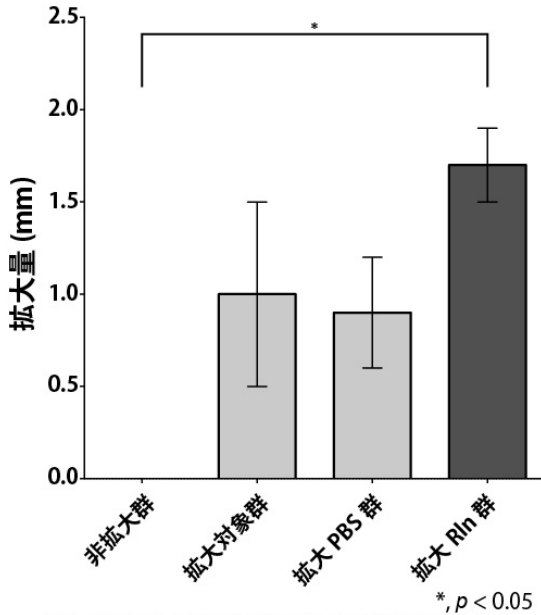


図 4. 拡大開始 48 時間後における矢状縫合部の拡大量

4 )

(2) 拡大開始 48 時間後における矢状縫合部のコラーゲン線維の組織学的検討

矢状縫合部拡大開始 48 時間後における矢状縫合部の VVG 染色にて、非拡大群、拡大対

象群、拡大 PBS 群において、矢状縫合部内のコラーゲン線維は明赤色に染色されたが、拡大 RIn 群ではほとんど観察されなかった (図 5)。

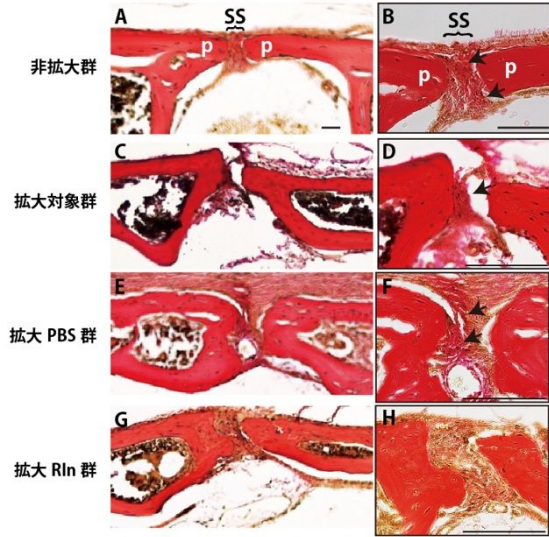


図 5. 拡大開始 48 時間後における矢状縫合部の VVG 染色

(3) 拡大開始 1 週間後における矢状縫合部の骨量および骨密度の測定

矢状縫合部拡大開始 1 週間後における矢状縫合部の microCT 像にて、拡大対象群、拡大 PBS 群と比較して、拡大 RIn 群では矢状縫合拡大部における骨量および骨密度が有意に増加していた。また、統計学的有意差は認められなかったが、拡大対象群、拡大 PBS 群では非拡大群を比較して、骨量および骨密度

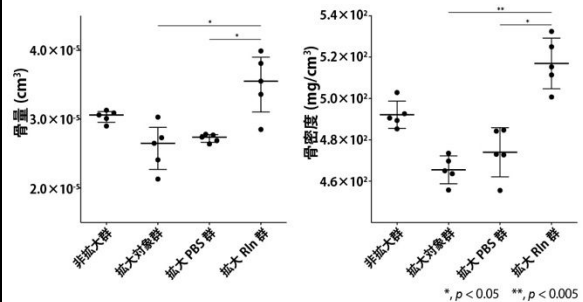


図 6. 拡大開始 1 週間後における矢状縫合部の骨量・骨密度が減少する傾向を認めた (図 6)。

(4) 拡大開始 1 週間後における矢状縫合部の組織学的検討

矢状縫合部拡大開始 1 週間後における矢状縫合部の TRAP 染色像にて、非拡大群、拡大対象群、拡大 PBS 群と比較して、拡大 RIn 群では縫合部周囲の頭頂骨表面に多数の TRAP 陽性多核細胞が出現した。

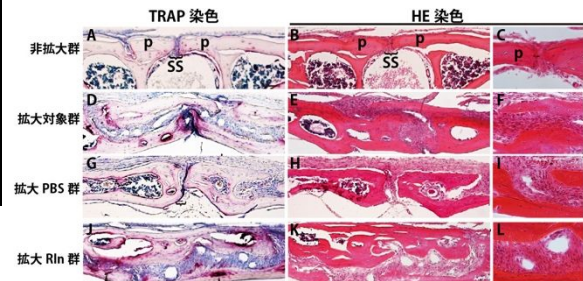


図 7. 拡大開始 1 週間後における矢状縫合部の TRAP 染色・HE 染色

矢状縫合部拡大開始1週間後における矢状縫合部のHE染色像にて、非拡大群、拡大対象群、拡大PBS群と比較して、拡大RIn群では縫合部周囲において旺盛な類骨の形成が認められた(図7)。

#### (5)結論

RInは、頭蓋矢状縫合部側方拡大時の骨リモデリングに影響を与えることが示され、効率的な縫合部拡大および拡大後の速やかな骨形成に有用となる可能性が示唆された。

#### <引用文献>

- 1) Maruo N, et.al. Endocrine. 2007 32(3):303-10.
- 2) Samuel CS, et.al. Endocrinology. 2009 150(3):1495-502.
- 3) Samuel CS, et.al Endocrinology. 2004 145(9):4125-33.

#### 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3件)

Duarte C, Kobayashi Y, Morita J, Kawamoto T, Moriyama K, A preliminary investigation of the effect of relaxin on bone remodeling in suture expansion., European Journal of Orthodontics, 査読有, in press  
DOI:10.1093/ejo/cjw037

Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K, RELAXIN enhances differentiation and matrix mineralization through Relaxin/insulin-like family peptide receptor 2(Rxfp2) in MC3T3-E1 in vitro., Bone, 査読有, 65, 2014, 92-101  
DOI:10.1016/j.bone.2014.05.005

Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K, Relaxin receptors 1 and 2 and nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) mRNAs are expressed in oral components of developing mice., Archives of oral biology, 査読有, 59(2), 2014, 111-8  
DOI:10.1016/j.archoralbio.2013.10.010

#### [学会発表](計4件)

Duarte C, Kobayashi Y, Morita J, Kawamoto T, Moriyama K, RELAXIN Enhances Bone Remodeling During Murine Calvarial Sagittal Suture Expansion. 93<sup>rd</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2015年3月11日~3月14日, Boston(USA).

ドゥアルテ カロリーナ, 小林起穂, 森田淳平, 川元龍夫, 森山啓司, マウス頭

蓋矢状縫合部拡大時の骨リモデリングに対する子宮弛緩因子リラキシンの影響、第73回日本矯正歯科学会大会、2014年10月20日~22日、幕張メッセ(千葉・幕張)

ドゥアルテ カロリーナ, 小林起穂, 川元龍夫, 森山啓司, 子宮弛緩因子リラキシンの骨芽細胞の形質に及ぼす影響についての検討、第72回日本矯正歯科学会大会、2013年10月7日~10月9日、松本キッセイ文化ホール(長野・松本)

Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K, Relaxin affects mineralization and differentiation of MC3T3-E1 cells through rxfp2. 2<sup>nd</sup> Joint Annual Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013年5月28日~6月1日, 神戸コンベンションセンター(兵庫・神戸)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

川元 龍夫(KAWAMOTO, Tatsuo)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号:50323704

##### (2)研究分担者

森山 啓司(MORIYAMA, Keiji)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授  
研究者番号:20262206

小林 起穂(KOBAYASHI, Yukiho)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教  
研究者番号:20596233

東堀 紀尚(HIGASHIHORI, Norihisa)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教  
研究者番号:50585221

##### (3)連携研究者

森田 淳平(MORITA, Jumpei)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号:50737046

##### (4)研究協力者

ドゥアルテ カロリーナ(DUARTE Carolina)  
伊藤 洋介(ITO Yosuke)