

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861998

研究課題名(和文)メカニカルストレス刺激時における歯根膜細胞から骨芽細胞への分化メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of differentiation of periodontal ligament cell into osteoblast by mechanical stress

研究代表者

解良 洋平 (KERA, Yohei)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90647950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メカニカルストレスの内、伸展は歯根膜細胞を骨芽細胞に分化させ、骨が形成される。伸展にはシリコンチャンバーを用いた実験を考えたため、最初にこの系が成立するか調べた。マウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を伸展し、その指標かつ骨形成に関わるシクロオキシゲナーゼ2(COX2)の発現を調べたところ、対照群よりも伸展させた細胞にてCOX2は上昇し、実験系は成立した。

COX2はメチオニンアデノシル転移酵素(MATII)により抑制される事が線維芽細胞にて報告されている。MC3T3-E1を用いて同じ検証を行った所、同様の結果だった。これらより、伸展刺激はMATIIとCOX2を介して骨形成する事が示された。

研究成果の概要(英文)：Extension among mechanical stress causes differentiation of periodontal ligament cell into osteoblast, therefore, it causes bone formation. Because we tried to begin the extension experiment using silicon chamber, we investigated whether this experimental system was established. We extended mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) using the silicon chamber, and investigated cyclooxygenase-2 (COX2) gene expression which was an indicator of extension and involved in bone formation. COX2 gene expression in extension group was higher than control, so experimental system was established.

It was reported that COX2 was suppressed by methionine adenosyltransferase II (MATII) in mouse fibroblasts. When the same experiment was performed in MC3T3-E1, it was similar results. It was suggested that extension stress caused bone formation through MATII and COX2.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：メカニカルストレス 伸展 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

歯根膜組織は、歯根のセメント質と歯槽骨という2つの石灰化組織の間に存在する非石灰化の結合組織である。この組織は咬合力や矯正力に対して適応し、骨中の歯の移動に重要である。矯正力が歯根膜に加わった時、歯根膜が圧迫される圧迫側と、引っ張られる側である牽引側が生じる。牽引側において歯根膜細胞は骨芽細胞に分化することが知られている。しかしながら、歯根膜細胞が骨芽細胞に分化するメカニズムについては不明である。本研究では、歯根膜細胞がメカニカルストレスを受けた結果、どのような分子メカニズムによって骨芽細胞への分化が引き起こされるか、エピジェネティックな観点から遺伝子発現制御機構の解明を行う。細胞は、細胞内外の様々なシグナルに応答する。この細胞応答性が変化する仕組みの一つとして、DNA のメチル化および、ヒストンテールのアセチル化やメチル化といった翻訳後修飾がある。これらの修飾により遺伝子のクロマチン構造が変化した結果、ゲノムのシグナル応答性が変化するというエピジェネティック機構が注目されている (Strahl BD. et al. Nature. 2000)。特にヒストンのメチル化は、ヘテロクロマチン形成や遺伝子サイレンシングのみならず遺伝子発現の促進にも関与している(図 1)。エピジェネティック制御の例として、ヒストン H3K4 のアセチル化およびトリメチル化 (H3K4me3) 化は転写の活性化に関わり、ヒストン H3K9 ジメチル化 (H3K9me2) 化は遺伝子抑制領域の形成に関わっている (Bing Li. et al. Cell. 2007)。これまでに、ヒストンアミノ酸残基特異的なメチル化酵素やアセチル化酵素が多数同定され、それぞれの機能が解明されつつある。このように、様々な遺伝子発現にエピジェネティック機構の変化が伴うことから、歯根膜細胞が骨芽細胞に分化する分子メカニズムを解明する上で、この機構に着目することは、

重要であると考えられる。

2. 研究の目的

歯科矯正治療において、これまで矯正力および筋機能能力を利用して歯の移動および顎骨のコントロールが行われてきた。歯はエナメル質、象牙質、セメント質の3種類の硬組織と、結合組織である歯髄から構成されており、コラーゲン線維に富む歯根膜組織を介して歯槽骨内に結合している。歯根膜および骨組織を含む歯周組織は、咀嚼に伴う咬合力や矯正力などの外力に応答し、骨組織がリモデリングすることで維持される。このリモデリングには、歯根膜に加わるメカニカルストレスが重要な要因である。歯根膜に矯正力による伸展刺激が作用する時、圧迫される「圧迫側」と、引っ張られる側である「牽引側」が生じる。この内、牽引側において歯根膜細胞は骨芽細胞に分化することが知られているが、歯根膜細胞が骨芽細胞に分化する分子的なメカニズムについては不明な点が多い。このメカニズムを明らかにすることが研究の目的である。伸展刺激を受けた歯根膜細胞が、骨芽細胞に分化する機構が解明されれば、円滑な歯の移動を可能にすることが考えられる。これまでの歯科矯正治療において、歯の移動および顎骨のコントロールは行われてきたが、分子メカニズムの解析に基づいた根拠はなく、経験的に臨床に適応されてきている。歯牙移動時に引き起こされる骨の再構成のメカニズムにおいて、骨芽細胞分化についての機能解析は行われてきたが、メカニカルストレス時の歯根膜細胞から骨芽細胞への分化についての詳細な分子機構は不明な点が多い。申請者は、メカニカルストレス時における骨再構成のエピジェネティックな解析を、歯根膜細胞と骨芽細胞の關係に着目して解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 伸展刺激により歯根膜細胞は骨芽細胞に分化し、骨芽細胞は骨形成を行う。伸展刺激にはシリコン製のストレッチチャンパー(ストレッチクス社)を用いた実験を計画しており、まずこの実験系が成立するか、株化したマウス骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)を用いて検証した。MC3T3-E1 細胞への伸展刺激は以下の手順にて行う。ストレッチチャンパーにフィブロネクチン(BD 社)1mg/ml(0.1%)を使用し、チャンパー1 穴あたり 15 μ g でコーティングを行う。1 \times PBS で希釈した 0.1%フィブロネクチンを 15 μ g/well となるように、500 μ l ずつ well に加える。その後、37 $^{\circ}$ C で 4 時間以上インキュベーションする。インキュベーションの後、1 \times PBS で 1 回ウォッシュする。細胞の播種は 1 穴あたり 1.0 \times 10⁵ 個、培地は 500 μ l で行う。播種して 48 時間後、伸展を行う。12%伸展率で行い、15 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間で検証する。細胞回収後、RNA 精製を行い、cDNA 合成する(QIAGEN 社, RNeasy Mini kit)。cDNA 合成後、定量 PCR を用いて mRNA 量を実験群と対照群で比較した。実験系のポジティブコントロールとしては COX2 遺伝子の発現について調べる。

(2) シクロオキシゲナーゼ 2(COX2)はメチオンアデノシル転移酵素 II(MATII)により抑

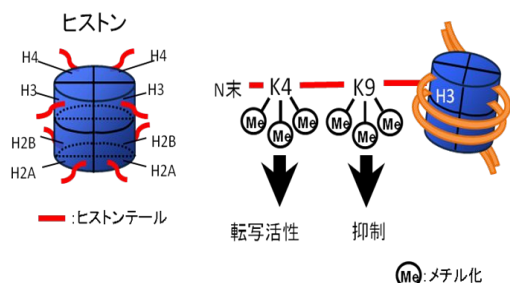


図1 ヒストンメチル化は転写活性化および不活性化領域の形成に重要である

制されている事が、マウス胎児線維芽細胞において報告されている(Kera Y. et al. J. Biol. Chem. 2013)。骨芽細胞においても MATII

が COX2 を抑制しているか、検証した。MATII をロックダウンするために、si MATII(Invitrogen 社、Stealth RNAi)を、MC3T3-E1 細胞にエレクトロポレーション法 (Invitrogen 社 , Neon Transfection System)を用いて遺伝子導入を行った。エレクトロポレーションには一回あたり 8 \times 10⁵ 個の細胞と、siRNA を 10 μ g を使用した。対照群にはネガティブコントロールとして、stealth RNAi siRNA negative control (Invitrogen 社)を使用した。ロックダウンして 24 時間、48 時間、72 時間で細胞を回収し、それぞれのタイムコースにおいて RNA 精製および cDNA 合成を行った。その後、定量 PCR で、対照群と実験群の mRNA 量を比較した。

4 . 研究成果

(1)伸展刺激を行って COX2 遺伝子の発現を対照群と実験群で比較した。15 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間において比較したところ、対照群と比較して実験群の方が、全てのタイムコースにおいて、COX2mRNA は増加していた。15 分では約 2 倍、30 分では約 6 倍、1 時間では約 8 倍、3 時間では約 6 倍、6 時間では約 2.5 倍だった。このことより、シリコンチャンパーを用いたこの伸展の実験系は成立することが示唆された。

(2) MATII をロックダウンして 24、48、72 時間で MATII 遺伝子の発現量を定量 PCR にて検証したところ、MATII は対照群と比較して、実験群の方が約 25%に減少していた。これより MATII のロックダウン実験は MC3T3-E1 細胞においても成功することが確認できた。また、この時の COX2 遺伝子の発現量は、全てのタイムコースにおいて約 2 倍になっており、骨芽細胞様細胞においても、以前の報告と同様に、MATII をロックダウン

すると、COX2 の発現が上昇する事がわかった。これらの結果より、伸展刺激は MATII と COX2 を介して骨形成す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)

[学会発表] (計 2 件)

解良 洋平、清流 正弘、山本 照子：固定源として矯正用アンカースクリューを用いて下顎全歯列遠心移動を行った下顎前突症例、第 29 回東北矯正歯科学会大会、2013 年 5 月 25 日 - 26 日、弘前文化センター(青森県弘前市)

解良 洋平、加藤 恭丈、太田 嶺人、松本 光代、山本 照子、五十嵐 和彦：メチオニンアデノシル転移酵素(MATII)によるエピジェネティックな COX-2 遺伝子発現制御機構、第 7 回エピジェネティクス研究会、2013 年 5 月 30 日-31 日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

解良 洋平 (KERA, Yohei)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90647950