

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：27102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15713

研究課題名(和文)骨細胞ciliaの機能解析を基軸としたインプラント周囲骨吸収制御戦略

研究課題名(英文)Strategy to control bone resorption around dental implants resorting to a criterion of pathological analysis of osteocytic ciliopathy

## 研究代表者

細川 隆司 (Hosokawa, Ryuji)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60211546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、物理刺激遮断による骨細胞の繊毛関連シグナル伝達および骨吸収抑制制御に関わる生体分子についてその一端を解明することとした。マウス由来株化骨細胞IDG-SW3は、分化開始をDay0とし、その分化段階でのDmp1発現に伴うGFP蛍光発色を確認した。また、マウス長管骨を、コラゲナーゼおよびEDTA溶液を交互に用いて溶解・脱灰処理し、回収した最後の3分画を骨細胞分画として実験に用いて解析中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to clarify osteocytic cilia related signaling by shutting out mechanical stimulation and to find out biomolecules concerning inhibitive control of bone resorption. IDG-SW3 cells were cultured and, taken into differentiating condition (Day0), fluorescent development of GFP, which is expressed in cooperation with Dmp1 expression and IDG-SW3 differentiation, was confirmed. Also, primary osteocytes were acquired from long bones of Dmp1-GFP transgenic mouse, and samples are being taken under analysis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯科補綴学一般 歯科インプラント

### 1. 研究開始当初の背景

抜歯された後の歯槽骨(顎骨歯槽突起)は吸収するが、その吸収量やスピードは個人差があり、研究代表者は、局所的あるいは全身的要因が骨吸収パターンに影響を与えていること(J Prosthet Dent. 67(6):820-6, 1992)、血中 estrogen levelに関連があること(J Prosthet Dent. 73(3):304-10, 1995)などを明らかにしてきた。また、インプラント治療における骨移植(骨造成)術後の吸収も臨床上の大きな問題になっている。研究代表者らのデータ(論文投稿中)でも、上顎前歯部の骨欠損部に腸骨移植を行った症例において、術後2週間目より経時的に術後吸収を追ったところ、移植骨の術後吸収が明らかである。現状ではこの術後吸収を防ぐ有効な手段はない。

骨研究においては、長い間『骨芽細胞』と『破骨細胞』を主な研究対象として検討を重ねてきた。これら2つの細胞は、動きがダイナミックであり、比較的培養も容易であることから、多くの研究成果が得られてきた。しかし、骨組織の主要な細胞である『骨細胞』の機能については、ほとんど明らかにされておらず、現在に至っても謎に包まれたままである。ところが最近、骨細胞を特異的に死滅させたマウスに尾部懸垂を施し後肢に荷重がかからないようにしたときに起こる骨萎縮への影響について実験した結果が池田らにより報告され、通常非荷重によって起こる骨量の減少が、骨細胞を死滅させたマウスではほぼ完全に抑制されていることが明らかになった。すなわち骨細胞は、生理的骨吸収の司令塔になっている可能性が出てきたのである。歯槽骨の吸収や移植骨の吸収は、力学刺激と密接に関わっていると思われ、その主要なコントロールを

骨細胞が行っている可能性が極めて高いと思われる。また、そのメカノセンサーは、骨細胞の繊毛であることも、現在のところ、おそらく正しいものと思われる(Gerdes JM, et al. Cell, 2009 他)。

### 2. 研究の目的

研究の背景より、(1)物理刺激の遮断による骨細胞の繊毛関連シグナル伝達の変化 (2) 超音波等の物理刺激による骨細胞への影響の検討 (3)骨吸収抑制制御に用いる生体分子の検討について明らかにしようとするものである。

### 3. 研究の方法

骨細胞は、長期の培養が可能で骨細胞として複数の分化段階を発現する株化細胞 IDG-SW3 および長期の実験には適さないものの実際にマウス長管骨内に存在する骨細胞を抽出したプライマリー細胞を用いた。IDG-SW3 は、増殖培地 (INF- $\gamma$  を含む) を用いて 33 インキュベータ内で培養。実験開始には 2 日でコンフルエントになるよう  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種。コンフルエントに達したら分化培地 (INF- $\gamma$  を含まず、50  $\mu$ g/ml ビタミン C および 4 mM  $\beta$  グリセロリン酸を含む) に交換して 37 のインキュベータに移して培養。細胞の分化を、Day 3~4 で Dmp-1 の発現とともに GFP が発現することで、顕微鏡下で観察確認し、さらに Day 10~14 で強い発現を確認。2~3 日ごとに培地交換し、0 日および 3, 7, 10, 14, 21, 35 日での N=3 でのサンプルを回収。細胞数のカウント、回収した細胞より total RNA および total protein を抽出。一方、プライマリー細胞は、トラン

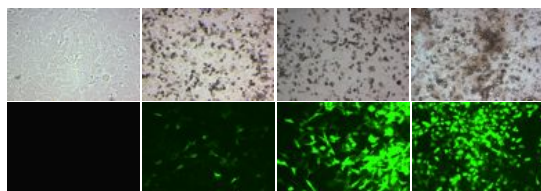
スジェニックにより Dmp-1 と GFP が同時に発現するマウスより大腿骨および上腕骨を回収。培地内で骨を分割し、コラゲナーゼおよび EDTA を含む培地にシェーカーにかけながら交互に浸漬して細胞を抽出。抽出した細胞は 4 日間静置後に培地交換してから実験に使用した。

#### 4 . 研究成果

##### 1 ) IDG-SW3 株化細胞の培養

IDG-SW3 細胞の培養には、培養用プラスチックディッシュ、プレートおよびフラスコに rat tail collagen type を用いてコラーゲンコートをして用いた。細胞を起こす際は 150 mm のディッシュを用い、その後、実験には 10 mm のディッシュ、12 well プレートおよび 12.5 T フラスコを用いた。人工無重力装置に搭載する場合には、フラスコ内に培地を充填させるため、通常の重力環境下でもフラスコを培地で充填させた状態で培養できることを確認した。

IDG-SW3 は Day0 から分化を開始させ、その分化段階での Dmp1 発現に伴う GFP 蛍光発色を確認した。また、Day0, 7, 14, 21 にサンプル採取を行い、解析中である。



( 上位相差写真、下 GFP 蛍光写真 左より Day0, 7, 14, 21 )

##### 2 ) プライマリー細胞の抽出

マウス長管骨 ( 大腿骨および上腕骨 ) から骨髓や骨膜などを除去して皮質骨のみにし、細

かい骨片に碎き、コラゲナーゼおよび EDTA 溶液を交互に用いて溶解・脱灰処理した。骨片を浸けて細胞が含まれているコラゲナーゼおよび EDTA 溶液をその都度回収し、回収した 9 段階中最後の 3 段階分の溶液から抽出した細胞を骨細胞分画および最後に残った骨片を実験に用いて、骨細胞より放出される物質について解析を行っている。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 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

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

細川隆司 ( HOSOKAWA RYUJI )  
九州歯科大学 歯学部 教授  
研究者番号 : 60211546

##### (2) 研究分担者

正木千尋 ( MASAKI CHIHIRO )  
九州歯科大学 歯学部 准教授

研究者番号：60397940

近藤祐介 ( KONDO YUSUKE )  
九州歯科大学 歯学部 助教  
研究者番号：00611287

向坊太郎 ( MUKAIBO TARO )  
九州歯科大学 歯学部 助教  
研究者番号：50635117

(3)連携研究者

田村暁子 ( TAMURA AKIKO )  
九州歯科大学 歯学部附属病院 医員  
研究者番号：30762067