

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592346

研究課題名（和文）歯科矯正治療時の歯の移動・骨リモデリングにおけるヘッジホッグシグナルの役割の解明

研究課題名（英文）Role of Hedgehog-Patched1 signaling pathway on orthodontic tooth movement and bone remodeling.

研究代表者

松崎 雅子 (MASAKO MATSUZAKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80313154

研究成果の概要：

Hh シグナルのレセプターである Patched1(Ptch1)haploinsufficient (+/-) マウスを用いて解析を行った。結果、顎顔面骨・長管骨において高代謝回転型の骨リモデリングが行われている事が確認された。さらに in vitro での解析から Ptch1 +/- の骨芽細胞では細胞増殖ではなく、分化能が、また破骨細胞支持能が亢進している事がわかった。このことから、成体の骨組織の恒常性維持に Hh シグナリングが関与する事が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：顎顔面骨，歯科矯正治療，Patched1

1. 研究開始当初の背景

成体の骨組織は、骨基質の吸収と形成というダイナミックな現象（骨改造現象 - 骨リモデリング）により常に再構築され、その形態と機能の恒常性を維持している。骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞が、骨組織を取り巻く環境・骨組織に加わる種々の刺激にตอบสนองして、時間的・空間的に協調することで骨リモデリングが起こる。骨リモデリングに影響を与える重要な刺激の一つに機械的刺激（メカニカルストレス）が挙げられる。健常人の骨組織は常に適度なメカニカルストレスを受けており、老化に伴う活動性の低

下、寝たきりなどのストレス減少下では急速に骨粗鬆化が進行することが知られている。また、至適なメカニカルストレス条件下では、骨折治癒や骨延長時の骨形成などが促進されることが知られている。同様に、歯科矯正治療による歯の移動も、メカニカルストレスにตอบสนองして促進された骨リモデリングを積極的に利用したものである。矯正力というメカニカルストレスにตอบสนองして、歯槽骨内においては圧迫側の骨吸収と牽引側の骨形成が繰り返される。つまり歯の移動は骨ターンオーバーが亢進した骨リモデリングの結果として達成される。このように、矯正力による

歯槽骨の骨リモデリングは歯科矯正治療の根幹をなす生体现象であるものの、その分子メカニズムは未だ詳細に明らかにされていないのが現状である。

骨芽細胞と破骨細胞の分化、成熟、機能を調節することで、成体内骨代謝機構・骨リモデリングに関与する分子・シグナル経路はこれまでに数多く報告されている。中でも、申請者らはヘッジホッグシグナルに着目しその骨発生・骨代謝における役割を解析してきた (*J Clin Invest* 107:295-304, 2001; *Development* 131:1309-1318, 2004)。

ヘッジホッグ (Hedgehog - Hh) は 1980 年に、キイロショウジョウバエにおいて体節の極性を決める segment-polarity gene の 1 つとして Wieschaus と Nusslein-Volhard によって最初に同定された。このシグナル経路は種を越えて高度に保存されている。モルフォゲンとして濃度勾配依存的に細胞の運命を決定するほか、mitogen として細胞の増殖や生存を、または誘導因子として器官の形態を制御し個体発生において非常に重要なシグナル分子である (*Genes Dev* 13:2072-2086, 1999)。

哺乳類ではインディアンヘッジホッグ (Indian hedgehog- Ihh)、ソニックヘッジホッグ (Sonic hedgehog- Shh)、デザートヘッジホッグ (Desert hedgehog- Dhh) の 3 つのホモログが存在する。その中でも骨格系で強い発現が認められるのは Ihh である。Hh シグナル伝達においては、受容体 Patched (Ptc) は通常 Smoothed (Smo) を抑制しており、Hh が Ptc に結合することでその抑制が解除されて細胞内へシグナルが伝達される。その結果、下流に存在する 3 つの転写因子 Gli によって標的遺伝子の転写が調節される (上図)。四肢骨の発生において Hh シグナルが重要な役割を果たすことは、Ihh ノックアウトマウス (*Genes Dev* 13:2072-2086, 1999)、Ihh ノックアウトキメラマウス (*J Clin Invest* 107:295-304, 2001)、Hh 受容体である Smoothed (Smo) の軟骨膜・骨髄特異的ノックアウトマウスおよび Smo ノックアウトキメラマウスの解析 (*Development* 131:1309-1318, 2004) からすでに明らかとなっている。しかしながら、成体の骨代謝・骨ターンオーバーの制御・メカニカルストレスによる骨リモデリングの制御への関与は不明なままであった。

申請者らは最近、Hh シグナル受容体 Patched1 のヘテロノックアウト (Ptc^{+/-}) マウスの四肢骨において、Hh シグナルの恒常的な活性化と骨リモデリングの亢進を認めることを見出した (未発表、投稿準備中)。このことは、Hh シグナルが骨発生のみならず成体における骨リモデリングに密接に関与することを示している。さらに、顎顔面骨の生理的な骨代謝調節、歯科矯正治療における骨リモデリングの亢進への関与も示唆される。以上

より、顎顔面骨の骨代謝調節と歯科矯正治療における骨リモデリングへの Hh シグナルの関与を明らかにすることは、歯槽骨内の歯の移動という生体现象の分子メカニズムの解明に一石を投じるのみならず、メカニカルストレスシグナルにおける Hh シグナルの関与をも明らかにするものと思われる。

2. 研究の目的

本研究は、歯科矯正治療による歯の移動・骨リモデリングにおける Hh シグナルの関与を分子レベルで解明することを目的とする。交付期間内に以下の 3 点を行うことを計画している。

1. 生理的条件下における Ptc1^{+/-}-マウスの顎顔面骨代謝の解析
2. 骨芽細胞・破骨細胞における Hh シグナル下流遺伝子と相互作用分子の解析
3. Ptc1^{+/-}-マウス・サイクロパミン投与マウスの実験的歯の移動・後戻り評価モデルを用いた歯科矯正学的・分子生物学的評価

4.

1 及び 2 により、歯の移動が行われる顎顔面骨の骨代謝 (骨形成・骨吸収・骨リモデリング) における Hh シグナルの役割とその分子メカニズムを明らかにする。3 では、Ptc1^{+/-}-マウス (Hh シグナルの恒常的活性化モデル) とサイクロパミン (Hh シグナル阻害剤) 投与マウス (Hh シグナルの抑制モデル) において実験的歯の移動・後戻り評価モデルを用いた歯科矯正学的評価を行う。あわせて歯の移動に伴う遺伝子・蛋白質発現の解析と骨リモデリングの評価を経時的に行うことにより、Hh シグナルの活性化と抑制が歯科矯正治療による歯の移動と治療後の後戻り・骨リモデリングに与える影響を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

生理的条件下における Ptc1^{+/-}-マウスの顎顔面骨代謝の解析

顎顔面骨組織の解析

マイクロ CT による骨形態計測、パラフィン包埋組織切片による組織学的観察、カルセインラベリングによる骨代謝能の評価を行った。

骨芽細胞の増殖・分化・survival の解析

Ptc1^{+/-}-マウスおよび wt マウス由来の骨芽細胞より mRNA を採取し、Real time RT-PCR 法により骨分化マーカーの発現を解析した。

骨芽細胞の破骨細胞形成支持能、および破骨細胞の分化・活性・survival の解析 Ptc1^{+/-}-マウスおよび wt マウス由来の骨芽

細胞および造血系細胞との共培養系を用いて破骨細胞分化因子の発現を mRNA レベルで解析した。また、TRAP 染色を行い破骨細胞分化を評価した。

骨芽細胞・破骨細胞における Hh シグナル下流遺伝子と相互作用分子の解析

Hh シグナル下流遺伝子の同定
Hh による骨芽細胞・破骨細胞分化誘導効果に与える影響を分化マーカーの発現を指標とし、gene chip による網羅的遺伝子発現解析を行う。

Hh シグナル下流遺伝子転写制御機構の解析
候補となった下流遺伝子に関して Hh シグナル下流の転写因子 Gli による転写制御を検討する。プロモーター領域全長あるいは deletion・mutation コンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイによって、Gli による転写活性調節に関する検討する。

Ptc1^{+/-}マウス・サイクロパミン投与マウスの実験的歯の移動・後戻り評価モデルを用いた歯科矯正学的・分子生物学的評価

動物および実験的歯の移動評価モデル
Ptc1^{+/-}マウスと野生型マウス、及びサイクロパミン(Hh シグナル阻害剤)投与マウスと非投与マウスにおいて実験的歯の移動モデルを作製し、両者の間で歯の移動度と周囲組織の変化を比較・観察する。

歯の移動に関する歯科矯正学的・分子生物学的評価
上記モデルにおいて圧迫側・牽引側を組織学的染色により同定し、次いで同部位より mRNA を採取し骨芽細胞・破骨細胞分化マーカーの発現を解析する。

後戻りに関する歯科矯正学的・分子生物学的評価

上記の によりモデルが完成した際には矯正装置撤去後においても同様の組織学的・分子生物学的解析を行い、矯正後後戻りに対する Hh シグナルの影響を評価する。

4. 研究成果

生理的条件下における Ptc1^{+/-}マウスの顎顔面骨代謝の解析

顎顔面骨組織の解析

Ptc1^{+/-}マウス (Ptc1KO) と野生型マウス (WT) の顎顔面骨について X 線撮影・マイクロ CT にて骨のサイズ、形状、質、骨密度、骨量をマクロ的に評価し、あわせて組織学的解析による質的検討も行った。組織学的解析としては、HE 染色、von Kossa 染色、TRAP 染色、カルセイン二重標識を行った。Ptc1KO では高代謝回転型の骨量増加を認めた。

骨芽細胞の増殖・分化・survival の解析

Ptc1KO と WT の新生仔頭蓋骨由来骨芽細胞の増殖・分化を、チミジン取り込み能、アリザリンレッド染色による基質合成能、Real time RT-PCR による分化マーカーの発現検討によって評価した。Ptc1KO 骨芽細胞では増殖は変わらないものの、分化能が亢進していることが明らかとなった。

骨芽細胞の破骨細胞形成支持能、および破骨細胞の分化・活性・survival の解析

Ptc1KO と WT の培養骨芽細胞と造血系細胞(骨髄細胞または脾細胞)の共存培養をおこない、TRAP 陽性多核細胞形成能を測定した。また、培養骨芽細胞における破骨細胞分化因子(RANKL)の mRNA レベルを評価した。形成破骨細胞に関しては、象牙片上での吸収窩測定によりその活性を評価するとともに、生存期間の検討も行った。Ptc1KO 骨芽細胞においては RANKL 発現の著しい上昇が認められ、破骨細胞支持能が亢進していた。一方、Ptc1KO 破骨細胞前駆細胞には異常は認められなかった。

骨芽細胞・破骨細胞における Hh シグナル下流遺伝子と相互作用分子の解析

Hh シグナル下流遺伝子の同定

Hh による骨芽細胞・破骨細胞分化誘導効果に与える影響を分化マーカーの発現と基質合成能を指標に検討した。骨芽細胞に対する Hh シグナルの影響をマーカー遺伝子の発現上昇を指標に経時的に評価した。これを元にタイムポイントを設定し gene chip による網羅的解析を行った。結果、今まで予想されなかった下流遺伝子が候補として同定された。

実験的歯の移動・後戻り評価モデルを用いた歯科矯正学的・分子生物学的評価

動物および実験的歯の移動評価モデル

野生型マウスを用いて実験的歯の移動モデルを作製し、両者の間で歯の移動度と周囲組織の変化を比較・観察した。

歯の移動に関する歯科矯正学的・分子生物学的評価

野生型マウスの歯周囲組織において、in situ hybridization 法により Scx、Tnmd など近年腱・靭帯などの強靭結合組織に発現が見られる遺伝子の発現が確認された。

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 2件)

Liu G, Iwata K, Ogasawara T, Watanabe J, Fukazawa K, Ishihara k,

Asawa Y, Fujihara Y, Chung UI, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Hoshi K, Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coted plates., J Biomed Mater Res A., 2009, in press, 査読有.

Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung UI, Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity., Developmental Cell, 2008,14: 689-69,査読有.

〔学会発表〕(計 1件)

須佐美 隆史, 上下顎骨切り術後に早期プレート抜去・ゴム牽引を行った Apert 症候群の1例, 第26回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会, 2008年10月16-17日, 盛岡

〔図書〕(計 1件)

須佐美 隆史, 朝倉書店, 2008, 鰐弓由来の症候群・口と歯の事典(高戸毅ほか編集), 204-207

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
ありません。

取得状況(計 0件)
ありません。

〔その他〕

ホームページ

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 雅子 (MASAKO MATSUZAKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80313154

(2) 研究分担者

須佐美 隆史 (TAKASHI SUSAMI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 80179184

鄭 雄一 (UNG-IL CHUNG)
東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号: 30345053

大久保 和美 (KAZUMI OHKUBO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10396715

近津 大地 (DAICHI CHIKAZU)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30343122

大木 明子 (AKIKO OHKI)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10345225

(3) 連携研究者