

平成21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007年～2008年

課題番号：19592356

研究課題名 (和文) 歯根膜細胞における Rho ファミリータンパク質 RhoE の細胞骨格制御機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of cytoskeleton regulation system by Rho family protein RhoE in periodontal ligament cells

研究代表者 木内 奈央 (KINOUCHI NAO)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：30457329

研究成果の概要：

歯根膜は、歯槽骨に歯を植立する懸架組織であり、その主な構成要素はコラーゲンの太い束から成る歯根膜線維と線維芽細胞系の歯根膜細胞である。矯正力に伴う歯の移動において、歯根膜組織は圧縮や伸展といった形態変化を引き起こした後にリモデリングを行い、一定の形態を維持しながら歯根とともに歯槽骨内を移動する。歯根膜組織が介在しない骨癒着歯やインプラントでは歯周組織のリモデリングは起こらず歯は移動しないことから、矯正歯科治療において歯根膜は極めて重要な組織であり、歯根膜の機械的刺激に応答したリモデリングや形態維持機構において、歯根膜細胞が中心的役割を演じていると考えられる。ところが、歯根膜細胞がどのような機構で機械的シグナルを生物学的シグナルに変換し、歯根膜組織のリモデリングや恒常性に関与しているのか、未だ詳細は不明である。過去に我々は、歯根膜細胞における力学的刺激応答性の分子制御機構を解明することを目的として、コラーゲンゲル中で三次元培養したヒト歯根膜細胞に圧縮力を負荷し、遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法にて網羅的に解析した。その結果、圧縮力負荷群において低分子量 GTP 結合タンパクである Rho ファミリーの RhoE が高発現していることを見出している (Araujo RMS, Oba Y, Moriyama K: J Periodont Res, (42) 15-22, 2007)。

一方、Rho ファミリーは、アクチン細胞骨格の再編成を介して様々な細胞機能を制御することが知られており、なかでもユニークな Rnd サブファミリーに属する RhoE (Rnd3) も細胞骨格制御に関与すると考えられているが、歯根膜細胞においては全く報告を見ない。過去に、我々は RhoE の細胞骨格制御における役割を検討したところ、圧縮力により RhoE が発現上昇し、ストレスファイバー形成が抑制されたが、RhoE アンチセンスオリゴを導入するとストレスファイバー形成が回復したことから (Oba Y et al, Orthodontic Waves 2008)、RhoE は歯根膜細胞において細胞骨格形成に抑制的に作用することを見出し、RhoE が歯根膜再薄のストレスファイバー形成の制御に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

そこで、本研究では歯根膜細胞の機械的刺激に応答した細胞骨格リモデリングにおける RhoE の役割を解明することを目的に、培養歯根膜細胞に圧縮力を加え、メカニカルストレス負荷時の歯根膜細胞の細胞骨格制御、とくにストレスファイバー (F アクチン) 形成における RhoE の役割を *in vitro* ならびに *in vivo* において以下の検討を行った。

まず、RhoE の三次元的な細胞内局在の解析と細胞骨格制御における役割に関して、メカニカルストレスに応答して発現する歯根膜細胞の RhoE の細胞内局在を三次元的に詳細に調べ、RhoA、Rac、Cdc42 などの発現を比較検討したところ、RhoE の発現が上昇することが確認された。また、RhoE の機能に関する検討に関して、メカニカルストレス負荷の歯根膜細胞において、アンチセンスや RhoE に特異的な合成二本鎖 RNA を用い RNAi にて RhoE の発現制御を行ったところ、ストレスファイバー形成が RhoE にて制御されることを確認した。さらに、加重負荷後 1 時間から 48 時間の各時間におけるストレスファイバー形成の観察について検討したところ、ストレスファイバー形成が RhoE にて制御されることが確認できた。

この結果を踏まえて、歯の移動時の歯根膜組織における RhoE の役割と、それに伴う歯根膜細胞の形態変化や細胞の分化制御を RhoE や細胞骨格関連因子の発現を検索し解析す

ることを目的に、RhoE に対する *in vivo* での RNAi を試みている。今回の実験では有害性が少なく、近年マウス皮下腫瘍や全身性転移癌に対する siRNA 導入実験でその有効性が確認されているアテロコラーゲンを担体として用い siRNA の導入を行っている。すなわち、RhoE に特異的な二本鎖 RNA (siRNA) とアテロコラーゲンを最適な濃度比率で混合した後、10 週齢の C57BL/6 マウスの歯周組織に *in vivo* 投与し RNAi を行いその抑制効果を検討している最中である。

以上のことから、RhoE が歯根膜細胞の細胞骨格制御に深く関わっている可能性は極めて高いと考えられ、力学的刺激に応答した歯根膜組織のリモデリング機序や細胞形態の維持機能は RhoE を介する歯根膜細胞の細胞機能制御が関与していることが示唆された。本研究を通じて、力学的刺激に伴う歯根膜細胞の分子制御機構の一端が明らかになれば、歯の移動における生物学的基礎的データとして歯科矯正学分野に大きく貢献するものと思われる。また、本研究は歯周治療やインプラント、さらには歯根膜再生医学の進歩にも大きく寄与すると考えられ、新しい歯科医療の開拓と治療戦略の構築に大きく貢献するものと期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、歯槽骨に歯を植立する懸架組織であり、その主な構成要素はコラーゲンの太い束からなる歯根膜線維と線維芽細胞系の歯根膜細胞である。矯正力に伴う歯の移動において、歯根膜組織は圧縮や伸展といった形態変化を引き起こした後にリモデリングを行い、一定の形態を維持しながら歯根と共に歯槽骨内を移動する。歯根膜組織が介在しない骨癒着歯やインプラントでは歯周組織のリモデリングは起こらず歯は移動しないことから、矯正歯科治療において歯根膜は極めて重要な組織である。歯根膜の機械的刺激に応答したリモデリングや形態維持機構において歯根膜細胞が中心的役割を演じていると考えられる。ところが、歯根膜細胞がどのような機構で機械的シグナルを生物学的シグナルに変換し、歯根膜組織のリモデリングや恒常性に関与しているのか、未だ詳細は不明である。我々は、歯根膜細胞における力学的刺激応答性の分子制御機構を解明することを目的として、コラーゲンゲル中で三次元培養したヒト歯根膜細胞に圧縮力を負荷し、遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法

にて網羅的に解析した。その結果、圧縮力負荷群において低分子量 GTP 結合タンパクである Rho ファミリーの RhoE が高発現していることを見出した (Aruajo RMS, Oba Y, Moriyama K: J Periodont Res, in press)。Rho ファミリーは、Rho、Rac、Cdc42 などのメンバーから成り、アクチン細胞骨格の再編成を介して様々な細胞機能を制御することが知られている。細胞骨格は細胞の形態を維持する上で重要であり、細胞内外のシグナルに応答してダイナミックに変化している。このような細胞骨格のリモデリングは細胞の運動、接着、極性、形態変化、細胞質分裂など細胞の基本活動を支える中心的な役割を果たしている。Rho ファミリーのなかでもユニークな Rnd サブファミリーに属する RhoE (Rnd3) は細胞骨格制御に関与すると考えられているが、歯根膜細胞における RhoE の機能に関する報告はない。我々は、RhoE の細胞骨格制御機能を検討し、圧縮力により RhoE の発現が上昇し、ストレスファイバーの形成が抑制されることを発見した (Oba Y et al, in preparation)。また、RhoE アンチセンス S-オリゴヌクレオチドを歯根膜細胞に導入

するとストレスファイバーの形成が回復した (Oba Y et al, in preparation)。このことから、RhoE は歯根膜細胞において細胞骨格形成を制御し、歯根膜細胞のストレスファイバー形成に重要な役割を担っている可能性が考えられる。RhoE は細胞骨格のみならず、細胞運動、細胞形態形成、さらにはがん細胞の分化抑制にも関与していることから (Chardin P, Nat Rev Mol Cell Biol 7: 54-62, 2006)、RhoE は多様な細胞機能に関与していると考えられる。以上の経緯から、メカニカルストレスに応答した歯根膜細胞における RhoE の役割を検討することに至った。

2. 研究の目的

Rho ファミリーは、アクチン細胞骨格の再編成を介して様々な細胞機能を制御することが知られている。細胞骨格は細胞の形態を維持する上で重要なばかりでなく、細胞内外からのシグナルに応答してダイナミックに変化しており、このような細胞骨格のリモデリングは細胞の運動、接着、極性、形態変化、細胞質分裂など細胞の基本活動を支える中心的な役割を果たしている。細胞骨格制御において、Rho ファミリーのなかでもユニークな Rnd サブファミリーに属する RhoE (Rnd3) も細胞骨格制御に関与すると考えられているが、歯根膜細胞においては全く報告を見ない。我々は、RhoE の細胞骨格制御における役割を検討したところ、圧縮力により RhoE が発現上昇し、ストレスファイバー形成が抑制されたが、RhoE アンチセンスオリゴを導入するとストレスファイバー形成が回復した。このことから、RhoE は歯根膜細胞において細胞骨格形成に抑制的に作用することを見出し、RhoE が歯根膜再薄のストレスファイバー形成の制御に重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、RhoE は細胞骨格のみならず、細胞運動、細胞形態形成、さらにはがん細胞の分化抑制にも関与している可能性が示唆されていることから、多様な細胞機能に関与していると考えられる。以上の経緯から、本研究はメカニカルストレスに応答した歯根膜細胞における RhoE の役割を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

メカニカルストレス負荷時の歯根膜細胞の細胞骨格制御、とくにストレスファイバー (F アクチン) 形成における RhoE の役割を *in vitro* ならびに *in vivo* で検討した。具体的には以下の通りである。

- ・ RhoE の発現と細胞骨格制御について (*in vitro* でのメカニカルストレス負荷における検討)

1) RhoE および細胞骨格関連因子の三次元発現解析

矯正治療のため抜歯された小白歯の歯根膜組織から歯根膜細胞を 10% 血清を含む α -MEM 培地中で単離培養した (Araujo RMS et al, J Periodont Res, (42) 15-22, 2007)。24 穴プレートに置かれたガラス製カバースリップ上に播種し培養した。メカニカルストレス負荷は、Kanzaki らの方法 (J Bone Miner Res, (17) 210-220, 2002) に準じ、シリンドラーに入れたおもりにて 3.0 (g/cm²) の応力でカバースリップ上の細胞に負荷した。加重負荷後、1 時間から 48 時間各時間において 10% ホルマリン溶液にて細胞を固定し、サンプルを作製した。蛍光免疫染色法によるストレスファイバーの観察にはファロイジン-ローダミンを使用し、RhoE の観察には抗ヒト RhoE 抗体と FITC でラベルした二次抗体を用いた。遺伝子発現は、RhoE 特異的な DIG ラベルした cRNA プロローブを作製し、*in situ* hybridization 法にて行った。メカニカルストレスに応答して発現する RhoE の mRNA またはタンパク質の時空間的細胞内局在について、セクショニング画像を用いて三次元的に解析した。また、同様の方法で RhoA、Rac、Cdc42、RhoE のサブファミリーである Rnd1、Rnd2、さらに細胞骨格制御関連因子の発現を調べ、RhoE との関連性を検討した。上記分子の定量的発現解析は、リアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法にて行った。

2) RhoE の過剰発現

RhoE の全長 cDNA に FLAG のタグを付加した遺伝子を組み込んだ発現ベクター (pCMV5-FLAG) を構築した。トランスフェクションによる RhoE 過剰発現の細胞骨格への影響を蛍光染色法にて観察する。RhoE トランスフェクションにおいて、導入効率の問題からマイクロインジェクション法にて行うことも検討した。

3) RNA 干渉法 (RNAi) による RhoE 発現抑制

細胞内の標的遺伝子 mRNA (messenger RNA) の発現を特異的に抑制する RNA 干渉法 (RNA interference: RNAi) が発見され、

種々の遺伝子機能の解析に用いられるようになってきている。RNAi は、19-21 塩基の small interfering RNA (siRNA) と呼ばれる二本鎖 RNA により、これと相同配列を有する標的遺伝子の発現が抑制される現象である。この二本鎖 RNA を用いた RNAi は、ゲノム DNA を損傷することなく標的遺伝子の発現を特異的にノックダウンするため安全性が高いと考えられている。また全ヒトゲノム配列情報を基に予測困難な問題を回避することができるため、迅速かつ高効率なプロセスで治療法開発を実現することが可能になると予測されることから、この現象を次世代の医療技術へと応用する研究も各分野で急速に進められようとしている。そこで、RhoE に特異的な 19 から 21 bp の二本鎖 RNA を *in vitro* 転写系で合成する。培養歯根膜細胞にリン酸カルシウムまたはリポフェクチン法で siRNA を導入する。RNAi の成否はウェスタンブロット法にて確認した。

4) RhoE の機能に関する検討 (細胞骨格制御因子の同定)

RNAi にて RhoE 発現制御を行った状態で、ストレスファイバー形成を調べ、RhoE の細胞骨格制御における役割を解析する。ROCK、mDia、アクチン結合タンパク質の Cofilin といった細胞骨格制御因子などの発現を二重蛍光染色法やウェスタンブロット法を用いて検索し、メカニカルストレス応答性の細胞骨格制御因子の同定を行う。同時に、他の Rho ファミリーの発現も検索し、そのクロストークを探ることとした。

5) RhoE のエフェクター分子の同定

Rho ファミリータンパクの機能は、活性型 Rho が下流のエフェクター分子に働くことにより発揮されるが、歯根膜細胞における RhoE の標的分子は不明である。Rho ファミリーのエフェクター分子でよく知られているのは Rho 結合キナーゼ (ROCK) とアダプター分子 mDia である。ROCK のアイソフォームの ROCK I と ROCK II、mDia のアイソフォームの mDia1、mDia2、mDia3 について検討した (Rienro wt al, Mol Cell Biol, (23) 4219-4229, 2003)。Tag

を付加したエフェクター遺伝子 (mDia、ROCK I、ROCK II など) の全長 cDNA を発現ベクター (pCMV5) に構築し、歯根膜細胞にリポフェクチン法にてトランスフェクションした。細胞を融解後、RhoE に対する GST pull-down assay を行い、メカニカルストレスに応答した RhoE の標的分子を同定した。また、細胞骨格制御における RhoA との関連性についても検討を加えることとした。

6) GTPase 活性の測定

RhoE の属する Rnd サブファミリーは活性型 GTP で存在すると考えられているが、歯根膜細胞では不明であるため、ストレスに応答した活性型 RhoE を ELISA 法または Pull-down 法にて解析した。

- 実験的歯の移動時における RhoE の発現と機能解析について (*in vivo* でのメカニカルストレス負荷における検討)

マウスを用いた歯の移動実験系を用いて、歯の移動に伴う歯根膜のリモデリング機構を解明する。歯の移動に伴う歯根膜細胞の形態変化や細胞の分化制御を RhoE や細胞骨格関連因子の発現を検索し解析する。

1) RhoE の発現と歯根膜リモデリングの検索

実験的歯の移動は、藤原らの方法 (J Bone Miner Res, (21), 956-964, 2006) に従い、10 週齢のマウス (C57BL/6) に矯正用コイルスプリング (約 10g) を装着し、上顎大白歯の近心移動を行う。移動開始 1-7 日後に上顎骨を摘出し、通法に従い組織切片を作製する。組織学的検索は、HE 染色、蛍光免疫染色、*in situ* hybridization 法にて行う。圧迫側と牽引側の歯根膜における RhoE 発現様相を比較検討する。同様に、*in vitro* 実験で得られたデータを参考に、他の Rho タンパク質および細胞骨格関連因子についても検討を加える。定量的解析は、リアルタイム PCR 法やウェスタンブロット法にて行う。

2) 歯の移動時の歯根膜組織における RhoE の役割の解明

- a) RhoE に対する *in vivo* での RNAi

実験的歯の移動時の歯周組織のリモデリングにおける RhoE の役割を RhoE に特異的な RNAi を行うことで検討する。RhoE に特異的な siRNA とアテロコラーゲンを最適な濃度比率で混合し歯周組織に in vivo 投与し RNAi を行う。RhoE に対する RNAi 効率はウェスタンブロット法にて確認する。今回の実験では為害性が少なく、近年マウス皮下腫瘍や全身性転移癌に対する siRNA 導入実験でその有効性が確認されているアテロコラーゲンを担体として用い siRNA の導入を行ったが、トランスフェクション効率が問題となる可能性がある場合、エレクトロポレーション法などの他の方法を試みることにした。

b) 組織学的観察(連続切片の再構築による三次元解析)

連続切片の再構築による三次元解析法 (J Bone Miner Res, 2006) を用いて、経時的な歯の移動様相と歯根膜リモデリング様相を解析する。HE 染色、免疫染色像においてアテロコラーゲンのみを投与した対照群と三次元的に比較検討する。歯根膜細胞のマーカーであるペリオスチンの発現も in situ hybridization 法と免疫染色にて検討する。歯根膜細胞のストレスファイバーの形成や RhoE エフェクター分子の発現も蛍光免疫染色、in situ hybridization 法、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法にて検討する。同時に、歯周組織における骨芽細胞や骨細胞、歯肉の線維芽細胞における RhoE の発現様相を対照群と比較検討する。

c) ペリオスチンノックアウトマウスを用いた実験

歯根膜や骨膜に特異的に発現するペリオスチンがメカニカルストレス関連因子であることを見出したことを踏まえて (Wilde J, Cell Tissue Res, (312) 345-351, 2003)、ペリオスチンを介した歯根膜リモデリングにおける RhoE の関与を探る。

4. 研究成果

歯根膜細胞の機械的刺激に応答した細胞

骨格リモデリングにおける RhoE の役割を解明することを目的に、培養歯根膜細胞に圧縮力を加え、メカニカルストレス負荷時の歯根膜細胞の細胞骨格制御、とくにストレスファイバー (F アクチン) 形成における RhoE の役割を in vitro ならびに in vivo において検討を行った。

まず、矯正治療のため抜歯された小白歯の歯根膜組織から歯根膜細胞を 10%血清含有 α -MEM 培地中で単離培養した。メカニカルストレス負荷は、Kanzaki らの方法 (J Bone Miner Res, (17) 210-220, 2002) に準じ、シリンダーに入れたおもりにて 3.0 (g/cm²) の応力でカバースリップ上の細胞に負荷した。RhoE の三次元的な細胞内局在の解析と細胞骨格制御における役割に関して、加重負荷後、1 時間から 48 時間各時間において 10%ホルマリン溶液にて細胞を固定し、サンプルを作製した後、抗ヒト RhoE 抗体と FITC でラベルした二次抗体を用いた蛍光免疫染色法にて、メカニカルストレスに応答して発現する歯根膜細胞の RhoE の細胞内局在を三次元的に詳細に調べ、RhoA、Rac、Cdc42 などの発現を比較検討したところ、メカニカルストレスに応答して RhoE の発現が上昇することを確認した。

次に、RhoE の機能に関する検討に関して、メカニカルストレス負荷の歯根膜細胞において、アンチセンスや RhoE に特異的な 19 から 21 bp の合成二本鎖 RNA を用い RNAi にて RhoE の発現制御を行ったところ、ウェスタンブロットやファロイジン-ローダミンを用いた免疫染色からストレスファイバー形成が RhoE にて制御されることが確認された。

この結果を踏まえて、歯の移動時の歯根膜組織における RhoE の役割と、それに伴う歯根膜細胞の形態変化や細胞の分化制御を RhoE や細胞骨格関連因子の発現を検索し解析するため、RhoE に対する in vivo での RNAi を試みている。すなわち、今回の実験では為害性が少なく、近年マウス皮下腫瘍や全身性転移癌に対する siRNA 導入実験でその有効性が確認されているアテロコラーゲンを担体として用い siRNA の導入を行っている。RhoE に特異的な二本鎖 RNA (siRNA) とアテロコラーゲンを最適な濃度比率で混合した後、10 週齢の C57BL/6 マウスの歯周組織に in vivo 投与し RNAi を行いその抑制効果をウェスタンブロット法にて検討している最中である。また、組織学的観察として連続切片を再構築により三次元解析し、経時的な歯の移動様相と歯根膜リモデリング様相を解析している。さらに、歯根膜細胞のストレスファイバーの形成や RhoE エフェクター分子の発現も蛍光免

疫染色や in situ hybridization 法、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法にて検討を加えている。同時に、歯周組織における骨芽細胞や骨細胞、歯肉の線維芽細胞における RhoE の発現様相を対照群と比較検討する予定である。

以上の結果から、RhoE が歯根膜細胞の細胞骨格制御に深く関わっている可能性は極めて高いと考えられ、力学的刺激に応答した歯根膜組織のリモデリング機序や細胞形態の維持機能は RhoE を介する歯根膜細胞の細胞機能制御が関与していることが示唆された。本研究を通じて、力学的刺激に伴う歯根膜細胞の分子制御機構の一端が明らかになれば、歯の移動における生物学的基礎的データとして歯科矯正学分野に大きく貢献するものと思われる。また、本研究は歯周治療やインプラント、さらには歯根膜再生医学の進歩にも大きく寄与すると考えられ、新しい歯科医療の開拓と治療戦略の構築に大きく貢献するものと期待される。

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 3件)

- 1) Yasuo Oba, et al.; Comparison of stability of mandibular segments following the sagittal ramus osteotomy with poly-L-lactic acid (PLLA) screws and titanium screws fixation. *Orthodontic Waves* 2008
- 2) RM de Araujo Santos, Yasuo Oba, Keiji Moriyama. ; Identification of genes related to mechanical stress in human periodontal ligament cells using microarray analysis. *Journal of Periodontal Research* (42) 15-22, 2007.
- 3) RM de Araujo Santos, Yasuo Oba, Keiji Moriyama. ; Role of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in periodontal ligament cells under mechanical stress. *Cell Biochemistry and Function* (25) 753-758, 2007.

[学会発表] (計 1件)

- 1) 大庭 康雄: 成長期の開咬の治療、中・四国矯正歯科学会 (岡山) 2007年7月15日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

- ・ 木内 奈央 (KINOUCHI NAO)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 30457329
- ・ 大庭 康雄 (OBA YASUO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号: 40294706

(2) 研究分担者

- ・ 藤原 慎視 (FUJIHARA SHINJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 70403706
- ・ 塩屋園 敦 (SHIOYASONO ATSUSHI)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 60403705
- ・ 北瀬 由紀子 (KITASE YUKIKO)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 70363166
- ・ 田中 栄二 (TANAKA EIJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 40273693
- ・ 井澤 俊 (IZAWA TAKASHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 30380017
- ・ 谷本 起穂 (TANIMOTO YUKIHO)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 20380032

(3) 連携研究者

無し