

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791421
 研究課題名 (和文) 義歯床下骨内部構造における力学的負荷の受容機構と骨改造機転の網羅的解析
 研究課題名 (英文) Genomic research for the receptive mechanism of mechanical stress and the bone remodeling in the inner bone structure in residual ridge
 研究代表者
 岡山 啓昌 (OKAYAMA KEISUKE)
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
 研究者番号：30436092

研究成果の概要 (和文)：力学的負荷による骨形成と炎症による骨吸収を検討する実験モデルとして、骨形成を促す作用を持つ BMP シグナルと、過剰な応力等により生じる炎症性サイトカイン TNF 由来シグナルとのクロストークに関する、細胞内遺伝子発現レベルにおける網羅的な解析を試みた結果、TNF シグナルにより影響を受けるシグナル経路群や同シグナルにより影響を受ける遺伝子群とその特徴についての新たな知見が得られた。

研究成果の概要 (英文)：To examine mechanism of bone formation to biomechanical stress and bone resorption by inflammation, in vitro genomic investigation on the crosstalk mechanism between BMP signaling related to bone formation and TNF signalling related to inflammatory cytokine induced in over mechanical stress. The results in this study provide a genome-wide profile of the downstream genes of BMP signals that are regulated by TNF- α in a stable 293 cell line expressing BMPRII, which is useful for further analysis of the crosstalk mechanism between BMP signals and TNF signals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	570,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：義歯床、骨改造、圧縮力

1. 研究開始当初の背景

骨は、力学的環境に対する適応機能を有し、荷重状況に応じ適応的に形状を変化させる。義歯を介し義歯床下組織に伝達される咬合

圧は、粘膜や骨表面の変化のみならず、より深部の海面骨、骨髄等へも影響を及ぼす。顎骨における咬合圧の受容は、顎骨全体の外形の形態および内部構造等で行われ、全体の調

和の中で機能し維持されると考えられる。従って義歯床下での内部の海綿骨構造や細胞の反応は、義歯の力学的適合を表現する上、義歯安定のための顎堤形態維持に重要な役割を持つと考えられる。しかし義歯床圧に対する骨内部（海綿骨）の反応については不明な点が多く、またストレスを感受する反応経路や内部構造の形態的变化を制御する機構についても十分には解明されていない。

これまで実験床からの荷重圧を調整し持続的負荷を与える動物実験モデルを作製し、骨外面からの持続的負荷により、内骨膜の骨芽細胞の活動性を上昇、新生骨の形成促進があることを明らかにした。また骨芽細胞の活動は、負荷が小さいものでは初期に活動性の上昇を示すが、一定の期間後に活動が徐々に低下することを示した。一方大きな負荷かけた場合、内部は継続的に活動性の上昇が確認された。このように負荷の大きさの違いにより骨芽細胞の活動性の経時的変化が異なることは、骨の形態的、力学的な適応を表していると考えられた。即ち、内部に伝達される負荷の大きさに応じて骨が形態的な適応を示し、それに伴って骨芽細胞の活動が制御されるメカニズムの存在が示唆された。顎堤吸収の原因として、不適切な義歯の使用による局所的な刺激とともに、咬合や義歯設計上の問題から生じる異常な圧力などにより促進されることは、臨床的に明らかである。メカニカルストレスに対する細胞の応答反応に関する研究は活発に行われている領域であるが、骨表面の変化だけではなく、より深部の海面骨や骨髄の変化について検討している研究は少ない。従って内部（海綿骨）を破壊してしまうような異常圧とはどのようなものか、またどのようにして外部の刺激を受け取るのか、さらにどのように内部（海綿骨）の骨形成が制御されているか、という観点を内部構造の形態学的な変化に対応させて細胞・分子レベルで検討する必要があると考え、本研究の申請に至り研究を行った。

本研究を遂行していく上で、骨芽細胞が最も重要な役割を持つ細胞の1つと考えている。骨芽細胞は間葉系幹細胞に由来するが、その分化過程で最も重要な作用をもつものが、骨誘導因子として1980年代後半に同定されたBMPである。BMPは、筋芽細胞への分化を抑制する一方、骨芽細胞への分化を促進する。BMP作用は、BMPの受容体との結合によりリン酸化を受け活性化されるSmad1/5/8がSmad4と複合体を形成し、核内に移行して標的遺伝子の反応領域と結合し転写活性を調節することにより発現する。骨芽細胞の分化は初期から終末分化にいたるまでBMPにより促進される。このBMPは、細胞に圧縮力を加えることによっても急速に発現が誘導される場合がある。

炎症性サイトカインの代表にはIL-1があるが、これに類似したサイトカインとしてTNF- α が知られている。TNF- α は主に単球やTリンパ球が産生し、その受容体であるTNF受容体は、骨芽細胞を含む種々の細胞に認められる。TNFはIL-1と同様、強力な骨吸収活性を示す。TNFを含む骨吸収性因子は、骨芽細胞に作用し破骨細胞分化因子(RANKL)の誘導を促し破骨細胞分化を促すこと等により、骨吸収を促進させる。TNFシグナルは一方で、間葉系幹細胞からの骨芽細胞や象牙芽細胞への分化誘導シグナルに対し抑制的に働くことが近年報告されていた。しかしそのシグナルクロストーク機構の解明は未だ不十分であり、このような炎症の要因は義歯床圧による内部構造の変化に影響を与える1つの要因である可能性があると考え本研究の最も重要視したテーマとして研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究は、当初の義歯床圧に対し義歯を支える顎骨の反応について、動物実験モデルを用いた網羅的な検討を行うことを目的とした。そこで動物実験モデルとして、ラット下顎骨を用いることを検討し、実際に下顎第一臼歯を抜歯して、顎堤の形態が義歯装着可能な安定状態になるまで経過観察し、安定期を設定した後に、義歯床圧モデルとして利用可能であるか検討することを最初の目的とした。また一方で、遺伝子発現の視点から解明することにより、義歯の設計や負担様式の判断に役立てることを目的として実験を行った。実際には抜歯窩顎堤の骨吸収、添加は、複雑なメカニズムによって進んでいくことが予想されたため、できる限りその要因を絞り込んでいく必要があることから、特にBMP2の発現に絞ったin vitro系の実験系を組んだ。細胞は圧縮力を受けると、速やかに骨形成因子、BMP2の発現が誘導される場合がある。一方で、炎症性サイトカインTNFが多く分泌される慢性炎症などにおいて、TNFはそのBMPシグナルに抑制的に作用することが知られている。本研究は、計画を一部修正し、細胞培養系を用い、力学的なストレスによっても誘導されるBMPシグナルと、過剰な応力等により生じる炎症性サイトカインTNF由来シグナルとのクロストークに関する解析モデルを構築し、遺伝子発現レベルでの網羅的な解析を試みる。

3. 研究の方法

(1) ラット下顎骨を用い、はじめに義歯装着の時期を判断するために抜歯窩の治癒を検討した。実験には5週齢雄ラットを用い、ジエチルエーテル、ネンブター麻酔後、下顎臼歯抜歯用に調整した固定台に設置し、また専用のヘーベルと抜歯鉗子によって抜歯を行っ

た。抜歯後1, 2, 4, 6, 8週後に過剰麻酔にて屠殺し、10%緩衝ホルマリンによる灌流固定を行った。ギ酸脱灰後、組織標本を作製した。抜歯窩が安定したと思われる4週後に第一臼歯部の印象を採得し、義歯を作製し装着した。義歯装着後の1, 2, 4週後に過剰麻酔にて屠殺し、標本を作製した。

(2)予備的にラット脛骨を用いて、圧縮力に対する内部構造の変化を形態学的に確認するために、15週齢のオスラットを用い、ジエチルエーテル、ネンプタールにて全身麻酔後、皮膚切開、脛骨近位端にコイルスプリングを用いた圧縮力を加えた。

(3)BMPシグナルとTNFシグナルのクロストークに関するマイクロアレイ解析

力学的なストレスで誘導されるBMPシグナルと、過剰な応力等により生じるTNF由来シグナルとのクロストークに関する、遺伝子発現レベルでの網羅的解析をDNAマイクロアレイを用い試みる。実験にはBMP受容体の一つBMPRIIを安定発現するよう改変したヒト細胞株HEK293を用い、無処理(対照群)の試料、BMP2単独で3時間処理した試料、もしくはBMP2とTNF- α を共に3時間処理した試料を用意し、回収したmRNAをcDNAに逆転写後、DNAチップと一色法でそれぞれ反応させ遺伝子発現プロファイルの差異を比較する。

(4)網羅的遺伝子情報に基づく、遺伝子解析の実施

本解析にはGeneSpring GX v7.3.1 (Agilent Technologies社)を使用する。発現レベル解析の前にデータの品質確認工程と標準化を実施する。次に、①スカッタープロット図解析を含む、発現レベルに差が見られた遺伝子の網羅的解析、②GenMAPP Pathwayデータベースを用いたパスウェイ解析、③Ven図解析、④ネットワーク推定、⑤SMAD binding elementを持つBMP下流遺伝子群の網羅的解析、⑥階層的クラスター解析および⑦遺伝子セット解析により、骨形成促進シグナルであるBMPシグナルと炎症性または骨吸収性サイトカインシグナルであるTNFシグナルとのクロストークに関係の深い主要な上流因子を検討する。また、マイクロアレイ解析による遺伝子情報から得られた、特徴的な挙動を示す遺伝子群については、更に詳細な挙動の検討を実施する。

4. 研究成果

(1)ラット下顎骨の抜歯窩の治癒の検討について組織学的検討を行ったところ、歯槽骨は歯槽頂の抜歯窩面から吸収がおこり、4週後には、大部分が新生骨で満たされることがわかった。しかしその後肉眼的には安定しているようにみえても組織学的には、新生骨はリモデリングによって構造を著しく変化させることから、安定期の定義と決定は非常に難しいと思われた。結果として義歯圧だけでなく、生理的なりモデリングによる要素が加

わり、それらを排除するために、当初の計画を変更して発現遺伝子を絞り込むこと目的にin vitro系の実験を先行して行い、それを動物実験モデルに当てはめることを計画した。

(2)また同時に開始したラット脛骨を用いたモデルは、装置の固定が不安定で感染が加わるなど解析が困難となり、これについても装置の設計を再検討する必要があると判断し、装置の材質から設計について再検討を行うこととした。

(3)16,038個の品質管理工程を通過した検討対象ヒト遺伝子のうち、BMP2処理により発現量に影響を受ける遺伝子(上昇502遺伝子、抑制451遺伝子)の中でTNF- α の共処理により発現が抑制される遺伝子群(*SUSD1* 遺伝子を含む73遺伝子)と、逆にむしろ発現誘導が促進される遺伝子群(*FAM105B*を含む128遺伝子)が抽出された。

(4)上記の解析で明らかにした、BMP2処理で発現量が上昇し、かつTNF- α の共処理でその発現上昇が抑制される73の遺伝子群の内、*MPPE1*を含む9つの遺伝子が上流プロモーター領域にSMAD binding element 領域様配列を保有することが明らかとなった。

(5)パスウェイ解析手法により、BMP2処理による影響が認められた、Id経路やNotch経路を始めとする12の細胞内シグナル伝達経路の内、Wnt経路やT細胞受容体経路を始めとする4つのシグナル経路への影響が、TNF- α の共処理により抑制されることが示唆された。これらの解析により、BMPシグナルがTNFシグナルにより受ける影響のゲノムワイドかつ多角的な検討材料が得られた。本実験モデルから得た遺伝子情報が、将来的な義歯床の分子生物学的評価系の確立に向けた、基盤的研究に活用されることが期待される。

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1件)

- ① K. Okayama, T.A. Kudo, Y. Shimizu, Y. Zhang, F. Zhao, M. Kano, H. Kanetaka, and K. Sasaki. Regulation of bone morphogenetic protein-mediated signaling by tumor necrosis factor- α . *Interface Oral Health Science* 2009. 202-204, 2010, 査読無し

[学会発表] (計1件)

- ① K. Okayama, T.A. Kudo, Y. Shimizu, Y. Zhang, F. Zhao, M. Kano, H. Kanetaka, K. Sasaki. Genome-wide analysis of the regulation of BMP2-induced gene expression by inflammatory cytokine TNF- α in a stable 293 cell line expressing BMPRII. The 3rd

International Symposium for Interface
Oral Health Science in Sendai. 2009
年1月15, 16日. 仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 啓昌 (OKAYAMA KEISUKE)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常
勤講師

研究者番号 : 30436092