

令和 3 年 5 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24145

研究課題名（和文）骨代謝のスイッチを変換する骨細胞の酸素濃度感知による矯正的歯の移動制御機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of the control mechanism of orthodontic tooth movement by sensing the oxygen concentration of bone cells that convert the switch of bone metabolism

研究代表者

小田垣 直弥 (Odagaki, Naoya)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：50845378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、まず実験的歯の移動モデルを作製し、圧迫側で生じる低酸素関連因子の詳細を解析した結果、Hif1-をはじめとした低酸素関連因子発現の増加を認めた。次に、低酸素状態下で歯根膜細胞および骨細胞におけるHif1-の増加を確認した。また、低酸素状態が小胞体ストレスやカテニン経路を介して骨細胞間の情報伝達能力を低下させること、また、低酸素状態による骨細胞間の情報伝達能力の低下とスクレロスチン発現の減少は骨細胞からの骨吸収シグナルを減少させることが分かった。本研究の結果、矯正的歯の移動の初期段階において骨細胞の低酸素状態の感知により骨吸収シグナルを減少させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、低酸素状態において骨細胞間の情報伝達能力が低下すること、またそれにより骨細胞からの骨吸収シグナルが減少する可能性を示唆した点である。矯正的歯の移動時の低酸素環境における詳細な分子機構の解明は歯の移動促進および矯正治療期間短縮への臨床展開へつながる重要な課題であることから、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We first made an experimental tooth movement model and analyzed the details of hypoxia-related factors that occur on the compression side. As a result, we found an increase in the expression of hypoxia-related factors such as Hif1-. Next, we confirmed an increase in Hif1- in periodontal ligament cells and osteocytes under hypoxic conditions. In addition, therefore, our works indicated that hypoxia decreased the GJIC capacity among osteocytes through ER-stress/-catenin axis. The decreased GJIC and sclerostin by hypoxia is then reduced the bone resorption effect from osteocytes. Moreover, the expression of Hif1a is sensitive to mechanical stimuli. In summary, the above-mentioned finding may be a complement mechanism for the low orthodontic tooth movement speed at the early stage.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：矯正的歯の移動 骨細胞 骨代謝 低酸素

1. 研究開始当初の背景

低酸素環境は生体内で生理的に存在し、低酸素誘導因子が変化することで組織幹細胞の維持に重要な役割を果たしている。近年、骨細胞が低酸素環境を感知する事で、骨形成を抑制する蛋白質である Sclerostin の発現制御を介して骨量を制御することが報告<sup>1)</sup>され、低酸素環境は骨代謝の新規制御因子として注目が集まっている。

申請者は先行研究において、実験的歯の移動を行い、そこで生じる変化を組織レベルおよび遺伝子レベルで解析する過程で、歯根膜のダイナミックな形態的变化および歯槽骨の活発な骨代謝反応を確認した。このような変化に対し、歯根膜および歯槽骨の両者においてアポトーシスや炎症反応が生じていることは既知の事実であるが、低酸素環境に関する詳細な分子機構に関しては解明されていない。また骨細胞の低酸素環境の感知による骨代謝制御という新しい知見<sup>2)</sup>から、矯正歯の移動時の圧迫側歯槽骨で生じる低酸素環境における骨細胞の役割と、歯根膜と骨細胞との相互関係に「着眼」した。

以上のことから、申請者は「**矯正歯の移動時の圧迫側歯槽骨では、歯根膜との相互関係を介して骨細胞が酸素濃度を感知することが起点となり、骨代謝のスイッチが骨吸収へと変換されるのではないか**」という研究課題の核心をなす学術的「問い」を立てた。



図1：本研究の学術的背景および仮説

2. 研究の目的

矯正歯の移動時の圧迫側歯槽骨において低酸素状態となり骨吸収が生じる中で、骨細胞および歯根膜細胞と骨細胞の相互関係がどう関与しているのか、その詳細を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

・ 実験的歯の移動モデルにおける *in vivo* での低酸素誘導因子の変化を解析する

マウスに対して実験的歯の移動を行い、切片を作製する。組織染色、蛍光免疫染色を用いることで、低酸素誘導因子の歯根膜および歯槽骨における変化を把握する。圧迫側で生じる低酸素関連因子の詳細を解析するため、バイオインフォマティクスを用いた独自の解析手法により時空間的(位置、程度、タイミング)な定量を行う<sup>2)</sup>。

・ *In vitro* での低酸素環境に伴う分子機構の変化を把握する

歯根膜細胞および骨細胞について、初代培養細胞または細胞株を用いて共培養モデル(図2F)を作製し、歯根膜細胞に対して圧迫力を負荷

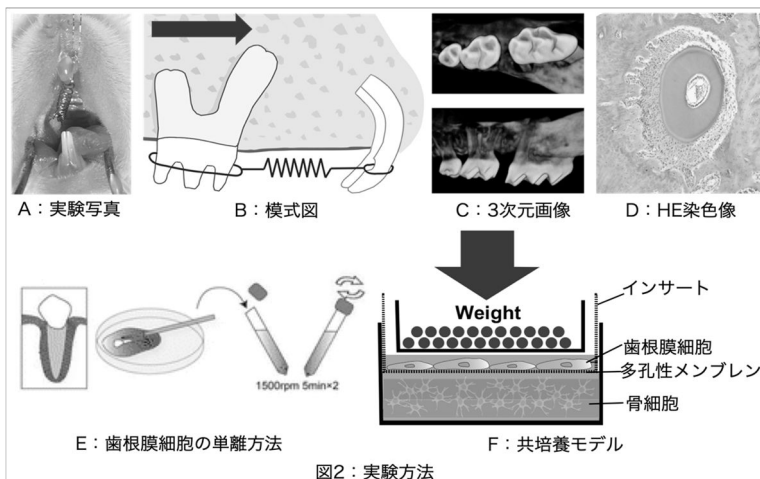


図2：実験方法

することで、矯正歯の移動における圧迫側を再現する。圧迫負荷後の歯根膜細胞および共培養を行った骨細胞に対し、RT-PCR およびウエスタンブロットを用いて細胞内の RNA およびタンパクを確認するとともに、ELISA を用いて培養上清中の分泌タンパクを定量する。以上により、骨細胞と歯根膜細胞における遺伝子発現とタンパクの変化を把握する。

・ siRNA および中和抗体を用いて、骨細胞の酸素濃度感知を起点として骨代謝が行われる可能性を検討する

上記モデルにて変化が生じた遺伝子を siRNA によりノックダウンする。申請者はこれまでの研究から、siRNA によるノックダウンを用いた実験系を確立している<sup>3)</sup>。また、共培養モデルに対し中和抗体を使用することで、歯根膜細胞と骨細胞の相互作用を検討する。これらの実験により、低酸素環境での骨細胞主導の歯槽骨骨代謝における詳細な分子機構を解明することで、骨細胞

の酸素濃度感知を起点として骨代謝が生じる可能性を検討する。

【参考文献】

- 1) Stegen S, et al., *Nat Commun*, 2018.      2) Odagaki N, et al., *J Dent Res*, 2018.

4. 研究成果

初年度の研究は、まず実験的歯の移動モデルを作製し、組織染色および蛍光免疫染色を行った。次に、圧迫側で生じる低酸素関連因子の詳細を解析するため、バイオインフォマティクスを用いた解析手法により時空間的な定量を行った。その結果、圧迫側および牽引側において Hif1- をはじめとした低酸素関連因子発現の増加を認めた。

低酸素培養装置を購入し、低酸素状態で歯根膜細胞および骨細胞における Hif1- の増加を確認した。

次に低酸素状態における骨細胞の働きをさらに検討した。骨細胞 MLO-Y4 に対して光退色後の蛍光回復 (FRAP) を用いた結果、MLO-Y4 骨細胞様細胞間の情報伝達 (GJIC) が低酸素に反応して減少した (図 3A、B、D)。しかし、最大回復レベルと細胞密度は、対照群と低酸素群の間に有意差を示さなかった (図 3C、F)。さらに免疫蛍光染色、ウェスタンブロット、qPCR を行ったところ低酸素に反応した Ser368 での Cx43 のリン酸化の増加により、タンパク質レベルと mRNA レベルの両方で Cx43 の発現が減少し、Cx43 の GJIC が減少したことを示した (図 3G-I、4A-C)。

一方、 $\beta$ -カテニンのタンパク質発現は、Ser33/37/45/Thr41 でのリン酸化の増加により有意に減少し、 $\beta$ -カテニンの分解を引き起こした (図 4A、B)。一方、小胞体 (ER) ストレスのマーカー (Atf4、Ddit3、GRP75) は、低酸素条件下で mRNA レベルにおいて有意に増加した (図 4C)。また過去の報告と同様に、低酸素状態はスクレロステチンのタンパク質発現を低下させた (図 4A、B)。

過去の報告において、

$\beta$ -カテニンは Cx43 の発現を直接増加させる<sup>3)</sup>

小胞体ストレスは小胞体ストレスを介して  $\beta$ -カテニンを減少させる<sup>4)</sup>

低酸素状態により小胞体ストレスが生じる<sup>5)</sup>

低酸素シグナル伝達は、PHD を介してスクレロステチンの発現を直接減少させる<sup>6)</sup>

ことが明らかになっている。したがって本研究により、低酸素状態が小胞体ストレスや  $\beta$ -カテニン経路を介して骨細胞間の情報伝達能力を低下させること、また、低酸素状態による骨細胞間の情報伝達能力の低下とスクレロステチン発現の減少は骨細胞からの骨吸収シグナルを減少させることが分かった。

本研究の結果、矯正歯の移動の初期段階において骨細胞の低酸素状態の感知により骨吸収シグナルを減少させる可能性が示唆された。矯正歯の移動時の低酸素環境における詳細な分子機構の解明は歯の移動促進および矯正治療期間短縮への臨床展開へつながる重要な課題であることから、今後もさらに研究を発展させる必要がある。

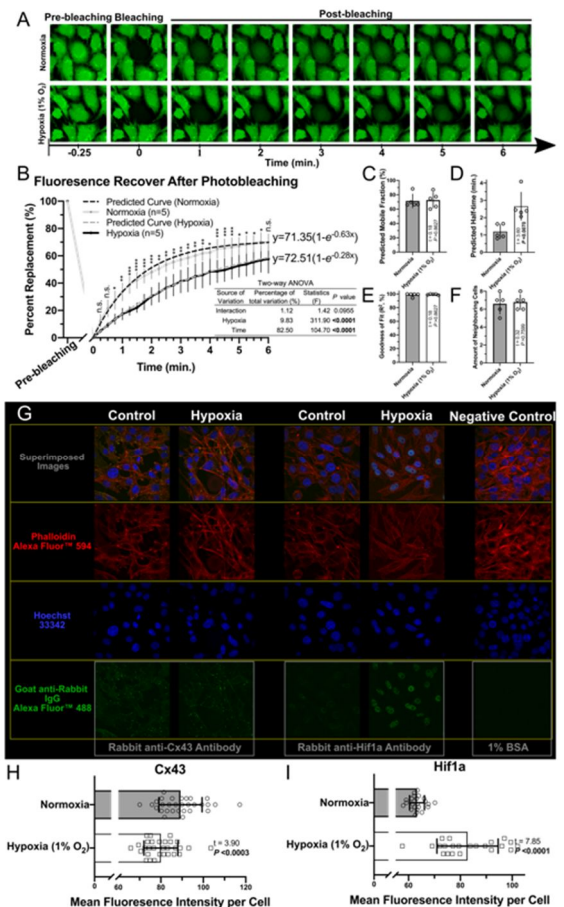
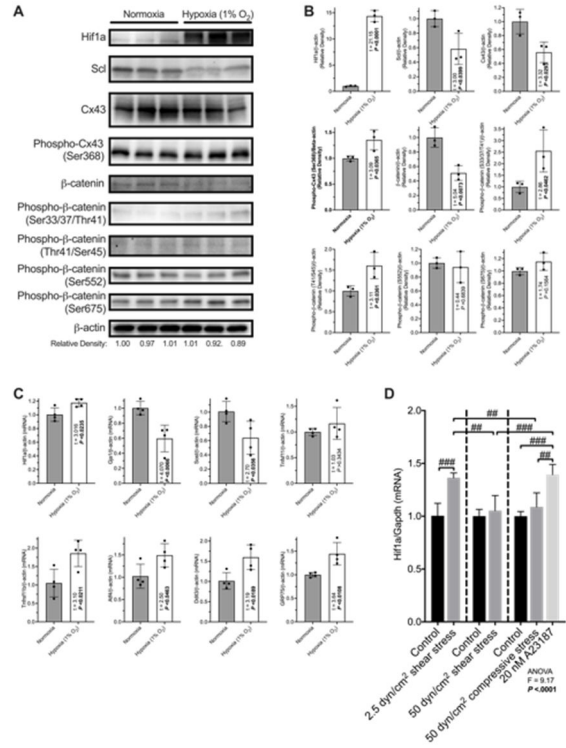


Figure 3. (A) An example of time-lapse images of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). (B-F) The quantitative results of FRAP experiments. (G-I) The

## References

3. van der Heyden MA, Rook MB, Hermans MMP, et al. Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. *J Cell Sci.* 1998;111 ( Pt 1(12):1741-1749. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9601103>.
4. Xia Z, Wu S, Wei X, et al. Hypoxic ER stress suppresses  $\beta$ -catenin expression and promotes cooperation between the transcription factors XBP1 and HIF1 for cell survival. *J Biol Chem.* 2019;294(37):13811-13821. doi:10.1074/jbc.RA119.008353
5. Chipurupalli S, Kannan E, Tergaonkar V, D'Andrea R, Robinson N. Hypoxia Induced ER Stress Response as an Adaptive Mechanism in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):749. doi:10.3390/ijms20030749
6. Stegen S, Stockmans I, Moermans K, et al. Osteocytic oxygen sensing controls bone mass through epigenetic regulation of sclerostin. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-04679-7



**Figure 4.** Western blot images (A) and their quantitative results (B). (C) Results of qPCR. (D) Hif1a expression in

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------