

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592274

研究課題名（和文）性質の異なる破骨細胞に着目した病的・非生理的歯根吸収機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of pathological and/or unphysiological root resorption mechanism focused on the two types of osteoclasts

研究代表者

吉村 善隆（YOSHIMURA YOSHITAKA）

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30230816

研究成果の概要（和文）：本研究は、性質の異なる破骨（破歯）細胞に焦点を絞り、乳歯の病的あるいは非生理的な歯根吸収が亢進する際の動態を特定することで、異常吸収のメカニズムを解明すること目的に検索を行った。Treg細胞の活性が低下、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）ハプロタイプの差異、伸展刺激など破骨細胞の分化誘導系における培養条件等の違いおよび活性酸素除去剤、抗酸化物質によって、破骨細胞の形態学的特徴が異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the pathological and/or unphysiological root resorption mechanism focused on the two types of osteoclasts. Our results were suggested that morphologic characteristics of the osteoclasts varied according to the down-regulation of Treg activity, difference of the major histocompatibility complex (MHC) haplotype, tensile force in culture condition and ROS scavengers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

機能的に一種類と考えられていたマクロファージの中には、LPSとIFN- γ などのサイトカインによって活性化される古典的活性化マクロファージ（M1マクロファージ）と、IL-4やIL-13によって選択的に活性化される創傷治癒的マクロファージ（代替的活性化マクロファージ、免疫応答サブレッサー型マクロファージ）（M2マクロファージ）が存在することが明らかにされている（Nat Rev

Immunol 8: 958-969, 2008）。

このように、マクロファージと同じ起源をもつ破骨細胞においても、マクロファージと同様に機能的に複数のサブセットが存在している可能性が容易に推測される。

従来、吸収窩を形成していない破骨細胞は休止期、あるいは成熟破骨細胞への分化途中の破骨細胞と考えられてきた。しかし、破骨細胞においてもマクロファージ同様に複数のサブセットが存在しているなら、吸収窩を有していない破骨細胞は、骨吸収中の破骨細

胞とは別の機能を行っている可能性がある」と推測される。また、乳歯歯根吸収においても、生理的吸収と病的・非生理的吸収では吸収窩の形態・大きさ、吸収後の周囲組織の修復形態などにおいて明らかに異なっている。これらの現症が複数のサブセットの破骨細胞によって引き起こされると仮定するならば、歯根吸収における臨床的多様性は理論的に説明することが可能と思われる。

以上のことから、申請者らは破骨細胞には複数のサブセットが存在し、それぞれが特有の機能を有しているという仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新たな観点から性質の異なる破骨（破歯）細胞に焦点を絞り、乳歯の病的あるいは非生理的な歯根吸収が亢進する際の動態を特定することで、異常吸収のメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) マウスの上顎第一臼歯から歯根膜細胞を分離し、歯根膜細胞の継代培養を行った。また、マウスの脾臓から抗体ビーズを用いて特異的に Treg 細胞を分離した。マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) は RANKL 刺激によって破骨細胞に分化誘導が可能である。初めに RAW 細胞の破骨細胞への分化誘導過程において各種因子を刺激した場合などの詳細を検討した。

次に、RAW 細胞、マウス歯根膜細胞および Treg 細胞の共存培養を行い、それぞれの細胞群の組み合わせにおける成熟破骨細胞数を定量した。

(2) マウスの種類によって、その骨髄由来細胞から誘導される破骨細胞の形態学的特徴が大きく異なるという報告があった。この報告を確認するために破骨細胞への分化誘導実験を行い、細胞形態学的に解析を行った。

(3) RAW 細胞の破骨細胞への分化誘導系において伸展刺激を加え、分子生物学的および細胞形態学的に解析を行った。

(4) RAW 細胞の破骨細胞への分化誘導系に活性酸素を除去する白金ナノコロイド (nano-Pt)、抗酸化物質である N-アセチルシステイン (NAC) およびグルタチオン (GSH) を添加した。

4. 研究成果

(1) 成熟破骨細胞数は、RAW 細胞単体培養に対し Treg 細胞との共存培養では有意に減少

した。この Treg 細胞による破骨細胞への分化誘導抑制は、歯根膜細胞との共存培養によっては影響を受けなかった。また、透過性膜を介在し RAW 細胞と Treg 細胞との直接接触を遮った場合も同様に抑制された。このことから、Treg 細胞による破骨細胞分化誘導抑制は、細胞接触を必要としないことが示唆された。

以上結果から、乳歯の病的あるいは非生理的歯根吸収は、Treg 細胞の活性が低下することで引き起こされている可能性が示唆された。

(2) ddY マウスの骨髄由来細胞から誘導される破骨細胞においては大型の核の数が多い破骨細胞が観察され、組織適合抗原ハプロタイプが H2KdDd バックグラウンドの BALB/c マウスにおいては小型の核の数が多い破骨細胞が観察され、H2KbDb バックグラウンドの C57BL/6 マウスにおいては前述の中間の大きさ・核数の破骨細胞が観察された。ddY マウスはクローズドコロニーであることから、マウス主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) ハプロタイプの差異によって破骨細胞の形態学的特徴が異なることが示唆された。

(3) 伸展刺激を加えた場合、小型で核の数が少ない破骨細胞が観察された (図 1)。

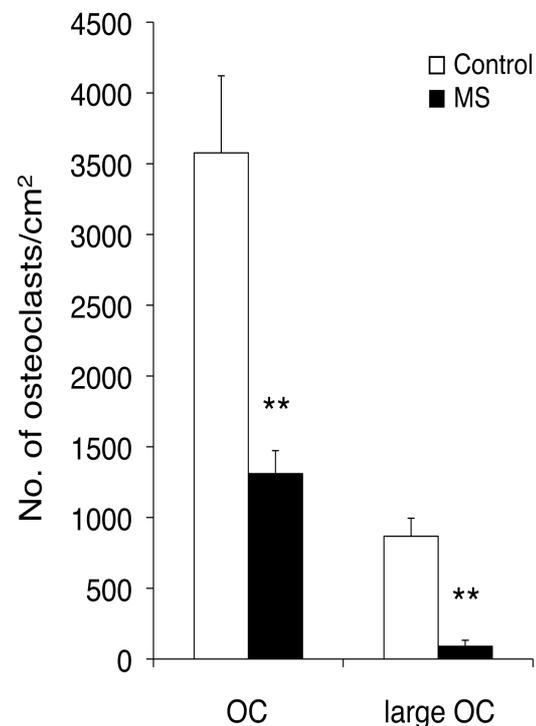


図 1 破骨細胞数 (OC) および巨大破骨細胞数 (large OC)

これは iNOS を介した NO 量が関連していることが示唆された (図 2、3)。また、破骨細

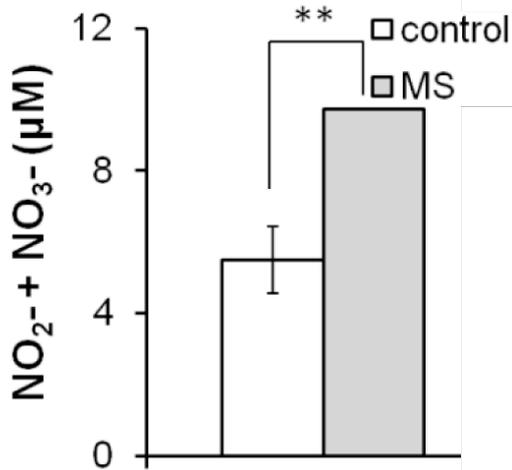


図 2 伸展刺激群 (MS) および対照群 (control) の NO 量

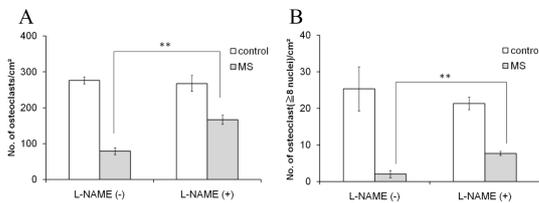


図 3 L-NAME (NOS inhibitor) 処理による破骨細胞数 (A) および巨大破骨細胞数 (B)

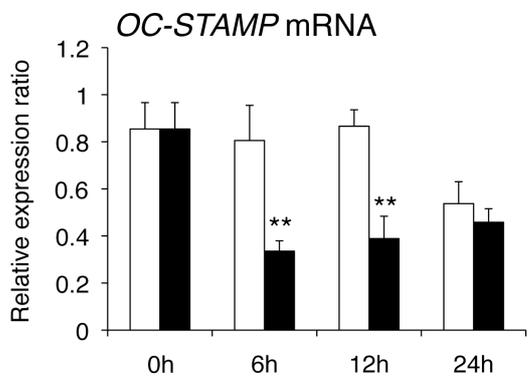
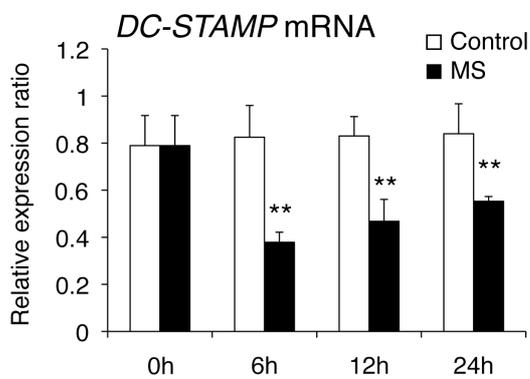


図 4 伸展刺激群 (MS) および対照群 (control) における DC-STAMP および OC-STAMP の mRNA 発現

胞のマーカーとされる破骨細胞特異的遺伝子 (TRAP、CTR、MMP-9、Cath-K、C1C7 および ATP6i) の mRNA 発現量は、6、12、24 時間のいずれの時点でも有意に減少し、TRAP 陽性破骨細胞数との相関が認められた。

また、破骨細胞の細胞融合に必須の融合因子である DC-STAMP および OC-STAMP の mRNA 発現量も伸展刺激によって減少した (図 4)。

DC-STAMP のタンパク質発現量は、24 時間の伸展刺激によって顕著に減少し、細胞接着因子である E-cadherin、Integrin αV および Integrin β3 のタンパク質発現量も減少した (図 5)。

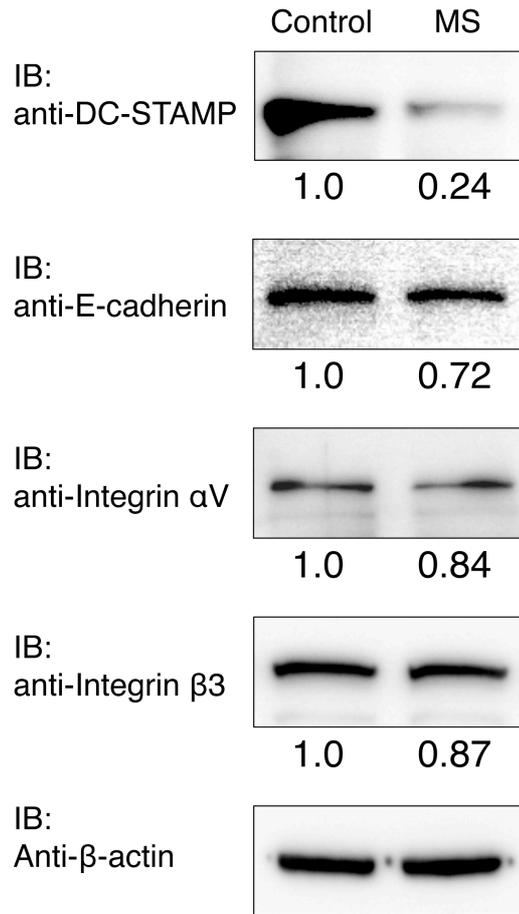


図 5 伸展刺激群 (MS) および対照群 (control) における各種タンパク質の発現

破骨細胞分化の master switch である NFATc1 の mRNA 発現量は、6 時間で減少し、12 時間以降増加し、NFATc2 および 3 の mRNA 発現量は変化しなかった。NFAT の転写活性は、伸展刺激によって有意に増加した。

以上の結果は、DC-STAMP などの細胞融合に必要な分子の発現が、伸展刺激によって抑制されたために、破骨細胞の細胞融合が抑制されたことによると示唆された。

(4) 白金ナノコロイドを添加した場合、小

型で核の数が少ない破骨細胞が観察された (図 6、7)。

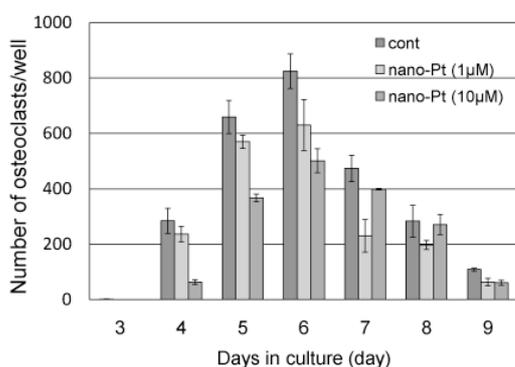


図 6 白金ナノコロイド (nano-Pt) 処理による破骨細胞数

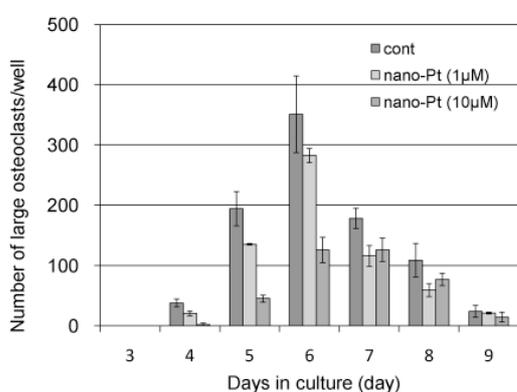


図 7 白金ナノコロイド (nano-Pt) 処理による巨大破骨細胞数

また、NAC および GSH でもその濃度依存的に小型で核の数が少ない破骨細胞が観察された (図 8)。

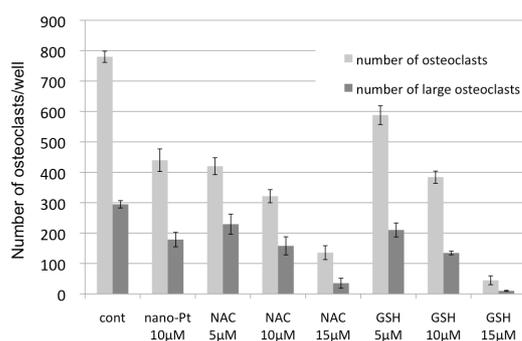


図 8 抗酸化物質 NAC および GSH 処理による破骨細胞数および巨大破骨細胞数

以上の結果から、破骨細胞の分化誘導系における培養条件等の培養環境の違いによって、破骨細胞の形態学的特徴が異なることが示唆された。

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 5 件)

① Sumika Kameyama, Yoshitaka Yoshimura, Takeshi Kameyama, Takashi Kikuri, Mino Matsuno, Yoshiaki Deyama, Kuniaki Suzuki, Junichiro Iida, Short-term mechanical stress inhibits osteoclastogenesis via suppression of DC-STAMP in RAW264.7 cells, International Journal of Molecular Medicine, 査読有、31 巻、2013、292-298、DOI: 10.3892/ijmm.2012.1220

② Keigo Abe, Yoshitaka Yoshimura, Yoshiaki Deyama, Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa, Kanchu Tei, Hisashi Shinoda, Kuniaki Suzuki, Yoshimasa Kitagawa, Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells, International Journal of Molecular Medicine, 査読有、29 巻、2012、1007-1015 DOI: 10.3892/ijmm.2012.952

③ Takashi Kikuri, Yoshitaka Yoshimura, Futoshi Tabata, Tomokazu Hasegawa, Jun Nishihara, Tetsuo Shirakawa, Stage-dependent suppression of the formation of dentin-resorbing multinuclear cells with migration inhibitory factor in vitro, Experimental and Therapeutic Medicine, 査読有、3 巻、2012、37-43 DOI: 10.3892/etm.2011.362

④ Mayumi Nomura, Yoshitaka Yoshimura, Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa, Yumi Taniguchi, Yoshiaki Deyama, Ken-ichi Koshiro, Hidehiko Sano, Kuniaki Suzuki, Nobuo Inoue, Platinum Nanoparticles Suppress Osteoclastogenesis Through Scavenging of Reactive Oxygen Species Produced in RAW264.7 Cells, Journal of Pharmacological Sciences, 査読有、117 巻、2011、243-252 DOI: 10.1254/jphs.11099FP

⑤ Kenjiro Shibata, Yoshitaka Yoshimura, Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa, Yumi Taniguchi, Yoshiaki Deyama, Kuniaki Suzuki and Junichiro Iida, Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells, International Journal of Molecular Medicine, 査読有、28 巻、2011、73-79 DOI: 10.3892/ijmm.2011.675

〔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

吉村 善隆 (YOSHIMURA YOSHITAKA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号： 30230816

(2) 研究分担者

土門 卓文 (DOMON TAKANORI)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号： 50217618

菊入 崇 (KIKUIRI TAKASHI)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号： 10322819

(3) 連携研究者

出山 義昭 (DEYAMA YOSHIAKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号： 80271667

長谷川 智一 (HASEGAWA TOMOKAZU)
徳島大学・大学病院・講師
研究者番号： 50274668