

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11028

研究課題名(和文)細胞間ミトコンドリア輸送因子RhoT1の歯周組織修復に対する機能解析

研究課題名(英文)Functional roles of RhoT1 on repair of periodontal tissue

研究代表者

二宮 禎(NINOMIYA, Tadashi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：00360222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ミトコンドリア輸送因子であるmitochondrial Rho GTPase 1 (RhoT1)の歯周組織の修復に対する機能的役割を解明することを目的とした。RhoT1は、歯根膜間葉系細胞(MSCs)に発現が見られ、LPS刺激時や飢餓状態において、その発現が増加することが明らかにされた。また、LPS刺激などによりダメージを受けた歯根膜MSCsは、正常な歯根膜細胞からミトコンドリアを供給され、生存が維持された。これらの所見より、RhoT1は、歯根膜MSCsにおいて細胞ダメージを回復させるために重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the functional role of mitochondrial Rho GTPase 1 (RhoT1), mitochondrial transporter factor, on the repair of periodontal tissue. RhoT1 expressed on mesenchymal stromal cells (MSCs) in periodontal ligament (PDL) and the level of its expression increased with stimulation of LPS and starvation state. In addition, damaged PDL MSCs were rescued by a transport of mitochondria from intact PDL MSCs and then were survived. These finding indicated that RhoT1 is important for restoring the damage of periodontal ligament cells.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：RhoT1 MSCs 遊走能 ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 機能的な歯を維持するために、いかにして歯を再生また歯槽骨を維持するかが大きな課題になっている。

(2) 胎生幹細胞や iPS などによる歯周組織再生が行われている。また、骨吸収抑制剤による歯槽骨維持法の開発が行われている。しかしながら、十分な結果が得られておらず、新たな歯槽骨維持法の開発が急務である。

(3) 細胞内小器官であるミトコンドリア(Mt)は、炎症などを伴う病的状態により損傷を受ける。

(4) 間葉系幹細胞 (MSCs)は、細胞膜ナノチューブ(Tunnelling Nanotubes:TNT)により、細胞間で Mt を輸送し、損傷細胞を回復させる。その TNT による Mt 輸送には、カルシウムセンサーとして働く RhoT1 (Mitochondrial Rho GTPase 1)が重要な役割を担っている。

以上より、RhoT1 による Mt 輸送制御は、炎症性疾患の新治療法として期待される。

### 2. 研究の目的

本実験では、以下のことを明らかにする。

(1) 歯根膜組織において、RhoT1 が発現すること。

(2) RhoT1 が、歯根膜細胞の生存において重要な役割を担うこと。

(3) RhoT1 が歯周病における歯周組織損傷の修復に関与すること。

以上より、歯周組織維持法の開発への可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) RhoT1 発現細胞の局在と同定

C57BL/6(5週齢、オス)の上顎骨を採取し、脱灰およびパラフィン包埋を行った後、組織標本により、歯根膜組織における RhoT1 の局在を検討した。さらに、歯根膜細胞を採取した後、Magnetic cell sorting system により、歯根膜間葉系細胞(MSC)マーカーとして知られる CD146 の抗体を用いて、歯根膜 MSCs を単離し、ウエスタンブロットによる RhoT1 の発現を検索した。

(2) 歯根膜 MSCs による細胞接触の検討

前述実験により単離した歯根膜 MSCs とマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞の共存培養を行い、細胞の挙動を観察した。さらに、ミトコンドリアを MitoTracker によりラベルした歯根膜 MSCs と LPS で処理を行った歯根膜細胞を共存培養し、細胞突起などによる Cell-Cell contact を評価した。

(3) 組織修復時における細胞遊走機能

細胞間輸送には細胞接触が重要であることから、組織損傷時の細胞遊走と RhoT1 の相互作用を検討した。本実験では、マウス大腿骨に骨欠損を作製し、その治癒過程における MSCs 遊走を観察した。さらに、修復部位の細胞を回収し、細胞遊走因子として考えら

れている LRP1 抗体を用いて、MACs により LRP1 陽性細胞を単離した。その細胞の性状を検討した。

(4) 飢餓状態における RhoT1 の役割

MSCs、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞および歯根膜細胞に対して、LPS 刺激を加えて、それらの細胞死率を評価した。また、RhoT1 発現を検索し、LPS 刺激と RhoT1 発現の関係を検討した。

### 4. 研究成果

(1) RhoT1 発現細胞の局在と同定

RhoT1 陽性細胞は、上顎骨の歯根周囲を覆っている歯根膜組織に点在していた(図1)。また、歯根膜における CD146 陽性細胞を単離し、RhoT1 発現を検索した結果、CD146 陽性細胞の方が、CD146 陰性細胞よりも強い発現が認められた。

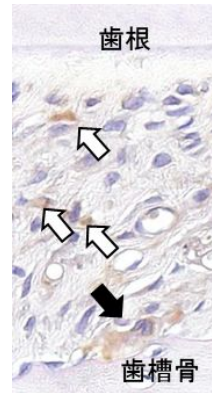


図1: 歯根膜にRhoT1陽性細胞(白矢印)が点在しており、牽引側よりも、圧迫側で多く存在していた。また、歯槽骨表面の破骨細胞(黒矢印)にもRhoT1発現が認められた。

(2) 歯根膜 MSCs による細胞接着の検討

歯根膜 MSCs と RAW264.7 細胞の共存培養では、歯根膜 MSCs が長い突起を出しており、その突端が RAW264.7 細胞と接着しているものが多く見られた(図2)。また、ラベル歯根膜 MSCs と LPS 処理歯根膜細胞の共存培養においては、それぞれの細胞が突起を伸ばした Cell-Cell contact が見られ、歯根膜細胞内には、MitoTracker でラベルされたミトコンドリアの存在が認められた。

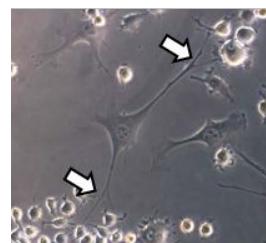


図2: 多能性株化間葉細胞であるC3H10T1/2細胞は、RAW264.7細胞にミトコンドリアが豊富に存在するナノチューブ(矢印)で連結している

これらの所見は、歯根膜 MSCs が、破骨細胞や歯根膜線維芽細胞に対して、Mt を供給している可能性が示された。以上より、歯根膜において、MSCs は破骨細胞や歯根膜線維芽細胞を支持することが示唆された。

(3) 組織修復時における細胞遊走機能

骨欠損 3 日目で LRP1 陽性細胞が出現し、その後、数を増やした。上顎臼歯の抜去後の歯槽骨修復においても、同様な結果が得られた。単離された LRP1 陽性細胞は MSC マーカーに加え、細胞接着に関与する Paxillin を発現しており、さらに、RhoT1 の高い発現が認められた。

これらのことより、組織損傷治癒において、MSCs の遊走と RhoT1 発現は、相関関係がある可能性が示唆された。

#### (4) 飢餓状態における RhoT1 の役割

MSCs、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞、そしてマウス歯根膜細胞に対する LPS 刺激は、これらの細胞の細胞死率を増加させた。また、LPS 刺激または飢餓状態におくことで、これらの細胞における RhoT1 発現量は増加した。一方、LPS 刺激後の MSCs に対して、非刺激 MSCs を加えると、細胞間の細胞突起によるネットワークが活性化され、その細胞突起内にミトコンドリアが含まれていることが明らかになった。このことに加え、細胞生存率も改善された。これらの所見は、飢餓状態または LPS 刺激により、MSCs は細胞間ネットワークを活性化することで、細胞死から回避する機能を有することが示唆された。

以上より、LPS 刺激などに対して MSCs や歯根膜細胞の RhoT1 発現が細胞損傷を改善するため、RhoT1 の調節により歯周病治療が可能になると推測される。

#### 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 21 件 )

Yoshioka Y, Yamachika E, Nakanishi M, Ninomiya T, Nakatsuji K, Matsubara M, Moritani N, Kobayashi Y, Fujii T, Iida S. Molecular alterations of newly formed mandibular bone caused by zoledronate. *Int J Oral Maxillofac Surg* (in press) DOI:10.1016/j.ijom.2018.02.002. 査読有

Hiraga T, Ninomiya T. Establishment and characterization of a C57BL/6 mouse model of bone metastasis of breast cancer. *J Bone Miner Metab* (in press) DOI: 10.1007/s00774-018-0927-y 査読有

Wakabayashi H, Wakisaka S, Hiraga T, Hata K, Nishimura R, Tominaga M, Yoneda T. Decreased sensory nerve excitation and bone pain associated with mouse Lewis lung cancer in TRPV1-deficient mice. *J Bone Miner Metab* (in press) DOI: 10.1007/s00774-017-0842-7 査読有

Horibe K, Hosoya A, Hiraga T, Nakamura H. Expression and localization of CRAMP in rat tooth germ and during reparative dentin formation. *Clin Oral Invest* (in press) DOI: 10.1007/s00784-018-2353-x 査読有

Tanaka M, Hosoya A, Mori H, Kayasuga R, Nakamura H, Ozawa H (2018) Minodronic acid induces morphological changes in osteoclasts at bone resorption sites and reaches a level required for antagonism of purinergic P2X2/3 receptors. *J Bone Miner Metab* 36:54-63. DOI:10.1007/s00774-017-0814-y. 査読有

Ozaki Y, Koide M, Furuya Y, Ninomiya T, Yasuda H, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Yoshinari N, Udagawa N. (2017) Treatment of OPG-deficient mice with WP9QY, a RANKL-binding peptide, recovers alveolar bone loss by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis. *PLoS One*, 12(9):e0184904, DOI:10.1371/journal.pone.0184904. 査読有

Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N (2017) Bone Formation is coupled to resorption via suppression of sclerostin expression by osteoclasts. *J Bone Mineral Res* 32: 2074-86. DOI: 10.1002/jbmr.3175 査読有

Nakamura M, Nakamichi Y, Mizoguchi T, Koide M, Yamashita T, Ara T, Nakamura H, Penninger JM, Furuya Y, Yasuda H and Udagawa N (2017) The W9 peptide directly stimulates osteoblast differentiation via RANKL signaling. *Journal of Oral Biosciences* 59: 146-51. 査読有

Murakami K, Kobayashi Y, Uehara S, Suzuki T, Koide M, Yamashita T, Nakamura M, Takahashi N, Kato H, Udagawa N and Nakamura Y (2017) A Jak1/2 inhibitor, baricitinib, inhibits osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression in osteoblasts in vitro. *PLoS One* 12: e0181126. DOI: 10.1371/journal.pone.0181126. 査読有

Yukita A, Hara M, Hosoya A, Nakamura H (2017) Relationship between localization of proteoglycans and

induction of neurotrophic factors in mouse dental pulp. *J Oral Biosc* 59: 31-7. 査読有

Hosoya A, Takahama A, Nakamura H (2017) Localization of RELM-β/FIZZ2 is associated with cementum formation. *Anat Rec (Hoboken)* 300:1865-74. DOI: 10.1002/ar.23636 査読有

Kozłowska AK, Topchyan P, Kaur K, Tseng HC, Teruel A, Hiraga T, Jewett A (2017) Differentiation by NK cells is a prerequisite for effective targeting of cancer stem cells/poorly differentiated tumors by chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *J Cancer* 8(4): 537-554, DOI:10.7150/jca.15989. 査読有

Yang M, Arai A, Udagawa N, Hiraga T, Lijuan Z, Ito S, Komori T, Moriishi T, Matsuo K, Shimoda K, Zahalka AH, Kobayashi Y, Takahashi N, Mizoguchi T (2017) Osteogenic factor Runx2 marks a subset of leptin receptor-positive cells that sit atop the bone marrow stromal cell hierarchy. *Sci Rep* 7(1): 4928. DOI:10.1038/s41598-017-05401-1. 査読有

Hiraga T, Ito S, Nakamura H (2016) EpCAM expression in breast cancer cells is associated with enhanced bone metastasis formation. *Int J Cancer* 138(7): 1698-1708. DOI: 10.1002/ijc.29921 査読有

Hiraga T. (2016) Targeted agents in preclinical and early clinical development for the treatment of cancer bone metastases. *Expert Opin Invest Drugs* 25(3): 319-334. DOI: 10.1517/13543784.2016.1142972 査読有

Hiraga T, Nakamura H. (2016) Comparable roles of CD44v8-10 and CD44s in the development of bone metastases in a mouse model. *Oncol Lett* 12(4): 2962-2969, 2016. DOI: 10.3892/ol.4985 査読有

宇田川信之、小出雅則、溝口利英、中村美どり、下平滋隆、田口明、(2016)骨はダイナミックに躍動している、日本顎咬合学雑誌、36巻、161-170、査読有

Kobayashi Y, Thirukonda GJ, Nakamura Y, Koide M, Yamashita T, Uehara S, Kato H, Udagawa N, Takahashi

N.(2015) Wnt16 regulates osteoblast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun* 463: 1278-1283, 2015 DOI: 10.1016/j.bbrc.06.102. 査読有

Hosoya A, Nakamura H (2015) Ability of stem and progenitor cells in the dental pulp to form hard tissue. *Jpn Dent Sci Rev* 51:75-83 査読有

Sakai K, Shimodaira S, Maejima S, Udagawa N, Sano K, Higuchi Y, Koya T, Ochiai T, Koide M, Uehara S, Nakamura M, Sugiyama H, Yonemitsu Y, Okamoto M, Hongo K. (2015) Dendritic cell-based immunotherapy targeting Wilms' tumor 1 in patients with recurrent malignant glioma. *J Neurosurg* 123:989-997 DOI: 10.3171/2015.1.JNS141554 査読有

21 Kobayashi Y, Uehara S, Koide M, Takahashi N. (2015) The regulation of osteoclast differentiation by Wnt signals. *Bonkey* 4:713 DOI: 10.1093/jb/mvv124. 査読有

[学会発表](計 15 件)

Hiraga T, Nakamura H. Functional comparison between CD44s and CD44v8-10 in cancer metastasis to bone. American Society for Bone and Mineral Research 2017 Annual Meeting, 2017.

Udagawa N, Uehara S, Koide M, Arai A, Mizoguchi T, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Fukuda C, Tsuda E. Anti-Siglec-15 antibody inhibits bone-resorbing activity of osteoclasts and stimulates osteoblast differentiation. American Society for Bone and Mineral Research 2017 Annual Meeting, 2017.

Koide M. Regulation of sclerostin expression by bone resorption. 第59回歯科基礎医学会学術大会 2017

雪田 聡、二宮 禎、細矢明宏、中村浩彰 ケモカイン CCL25 投与が乳幼児期マウス骨形成に与える影響 第59回歯科基礎医学会学術大会 2017

小出雅則、小林泰浩、山下照仁、上原俊介、中村美どり、平岡 行博、尾崎友輝、飯村忠浩、高橋直之、宇田川信之 破骨細胞由来のLIFはsclerostinの発現低下を介して、骨形成を促進する 第59回歯科基礎医学会学術大会 2017

尾崎友輝、小出雅則、二宮 禎、中村美どり、

吉成伸夫、高橋直之、宇田川信之 W9 ペプチド投与は OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨喪失を改善する 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会 2017

小野亜美、細矢明宏、中村浩彰 歯の発生過程における DMP-1, DSP, FAM20C の局在 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会 2017

吉羽永子、大倉直人、細矢明宏、中村浩彰、野杵由一郎 吉羽邦彦 ヒト歯髓組織創傷治癒過程における骨髄由来間葉系前駆細胞 fibrocyte の動態検索 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会 2017

竹内晶音、二宮 禎、杉山稔恵 鳥類型恐竜における骨髄骨の発現と分布に関する研究 第 123 回日本畜産学会 2017

Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Imura T, Yasuda H, Takahashi N and Udagawa N Osteoclast-derived LIF promotes bone formation through suppression of sclerostin expression. 14<sup>th</sup> Meeting of Bone Biology Forum, 2017

尾崎友輝、小出雅則、古屋優里子、二宮禎、保田尚孝、中村美どり、吉成伸夫、高橋直之、宇田川信之 W9 ペプチド投与による OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨喪失の改善効果 第 35 回日本骨代謝学会 2017

小出雅則、小林泰浩、山下照仁、上原俊介、尾崎友輝、飯村忠浩、中村美どり、保田尚孝、高橋直之、宇田川信之 破骨細胞由来の LIF は骨細胞における sclerostin の発現を低下させ、骨形成を促進する 第 35 回日本骨代謝学会 2017

平賀 徹 Bisphosphonate の抗がん作用:2017 Update 第 16 回松本ボンフォーラム 2017

横山亜矢子、山田珠希、平賀 徹、長谷川智香、山崎 裕、網塚憲生 乳がん骨転移巣における骨細胞の組織化学的検索 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017

小出雅則、小林泰浩、山下照仁、上原俊介、尾崎友輝、中村美どり、高橋直之、宇田川信之、破骨細胞が分泌する LIF は sclerostin の発現を低下させ、骨形成を促進する 第 2 回日本骨免疫学会ウィンターセミナー 2017

骨リモデリングの制御機構、pp169-173、メディカルレビュー社

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二宮 禎 (NINOMIYA, Tadashi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号: 00360222

### (2) 研究分担者

中村 浩彰 (NAKAMURA, Hiroaki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 50227930

平賀 徹 (HIRAGA, Toru)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 70322170

小出 雅則 (KOIDE, Masanori)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号: 10367617

〔図書〕(計 1 件)

1. 小出雅則、宇田川信之 (2016) THE BONE