

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18592225
 研究課題名（和文） 骨免疫学的観点から T リンパ球に着目した病的・非生理的乳歯歯根吸収機構の解析
 研究課題名（英文） Osteoimmunological analysis of pathological and/or unphysiological root resorption in deciduous teeth involvement of T lymphocyte
 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： 本研究は、骨免疫学的観点から CD4 陽性 T 細胞（Th1、Th2、Th17 細胞）に着目し、病的あるいは非生理的な乳歯歯根吸収機構の解明を目的に検索を行った。Th1 細胞の産生するインターフェロン- γ 、Th2 細胞の産生するインターロイキン（IL）-4 は破歯細胞への分化を抑制し、Th17 細胞の産生する IL-17 は亢進した。これらの結果は CD4 陽性 T 細胞が産生するサイトカインが歯根吸収機構に作用していることを示唆した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：矯正・小児系歯学

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、歯根吸収、乳歯

1. 研究開始当初の背景

乳歯から永久歯への交換にみられる最も重要な現象は、乳歯歯根の吸収である。臨床的に永久歯を先天的に欠損している場合でも歯根吸収が認められる。また、乳歯の根尖性歯周炎などによる根尖病巣の予後は不良のことが多く、外傷による歯牙脱臼とあわせて永久歯の萌出前の乳歯の歯根吸収が高頻度に認められる。

骨吸収機構については明らかに成りつつあるが、歯根吸収の詳細な機構については未だ不明な点が多い。このため、歯根吸収機構

を解析することは小児歯科臨床において極めて重要である。

近年、T 細胞から発見された TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) が破骨細胞分化因子 (RANKL: receptor activator of NF κ B (RANK) ligand) と同一であることが再発見され、RANKL が骨と免疫とをつなぐ重要な因子であることが明らかになった。さらに、この RANKL、RANKL のレセプターである RANK、RANKL のデコイ（おとり）レセプターである osteoprotegerin (OPG) の研究、また、破骨細胞におけるインターフェロン (IFN) - γ の研究によって、骨免疫学

(osteoimmunology) という言葉が定着した。

CD4 陽性 T リンパ球 (T 細胞) は主要組織適合抗原 (MHC) クラス II 分子を認識するヘルパー T 細胞であり、種々のサイトカインを放出し、B 細胞の抗体産生やマクロファージなどを活性化する役割を持ち、免疫学領域では十分な研究が進んでいる。また、CD14 は単球/マクロファージ系の細胞に発現しているレセプター蛋白質で、近年の研究から、CD14 陽性細胞から RANKL により破骨細胞を誘導することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CD4 陽性 T 細胞に着目し、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 T 細胞の役割を解明するとともに、このメカニズムを解明することによって、薬物開発をはじめとした歯根吸収に対する新しい治療戦略を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜由来細胞の分離・培養

マウスの歯根膜由来細胞の分離・培養を行った。

歯根中央部 1/3 の領域の歯根膜を無菌的に剥離・細切し、培養皿上に増殖してくるものを継代培養 (5 代以内) して、歯根膜細胞として使用した。

(2) CD4 陽性 T 細胞、CD14 陽性細胞の分離

LPS をはじめとする起炎物質を腹腔内投与し、7~10 日間飼育した。適切な時期に脾臓を摘出し、脾臓由来細胞を得た。脾臓由来細胞は赤血球を除去し洗浄後、抗マウス CD4 マイクロビーズ (MACS) を用いて、活性化 CD4 陽性 T 細胞を得た。

また、単球分画は、血液を密度勾配遠心法 (Opti-Prep 分離法) により粗精製し、抗マウス CD14 抗体を用いて細胞と抗体とを結合し、その細胞-抗体複合体をマイクロビーズ (MACS) と結合 (間接法) することにより、CD14 陽性細胞を得た。

(3) CD14 陽性細胞様細胞の培養

マクロファージ様細胞株で CD14 陽性細胞である RAW264.7 細胞を通常法に従い培養を行った。

(4) 骨芽細胞様細胞の培養

骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞を通常法に従い培養を行った。

(5) 伸展刺激

Bio Flex プレート (I 型コラーゲンコート) に細胞を播種し、Flexercell tension system

に従い伸展刺激を与えた。

(6) 各種 mRNA 発現の検討

総 RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、RT-PCR 法により、RANKL、IFN- γ など、各種 mRNA の発現状況を検討した。

(7) CD4 陽性 T 細胞、歯根膜由来細胞および CD14 陽性細胞の共存培養による破骨細胞の誘導

歯根膜由来細胞、CD14 陽性細胞と CD4 陽性 T 細胞などの単独培養・共存培養を行い、破骨細胞誘導能を TRAP 染色による TRAP 陽性多核細胞の定量化によって評価した。

(8) サイトカイン量の測定

培養上清中のサイトカイン量を ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

歯根膜由来細胞、CD14 陽性細胞および CD4 陽性 T 細胞の分離・培養を行った。マウス歯根膜由来細胞はマウス歯根中央部より得られた。CD4 陽性 T 細胞はマウス脾臓を摘出し、赤血球を除去し洗浄後、脾臓由来細胞を集め、抗マウス CD4 マイクロビーズを用いて得た。さらに抗 CD3 抗体刺激によって活性化型 CD4 陽性 T 細胞を得た。CD14 陽性細胞は血液を密度勾配遠心法により粗精製し、抗マウス CD14 抗体を用いて細胞と抗体とを結合し、その細胞-抗体複合体をマイクロビーズと結合 (間接法) することにより得られた。

RANKL 存在下で歯根膜由来細胞と CD14 陽性細胞の共存培養による破骨 (破歯) 細胞の誘導は可能であった。しかしながら、歯根膜由来細胞と CD14 陽性細胞、CD4 陽性 T 細胞の共存培養によって破骨細胞は誘導されなかった。これは CD4 陽性 T 細胞、特に Th1 細胞が産生するインターフェロン- γ による破骨 (破歯) 細胞への分化誘導抑制であった。

次に CD4 陽性 T 細胞を分離後、インターロイキン (IL) -12 刺激で Th1 細胞へ、IL-4 刺激で Th2 細胞へ、IL-23 刺激で Th17 細胞へそれぞれ分化させ、これらそれぞれと、RANKL 存在下で歯根膜由来細胞と CD14 陽性細胞との共存培養を行い、破骨細胞分化に対する影響を検索した。

Th1 細胞との共存培養においては、CD14 陽性細胞から破骨細胞への分化を抑制した。これは Th1 細胞が産生する IFN- γ が破骨細胞への分化を抑制するものであった。Th1 細胞非存在下での共存培養において、IFN- γ を添加により破骨細胞への分化が抑制された結果からも裏付けられた。

また、Th2 細胞との共存培養においても、破骨細胞への分化は抑制された。これは Th2

細胞の産生する IL-4 が破骨細胞への分化を抑制したと考えられた。しかし、Th2 細胞非存在下での共存培養において、IL-4 の添加により破骨細胞への分化が抑制されたことから、Th2 細胞への分化に必要な IL-4 によって破骨細胞への分化が抑制されることも考えられた。

Th1 細胞もしくは Th2 細胞の非存在下の実験により、破骨細胞分化は IFN- γ 、IL-4 によって抑制された。また、Th17 細胞の発現する RANKL のみでは破骨細胞分化は難しく、Th17 細胞の発現する IL-17 が歯根膜由来細胞に作用し RANKL 発現を増加し破骨細胞へ分化させることが示された。これは歯根膜由来細胞に IL-17 を作用させると RANKL の発現が亢進した結果からも裏付けられた。さらに、IL-1、IL-6 など炎症系サイトカインは歯根膜由来細胞の RANKL 発現を亢進させた。

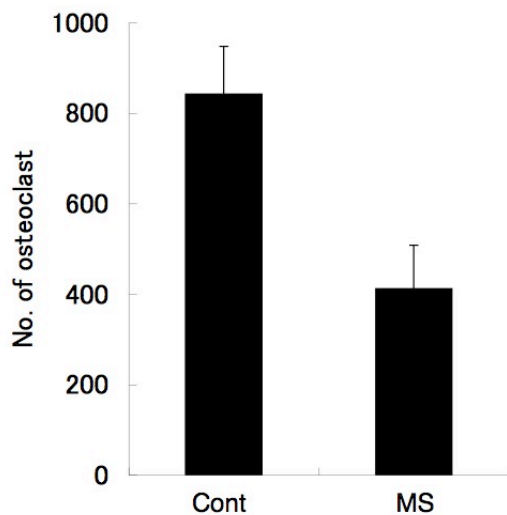


図 1: The number of osteoclasts decreased with mechanical stress. Cont, control group; MS, mechanical stress group.

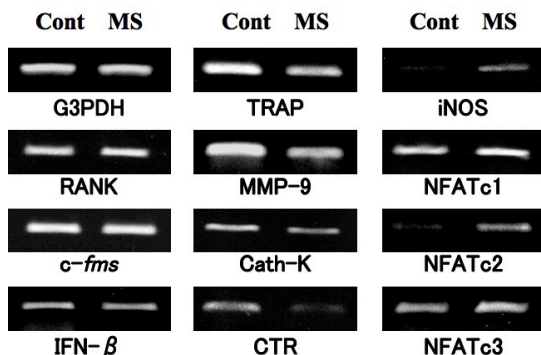


図 2: Mechanical stress was related to the expression of osteoclast differentiation genes. RAW cells were cultured with or without

mechanical stress. The total RNA was extracted, and RT-PCR analysis was performed. Cont, control group; MS, mechanical stress group.

また、マクロファージ様細胞株で CD14 陽性細胞である RAW264.7 細胞のみを用いた破骨細胞分化に対する伸展刺激負荷の影響も検索した。伸展刺激負荷によって、破骨細胞分化は抑制され、破骨細胞の融合および巨大化も抑制した(図 1)。これは NFATc1 の発現を抑制しなかったことから、その下流で抑制されていると思われた(図 2)。

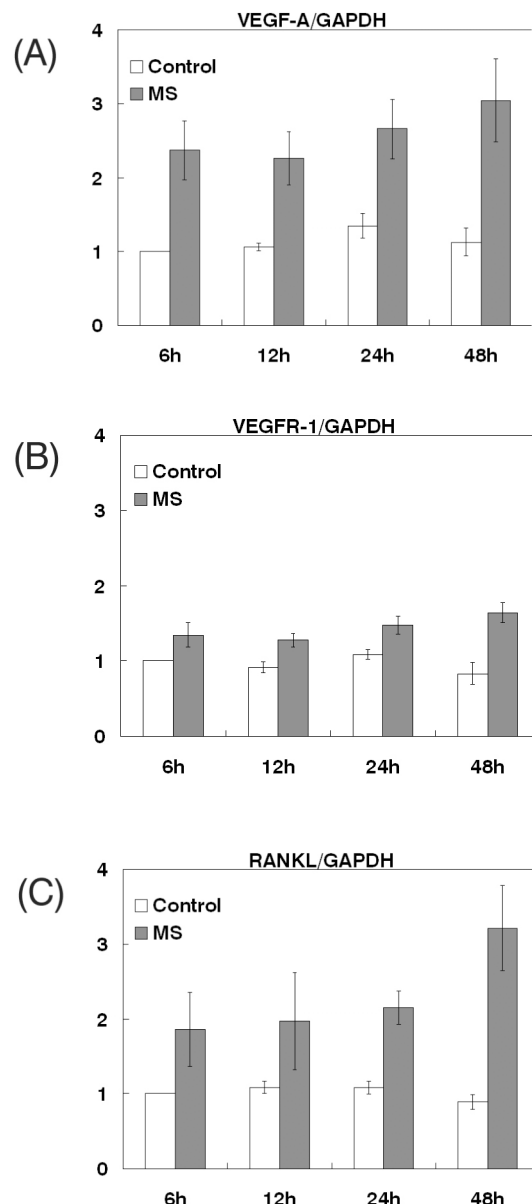


図 3: The effect of mechanical stress on mRNA expression of VEGF-A (A), VEGFR-1 (B) and RANKL (C). Control, control group; MS, mechanical stress group.

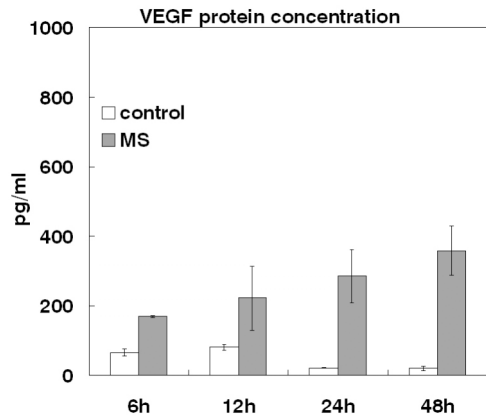


図4: The effect of mechanical stress on protein concentration of VEGF. (C). Control, control group; MS, mechanical stress group.

また、骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞に対する伸展刺激負荷の影響を検索した実験により、オステオプロテグリン (OPG) の発現は変化せず、vascular endothelial growth factor (VEGF)-A/VEGF receptor の発現が増強し VEGF-A が autocrine 的に作用し、RANKL 発現を増強するとともに破骨細胞分化が亢進した(図3)。さらに VEGF の産生量も増加した(図4)。

しかしながら、CD14 陽性細胞の RANKL 刺激による破骨細胞への分化は、伸展刺激負荷により抑制されたことと相反した。これらの結果は RANKL と OPG との発現バランスが重要であると示唆された。

以上の結果より、Th1 細胞および Th2 細胞による破骨(破歯)細胞分化抑制機構が失われ、Th17 細胞および炎症性サイトカインによって破骨細胞の活性化が亢進することにより、乳歯の病的あるいは非生理的な歯根吸収を生じ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 2件)

- ① Takeshi Nakai, Yoshitaka Yoshimura, Yoshiaki Deyama, Kuniaki Suzuki, Junichiro Iida. (2009) Mechanical stress up-regulates RANKL expression via VEGF autocrine in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Molecular Medicine reports 2(2): 229-234. 査読有
- ② Nobumitsu Suzuki, Yoshitaka Yoshimura, Yoshiaki Deyama, Kuniaki Suzuki and Yoshimasa Kitagawa (2008) Mechanical

stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells. International Journal of Molecular Medicine 21(3): 291-296. 査読有

[学会発表] (計 5件)

- ① 中井丈生、吉村善隆、出山義昭、鈴木邦明、飯田順一郎 (2008) マウス骨芽細胞様細胞に対する機械的刺激が VEGF 発現を増加する、第 50 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、平成 20 年 9 月 23 日、東京都
- ② 鈴木宣充、吉村善隆、出山義昭、鈴木邦明 (2007) 機械的刺激は破骨細胞分化を抑制する、第 58 回日本薬理学会北部会、平成 19 年 9 月 29 日、札幌市
- ③ 中井丈生、吉村善隆、出山義昭、鈴木邦明、飯田順一郎 (2007) マウス骨芽細胞様細胞の VEGF 発現における機械的刺激の影響、第 49 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、平成 19 年 8 月 30 日、札幌市
- ④ 鈴木宣充、吉村善隆、出山義昭、鈴木邦明、北川善政 (2007) 破骨細胞分化における機械的刺激の影響、第 49 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、平成 19 年 8 月 30 日、札幌市
- ⑤ 鈴木宣充、吉村善隆、八田光世、出山義昭、鈴木邦明、北川善政 (2006) RAW 細胞の破骨細胞への分化誘導に対する機械的刺激の影響、第 48 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、平成 18 年 9 月 22 日、横浜市

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

小口 春久 (OGUCHI HARUHISA)
北海道大学・名誉教授
研究者番号: 30124689

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

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

(3) 連携研究者

なし