

平成21年 5月15日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18689045

研究課題名（和文）圧縮ストレスに対する口腔粘膜の細胞応答が顎堤吸収に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effects of Mechanical Stress on Oral Mucosa and Its Relation to Osteo-Immunology in Alveolar Bone

研究代表者

江草 宏（EGUSA HIROSHI）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30379078

研究成果の概要：

本研究は、口腔粘膜への圧縮力が粘膜の細胞を刺激し、これによって産生された因子が粘膜直下の顎の骨の代謝に及ぼす影響を検討することを目的に行われた。口腔粘膜の細胞あるいは破骨細胞に圧縮負荷を与えると、粘膜細胞は炎症および骨吸収に関わる因子の産生を促進することが明らかとなった。また、圧縮刺激が破骨細胞の分化に必須な因子の活性を促進することを明らかにし、破骨細胞活性に関わる蛋白質およびいくつかの小分子化合物を新規に特定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

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：口腔粘膜，メカニカルストレス，顎堤吸収，破骨細胞，骨芽細胞，骨代謝

## 1. 研究開始当初の背景

不適切な義歯を装着した場合、それを支える顎堤が吸収の一途をたどることは臨床的に広く認められている事実である。この「顎堤吸収」は、結果として可撤性補綴装置の支持・維持を困難にするばかりではなく、インプラント治療の可否、審美性にも大きな影響を及ぼすため、古くより補綴医にとって日常的に直面する難題である。しかし、これまでにその原因・発症機構を明確に証明した報告および予防策はみあたらない。

近年、関節リウマチや歯周病などの研究が進展するにつれ、免疫系と骨代謝の密接な関

係、いわゆる「Osteo-immunology（骨免疫学）」が注目されるようになってきている。歯科補綴分野で問題となる顎堤吸収は、補綴装置を介した人工的な力、すなわちメカニカルストレスが持続的に顎堤に加わった状態で生じており、特に、不適切な義歯を使用した場合、非生理的な圧縮ストレスが義歯床直下に存在する粘膜にとって外来刺激となっている可能性がある。この際、口腔粘膜が、この刺激に対して第一線で免疫系/骨代謝に関わる応答をしている可能性は高い。これらの知見を基に本申請研究では、「顎堤粘膜に加わる非生理的圧縮ストレスが外来刺激と

して粘膜の細胞のサイトカイン・増殖因子の産生を促し、二次的に歯槽骨の吸収に影響を及ぼしている」との作業仮説を提起し、研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔粘膜に加わるメカニカルストレスが口腔粘膜のサイトカイン産生を促し、歯槽骨の骨代謝に影響を及ぼしている可能性を検討することである。

また、骨代謝の主役である骨芽細胞、破骨細胞の分化に関与する分子機構を探索し、顎堤吸収のメカニズム解明へ寄与することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 顎堤への咬合圧ストレスを模倣した培養細胞圧縮装置を開発する。
- (2) 培養細胞圧縮装置を用いて、口腔粘膜細胞（歯肉線維芽細胞）、骨芽細胞、あるいは破骨細胞に圧縮負荷を与え、サイトカイン・増殖因子、骨代謝因子の産生を検討する。
- (3) 破骨細胞の分化を検討するためのツールとして、破骨前駆細胞 RAW 株に、破骨細胞分化に必要な不可欠な転写因子 NFAT をターゲットとしたリンフェラーゼレポーターベクターを組み込んだ細胞株を樹立する。
- (4) NFAT レポーター遺伝子破骨細胞株を用いて、圧縮負荷が破骨細胞の分化に及ぼす影響を検討する。
- (5) NFAT レポーター破骨細胞株を用いて、破骨細胞分化に影響を及ぼす化合物・因子をスクリーニングし、これらが破骨細胞および骨芽細胞に及ぼす影響を検討する。
- (6) 破骨細胞分化に重要な分子である calcineurin B と結合する蛋白分子を、Yeast Two Hybrid 法を用いて新規に同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 培養細胞圧縮装置の開発

細胞培養プレートを入包する密閉チャンバー内に、ガス混合装置で5%に調整されたCO<sub>2</sub>をコンプレッサーユニットにより送り込み、チャンバー内圧を上げることにより培養液を介して培養細胞に圧力をかけることが可能な装置をカスタムメイドで作製した。また、このチャンバー内にデジタル圧力センサーを取り付け、設定圧（～50 kPa）に達すると、この状態を設定時間維持し、その後脱気することで内圧を外気圧

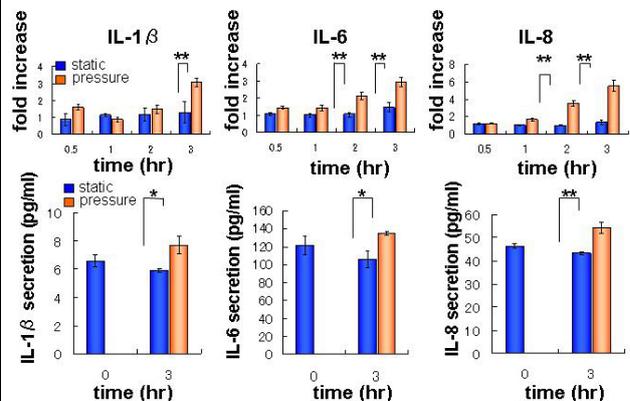
にまで下げ、反復的に圧縮力を付加できるように設計し実用化した（図）。



この装置はチャンバー内に入るサイズの培養容器であればどのようなものでも用いることができるため、従来に市販されている機器よりも汎用性が高く低コストで研究を行うことが可能となった。

### (2) 圧縮負荷が口腔粘膜細胞に及ぼす影響

反復圧縮負荷（50 kPa）は口腔粘膜細胞の細胞増殖を抑制し、炎症性サイトカイン IL-1β, IL-6, IL-8 の遺伝子および蛋白質の産生を促進することが明らかとなった（図）。



さらに、この反復圧縮負荷は口腔粘膜細胞において骨吸収因子 RANKL の遺伝子発現を促進することが明らかとなった。

圧縮負荷によって口腔粘膜が骨代謝に関与する因子を産生することはこれまでに報告されておらず、今回の成果は今後の顎堤組織における口腔粘膜と歯槽骨との骨免疫学研究に繋がるため、非常に有意義である。

### (3) 圧縮負荷が骨芽細胞分化に及ぼす影響

反復圧縮負荷（50 kPa）は骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）の細胞増殖を抑制し、骨系分化に抑制的に作用した。

また、MSC が骨芽細胞系に分化する過程における細胞外基質の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイを用いて検討した結果、MSC の骨芽細胞系分化過程では、骨芽細胞系以外の多数の細胞外基質関連遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった (2007 年 *Tissue Eng* に発表)。さらに、MSC の骨芽細胞分化過程では、osteocalcin プロモーター領域における特定の CpG 配列のメチル化が分化に関与している可能性を示唆する所見を得た。これらの成果は、これまでの骨代謝研究でほとんど注目されていなかった遺伝子群の発現抑制機構およびエピジェネティクスの重要性を示唆しており、さらなる機序の解明が期待される。

#### (4) NFAT レポーター破骨細胞株の樹立

一般的に、破骨細胞の培養およびその分化の評価方法は確立されているとはいえ、比較的煩雑で再現性も困難である。今回我々は、破骨細胞分化を容易に誘導でき、破骨細胞分化過程で活性が亢進する NFAT をターゲットとしたルシフェラーゼレポーターベクターを組み込んだ RAW 細胞株の樹立に成功した。この細胞株は、分化誘導によって NFAT 活性を著明に亢進し、これに伴って発光するルシフェラーゼは発光プレートリーダーによって簡単に測定可能であり、非常に感度、再現性が高い。この細胞株は今後の破骨細胞研究において非常に有用なツールとなることが期待される。

#### (5) 圧縮負荷が破骨細胞分化に及ぼす影響

反復圧縮負荷 (50 kPa) は、RANKL 存在下で破骨細胞の NFAT 活性を著明に促進し、分化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。この結果は、不適切な義歯によって顎堤に圧縮負荷が生じた場合、破骨細胞の活性が高まる可能性を示唆しており、今後のさらなる研究成果が期待される。

#### (6) 破骨細胞分化に関与する小分子化合物

NFAT レポーター破骨細胞株を用いたケミカルコンパウンドライブラリーのスクリーニングから、破骨細胞活性に関わるいくつかの新規因子を特定した。

この因子のひとつハルミンは、RANKL 非依存性に NFAT 活性を著明に促進するが、同時に促進される分化制御因子 Id2 によって破骨細胞分化を抑制し、骨芽細胞に対しては石灰化を促進する機能を有している可能性が示唆された。今後、この化合物が骨吸収抑制剤として利用できる可能性があり、今後の研究の発展が期待される。

#### (7) 骨芽/破骨細胞分化を制御するペプチド

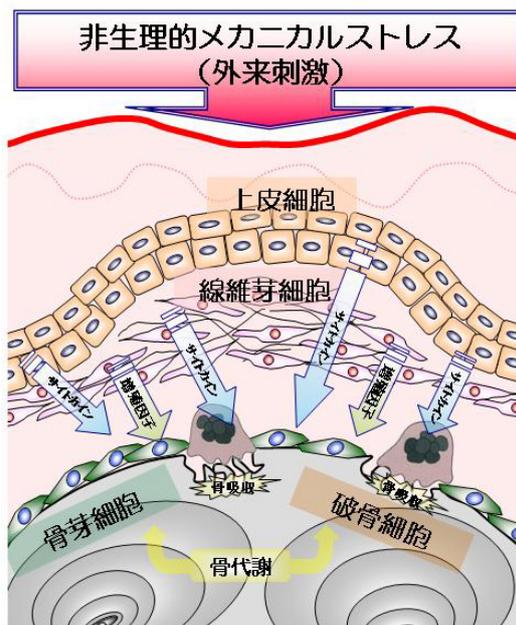
骨芽細胞および破骨細胞の分化に影響を及

ぼす可能性のある分子として、Osteopontin 由来のアミノ酸配列 SVVYGLR に着目した。この配列の合成ペプチドは、一方で骨芽細胞の接着および増殖能をインテグリン  $\alpha V \beta 3$  を介して促進し、他方で破骨細胞の分化を抑制する作用を有することが明らかとなった (2009 年 *Biomaterials* に発表)。この特性からこの合成ペプチドが骨組織再生医療へ応用できる可能性が考えられ、今後の研究発展が期待される。

#### (8) PICK1 が破骨細胞分化に及ぼす影響

Yeast Two Hybrid 法の結果、calcineurin B と結合する分子として PDZ ドメインを有する PICK1 を新規に同定した (2008 年 *Biochem Biophys Res Commun* に発表)。また、PICK1 は破骨細胞内で実際に calcineurin B と結合しており、NFAT 活性に影響を及ぼすことを明らかとした。さらに、PICK1 の PDZ ドメインは calcineurin B の C 末端配列 VDV と結合することを明らかにした。将来的にはこの配列をターゲットにしたペプチドを合成するなどの方法で、破骨細胞の分化を制御する戦略が考えられるため、本研究の成果は骨組織再生医療においても有用である可能性が考えられる。

本研究成果から、口腔粘膜は圧縮負荷によって、炎症性サイトカインや骨代謝因子の産生を亢進することが明らかとなった。また、圧縮負荷によって破骨細胞および骨芽細胞の活性も変化することから、口腔内では非生理的メカニカルストレスによって口腔粘膜が産生したサイトカイン、骨代謝因子は、粘膜直下の顎堤組織の骨代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された (図)。



また、骨代謝に関わる分子として、ハルミン

および合成ペプチド SVVTGLR を見出し、破骨細胞の分化におけるシグナル伝達系に PICK1 が関与していることを明らかにした。さらに、骨芽細胞の分化に遺伝子群の発現抑制機構およびエピジェネティクス機構の関与を示した。これらの成果は今後の骨代謝研究の発展に大いに貢献す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 6 件)

- ① Egusa H, Kaneda Y, Akashi Y, Hamada Y, Matsumoto T, Saeki M, Thakor DK, Tabata Y, Matsuura N, Yatani H: Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide SVVYGLR on osteoprogenitors and osteoclasts. *Biomaterials*, accepted. 査読有
- ② Iida T, Egusa H, Saeki M, Yatani H, Kamisaki Y: PICK1 binds to calcineurin B and modulates the NFAT activity in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375: 655-659, 2008. 査読有
- ③ Wang CJ, Iida K, Egusa H, Hokugo A, Jewett A, Nishimura I: Trabecular bone deterioration in col9a1<sup>+/-</sup> mice associated with enlarged osteoclasts adhered to collagen IX-deficient bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23: 837-849, 2008. 査読有
- ④ Itsuki Y, Saeki M, Nakahara H, Egusa H, Irie Y, Terao Y, Kawabata S, Yatani H, Kamisaki Y: Molecular cloning of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains. *FEBS Letter*, 582: 2365-2370, 2008. 査読有
- ⑤ Egusa H, Iida K, Kobayashi M, Lin TY, Zhu M, Zuk PA, Wang CJ, Thakor DK, Hedrick MH, Nishimura I: Downregulation of extracellular matrix-related gene clusters during osteogenic differentiation of human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Engineering*, 13: 2589-2600, 2007. 査読有
- ⑥ Matsumoto T, Okazaki M, Nakahira A, Sasaki J, Egusa H, Sohmura T: Modification of apatite materials for bone tissue engineering and drug delivery carriers. *Current Medicinal Chemistry*, 14: 2726-2733, 2007. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① Egusa H, Kaneda Y, Akashi Y, Kayashima H, Yatani H: Enhanced Bone Regeneration with

Bioactive Synthetic Peptide SVVYGLR. 6th Biennial Congress of Asian Academy of Prosthodontics, Apr. 25. 2009. Seoul, Korea.

- ② Egusa H: Development of high-throughput screening system for identifying osteoclastogenesis-related compounds. *87th IADR General Session*, Apr. 3. 2009. Miami, USA.
- ③ Akashi Y, Egusa H: Cyclic pressure affects cytokine production in human gingival fibroblasts. *87th IADR General Session*, Apr. 3. 2009. Miami, USA.
- ④ Kaneda Y, Egusa H, Akashi Y, Ashida S, Hamada Y, Yatani H: Bone regeneration induced by functional peptide SVVYGLR. *87th IADR General Session*, Apr. 1. 2009. Miami, USA.
- ⑤ 明石喜裕, 江草 宏: 周期的圧縮刺激によるヒト口腔粘膜細胞のサイトカイン産生: 平成 20 年度日本補綴歯科学会関西支部学術大会, 2009 年 2 月 8 日, 和歌山.
- ⑥ 土居正典, 江草 宏: Harmine の NFAT 発現増強作用: 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 2008 年 9 月 25 日, 東京.
- ⑦ 江草 宏: オープンリガンドライブラリーを用いた破骨細胞分化関連化合物のスクリーニング: 第 50 回歯科基礎医学会学術大会シンポジウム「硬組織の明るい未来を目指して」シンポジスト, 2008 年 9 月 23 日, 東京.
- ⑧ Egusa H: DNA methylation analysis of osteogenic gene promoter regions in mouse bone marrow stromal cells. *American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting*, Sep. 14, 2008. Montreal, Canada.
- ⑨ 江草 宏: 組織幹細胞分化における“Gene Pruning”およびエピジェネティクス機構: 第 6 回次世代バイオマテリアル若手研究会招待講演, 2008 年 8 月 1 日, 大阪.
- ⑩ Egusa H: Global methylation screening in mesenchymal stem cell genomes during osteogenesis. *86th IADR General Session*, Jul. 4, 2008. Toronto, Canada.
- ⑪ Ashida S, Egusa H: Bisulfite sequencing analysis of mouse osteocalcin and osteopontin promoter regions. *86th IADR General Session*, Jul. 4, 2008. Toronto, Canada.
- ⑫ Iida T, Egusa H: Involvement of calcineurin and PICK1 in RANKL-induced osteoclast differentiation. *86th IADR General Session*, Jul. 4, 2008. Toronto, Canada.
- ⑬ 金田善俊, 江草 宏, 濱田吉之輔, 矢谷博文: 機能性ペプチド SVVYGLR を用いた骨組織再生の試み: 第 117 回日本補綴歯科学会学術大会, 2008 年 6 月 7 日, 名古屋.

- ⑭ 江草 宏, 蘆田俊二, 小林宗正, 明石喜裕, 矢谷博文: マウス骨髄間質幹細胞における骨関連遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化解析: 第2回日本エピジェネティクス研究会年会, 2008年5月9日, 三島.
- ⑮ 飯田務, 江草 宏, 佐伯万騎男, 土居正典, 上崎善規, 矢谷博文: RANKLによる破骨細胞分化における calcineurin 結合タンパク質 PICK1 の関与: 第49回歯科基礎医学会学術大会 2007年8月30日, 札幌.
- ⑯ 江草 宏, 蘆田俊二, 矢谷博文: 骨髄間質細胞の骨系分化へのDNAメチル化の関与: 第25回日本骨代謝学会, 2007年7月20日, 大阪.
- ⑰ Kaneda Y, Egusa H, Hamada Y, Ashida S, Kobayashi M, Yatani H: Effects of osteopontin-derived peptide SVVYGLR on cells from mesenchymal tissues. *85<sup>th</sup> IADR General Session*, Mar.21. 2007. New Orleans, USA.
- ⑱ Egusa H, Iida K, Kobayashi M, Lin T, Wang JC, Nishimura I: Extracellular matrix gene suppression during human mesenchymal stem cell differentiation. *85<sup>th</sup> IADR General Session*, Mar.21. 2007. New Orleans, USA.

[図書] (計1件)

- ① 矢谷博文, 中村隆志, 瑞森崇弘, 石垣尚一, 山田真一, 江草 宏: 大阪大学出版会, 顎口腔機能の再建をめざして「生命歯科医学のカッティング・エッジ」米田俊之編: 2008, 167-179.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 間葉系細胞増殖促進剤およびそれを含有する骨格系生体材料

発明者: 濱田吉之輔, 江草 宏, 金田善俊, 松浦成昭, 岡崎正之

権利者: 濱田吉之輔, 江草 宏, 金田善俊, 松浦成昭, 岡崎正之

種類: 特許権

番号: 特願 2006-236970

PCT/JP2007/066756

出願年月日: 2006年8月31日

国内外の別: 国内および国外 (米国, 欧州)

[その他]

学術賞受賞

- ① Egusa H: 第6回アジア補綴歯科学会 最優秀ポスター発表賞, Asian Academy of Prosthodontics: 平成21年4月26日.
- ② Kaneda Y, Egusa H *et al.*: Arthur R. Frechette Prosthodontic Research Award Finalist, 国際歯科研究学会: 平成21年4月3日.

- ③ Akashi Y, Egusa H *et al.*: Pre-Prosthetic Regenerative Science Award for Young Investigators 2<sup>nd</sup> Place, 国際歯科研究学会: 平成21年4月3日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江草 宏 (EGUSA HIROSHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 30379078

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし