

令和 3 年 4 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17240

研究課題名(和文) 鎖骨頭蓋異形成症における易感染性と歯の移動遅延解明にむけた免疫細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of immune cells to delayed tooth movement in craniocerebral dysplasia

研究代表者

坂東 加南 (Bando, Kanan)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：20772198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：鎖骨頭蓋異形成症は骨牙細胞分化の必須転写因子であるRunx2の遺伝子変異による遺伝性疾患であり、顕著な歯の移動遅延が認められるため、矯正歯科治療が困難である。Runx2は、骨牙細胞の必須転写因子として知られているが、免疫細胞においても発現が確認されている。口腔内における免疫細胞におけるRunx2の発現については、検討されていない。そこで、歯周組織中のRunx2発現を確認したところ、樹状細胞および好塩基球にて発現が確認された。次に、Runx2発現がメカニカルストレスに影響を受けるかを検討した。樹状細胞のRunx2発現はメカニカルストレス負荷によって上昇が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鎖骨頭蓋異形成症は骨牙細胞分化の必須転写因子であるRunx2の遺伝子変異による遺伝性疾患であり、顕著な歯の移動遅延が認められるため、矯正歯科治療が困難である。本研究は、新しい視点から鎖骨頭蓋異形成症の易感染性、歯の移動遅延の原因となる免疫細胞を同定、機能解析することにより、鎖骨頭蓋異形成症の顎顔面、口腔内病態を明確にし、新たな矯正歯科治療法の開発の基盤を提供することを目的とする。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the expression of Runx2 on immune cells in the oral cavity. Runx2 is known to be an essential transcription factor for osteoblasts, but its expression has also been confirmed in immune cells, although the expression of Runx2 in immune cells in the oral cavity has not been investigated. The expression of Runx2 in periodontal tissues was confirmed in dendritic cells and basophils. Next, we examined whether Runx2 expression was affected by mechanical stress. The expression of Runx2 in dendritic cells was increased by mechanical stress.

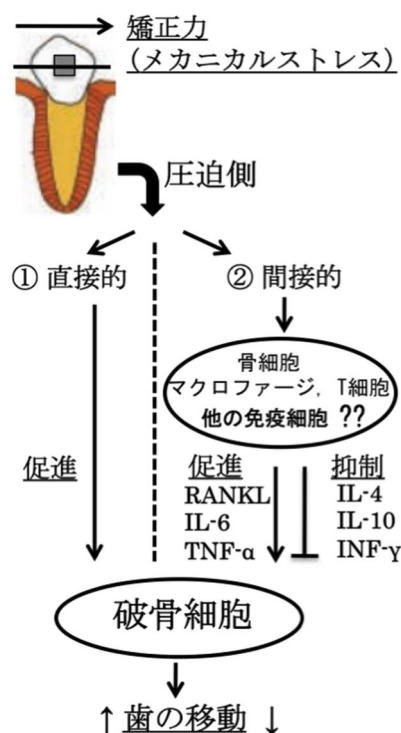
研究分野：矯正

キーワード：鎖骨頭蓋異形成症

### 1. 研究開始当初の背景

鎖骨頭蓋異形成症は遺伝性疾患であり、全身的に骨化遅延が認められ、鎖骨の低形成や泉門閉鎖の遅延、口腔内異常所見として歯の萌出遅延、乳歯晩期残存や骨格性反対咬合が認められる。そのため、「厚生労働大臣が定める先天性疾患」として矯正歯科治療に健康保険が適応され、同症患者の矯正治療の対象となる。患者は歯の移動が遅延することが知られているが、その原因は明らかになっておらず、最良の矯正治療方法は確立されていない。その一方で、同症患者の70%が反復性副鼻腔炎や反復性耳感染症に罹患しており、免疫応答が低下していることが推測されるが、その原因となる免疫細胞は特定されていない。

近年、関節リウマチや歯周病で見られる炎症性骨破壊での骨代謝に影響を及ぼす免疫系の関与「骨免疫学」が注目されている(Takayanagi et al, Nature 2000)。矯正的歯の移動における破骨細胞形成は、メカニカルストレスが直接作用する経路(図1)、歯周組織にサイトカインが発現し、間接的に作用する経路(図1)の双方が非常に重要である。申請者グループは、Runx2ヘテロノックアウトマウスにおけるメカニカルストレス応答による解析をすすめ新しい知見をえた。その一方で、免疫系についてはだれも報告していない。サイトカインの産生細胞についても、骨細胞、T細胞やマクロファージなどの関与が推測されているが、それ以外の免疫細胞における報告はない。



### 2. 研究の目的

本研究では、鎖骨頭蓋異形成症患者の易感染性に伴う免疫機能の異常と歯の移動遅延の解明にむけ、新しい視点から歯の移動に伴う破骨細胞への免疫系の関与を明らかにすることにより、同症の病態解明をめざし、最良の歯科矯正と易感染性への治療法を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫細胞における Runx2 発現解析

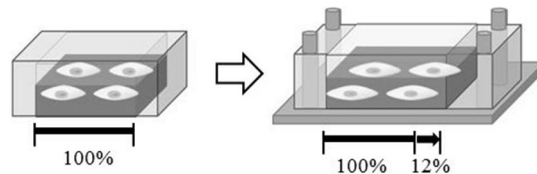
Runx2は、骨芽細胞の必須転写因子として知られているが、免疫細胞においても形質細胞様樹状細胞(pDC)、好塩基球、natural killer (NK)細胞において発現が確認されている。pDCについては、Runx2により分化、サイトカイン産生を制御するとの報告があるが(Sawai et al, JEM 2013)、好塩基球とNK細胞はともに、様々なサイトカイン産生し(IL-4,IL-6, IFN-γなど)、アレルギーやウイルス感染防御に対して重要な細胞であることが知られているが、Runx2の影響については明らかになっていない。そこで、これら細胞を含む免疫細胞(T細胞、B細胞、好中球、マクロファージ、好酸球など)のRunx2発現をreal time PCR法にて確認した。

## (2) 歯周組織からの細胞単離

歯周組織を採取し、コラゲナーゼ(RPMI1640, 10%FCS, 1mg/ml collagenase、0.1mg/ml Dnase)にて37℃, 1時間処理した。その後、PBS洗浄を2回行い、70um cell strainerにて細胞を単離した。細胞染色は、FcRをプロッキングし(10ug/ml)、その後、各抗体 (CD45, CD11b, CD11c, c-kit, FcεR1, B220, PDCA1, 5ug/ml)にて、30分間氷上にて染色した。洗浄後に、1ug/ml DAPIにて死細胞染色を行った。その後、FACS Ariaにて、各細胞をソーティングした。

## (3) In vitro において伸展力や圧縮力メカニカルストレスによる免疫細胞の影響

マウスから免疫細胞を分離し、これまでの研究に使用した再現性のあるオリジナルの装置を用いたシリコンチャンバーを一方向的に12%進展させた。過去の報告にて、有限要素解析にて、ヒトの上顎中切歯に物理的に力をかけて歯を水平的に移動させると、歯根膜が8-25%進展され、歯根中央部の歯根膜にかかる伸展率は12%であることから、本研究では伸展率12%で行った。伸展力メカニカルストレスを負荷後、RNAを抽出し、Runx2発現をreal time PCR法を用いて比較検討を行う。



## (4) 矯正的歯の移動

ニッケルチタンワイヤー (0.014インチ)を上顎切歯に装着して固定源とし、上顎右側第一臼歯を頬側から口蓋側に移動させる。

歯の移動距離は、シリコン印象後に石膏模型にて測定または、CT撮影後にて、第一臼歯の幅径を測定する。

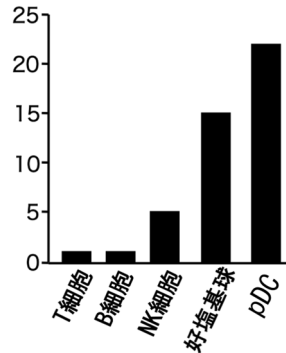


## (5) 細胞枯渇

好塩基球を枯渇するため、Ba103抗体およびコントロール抗体を静脈注射する。

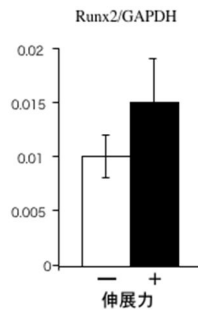
### (1) Runx2 発現免疫細胞の解析

歯周組織から各免疫細胞 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞、好塩基球、pDC )をソーティングし、RNeasyMini kit にて RNA を抽出し、real time PCR 法を用いて比較検討した。好塩基球、pDC 細胞は、T 細胞、B 細胞と比較して、それぞれ 15 倍、20 倍、Runx2 の発現が高かった。



### (2) In vitro において伸展力メカニカルストレスによる免疫細胞の影響

伸展力メカニカルストレスにより、骨芽細胞の Runx2 発現が上昇することが知られている。そこで、今回は、好塩基球において、伸展力メカニカルストレスが Runx2 発現に影響をあたえるかを検討した。Runx2 発現は、伸展力負荷 4 時間後に測定したところ、発現の上昇が認められた。



### (3) 免疫細胞が矯正歯の移動にあたえる影響

Ba103 抗体およびコントロール抗体を静脈内投与し、好塩基球を枯渇し、矯正歯の移動をおこなったところ、歯の移動量に差は認められなかった。また、歯周組織中の好塩基球をフローサイトメトリー解析したところ、枯渇されていなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Endo Yasuo, Funayama Hiromi, Yamaguchi Kouji, Monma Yuko, Yu Zhiqian, Deng Xue, Oizumi Takefumi, Shikama Yosuke, Tanaka Yukinori, Okada Satoru, Kim Siyoung, Kiyama Tomomi, Bando Kanan, Shima Kazuhiro, Suzuki Hikari, Takahashi Tetsu.	4. 巻 140
2. 論文標題 Basic Studies on the Mechanism, Prevention, and Treatment of Osteonecrosis of the Jaw Induced by Bisphosphonates.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 63-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuroishi Toshinobu, Bando Kanan, Bakti Reiska kumala, Ouchi Gaku, Tanaka Yukinori, Sugawara Shunji.	4. 巻 10
2. 論文標題 Migratory dendritic cells in skin-draining lymph nodes have nickel-binding capabilities.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 5050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61875-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Bando Kanan, Kuroishi Toshinobu, Sugawara Shunji, Endo Yasuo.	4. 巻 49
2. 論文標題 interleukin-1 and histamine are essential for inducing nickel-allergy in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Allergy	6. 最初と最後の頁 1362-1373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cea.13467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Hikari, Bando Kanan, Tada Hhiroyuki, Kiyama Tomomi, Oizumi Takefumi, Funayama Hiromi, Sugawara Shunji, Takahashi Tetsu, Endo Yasuo.	4. 巻 42
2. 論文標題 Augmentation of Lipopolysaccharide-Induced Production of IL-1 and IL-1 in Mice Given Intravenous Zoledronate (a Nitrogen-Containing Bisphosphonate) and Its Prevention by Clodronate (a Non-nitrogen-containing Bisphosphonate).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 164-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00408.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tada Hiroyuki, Nishioka Takashi, Takase Aya, Numazaki Kento, Bando Kanan, Matsushita Kenji.	4. 巻 21
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis induces the production of interleukin-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Microbiology	6. 最初と最後の頁 e12792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.12972.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------	---------