

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791564

研究課題名（和文） 牽引側の骨形成・石灰化過程におけるマトリックスベジクルの役割

研究課題名（英文） Role of matrix vesicle in orthodontic tooth movement.

研究代表者

大久保 和美 (OHKUBO KAZUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 10396715

研究成果の概要：

マウス骨細胞由来の細胞株 MLO A5 を血清存在下で培養し、グリセロリン酸およびアスコルビン酸を添加して石灰化を誘導した。単離した基質小胞を抗原として SPF で飼育したラット (WKY/NCrj) の足部に皮下注射後、3 週で腹部大動脈リンパ節を摘出し、B 細胞を単離し、ミエローマ細胞を PEG で融合させ、約 100 万種類のハイブリドーマ細胞を作製した。この中から、基質小胞に特異的な物質を認識する抗体を産生するものを選択する目的で一次スクリーニングを行った。すなわち、対照として、同じく T 抗原を遺伝子導入した遺伝子改変マウスの長幹骨由来の骨細胞より樹立した細胞株で、逆に基質小胞を分泌せず石灰化も生じない MLO Y4 細胞を使用し、ELISA 法を用いて、MLO A5 に結合するが MLO Y4 には結合しない有望なハイブリドーマ細胞を複数同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

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：歯科矯正、石灰化、骨形成

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞による初期石灰化は、骨芽細胞から細胞外基質へ分泌される基質小胞で開始される。しかし、基質小胞における石灰化の分子機構は依然として不明な点が多く残されている。本研究では、高石灰化能を有する骨細胞株 MLO A5 を使用する。この骨細胞株 MLO A5 は、加藤らによって樹立されたもので

あり(Kato et al. J Bone Miner Res 2001)、細胞の石灰化条件、細胞の微細形態学解析、基質小胞の分泌条件、あるいは基質小胞の単離方法などは、すでに検討されているが、同細胞より基質小胞を単離し、基質小胞に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製する手法を用いて、基質小胞に特異的な物質の同定を行い、生物学石灰化機構の解明を試み

る点は、これまで全く報告がない。基質小胞特異物質の局在解析においては、同定された因子の発現、局在パターンの解析は Real time RT-PCR 法などの分子生物学的解析法や、in situ hybridization 法や免疫組織化学、免疫電顕法などの形態学的解析法を駆使した多角的な解析を行い、また、基質小胞特異物質が同定された後は、特異抗体を用いたプロテオソーム解析、標的蛋白のアミノ酸配列の決定、およびアミノ酸配列からの遺伝子クローニングを予定しているため、これらの知見は全て新規の報告となる。

さらに本研究は、同物質の局在、発現を歯の移動実験モデルで検索し、歯の移動における骨形成機構の解明を試みる。牽引側の骨形成機構の一端が明らかになれば、歯槽骨改変現象を利用した歯科矯正学に貴重な知見をもたらすものと予想され、他の施設では行われていない独創的な研究になると思われる。

また、骨の石灰化は、骨が有する最大の特質である剛性を、骨自身に与えるという点で、骨の本質的な機能である。そのため、本研究の知見は、歯の移動の機序解明や歯科矯正治療法の開発に貢献するだけでなく、骨形成機構の根本的解明につながる重要な情報を提供すると思われる。さらに、本研究で同定される因子は、石灰化および骨形成を強力に促進することが予想される。石灰化、骨形成を促進する代表的な生理活性物質としては、Bone Morphogenetic protein(BMP)が最も有名であり、様々な研究が行われ、マウスやラットなどのげっ歯類を用いた実験レベルでは、非常に強力な骨形成効果を有することが示されている。しかし、その他の動物を用いた実験では、その生体内での骨形成効果は必ずしも安定してはいない。また、実際行われている臨床応用例としては、欧米での、整形外科領域における限定された疾患（脊椎固定、遷治癒骨折治療）の治療に用いられている。しかし、ヒトにおける骨形成効果を期待するには、現在のタンパクデリバリー法では、非常に高濃度の BMP 投与が必要であり、副作用を惹起する可能性を否定出来ない。本研究で同定される物質は、これらの問題点を解消しうる性能を有する可能性があり、従来の生体材料あるいは生理活性物質ではなしえなかったような骨再建・再生法が可能になると思われる。

2. 研究の目的

(1) 矯正治療における歯の移動は、圧迫側での破骨細胞による骨吸収と、牽引側での骨芽細胞による骨形成とが同期して進行する。したがって、骨改変現象の促進的制御が可能になれば、効率よく、しかも安全に歯の移動を行うことが出来るようになる。

歯科矯正学分野では、これまでも骨代謝因

子と歯の移動との関係について数多くの研究が報告されて来ている。特に歯の移動時における圧迫側の骨吸収に関しては、破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への分化制御機構、成熟破骨細胞の機能活性化制御機構、といった骨吸収機構の本質的事項について、NFATc1、RANKL、IL-1、PGE2などの分子の関与が指摘され、重要な発見が次々になされてきた。その結果、圧迫側の骨吸収については、多くの知見が得られ、歯科矯正学での将来的臨床応用につながる成果も存在する。一方、牽引側の骨形成機構に関して見てみると、骨形成という現象が移動後の歯の支持構造を形成する上で不可欠な過程であるにも関わらず、その内容は、十分に研究されてきたとは言いがたい。すなわち、本研究の目的は、歯移動時の歯槽骨改変現象の一翼を担う牽引側骨形成において、その起点となる石灰化機構に着眼し、歯の移動における骨形成機構の解明することである。

(2) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

上述のように、本研究では、歯移動時の歯槽骨改変現象の一翼を担う牽引側骨形成において、その起点となる石灰化機構に着眼し、歯の移動における骨形成機構を解明することを目的とする。その目的を達成するための具体的検討項目として、

高石灰化細胞株 MLO-A5 より基質小胞を単離し、基質小胞に対する特異抗体を作製する

特異抗体を用いて基質小胞特異物質を同定する

生体内における基質小胞特異物質の発現・局在を解析する

歯の移動実験モデルにおいて基質小胞特異物質の発現・局在を解析する

以上を本研究期間内において、明らかにする。

(3) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義
骨芽細胞による初期石灰化は、骨芽細胞から細胞外基質へ分泌される基質小胞で開始される。

しかし、基質小胞における石灰化の分子機構は依然として不明な点が多く残されている。本研究では、高石灰化能を有する骨細胞株 MLO-A5 を使用する。この骨細胞株 MLO-A5 は、加藤らによって樹立されたものであり(Kato et al. J Bone Miner Res 2001)、細胞の石灰化条件、細胞の微細形態学解析、基質小胞の分泌条件、あるいは基質小胞の単離方法などは、すでに検討されているが、同細胞より基質小胞を単離し、基質小胞に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製する手法を用いて、基質小胞に特異的な物質の同定を行い、生物学石灰化機構の解明を試みる点は、

これまで全く報告がない。基質小胞特異物質の局在解析においては、同定された因子の発現、局在パターンの解析は Real time RT-PCR 法などの分子生物学的解析法や、in situ hybridization 法や免疫組織化学、免疫電顕法などの形態学的解析法を駆使した多角的な解析を行い、また、基質小胞特異物質が同定された後には、特異抗体を用いたプロテオソーム解析、標的蛋白のアミノ酸配列の決定、およびアミノ酸配列からの遺伝子クローニングを予定しているため、これらの知見は全て新規の報告となる。

さらに本研究は、同物質の局在、発現を歯の移動実験モデルで検索し、歯の移動における骨形成機構の解明を試みる。牽引側の骨形成機構の一端が明らかになれば、歯槽骨改変現象を利用した歯科矯正学に貴重な知見をもたらすものと予想され、他の施設では行われていない独創的な研究になると思われる。

また、骨の石灰化は、骨が有する最大の特質である剛性を、骨自身に与えるという点で、骨の本質的な機能である。そのため、本研究の知見は、歯の移動の機序解明や歯科矯正治療法の開発に貢献するだけでなく、骨形成機構の根本的解明につながる重要な情報を提供すると思われる。さらに、本研究で同定される因子は、石灰化および骨形成を強力に促進することが予想される。石灰化、骨形成を促進する代表的な生理活性物質としては、Bone Morphogenetic protein(BMP)が最も有名であり、様々な研究が行われ、マウスやラットなどのげっ歯類を用いた実験レベルでは、非常に強力な骨形成効果を有することが示されている。しかし、その他の動物を用いた実験では、その生体内での骨形成効果は必ずしも安定してはいない。また、実際行われている臨床応用例としては、欧米での、整形外科領域における限定された疾患（脊椎固定、遷治癒骨折治療）の治療に用いられている。しかし、ヒトにおける骨形成効果を期待するには、現在のタンパクデリバリー法では、非常に高濃度の BMP 投与が必要であり、副作用を惹起する可能性を否定出来ない。本研究で同定される物質は、これらの問題点を解消しうる性能を有する可能性があり、従来の生体材料あるいは生理活性物質ではなしえなかったような骨再建・再生法が可能になると思われる。つまり、本申請が実現すれば、歯科学のみならず、医学や細胞生物学にも多大な貢献ができると確信される。

3. 研究の方法

石灰化の起点となる基質小胞に対する特異抗体の作製 T 抗原を遺伝子導入した遺伝子改変マウスの長幹骨由来の骨細胞より樹立し、高石灰化能を有し、大量の基質小胞(matrix

vesicle, MV)を分泌することが知られている細胞株 murine long bone osteocyte(ML0) A5 を用いて、以下の方法により基質小胞の単離と特異物質同定を行う。

ML0 A5 を血清存在下で培養し、グリセリン酸およびアスコルビン酸を添加して石灰化を誘導する。石灰化誘導条件において細胞は、基質小胞を大量に分泌する。シャーレ上で培養した ML0 A5 および産生された基質を 0.25%トリプシンで処理し、細胞を遠沈した後、培養上清を高速回転(100,000g)で遠心し、基質小胞を単離する。

単離した基質小胞を、抗原としてコンプライートアジュバンと混和し、SPF で飼育したラット(WKY/NCrj)の足部に皮下注射する。抗原注射後、3週で腹部大動脈リンパ節を摘出し、B細胞を単離する。単離したB細胞とミエローム細胞をPEGで融合させ、おおよそ100万種類のハイブリドーマ細胞を作製する。

作製したハイブリドーマ細胞の中から、基質小胞に特異的な物質を認識する抗体を産生するものを選択する。一次スクリーニングとして、ハイブリドーマ細胞の中から、ML0 A5 と特異的に結合する抗体を産生する細胞を選抜する。すなわち、対照として、同じくT抗原を遺伝子導入した遺伝子改変マウスの長幹骨由来の骨細胞より樹立した細胞株で、逆に基質小胞を分泌せず石灰化も生じない ML0 Y4 細胞を使用する。ELISA 法で、ML0 A5 に結合し、ML0 Y4 には結合しないハイブリドーマ細胞を選抜する。二次スクリーニングとして、モノクローナル抗体を用いたマウス胎仔組織切片において免疫染色を行い、骨の石灰化部位を特異的に染色する抗体を選抜する。胎生 18.5 日齢マウス胎仔の whole body の凍結切片を作製し、作製したモノクローナル抗体を一次抗体とし、二次抗体としては HPR 標識抗マウス IgG 抗体を用いて、免疫組織化学を行う。

三次スクリーニングでは、免疫電顕法で基質小胞と結合する抗体を産生する細胞を選抜する。胎生 18.5 日齢マウス胎仔の頭蓋骨非脱灰樹脂超薄切片を作製し、モノクローナル抗体を一次抗体とし、二次抗体としては金粒子標識抗マウス IgG 抗体を用いて、post-embedding 免疫電顕法を行う。

4. 研究成果

以下の流れで石灰化の起点となる基質小胞に対する特異抗体の作製を試みた。基質小胞の単離と特異物質同定には、高石灰化能を有するマウス骨細胞由来の細胞株 ML0 A5 を用いた。同細胞株は、T 抗原を遺伝子導入した遺伝子改変マウスの長幹骨由来の骨細胞より樹立し、高石灰化能を有し、大量の基質小胞(matrix vesicle, MV)を分泌することが知られているが、この ML0 A5 を血清存在下で

培養し、グリセロリン酸およびアスコルビン酸を添加して石灰化を誘導した。本石灰化誘導条件において細胞は、基質小胞を大量に分泌したが、シャーレ上で培養した MLO A5 および産生された基質を 0.25%トリプシンで処理し、細胞を遠沈した後、培養上清を高速回転(100,000g)で遠心し、基質小胞を単離した。次いで、単離した基質小胞を抗原として SPF で飼育したラット(WKY/NCrj)の足部に皮下注射した。抗原注射後、3 週で腹部大動脈リンパ節を摘出し、B 細胞を単離し、単離した B 細胞とミエローム細胞を PEG で融合させ、おおよそ 100 万種類のハイブリドーム細胞を作製した。現在は、作製したハイブリドーム細胞の中から、基質小胞に特異的な物質を認識する抗体を産生するものを選択する目的で一次スクリーニングを行っている。すなわち、対照として、同じく T 抗原を遺伝子導入した遺伝子改変マウスの長幹骨由来の骨細胞より樹立した細胞株で、逆に基質小胞を分泌せず石灰化も生じない MLO Y4 細胞を使用し、ELISA 法を用いて、MLO A5 に結合するが MLO Y4 には結合しない有望なハイブリドーム細胞を複数同定し、現在、詳細に解析中である。

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2件)

1. Mitsuyoshi Iino, Masayuki Fukuda, Hirokazu Nagai, Yoshiyuki Hamada, Hiroyuki Yamada, Kazutoshi Nakaoka, Yoshiyuki Mori, Daichi Chikazu, Hideto Saijyo, Ichiro Seto, Kazumi Ohkubo, Tsuyoshi Takato
Evaluation of 15 mandibular reconstructions
DUMBACH TAITAN Mesh System and particulate cancellous bone and marrow harvested from bilateral posterior ilia
2. 日本人片側性口唇口蓋裂患者における 5-Year-Old Index を用いた咬合評価 ;
Assessment of the Dental Arch Relationship using the 5-Year-Old Index in Japanese Patients with Unilateral Cleft Lip and Palate : 須佐美隆史, 鳥山宏之, 和田満美子, 大久保和美, 松崎雅子, 仲宗根愛子, 荻原祐二, 森良之, 米原啓之, 高戸毅 ; 日本口蓋裂学会雑誌 Vol.32, No.1, Page34-42

[学会発表](計3件)

1. 片側顎裂に対する二次的骨移植後の長期結果と顎裂部の咬合処置 ; 大久保和美, 須佐美隆史, 松崎雅子, 仲宗根愛子, 森良之, 米原啓之, 近津大地, 西條英人, 長谷川義道,

富塚健, 大木明子, 引地尚子, 高戸毅 ; 第31回 日本口蓋裂学会総会・学術集会 ; 平成19年5月24・25日@草津

2. ヘミフェイシャルマイクロソミアの症状発現とその咬合 ; 大久保和美, 須佐美隆史, 松崎雅子, 西條英人, 森良之, 米原啓之, 高戸毅 ; 第25回 日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会 ; 平成19年11月8・9日@東京

3. 顎口腔機能と顎変形症の治療計画 - OSASとTMJを中心に - 顔面非対称を呈する顎変形症と顎関節 ; 大久保和美, 須佐美隆史 ; 第18回日本顎変形症学会総会 イブニングシンポジウム ; 平成20年6月17-18日@名古屋

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

大久保 和美 (OHOKUBO KAZUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 10396715

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし