

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06321・19K21405

研究課題名(和文) 骨細胞におけるメカニカルストレス応答性のRANKL発現制御因子の探索

研究課題名(英文) RANKL expression in response to mechanical stress in osteocyte

研究代表者

庄司 あゆみ (Shoji, Ayumi)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60826254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞は外部刺激および骨系細胞の活動を感知し代謝を司るメカノセンサーとしての役割が注目されている。骨細胞由来のRANKLが骨代謝に重要な役割を示すことが報告され、我々は矯正力負荷時は骨細胞がRANKL主要発現細胞として機能することを明らかにした。しかし、メカニカルストレスに応答した骨細胞におけるRANKL発現の制御機構は不明である。本研究では、マウス骨細胞様細胞株(ML0-Y4)へのメカニカルストレス(流体剪断応力; FFSS)付与の実験系の構築に成功し、RT-PCRでのRANKL, OPG, Opmなどの発現を確認を継続している。今後は更に実験を行いより精度の高い結果を出していきたいと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究での矯正力(=メカニカルストレス)を感受・応答する骨リモデリング分子の同定とその制御機構の解明は、骨の動的な恒常性とその破綻により発症する疾患を新たな枠組みで理解することを可能にする。マウス骨細胞様細胞株(ML0-Y4)へのメカニカルストレス(流体剪断応力; FFSS)付与の実験系の構築により、今後の矯正歯科治療における新たな治療法開発の分子的基盤の確立につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Osteocytes, the most numerous cells in bone, are stellate-shaped cells enclosed within a bone lacunocanalicular network and have been shown to function as mechanosensory cells in bone. Osteocyte-derived RANKL plays a crucial role in the regulation of osteoclastogenesis during orthodontic tooth movement. Although osteocytes have been thought to be the functional regulator in orthodontic tooth movement, it is not well-understood how they contribute to the alveolar bone remodeling via orthodontic force. In this study, I established a loading method to add mechanical stress (Fluid flow shear stress; FFSS) on ML0-Y4, continue to confirm RANKL, OPG, Opm expression by using RT-PCR.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯の移動 骨細胞 RANKL

## 1. 研究開始当初の背景

骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によって動的な恒常性を保ちながら常に作り替えられている。この再構築現象は「骨リモデリング」と呼ばれ、骨組織の強度とミネラル代謝などの機能の維持に重要である。骨細胞は骨基質中に埋入した細胞であり、骨組織中に最も豊富に存在する。骨細胞は骨細管中に細胞突起を伸展し、これらがギャップ結合によって連結することで細胞間ネットワークを形成している。このネットワーク構造は力学刺激の受容と細胞間の情報伝達に適しているとされており、骨細胞のメカノセンサーとしての役割が注目されている。

矯正学的な歯の移動過程において、歯根周囲の歯槽骨では緻密に制御された骨リモデリングが起こる。矯正力負荷時の力学的刺激は歯周組織構成細胞を刺激し、歯槽骨の圧迫側では骨吸収を、牽引側では骨形成を誘導する。圧迫側での骨吸収を担う破骨細胞の分化には RANKL 発現細胞による支持が必須であり、RANKL や RANK を欠損するマウスは破骨細胞の欠如により重度の大理石骨病および歯の萌出不全を呈する。

これまで、矯正力負荷にตอบสนองして RANKL を産生し、破骨細胞による骨吸収とそれに伴う歯の移動を制御する主要な細胞について検討してきた。歯周組織構成細胞を単離する新規分画系を確立し、野生型マウスの歯周組織における RANKL 発現を解析した結果、歯根膜細胞や骨芽細胞と比較し、骨細胞で RANKL の高い発現が見出された。さらに骨細胞由来の RANKL の作用を生体レベルで明らかにするため、骨細胞特異的 RANKL 欠損マウス (Tnfsf11flox/Dmp1-Cre) での歯の移動実験を行ったところ、対照群 (Tnfsf11flox/+ Dmp1-Cre) と比較して、移動量が有意に低下し、圧迫側における TRAP 陽性の破骨細胞数が減少していた。以上の結果から申請者は、矯正力に伴う骨吸収において、骨細胞が、歯槽骨のリモデリングを制御する RANKL の主要な発現細胞であることを初めて示した。

周囲を骨基質に囲まれるというその特徴から、その機能や力学刺激応答特性を検証することは困難であった。近年、様々なモデル動物の確立によってその機能が明らかになってきている。圧迫側における骨細胞からのシグナル因子としては、OPN, MEPE, CTGF の様な、破骨細胞分化および活性化を起こすカタボリックなシグナルが報告されており、これら因子が RANKL 発現に関与する可能性がある。骨細胞の力学刺激感知機構として、体幹の骨や *in vitro* の実験系においては骨組織の歪みに伴う骨基質や骨細胞自身の変形<sup>4)</sup>、骨小腔と骨細管系内に生じると考えられる間質液流、静水圧<sup>5)</sup>などが提唱されている。代表的な力学負荷系の一つである Fluid flow shear stress (流体剪断応力) では、応力によってもたらされた変形が、骨基質や骨細胞自身の変形を生じるとともに、骨小腔と骨細管系内をとりまく細胞外液に流れを生じ、電気的・生化学的シグナルに変換、ギャップ結合を介した細胞間ネットワークを介して伝達されるとの報告がある。骨細胞の矯正力への応答にも同様なメカニズムが考えられ、また Opn などの関与が報告されているが、網羅的な解析に乏しくその詳しい機序については不明な点が多い。

<参考文献>

- 1) Xiong et al., Nat Med. 2011
- 2) Nakashima et al., Nat Med. 2011
- 3) Shoji-M et al., Scientific Reports. 2017
- 4) Nicoletta et al., J.of Biomechanics. 2006
- 5) Anderson and Knothe Tate, J.of Biomechanics. 2008

## 2. 研究の目的

当該分野において、本研究は *in vitro* および *in vivo* の実験系を用い力学負荷時の骨細胞の機能解析および発現変動遺伝子を解明することを特色とし、メカニカルストレス応答性の骨細胞の RANKL 発現制御因子を同定する独創的な研究といえる。自らが歯周組織構成細胞の新規分画モデルを作出してきた経験を生かし、骨細胞とメカニカルストレス応答に関わる候補遺伝子を明らかにする。本研究で明らかになる矯正力(=メカニカルストレス)を感受・応答する骨リモデリング分子の同定とその制御機構の解明は、骨の動的な恒常性とその破綻により発症する疾患を新たな枠組みで理解することを可能にする。本課題は、矯正歯科治療における新たな治療法開発の分子的基盤の確立につながることを期待して取り組む研究である。

## 3. 研究の方法

本研究は研究期間を2年間とし、*in vitro* および *in vivo* の実験系を用いて検討を行う。

<*in vitro*>

骨細胞のメカニカルストレス応答性の因子を検討する目的で、様々な力学的条件下におけるマウス骨細胞様細胞株 ML0-Y4 の機能解析を行う。力学的負荷には培養細胞伸展器もしくは遠心力を利用した Fluid flow による shear stress を用いる。RANKL の発現に関しては、RANKL の蛍光標識融合タンパク質を発現するプラスミドを細胞に遺伝子導入することで、蛍光標識にてトラッキングを行い、RANKL 発現の前後で発現の増加および減少のみられる候補遺伝子の同定

を、GeneChip を用いたマイクロアレイおよびゲノムワイドなスクリーニングとプロテオーム解析を展開し試みる。得られた候補遺伝子の機能を明らかにするために、強制発現・ノックダウンの系を用いたメカニズム解析を行う。

<in vivo>

In vitro の結果を基に、マウスの矯正力負荷モデルを用いて候補遺伝子の中和抗体実験を行い、マイクロ CT による歯の移動量測定や骨構造解析、HE 染色や TRAP 染色などの組織学的解析を実施し、候補遺伝子の生体における RANKL 発現制御機構を in vivo で解明する。

#### 4 . 研究成果

矯正力負荷時の骨細胞の動態を細胞レベルで確認する為、骨細胞への、流体剪断応力 (FFSS) を用いた力学刺激付与実験の構築を行った。マウス骨細胞様細胞株 (ML0-Y4) を、type1 collagen コートディッシュに播種し、5%FBS, 5%CS, 1%ペニシリンストレプトマイシンを添加した  $\alpha$ -MEM にて培養した。FFSS は電磁式オービタルシェーカーを用い、120rpm の回転速度にて CO2 インキュベーター内で遠心力を付与した。

実験のタイムコースとして、FFSS 付与開始 48hr 前に ML0-Y4 を  $2 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> となる様 播種し、FFSS 付与 0hr をコントロール群、FFSS 付与 3 時間を FFSS3 群、6 時間を FFSS6 群とし、各力学負荷終了後細胞を回収し RT-PCR にて遺伝子発現解析を行った。RT-PCR にて RANKL, OPG, Opn などの発現を確認したが、メカニカルストレス 付与方法の選定、FFSS での実験系の構築に時間を費やしたため現段階において 3 群間での比較は困難であった。今後は PGE2 receptor、ER、PTH receptor (type1)、CTGF 等の発現も確認していく予定であり、それぞれの実験を継続的に遂行することにより、有意差の得られる明確な実験結果を獲得する。そのデータを用いて、国内のみならず、国外の学会への発表を行うと同時に、論文の作製および投稿を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 庄司あゆみ
2. 発表標題 歯の矯正学的移動に伴う骨細胞におけるRANKL発現
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuji M, Shoji A, Hirabayashi K, Kobayashi Y, Moriyama K
2. 発表標題 Analysis of dentocraniofacial morphology in patients with achondroplasia
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会・The 13th World Congress of International Cleft Lip and Palate oundation CLEFT 2019 ICPF合同学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横内里帆、小倉健司、庄司あゆみ、中島すみか、辻美千子、松本力、森山啓司
2. 発表標題 トリーチャー・コリンズ症候群患者の頭蓋顎顔面形態と上気道
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上貴裕、庄司あゆみ、小倉健司、狩野桜子、佐川夕季、小林起穂、辻美千子、松本力、森山啓司
2. 発表標題 トリーチャー・コリンズ症候群患者の下顎骨における antegonial notchの形態に関する検討
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogura K, Kobayashi Y, Hikita R, Shoji A, Tsuji M, Moriyama K
2. 発表標題 Analysis of palatal morphology of craniosynostosis patients: Comparison between Apert syndrome and Crouzon syndrome
3. 学会等名 The 11th Asian Pacific Orthodontic Conference(APOC 2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 庄司あゆみ、辻美千子、木下由紀子、小倉健司、小林起穂、鈴木聖一、森山啓司
2. 発表標題 口腔顎顔面領域の筋機能異常を有する先天異常疾患患者に対する口腔筋機能療法の試み
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 庄司あゆみ、辻美千子、木下由紀子、小倉健司、小林起穂、三浦佳子、葛西美樹、鈴木聖一、森山啓司
2. 発表標題 ダウン症候群患者における口腔筋機能療法に関する検討
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----