

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24130

研究課題名(和文) 圧迫力と炎症性因子が破骨細胞による骨芽細胞の機能調節に及ぼす影響についての研究

研究課題名(英文) Compression force and inflammatory factors on the functional regulation of osteoblasts by osteoclasts

研究代表者

松生 理恵子 (MATSUIKE, Rieko)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：10844219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：圧迫力は矯正器具を介し持続的に負荷されている。破骨細胞及び骨芽細胞は互いに作用しあい、骨のリモデリングにおいて重要な役割をしている。セマフォリン4D破骨細胞から放出され骨芽細胞におけるRANK受容体を抑制することで骨形成に抑制的に働く。本研究では破骨細胞に対し培地量を増加させることで持続的圧迫力を負荷し、Sema4Dに対する影響について調べた。TRAP陽性細胞は圧迫力の負荷に比例し、増加したが、Sema4Dの遺伝子発現はそれに反比例し減少した。これにより矯正治療の持続的圧迫力の負荷は破骨細胞におけるSema4Dの減少を介して骨形成を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リュウマチや歯周病などに認められる炎症性の骨破壊、ならびに骨粗鬆症など加齢に伴う骨吸収は、患者のQOLを著しく低下させるため、活発な研究が行われている。機械的刺激は、骨芽細胞のみならず骨表層で骨吸収を担う破骨細胞にも負荷される。我々はこれまでに、持続的な圧迫力が破骨細胞に対し促進的に働くことを明らかにした。本研究では、圧迫力が破骨細胞による骨芽細胞の機能調節に及ぼす影響について調べた。これにより持続的な圧迫力が、破骨細胞におけるSema4Dの発現の減少を介し、骨芽細胞に対して促進的に影響することを明らかにした。これにより持続的な圧迫力が骨代謝を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Compression force (CF) is continuously applied to alveolar bone via orthodontic appliances. Osteoclast and osteoblast plays an important role in bone remodeling. Semaphorin 4D (Sema4D) derived from osteoclasts suppresses bone formation via its RANK in osteoblast. In the present study, we examined the effects of continuous stimulation of CF on Sema4D expression in osteoclast-like RAW264.7 cells. The cells were continuously stimulated by CF, which was generated by increasing the volume of culture medium in the wells of a 96-well plate, in the presence of RANKL for 4 days. The number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) positive multinuclear cells was increased, whereas Sema4D expression was decreased by application of 0.6 and 1.1 g/cm² CF as compared to 0.3 g/cm² CF. Continuous application of CF suppressed Sema4D expression, suggesting that suppressive effects of Sema4D via osteoclast on osteoblastic bone formation might be diminished during orthodontic treatment.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正学 破骨細胞 メカニカルストレス 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

運動や日常動作に伴う機械的刺激は、骨代謝に影響を及ぼす。口腔においては、歯科矯正力が歯根と歯根膜を介して歯槽骨に伝わり、圧迫側では骨吸収が、牽引側では骨形成が促進して歯が移動することが知られている。また、歯周病は、歯周病原菌感染に起因する炎症性骨吸収を主症状とし、食片圧入や歯ぎしりに伴う力が骨吸収を修飾する。

骨芽細胞は高い骨形成能を有し、骨リモデリングにおける骨形成の主要な役割を担う。一方、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞が融合して形成される破骨細胞は、骨の無機質の溶解を担う H^+ や有機質を水解するプロテアーゼを分泌し、骨吸収に特化した機能を有する。骨芽細胞は破骨細胞分化促進因子 receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) とそのおとり受容体である osteoprotegerin を産生して、破骨細胞の分化と骨吸収機能を調節する役割も有している。培養骨芽細胞を用いた研究では、様々な種類と強さの機械的刺激の影響が検討されており、歯科矯正治療を想定した適度な圧迫力や牽引力は、骨芽細胞の分化を誘導して骨形成機能を高める一方で、過度に強い力はこれらを抑制するだけでなく、RANKL の産生増加と osteoprotegerin の産生低下を招いて、破骨細胞性骨吸収を促進させることが明らかにされている。

2. 研究の目的

最近、破骨細胞が骨吸収を担うだけでなく、骨芽細胞の分化と骨形成機能に影響するとの知見が散見される。すなわち、破骨細胞は、骨形成に抑制的に作用する Semaphorin 4D (Sema4D) と促進的に作用する Complement component 3a (CC3a) を発現し、骨芽細胞の分化と機能を調節している。しかしながら、歯科矯正力や食片圧入・歯ぎしりによる力を想定した持続的な力が、破骨細胞によるこれらの因子の発現に及ぼす影響は不明である。そこで、本研究では、持続的な圧迫力の負荷や炎症性因子の刺激が、破骨細胞による骨芽細胞分化・骨形成機能の調節に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

マウス単球/マクロファージ系の RAW264.7 細胞を 48-well plate に播種した後、50 ng/mL RANKL、10%ウシ胎児血清および 1%抗生物質を添加した分化培養培地 240 μ L で破骨細胞様細胞へ分化誘導した。なお、破骨細胞様細胞への分化は、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色にて確認した。

(2)細胞への圧迫力の負荷培養

前述の分化培養培地に、RANKL 非添加の培地を加えて培地の総量を 240~1330 μ L とした。これにより、培地中の RANKL の総量は一定のまま、それぞれ約 0.3~1.8 g/cm² の圧迫力 (培地の比重を 1 と仮定) が well 底面の細胞に負荷される。歯周病による炎症性骨吸収を想定した培養では、培地に炎症性因子として *Escherichia coli* 由来の菌体内毒素 (LPS) を加えて培養した。また、マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞に前述の方法で圧力を負荷した。顕微鏡にて細胞の形態を観察して、形態変化が生じていないことを確認した。

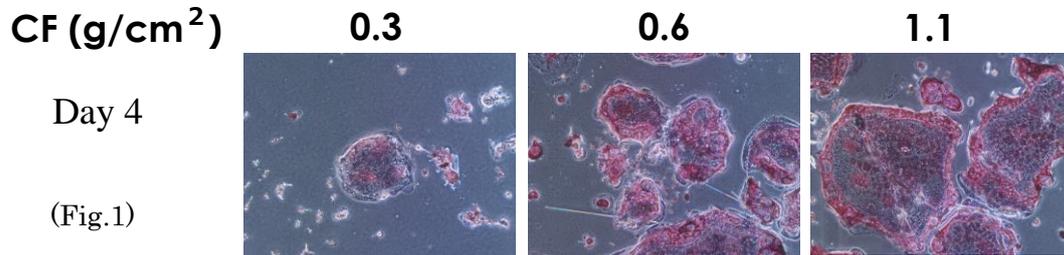
(3)遺伝子発現検索

圧迫力の負荷後、1、3、4 日目の細胞から RNA 回収キットを用いて全 RNA を抽出し、さらに、RNA-cDNA 変換キットで mRNA から cDNA を作成した。作製した cDNA を鋳型として、破骨細胞由来の骨芽細胞機能調節因子 (Sema4D、CC3a) と、骨芽細胞が発現する骨形成因子 (Runx2、Type I collagen) に特異的なプライマーと SYBER-Green I *Taq* ポリメラーゼを含む PCR 反応液を作製し、real-time PCR 法にて遺伝子を増幅し、遺伝子発現量を調べた。

4. 研究成果

(1)TRAP 染色

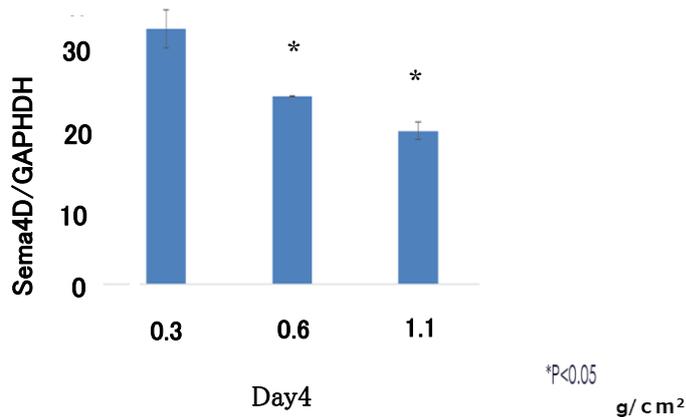
圧迫力が大きくなるとともに、TRAP 陽性細胞数とその面積が増加した (Fig.1)。この傾向は LPS を加えても同様であり、LPS 添加による影響は認められなかった。



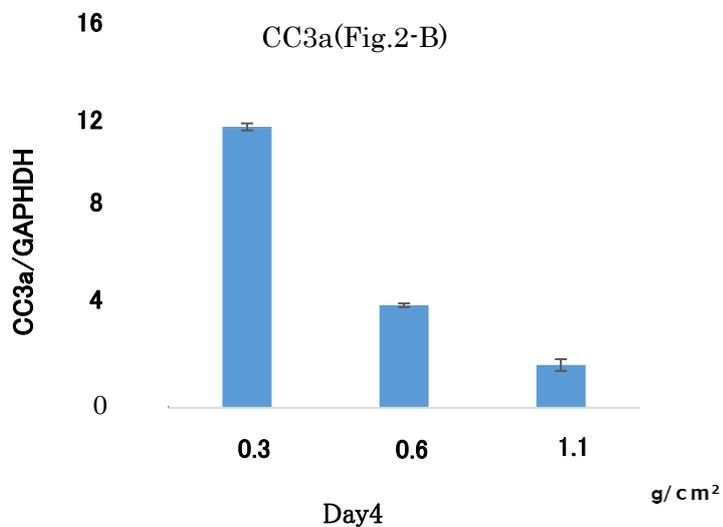
(2)遺伝子発現

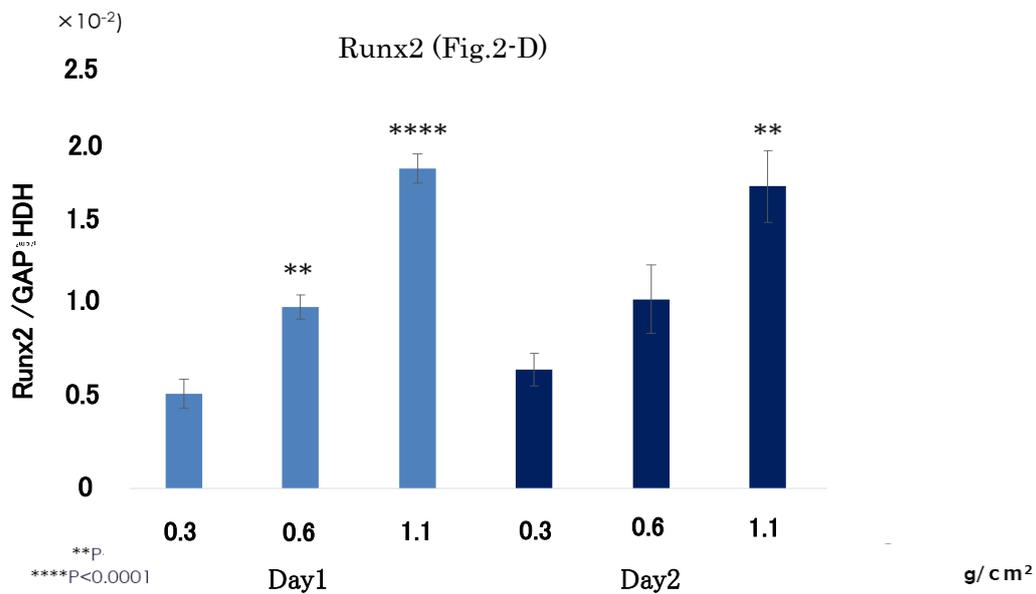
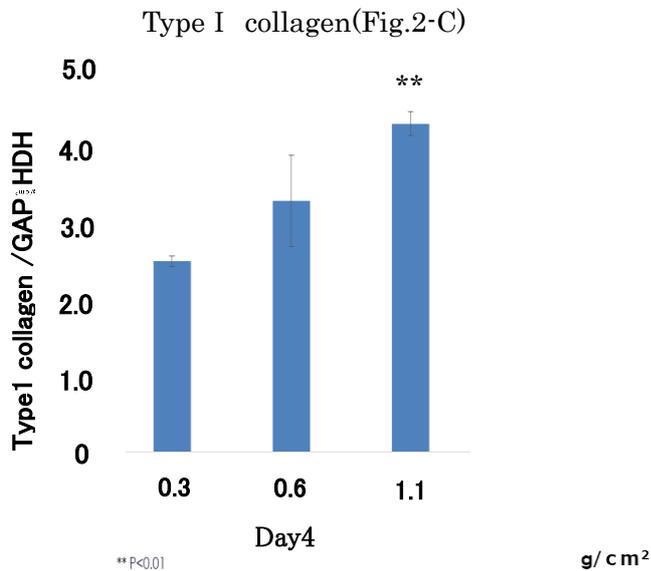
破骨細胞が産生する Sema4D と CC3a の遺伝子発現は、圧力が大きくなるとともに減少した (Fig. 2-A, B)。一方で、LPS 添加と非添加の両者の間で、Sema4D と CC3a の発現に顕著な差は認められなかった。また、MC3T3-E1 細胞の Runx2 と Type I collagen の発現は、圧力の大きさとともに増加した (Fig. 2-C,D)。

Semaphorin4D (Fig.2-A)



CC3a(Fig.2-B)





(3)考察

本研究では、破骨細胞への持続的な圧迫力の負荷によって、骨芽細胞分化抑制因子の **Sema4D** と同促進因子の **CC3a** の両方の発現が低下した。本結果から持続的な圧迫力を破骨細胞に負荷すると、破骨細胞から骨芽細胞への働きかけが抑制されると考えられた。今後、破骨細胞に圧迫力を負荷して得た培養上清の存在下で骨芽細胞を培養し、**Sema4D** および **CC3a** の産生低下の影響を検証する必要がある。一方、破骨細胞への圧迫力の負荷と同様の方法で骨芽細胞に圧力を負荷したところ、骨芽細胞の骨形成因子の上昇が認められた。本結果から、持続的な圧迫力は破骨細胞を介することなく直接、骨芽細胞による骨形成を促進可能性が示唆された。また、本研究では、持続的な圧力の負荷と同時に **LPS** を添加しても、その影響は認められなかった。本研究では、炎症性骨吸収を想定した先行研究で多用される *E. coli* 由来の **LPS** を用いた。**LPS** は由来する菌種によって、炎症惹起などの作用の程度が異なるとされている。本研究には持続的な圧迫力の負荷の要素を含むことから、歯周病原菌を含め他菌種由来の **LPS** で検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rieko Matsuike, Kumiko Nakai, Hideki Tanaka, Maki Nagasaki, Tasuku Charlesron-Coad, Akira Nkajima, Kotoe Mayahara, Takayuki Kawato, Noriyoshi Shimizu, Masao Maeno, Mitsuru Motoyoshi
2. 発表標題 Compressive force suppress Semaphorin 4D expression in osteoclast-like RAW264.7 cells
3. 学会等名 第79回日本矯正歯科学会学術大会・第9回国際矯正歯科会議世界大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松生理恵子, 田中秀樹, 中井久美子, 岡 仁, 原田修成, 飯田隆文, 前野正夫, 川戸貴行
2. 発表標題 持続的な圧迫力は破骨細胞による骨無機質溶解を促進する
3. 学会等名 第68回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------