

機関番号	12601
研究種目	基盤研究 (C)
研究期間	2008~2010
課題番号	20592387
研究課題名 (和文)	PTH シグナルを利用した骨新生技術開発と顎裂部骨欠損に対する歯科矯正学的応用
研究課題名 (英文)	Novel bone tissue engineering method using PTH signaling, its application to secondary alveolar bone grafting in patients with CLP and orthodontic evaluation
研究代表者	須佐美 隆史 (SUSAMI TAKAFUMI) 東京大学・医学部附属病院・准教授 研究者番号 : 80179184

研究成果の概要 (和文) : 本研究は、顎裂部で機能しうる新生骨を形成するために副甲状腺ホルモン (PTH) を利用し、効率的な骨形成を図るとともにその作用メカニズムを解明し、最終的には、その新生骨に対する矯正学的評価を行うことを目的として計画された。研究の結果、PTH の利用あるいは $G\alpha q$ シグナルの抑制によって細胞レベルならびに生体レベルの両方で骨分化・骨形成を促進することが可能であることが判明し、顎裂部で機能しうる高品質の新生骨が作製可能であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : This study was conducted to (1) make tissue-engineered bone by using parathyroid hormone (PTH), (2) elucidate the mechanism of PTH function in bone formation and (3) evaluate the quality as a material for bone grafting of the tissue-engineered bone constructed by this novel method in terms of orthodontics. As a result, PTH was found to be able to promote bone formation and bone differentiation both in vivo and in vitro. It was suggested that use of PTH or suppression of $G\alpha q$ signaling may be effective to produce tissue-engineered bone which could be applied to secondary alveolar bone grafting.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 矯正・小児系歯学

キーワード : 顎裂部骨移植、副甲状腺ホルモン、歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂の治療には矯正、外科治療をはじめとした長期にわたる集学的治療が必要なため、患者の肉体的、精神的負担は一般の矯正治療と比較して非常に大きなものとなる。そこで、各治療段階における患者側の負担を

可能な限り軽減し、患者の QOL の向上を図ることは、われわれに課された重大な使命である。特に顎裂部骨移植の際に行われる腸骨採取に伴う負担は大きく、解決すべき深刻な問題の 1 つである。現在のところ、患者の負担軽減のために、骨誘導能を持った素材であ

る β -TCPや患者自身のPRP (Platelet Rich Plasma)を採取した腸骨と混合して移植する治療法なども報告されているが、その成績は未だ不確実である。そのため、依然として腸骨より採取した海綿骨移植が主流であり、顎裂部以外に侵襲を加えない骨形成法の開発が待たれていた。この状況下で、顎裂部骨移植とそれに続く矯正治療の成功を目指し、われわれは、再生医療的アプローチによる新生骨の作成と矯正学的評価を試み、実験レベルでは、一定の成果を挙げていたものと自負している。しかしながら、臨床応用という観点で考えると、改善すべき点が多く残されていることは否定出来ない事実である。

2. 研究の目的

本研究では、顎裂部で機能しうる新生骨を形成するために副甲状腺ホルモン (PTH) を利用し、効率的な骨形成を図るとともにその作用メカニズムを解明し、最終的には、その新生骨に対し矯正学的評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 手術侵襲を最小限にするというコンセプトに基づき、我々は顎裂部骨欠損修復のための新生骨の細胞源として、骨髄穿刺で採取出来る程度の少量の骨髄を理想としている。そこで、骨髄由来間葉系細胞および各種株化培養細胞を用いて、それらの細胞に対してPTHが骨分化誘導能を持つか検討した。

(2) PTHの骨形成促進作用メカニズムを明らかにする目的で、PTHの骨形成促進作用が認められる骨芽細胞様細胞株培養系を用いた解析を行った。具体的には $G\alpha s$ および $G\alpha q$ を骨芽細胞に同時に強制発現させ、その発現バランスにより、骨芽細胞分化および破骨細胞形成支持能に差が現れるかを検討した。

(3) PTHはPTH受容体に結合し、その下流のG蛋白を活性化することによって細胞内にシグナルを伝えることが知られているので、PTHの生体内における骨形成促進作用メカニズムを明らかにするために、 $Gn\alpha q$ 遺伝子を骨特異的に過剰発現させたマウスをはじめ、G蛋白に関する遺伝子操作マウスを用いた解析を行った。

4. 研究成果

間葉系細胞に対するPTHの骨分化誘導能を検討し、分化刺激下では間葉系細胞に対するPTHの骨形成促進作用が認められることを示

唆する結果を得た。 $G\alpha s$ および $G\alpha q$ を骨芽細胞に同時に強制発現させ、その発現バランスにより、骨芽細胞分化および破骨細胞形成支持能に差が現れることが判明した。

PTHはPTH受容体に結合し、その下流のG蛋白を活性化することによって細胞内にシグナルを伝えることが知られているので、PTHの生体内における骨形成促進作用メカニズムを明らかにするために、G蛋白に関する遺伝子操作マウスを用いた解析を行った。 $Gn\alpha q$ 遺伝子を骨特異的に過剰発現させたマウスの解析で、同マウスは同胞野生型マウス(WT)と比較して骨量が減少しており、PTH刺激には反応しないことが明らかとなった。また、骨特異的に $Gn\alpha q$ および $Gn\alpha 11$ の両方を欠損させたマウス(cDKO)の解析で、cDKOは生理的条件下ではWTと骨量の差が無いものの、PTH刺激に対してはWTよりも骨量が増加することが判明した。さらに骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞において $G\alpha q$ シグナルインヒビターであるregulator of G protein signaling-2を過剰発現すると、骨芽細胞分化が促進された。このことから、 $G\alpha q$ シグナルは生体内におけるPTHの作用を抑制することが明らかとなった。

以上の事実からPTHの利用、 $G\alpha q$ シグナルの抑制によって顎裂部で機能しうる高品質な新生骨が作製可能であることが示唆された。

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14件)

① Ogata N, Shinoda Y, Wettschureck N, Offermans S, Takeda S, Nakamura K, Segre GV, Chung UI, Kawaguchi H. The $G\alpha q$ signal in osteoblasts is inhibitory to the osteoanabolic action of Parathyroid Hormone. J Biol Chem. 2011 Apr 15;286(15):13733-40. (査読有)

② Shinoda Y, Kawaguchi H, Higashikawa A, Hirata M, Miura T, Saito T, Nakamura K, Chung UI, Ogata N. Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. J Cell Biochem. 2010 Mar 1;109(4):755-63. (査読有)

③ Ogata N. [Cytokines in bone diseases. Genetic defects of PTH/PTHrP receptor in chondrodysplasia]. Clin Calcium. 2010 Oct;20(10):1481-8. Review. Japanese.

(依頼原稿のため査読無し)

④ Ogasawara T, Ohba S, Fujihara Y, Takahashi T, Liu G, Chikazu D, Suenaga H, Chung UI, Yoda T, Mori Y, Susami T, Takato T, Hoshi K. Transforming growth factor- β 1 in combination with fibroblast growth factor-2 and insulin-like growth factor-I for chondrocyte proliferation culture and cartilage regenerative medicine. Asian J Oral Maxillofac Surg 2009 21:18-26.

(査読有)

⑤ Kan A, Ikeda T, Saito T, Yano F, Fukai A, Hojo H, Ogasawara T, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Screening of chondrogenic factors with a real-time fluorescence-monitoring cell line ATDC5-C2ER: identification of sorting nexin 19 as a novel factor. Arthritis Rheum. 2009 Nov;60(11):3314-23. (査読有)

⑥ Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBP β Promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57. PLoS One. 2009;4(2):e4543. (査読有)

⑦ Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, Mori Y, Takato T, Hoshi K. Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2009 May;15(5):1109-18. (査読有)

⑧ Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. J Biol Chem. 2008;283:24682-689. (査読有)

[学会発表] (計12件)

① 緒方直史 鄭雄一 中村耕三 川口浩 PTHによる骨形成促進作用の分子メカニズム第28回日本骨代謝学会学術集会 2010年7月21-23日東京都新宿区

② 緒方直史, 矢野文子, 鄭雄一, 中村耕三, 川口浩 Regulator of G protein signaling (RGS)-2 は G α q/PKCシグナルを抑制して副甲状腺ホルモン (PTH) の骨同化作用を増強する第27回日本骨代謝学会 2009年7月23-25日大阪府大阪市

③ Ogata N, Yano F, Chikazu D, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Regulator of G protein signaling (RGS)-2 enhances bone anabolic action of PTH through inhibition of G α q/PKC pathway in osteoblasts. 31th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2009. 9.11-15 Denver, Colorado, USA

④ 小笠原徹 高戸毅 細胞周期制御を利用した骨粗鬆症治療法開発のための基礎的検討第9回日本抗加齢医学会総会 2009年5月28-29日東京都港区

⑤ 大久保和美 須佐美隆史 松崎雅子 長濱浩平 飯野光善 森良之 近津大地 西條英人 大木明子 引地尚子 高戸毅:片側顎裂に対する二次的骨移植 -術後早期の評価と成長終了後の評価- 第33回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2009年5月28-29日東京都千代田区

⑥ 緒方直史 矢野文子 鄭雄一 中村耕三 川口浩 G α qシグナルは PKC δ を介して PTH の骨同化作用を抑制する. 第26回日本骨代謝学会学術集会 2008年10月29-31日大阪府大阪市

⑦ 小笠原徹 川口浩 高戸毅 星和人 間葉系細胞の分化多能性維持機構における Nanog の役割第26回日本骨代謝学会学術集会 2008年10月29-31日大阪府大阪市

⑧ 緒方直史 矢野文子 篠田裕介 鄭雄一 中村耕三 川口浩 β -カテニン は副甲状腺ホルモン (PTH) 受容体の細胞内ドメインに直接結合してそのシグナルを制御する第23回日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23日京都府京都市

[図書] (計5件)

須佐美隆史 ほか

① 医師・歯科医師のための口腔診療必携-困ったときのマニュアル・ヒント集 202 金原出版 2010 263

[その他]

ホームページ

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須佐美 隆史 (SUSAMI TAKAFUMI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80179184

(2) 研究分担者

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

小笠原 徹 (OGASAWARA TORU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20359623

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10361495