

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間： 2008～2009

課題番号：20890205

研究課題名（和文） 歯槽骨の骨吸収による歯の萌出メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of eruption mechanisms of teeth by bone resorption of alveolar bone

研究代表者

森川 和政 (MORIKAWA KAZUMASA)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70514686

研究成果の概要（和文）：

本研究では、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>Rs) のサブタイプのひとつである IP<sub>3</sub>R-III 型の破骨細胞における細胞接着との関わりのさらなる解析を行うため、IP<sub>3</sub>R 阻害剤であるゼストスポンギン C (XSC) を用いて破骨細胞への影響を調べた。XSC の存在下において破骨細胞の形態変化として収縮が認められ、破骨細胞の細胞接着部位であるポドゾーム発現部位と IP<sub>3</sub>R-III 型の共存の減少を認め、IP<sub>3</sub>R-III 型はポドゾームにおいてアクチン細胞骨格の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study the influence on the osteoclasts was examined by using the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors (IP<sub>3</sub>Rs) antagonist xestospongine-C (XSC) to do further analysis of the relation with the cellular adhesion in the osteoclasts of IP<sub>3</sub>R type III (IP<sub>3</sub>R-III). In the presence of XSC, shrinkage of osteoclasts and a decrease in the coexistence of IP<sub>3</sub>R-III and podosomes, the adhesion area of osteoclasts were verified. It can be suggested that IP<sub>3</sub>R-III accomplishes a key role in the adjustment of the actin cytoskeleton in podosomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,320,000 円	396,000 円	1,716,000 円
2009 年度	1,160,000 円	348,000 円	1,508,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	2,480,000 円	744,000 円	3,224,000 円

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：歯学 骨吸収 破骨細胞 細胞接着 萌出 歯槽骨 ゼストスポンギン C  
イノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体

## 1. 研究開始当初の背景

歯の萌出には、萌出経路の形成が重要で、歯を覆っている歯槽骨に破骨細胞の骨吸収がうまく作用しないと歯の埋伏による歯列不正など不正咬合を引き起こす可能性が高くなる。萌出経路の形成には破骨細胞が必須であり、個々の歯の萌出時期にその萌出経路が形成されなければ歯は萌出できない。また、破骨細胞の骨吸収活性には細胞接着、酸分泌、タンパク質分解酵素が深く関わっていることが知られているが、細胞接着については不明な点が多い。

私は、大学院入学時より、ラット破骨細胞におけるイノシトール 1,4,5-三リン酸(IP<sub>3</sub>)受容体(IP<sub>3</sub>R)の局在についての研究を行ってきた。IP<sub>3</sub>は細胞内Ca<sup>2+</sup>ストア(小胞体)からCa<sup>2+</sup>を放出するセカンドメッセンジャーであり、形態変化、分泌、遺伝子発現等の細胞の機能にとって重要な働きを持っている。IP<sub>3</sub>RはIP<sub>3</sub>の受容体であると共に、細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアに局在するCa<sup>2+</sup>チャネルで、組織や発生時期に特異的な三つのサブタイプ(I型、II型、III型)がある。IP<sub>3</sub>Rは、当初、小胞体に存在すると考えられてきたが、現在では形質膜にも認められており、形質膜に発現するIP<sub>3</sub>Rは細胞骨格、細胞接着の構築に関与していることが報告されている。一方、破骨細胞の骨基質への接着は骨吸収の重要なステップの一つであり、接着に関わる構造は古くから *in vitro* においてはアクチンを多く含むポドゾームと呼ばれる構造が相当すると考えられてきた。細胞と細胞外基質間の相互作用により、細胞の形態変化、運動、接着が成立し、それらの現象は、アクチン細胞骨格の調節が重要な因子となっている。研究の結果、私は、IP<sub>3</sub>RのサブタイプのひとつであるIP<sub>3</sub>R-III型の局在がこのポドゾーム発現部位と高い相同性を認め、破骨細胞の細胞接着に

関与している可能性を示唆した。

## 2. 研究の目的

本研究は、歯の萌出経路形成において重要な役割を持つ破骨細胞での細胞接着を免疫組織学、生化学的に解明し、歯槽骨の骨吸収による歯の萌出に関わるメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

『実験1. IP<sub>3</sub>Rアンタゴニストを用いた実験(カバーガラス上)』一週間培養した骨髄細胞にIP<sub>3</sub>RアンタゴニストであるゼストスポンギンC(XSC)の濃度を設定し添加後、時間の経過ごとの細胞変化を観察し、イメージ解析システムによって細胞の面積変化を測定する。また、免疫蛍光染色法を用いて、XSCの存在下、非存在下における細胞接着部位であるポドゾームへの影響、変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

『実験2. IP<sub>3</sub>Rアンタゴニストを用いた実験(デンチンスライス上)』コントロールとして、培養ディッシュ上で骨髄細胞を二日間、FBS、M-CSFを含んだα-MEM溶液で培養した後、デンチンスライス上にて五日間、FBS、M-CSF、RANKLを含むα-MEM溶液で培養する。破骨細胞が形成されていることをTRAP染色にて確認した後、細胞を剥がし、DAB発色反応にて吸収窩を観察する。XSC添加は、デンチンスライス上での培養三日目に行い、コントロール同様、培養五日後にDAB発色反応にて吸収窩を観察する。両者の吸収窩の面積を測定し、XSCの影響を解析する。

『実験3. 歯の萌出時の破骨細胞におけるIP<sub>3</sub>R-III型の発現に関する実験』新生児ラットから歯槽骨組織切片を作成し、免疫蛍光染色法を用いて、歯の萌出経路形成に関わる破骨細胞でのIP<sub>3</sub>Rの発現を共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

## 4. 研究成果

現在までに研究成果として以下のことが

各実験において確認できている。『実験 1. IP<sub>3</sub>Rアンタゴニストを用いた実験 (カバーガラス上) : XSCの非存在下においてはポドゾーム発現部位とIP<sub>3</sub>R - III型の局在は高い相同性が認められた。XSCの存在下においては破骨細胞の形態変化として収縮が認められ、アクチン線維の配列の乱れが観察された。また、ポドゾーム構造自体への影響も認められた。』、『実験 2. IP<sub>3</sub>Rアンタゴニストを用いた実験 (デンチンスライス上) : XSCの濃度依存的に破骨細胞分化の抑制、多核化の減少、吸収窩の減少が認められた。』、『実験 3. 歯の萌出時の破骨細胞におけるIP<sub>3</sub>R - III型の発現に関する実験 : 歯槽骨組織切片において歯の萌出経路形成に関わる破骨細胞でのIP<sub>3</sub>R - III型の発現が認められた。』

萌出不全に伴う埋伏歯、萌出性腐骨といった萌出障害は小児歯科臨床において重要な課題であるが、その原因の一つである歯槽骨の骨吸収メカニズムは十分に解明されていない。本研究の結果により、IP<sub>3</sub>R-III型と破骨細胞の細胞接着との関わりが局在の面からだけでなく、機能の面からも明らかとなり、骨吸収メカニズムの解明が大きく発展するものと考えられる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 4 件)

森川和政、佐伯 桂、大倉秀一郎、西田郁子、牧 憲司  
歯の萌出に伴う破骨細胞の役割の解明  
第27回日本小児歯科学会九州地方会  
2009. 11. 22 北九州

森川和政、今村 均、空田安博、牧 憲司  
歯の萌出に伴う歯槽骨吸収メカニズムの解明 -特に細胞接着-  
第47回日本小児歯科学会  
2009, 5. 14-15 大阪

森川和政、後藤哲哉、小林 繁、牧 憲司  
イノシトール1, 4, 5-三リン酸受容体害剤ゼストスポンギンC添加によるラット破骨細胞への影響について  
第69回九州歯科学会総会  
2009, 5. 30-31 北九州

森川和政、小林 繁、牧 憲司、後藤哲哉  
ラット破骨細胞におけるイノシトール1, 4, 5-三リン酸受容体の局在と細胞接着部位であるポドゾームとの関わりについて  
第26回日本骨代謝学会  
2008, 10. 29-31大阪

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森川 和政 (MORIKAWA KAZUMASA)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号 : 70514686