

令和 6 年 4 月 7 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K09868
研究課題名（和文）RANKL逆シグナルと破骨細胞エクソソームを基軸とした新規歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new periodontal regenerative therapy with RANKL reverse signaling and osteoclast-derived exosome

研究代表者
向坂 幸彦（Sakisaka, Yukihiro）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10760457
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、破骨細胞が分泌する細胞外膜小胞に発現しているRANKが骨芽細胞のRANKLを刺激することで骨芽細胞の分化を誘導するRANKL逆シグナルに着目し、セメント芽細胞においても同シグナルによって分化誘導が生じるかを検討した。本研究からRANK模倣ペプチドWP9QYはセメント芽細胞の分化を抑制し、その経路はセメント芽細胞のRANKLを介さない可能性が示唆された。以上の結果から、セメント質・骨組織間の恒常性維持に関わる分子メカニズムの違いについて検証が進められたとともに、本シグナル経路からのアプローチが次世代歯周組織再生療法につながる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病により失われた歯周組織の再生にはセメント質の再生が不可欠である。セメント質は骨組織と比較して類似した組成を持つ一方で構造が異なり、発生のメカニズムは未だ不明な点が多い。また骨組織では常に生じているリモデリングはセメント質においては限局的で、その吸収および形成を制御する因子についてはほとんど解明されていない。本研究から骨組織のリモデリングにおいて骨芽細胞の分化誘導を担うRANKL逆シグナルがセメント芽細胞に対して逆に分化を抑制し、骨とセメント質の恒常性維持の分子メカニズムの違いに関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was evaluating the effect of RANKL reverse signaling on differentiation of cementoblasts. In this study, a RANKL-binding peptide, WP9QY (W9), inhibited differentiation of cementoblasts, while it promoted differentiation of osteoblasts. And the suppression of RANKL in cementoblasts had no effect on the W9-induced inhibition of differentiation. These results suggested the other signaling pathways different from RANKL reverse signaling in homeostasis in cementum.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯学 再生医療 シグナル伝達 エクソソーム RANKL Wnt

1. 研究開始当初の背景

歯根膜に未分化間葉系細胞 (MSCs) が存在することが明らかにされ、同細胞の増殖・分化の制御に基づいた歯周組織再生療法の開発が進められている。現在はエナメルマトリックス蛋白や塩基性線維芽細胞成長因子などのシグナル分子を応用した技術が臨床にも広く用いられているが、これらの技術には未だ適応症に制限があり予知性も不十分と言える。歯周組織は骨、セメント質および歯根膜から成り立っているが、歯根と歯周組織の強固な付着、すなわち結合組織性付着を得るためにはセメント質の再生が不可欠である。従って、セメント芽細胞への分化の分子メカニズムを明らかにすることは歯周組織再生医学の発展に大きな意味を持つと考える。申請者は、これまでにセメント芽細胞の分化制御に分泌型糖タンパク Wnt シグナルが関与していることを報告してきた (Exp Cell Res, 2015)。さらに、申請者は、Wnt ファミリーの1つである Wnt3a はセメント芽細胞の前駆細胞である歯小囊細胞に対して転写因子 Osterix に依存的にアルカリホスファターゼの発現を誘導することを初めて見出した (J Periodontal Res, 2016; Biochem Biophys Res Commun, 2016)。一方で、Wnt シグナルだけで歯小囊細胞からセメント芽細胞まで分化を誘導することはできず、完全なセメント芽細胞の分化誘導メカニズムを解明することが喫緊の課題である。

これまで、破骨細胞の分化は、骨芽細胞表面のリガンド RANKL が破骨細胞表面の受容体 RANK を刺激することで行われると考えられていたが、近年、その誘導過程を中心的に制御しているのは、骨芽細胞ではなく骨細胞であることが報告された (Xiong et al, PLOS ONE, 2015)。さらに骨芽細胞上の RANKL はリガンドではなく受容体として機能し、破骨細胞由来の細胞外膜小胞 (エクソソーム) が表面に発現している RANK の刺激を受けて骨芽細胞の分化を誘導する「RANKL 逆シグナル」という新しい概念が確立している (Furuya et al, JBC, 2013; Ikebuchi et al, Nature, 2018)。

セメント質は骨組織と異なりリモデリングが限局された組織であり、その吸収および形成を制御する因子についてはほとんど解明されていない。in vitro の研究では、セメント芽細胞と破骨細胞前駆細胞との共培養系でセメント芽細胞の RANKL が破骨細胞分化を誘導することは報告されているが、破骨細胞由来のエクソソームがセメント芽細胞の分化誘導に与える作用に関する報告は皆無である。

これらの事実に基づき、本研究ではセメント芽細胞における RANKL 逆シグナルの作用とそれを基軸とした歯周組織の分化誘導について解析を行った。

2. 研究の目的

本研究は、破骨細胞由来の RANK 発現エクソソームによるセメント芽細胞の分化成熟作用およびその分子メカニズムを解明することで、セメント質再生における同エクソソームの有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、マウスセメント芽細胞株 OCCM-30 ならびにセメント芽細胞の前駆細胞である歯小囊細胞株 SVF4 さらにマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて RANK の模倣ペプチドである WP9QY (W9) 存在下にて培養し各種解析を行った。

4. 研究成果

各種細胞を W9 存在下にて 3 日間培養したところ、MC3T3-E1 ではアルカリホスファターゼ (ALP) 活性が有意に誘導された一方で、SVF4 および OCCM-30 では ALP 活性の抑制が有意に認められた。次に OCCM-30 を硬組織誘導培地にて可溶性 RANK および W9、BMP-2 存在下にて 5 日間培養したところ、W9 で認められた ALP 活性の抑制は可溶性 RANK (sRANK) では認められなかった。さらに RNA 干渉を用いて OCCM-30 の RANKL とオステオプロテグリン (OPG) の発現抑制を行った上で W9 存在下にてさらに 3 日間培養を行ったところ、W9 誘導性 ALP 活性の抑制において RANKL および OPG の発現抑制では有意な影響を認めなかった。

一連の研究結果から、骨組織において骨芽細胞の分化を誘導する W9 は、歯周組織においてはセメント芽細胞の分化を抑制し、さらにその経路は RANKL 逆シグナルとは異なるものである可能性が示唆された。今回の研究はセメント芽細胞における RANKL 逆シグナルの可能性について初めて検討した研究である。今回の研究結果からセメント質・骨組織間の恒常生維持に関わる分子メカニズムの違いについて検証が進められたとともに、本シグナル経路からのアプローチが次世代歯周組織再生療法につながる可能性が示された。

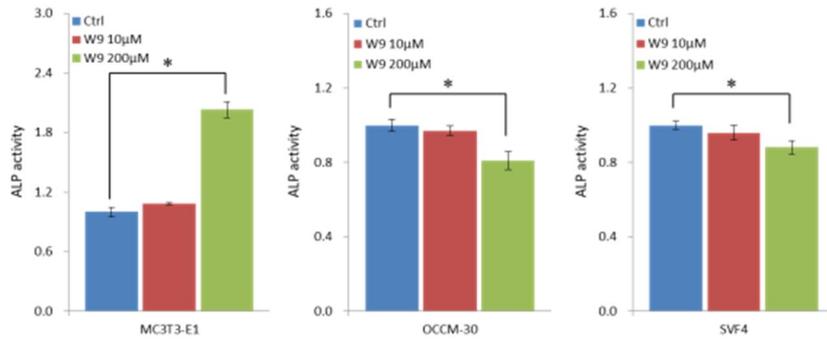


図1 各種細胞における W9 刺激時の ALP 活性

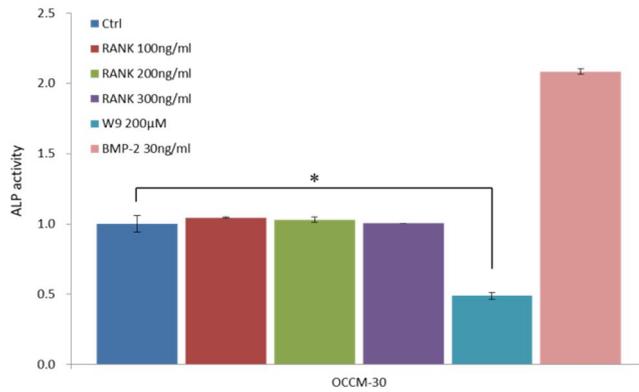


図2 W9 および sRANK 存在下にて培養した OCCM-30 の ALP 活性

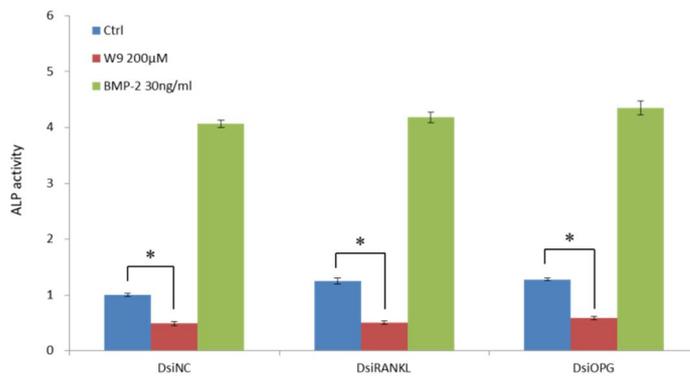


図3 RANKL および OPG の発現抑制下における OCCM-30 の W9 誘導性 ALP 活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakisaka Yukihiro, Ishihata Hiroshi, Maruyama Kentaro, Nemoto Eiji, Chiba Shigeki, Nagamine Masaru, Hasegawa Hiroshi, Hatsuzawa Takeshi, Yamada Satoru	4. 巻 16
2. 論文標題 Serial Cultivation of an MSC-Like Cell Line with Enzyme-Free Passaging Using a Microporous Titanium Scaffold	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1165 ~ 1165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma16031165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	鈴木 茂樹 (Suzuki Shigeki) (30549762)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	根本 英二 (Nemoto Eiji) (40292221)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	山田 聡 (Yamada Satoru) (40359849)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	丸山 顕太郎 (Maruyama Kentaro) (80833805)	東北大学・大学病院・医員 (11301)	

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