

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17244

研究課題名（和文）歯の移動における骨細胞の細胞死とダメージ関連分子の破骨細胞形成への影響の解明

研究課題名（英文）Analysis of the effect of osteocytes cell death and DAMPs on osteoclastogenesis during tooth movement

研究代表者

大堀 文俊（Ohori, Fumitoshi）

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：90937129

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：低酸素環境下で培養された骨細胞のRNA-seq（網羅的遺伝子発現）解析により、Lipocalin 2 (LCN2)をコードするLCN2遺伝子発現が増加することを発見した。LCN2は破骨細胞形成に直接的影響を与えなかったが、骨細胞に作用して間接的に破骨細胞形成に影響を与えていることが示唆された。また、細胞死した骨細胞が放出するDAMPs（ダメージ関連分子パターン）を含む因子は、破骨細胞形成を増強することが明らかになった。矯正学的歯の移動のモデルマウスを用いた研究により、骨細胞の細胞死が破骨細胞形成に重要であ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

近年、骨細胞が破骨細胞形成に関与していることが示されてきたが、詳細なメカニズムについて未解明な点が多く、その全容解明は骨代謝関連の学問や歯科矯正学における重要研究課題とされている。本研究により、矯正学的歯の移動に伴う低酸素・低栄養環境下において、骨細胞が放出する因子が破骨細胞形成を増強することが示唆された。骨細胞の制御による矯正治療の期間短縮が考えられるだけでなく、骨細胞をターゲットとした炎症性骨疾患等の治療法の確立などに繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We revealed that LCN2 gene expression was increased by RNA-seq analysis of osteocytes cultured under hypoxic conditions. Although LCN2 did not have the direct effect on osteoclast formation, LCN2 indirectly promoted osteoclast formation via other osteocytes. In addition, we found that the factors containing DAMPs released from necrotic osteocytes enhanced osteoclast formation. Our results of the OTM (orthodontic tooth movement) mice suggested that cell death of osteocytes is important for osteoclast formation during orthodontic tooth movement.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：矯正学的歯の移動 骨細胞 細胞死 破骨細胞 DAMPs

### 1. 研究開始当初の背景

矯正学的歯の移動は、圧迫側に出現する破骨細胞の骨吸収と牽引側に出現する骨芽細胞の骨形成によって起こる。破骨細胞形成を誘導している細胞は長年、骨芽細胞であると考えられてきたが、骨細胞も RANKL を発現して破骨細胞形成を誘導することが報告された (Nakashima et al. *Nat Med*, 2011)。骨細胞はメカニカルストレスを感じる細胞であるため (Bonewald, *J Bone Miner Res*, 2011) 矯正学的歯の移動時の骨リモデリングにも骨細胞が関与していると考えられている (図 1)。矯正学的歯の移動には、骨細胞が発現する RANKL が関与することが報告されており、歯の移動には骨細胞の働きが重要であることがわかってきた (Shoji-Matsunaga et al. *Sci Rep*, 2017)。このように、破骨細胞形成に対する骨細胞の影響を調べる研究は骨代謝の研究の中で非常に注目を集めているが、歯が移動する際の骨細胞の詳細な役割はまだ明らかになっていないのが現状である。

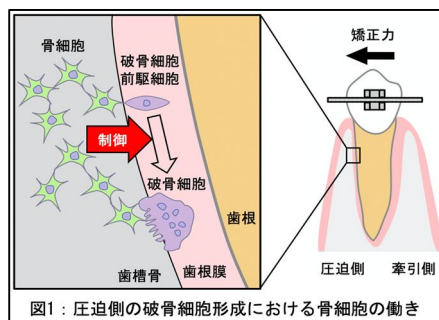


図1：圧迫側の破骨細胞形成における骨細胞の働き

ラットの矯正学的歯の移動時の圧迫側では歯槽骨内にある骨細胞は細胞死を起こし、その中にはネクロース様の骨細胞が観察されている (Hamaya et al. *Calcif Tissue Int*, 2002)。歯根膜付近の骨細胞は、歯根膜側に突起を伸ばすことで歯根膜側から多くの酸素と栄養の供給を受けていると考えられる。歯に矯正力が加わると、血管を含む圧迫側の歯根膜組織は圧迫されるため重度の血流障害を生じる (Schröder et al. *Mediat Inflamm*, 2020)。このような条件下では、歯根膜に近い骨細胞に対して酸素と栄養の供給が遮断され、骨細胞の細胞死が誘導されると推測されるが、実際に検証した実験や報告はない。

細胞死に伴い細胞外へと放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs) は、非感染性の炎症を惹起することが知られている (Gong et al. *Nat Rev*, 2020)。矯正学的歯の移動の圧迫側では、歯根膜線維芽細胞が DAMPs の一つである HMGB1 を発現し、マクロファージの遊走と破骨細胞形成に関与していることが示唆された (Kanzaki et al. *J Oral Biosci*, 2018)。さらに、骨折や骨壊死によってネクロースを起こした骨細胞から DAMPs が放出され、破骨細胞形成を誘導して骨吸収を促進することが報告された (Andreev et al. *J Clin Invest*, 2020)。以上より、矯正学的歯の移動により圧迫側に生じる低酸素・低栄養などをトリガーとした骨細胞の応答の解析と、その際に放出される DAMPs を含む様々な因子の破骨細胞形成に対する影響を解明することは重要であるといえる。

### 2. 研究の目的

矯正学的歯の移動における骨細胞の細胞死を起因とした破骨細胞形成への影響については不明な点が多い。本研究は、骨細胞を用いて圧迫側の環境 (低酸素・低栄養等) を再現し、その際に放出される因子が破骨細胞形成に与える影響、および歯の移動における骨細胞の細胞死と DAMPs が破骨細胞形成に与える影響を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) FACS を用いた primary 骨細胞の単離
 

骨細胞が蛍光を発する 5-6 日齢の DMP1-Topaz (C57BL/6-Tg(Dmp1-Topaz)11kal/J) マウスの頭蓋冠にコラゲナーゼおよび EDTA による段階的な酵素処理を行い、得られた fraction 2-5 を回収した。培養後、付着細胞のみを回収し、cell sorter (FACS Aria) を用いて primary 骨細胞として Topaz 陽性骨細胞を単離した。
- (2) 低栄養、低酸素環境下における骨細胞の解析
 

MLO-Y4 細胞 (骨細胞様細胞) を 24-well plate に播種し、BIONIX 低酸素培養キットを用いて 2% O<sub>2</sub> 環境下で培養した。Total RNA を抽出し、サンプルの品質評価は、Agilent 2100 バイオアナライザで行った。その後、Nextseq 500 を用いて RNA シークエンス解析を行った。発現変動遺伝子を抽出し、real-time PCR で確認を行った。

また、primary 骨細胞を低栄養 (serum starvation) 環境下で培養を行い、その形態について評価を行った。
- (3) 骨細胞より放出された DAMPs を含む因子が破骨細胞形成へ与える影響の解析
 

野生型 (C57BL/6J、8 週齢雄) マウスから採取した骨髓細胞に M-CSF を加えて 3 日培養し、破骨細胞前駆細胞を作製した。低酸素環境において MLO-Y4 細胞から放出された因子を破骨細胞前駆細胞に作用させて RANKL の存在下で培養し、TRAP 染色で破骨細胞形成について評価を行った。

また、低酸素環境において MLO-Y4 細胞から放出された因子を MLO-Y4 細胞に作用させて total RNA を抽出し、real-time PCR で RANKL と OPG の発現について解析した。

さらに、骨細胞の細胞死を誘導して DAMPs を含む培養液として回収し、これを conditioned

medium として破骨細胞前駆細胞に添加し、RANKL の存在下で培養した。TRAP 染色を行い、破骨細胞形成に与える影響について評価した。

- (4) 矯正学的歯の移動時の骨細胞の細胞死と破骨細胞形成への影響の解析  
野生型 (C57BL/6J、8 週齢雄) マウスの上顎切歯部歯槽骨と上顎左側第一臼歯の間に Ni-Ti クローズドコイルスプリングを装着し、上顎左側第一臼歯を近心移動させた。矯正力を付与して 0~12 日後に屠殺を行い、組織切片を作製し、上顎左側第一臼歯遠心頬側根圧迫側における骨細胞の細胞死について HE 染色を、破骨細胞形成について TRAP 染色を用いて評価した。また、透過型電子顕微鏡 (TEM) で骨細胞の細胞死の観察を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 低酸素環境における骨細胞の破骨細胞関連因子の放出  
2% O<sub>2</sub> 環境下で培養された MLO-Y4 細胞の RNA シークエンス解析により、Lipocalin 2 (LCN2) をコードする *LCN2* 遺伝子発現が増加することを見出した。同様の条件で MLO-Y4 細胞を培養し、抽出した RNA を real-time PCR で解析したところ、*LCN2* 遺伝子の増加が認められた。
- (2) 低酸素環境における骨細胞の破骨細胞形成への影響  
破骨細胞前駆細胞に RANKL の存在下で *LCN2* を作用させたところ、破骨細胞形成に変化が見られなかった。しかし、*LCN2* を MLO-Y4 細胞に作用させて real-time PCR を行うと、RANKL の遺伝子発現が増加した。一方で OPG の遺伝子発現は変化しなかった。
- (3) 低栄養環境における骨細胞の形態変化  
FACS を用いて単離した primary 骨細胞を無血清培地で培養すると、血清が含まれている培地で培養した骨細胞と比較して細胞突起の長さに変化が見られた。
- (4) 細胞死した骨細胞が放出する DAMPs が破骨細胞形成に与える影響  
細胞死させた骨細胞の conditioned medium で破骨細胞前駆細胞を培養すると、生きている骨細胞の conditioned medium で培養した時と比較して、破骨細胞数が増加した。
- (5) 矯正学的歯の移動における骨細胞の細胞死が破骨細胞形成に与える影響  
歯の移動 2 日から骨細胞の細胞死は観察され、歯の移動 6 日で empty lacunae が増加した。骨細胞の細胞死は硝子様変性組織の周囲で見られたことと、破骨細胞が歯の移動 6 日から増加したことより、細胞死した骨細胞が放出する DAMPs が破骨細胞形成に影響を与えていることが示唆された。また、TEM の解析により、圧迫側ではアポトーシス様骨細胞やネクローシス様骨細胞が観察されたため、歯の移動に伴い様々な種類の骨細胞の細胞死が存在することが明らかとなった。

以上の結果より、矯正学的歯の移動における低酸素・低栄養環境下の骨細胞が発現する因子や細胞死に伴い放出される DAMPs は破骨細胞形成を増強していることが示唆された。骨細胞の制御による矯正治療の期間短縮が考えられるだけでなく、骨細胞をターゲットとした炎症性骨疾患等の治療法の確立などに繋がることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ma Jinghan, Kitaura Hideki, Ogawa Saika, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Nara Yasuhiko, Pramusita Adya, Kinjo Ria, Kanou Kayoko, Kishikawa Akiko, Ichimura Atsuhiko, Mizoguchi Itaru	4. 巻 13
2. 論文標題 Docosahexaenoic acid inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclast formation and orthodontic tooth movement through GPR120	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 0-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.929690	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 -

1. 著者名 Ito Arata, Kitaura Hideki, Noguchi Takahiro, Ohori Fumitoshi, Mizoguchi Itaru	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of Coating Loss from Coated Stainless Steel Orthodontic Wire	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 9497 ~ 9497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app12199497	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 -

1. 著者名 Pramusita Adya, Kitaura Hideki, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Nara Yasuhiko, Kinjo Ria, Ma Jinghan, Kanou Kayoko, Tanaka Yukinori, Mizoguchi Itaru	4. 巻 10
2. 論文標題 Salt-Sensitive Hypertension Induces Osteoclastogenesis and Bone Resorption via Upregulation of Angiotensin II Type 1 Receptor Expression in Osteoblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.816764	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 -

1. 著者名 Kanou Kayoko, Kitaura Hideki, Noguchi Takahiro, Ohori Fumitoshi, Marahleh Aseel, Kinjo Ria, Ma Jinghan, Ren Jiayi, Ogasawara Kouetsu, Mizoguchi Itaru	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of age on orthodontic tooth movement in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 828 ~ 836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jds.2023.09.016	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 -

1. 著者名 Ma Jinghan, Kitaura Hideki, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Kinjo Ria, Kanou Kayoko, Ren Jiayi, Miura Mariko, Narita Kohei, Mizoguchi Itaru	4. 巻 24
2. 論文標題 Generating Bone Marrow Chimeric Mouse Using GPR120 Deficient Mouse for the Study of DHA Inhibitory Effect on Osteoclast Formation and Bone Resorption	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17000 ~ 17000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242317000	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 -

1. 著者名 Fan Ziqiu, Kitaura Hideki, Ren Jiayi, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Ma Jinghan, Kanou Kayoko, Miura Mariko, Narita Kohei, Lin Angyi, Mizoguchi Itaru	4. 巻 14
2. 論文標題 Azilsartan inhibits inflammation-triggered bone resorption and osteoclastogenesis in vivo via suppression of TNF- expression in macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2023.1207502	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 -

1. 著者名 Marahleh Aseel, Kitaura Hideki, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Mizoguchi Itaru	4. 巻 14
2. 論文標題 The osteocyte and its osteoclastogenic potential	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2023.1121727	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ohori F, Kitaura H, Noguchi T, Marahleh A, Ma J, Kanou K, Miura M, Ren J, Narita K, Ren J, Mizoguchi I.
2. 発表標題 Effect of DAMPs released from osteocyte necroptosis on osteoclastogenesis
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ohori F, Kitaura H, Noguchi T, Marahleh A, Ma J, Kanou K, Miura M, Ren J, Ren J, Narita K, Mizoguchi I.
2. 発表標題 Involvement of osteocyte necroptosis on osteoclastogenesis during orthodontic tooth movement
3. 学会等名 The 71st Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大堀文俊、北浦英樹、野口隆弘、Marahleh Aseel、Ma Jinghan、加納佳与子、三浦まり子、成田昂平、溝口到
2. 発表標題 ネクロプトーシスした骨細胞が矯正学的歯の移動に伴う破骨細胞形成に与える影響
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------	---------