

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月21日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659868

研究課題名（和文）顎骨形成促進への新戦略の分子機構研究

研究課題名（英文）Molecular Regulation of Bone Formation in Jaw

研究代表者

野田 政樹（NODA MASAKI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50231725

研究成果の概要（和文）：

顎骨の形成は、骨の粗鬆化の起こる高齢者において重要であり、また特に無歯顎等メカニカルストレスとの関わりも含めてそのメカニズムを明らかにし、新しい促進への分子機構の解明を行うことが重要である。本研究においては、陽イオンチャネルである TRPV4 の顎骨におけるメカニカルストレス応答性に着目し検討を行った。その結果、顎骨において TRPV4 の欠失は骨密度の低下を特異的に起こすことが明らかになり、また、TRPV4 は骨芽細胞の分化と共にその発現が上昇しこれに伴うカルシウムオシレーションが TRPV4 のアゴニストによって促進されることが明らかになった。さらに、顎骨の重要な特性である咬合に伴うメカニカルストレスについて検討を行い、液流動が TRPV4 依存性にカルシウムオシレーションを高めることが明らかになった。以上の結果、顎骨の形成促進における分子機構の一端が解明された。

研究成果の概要（英文）：

Jaw bone is important for mastification. However, the mechanism underlying the maintenance of jaw bone has not been fully understood. We have examined the role of TRPV4 in the regulation of bone mass especially in jaw bone. In the presence of TRPV4, jaw bone is maintained, while the absence of TRPV4 suppressed the levels of bone mass in jaw bone specifically as it did not change the levels of bone mass in parietal bone. TRPV4 gene expression is enhanced by differentiation of osteoblasts as well as the treatment with BMP2. TRPV4 is activated not only by it's agonist but also fluid flow as a mechanical stress. These data indicate that jaw bone is regulated by TRPV4 for its maintenance of the bone mass.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯科薬理学

1. 研究開始当初の背景

歯牙を支える顎骨の維持は重要であり、このためにはメカニカルストレスが加わることによる作用と骨形成のためのシグナルの存在が重要と考えられる。顎骨における適切なメカニカルストレスは骨量の維持ならびにインプラント等の土台が確保される上でその必要性がある。

2. 研究の目的

本研究においては、メカニカルストレス応答性の陽イオンチャネルである TRPV4 に着目し、これに基づく骨芽細胞におけるその制御の検討を目的とした。

3. 研究の方法

動物実験においては、TRPV4 等のノックア

ウトマウスおよびその野生型の対照のマウスを用いて、遺伝子の骨における発現並びに骨形態計測学的な検索を三次元のマイクロCTを用いて行い、BV/TV、骨梁数、骨梁間距離、骨梁幅、BFR、MAR、MSの解析を行った。細胞レベルにおいては、頭蓋冠より得られた骨芽細胞を培養し、この細胞の骨芽細胞分化培地における分化をアルカリフォスファターゼの酵素達成並びに RT-PCR に基づく遺伝子発現を指標に検討した。さらに、液流動によるメカニカルストレスに基づく骨芽細胞内のカルシウム・オシレーションを蛍光顕微鏡下で観察し、その TRPV4 による制御の動態の解析を行った。

4. 研究の成果

顎骨における TRPV4 の存在下では、維持される骨量は TRPV4 の欠失によって骨密度の低下が観察された。この TRPV4 のメカニカルストレス応答性の骨制御機構は、顎骨に特異的であり対象とした頭蓋冠の骨においては、TRPV4 の存在、非存在に関わらず骨密度が変わらず、このことは頭頂骨がメカニカルストレスの加わる骨ではないことと相関すると推察された。

さらに、骨芽細胞の分化と共に TRPV4 のレベルが上昇し、骨芽細胞分化培地におけるアルカリフォスファターゼの上昇発現との相関が明らかとなった。また、この分化の要因となるサイトカインの検索により BMP2 が TRPV4 の遺伝子発現を促進し、さらにはこれが転写性の制御によるものであり、また、新たなタンパクの合成の存在を必要とする過程であることが見出された。

TRPV4 の選択的なアゴニストとして 4 α PDD を用いて骨芽細胞における TRPV4 の活性化を行うと、このアゴニストによるカルシウムの細胞内におけるオシレーションの誘導が見出されるが、このカルシウムオシレーションは細胞の分化レベルに相関することが明らかになった。

次に、メカニカルストレスが細胞に加わるその形態の一つとして液流動による刺激への細胞の応答性を検討した結果、TRPV4 の存在に依存して細胞内カルシウムのオシレーションのシグナルがメカニカル刺激によって誘導されるが、一方で、TRPV4 の欠失した動物から得られた骨芽細胞においては、細胞外液流動に反応するメカニカルストレス依存性のカルシウムオシレーションのレベルの低下が観察された。

また、メカニカルストレスの応答性の受容体である β 2 アドレナリン受容体は、副甲状腺ホルモンによる骨量の増加においてその存在が必須であることが見出された。以上の観察は、メカニカルストレスの感知における TRPV4 の役割とこれに関連する細胞内シグ

ナルのアナボリックの作用の関わりを明らかにしたものである。

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 17 件)

1. Suzuki T, Noda M, et al. Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical force. *Bone*; 54(1):172-8, 2013 doi: 10.1016/j.bone.2013.01.001 査読有
2. Aryal S, Noda M, et al. Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss. *J Cell Physiol*. 228(7):1397-1403, 2013 doi: 10.1002/jcp.24317 査読有
3. Notomi T, Noda M, et al. Identification of two pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry*; 287(42):35057-64, 2012 doi: 10.1074/jbc.M111.328930 査読有
4. Miyajima D, Noda M, et al. Profilin1 regulates sternum development and endochondral bone formation. *Journal of Biological Chemistry*; 287(40):33545-53, 2012 査読有
5. Hanyu R, Noda M, et al. Anabolic action of parathyroid hormone regulated by the β 2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 109(19):7433-8, 2012 doi: 10.1073/pnas.1109036109 査読有
6. Sakuma T, Noda M, et al. CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells. *Journal of Cellular Physiology*; 227(7):2807-12, 2012 doi: 10.1002/jcp.24066 査読有
7. Hemmi H, Noda M, et al. Kaisho T, Steinman RM, and Idoyaga J. Trem14, an Ig superfamily member, mediates presentation of several antigens to T cells in vivo, including protective immunity to HER2 protein. *The Journal of Immunology*; 188(3):1147-55, 2012 doi: 10.4049/jimmunol.1102541 査読有
8. Izu Y, Noda M, et al. Type VI collagen deficiency induces osteopenia with distortion of osteoblastic cell

- morphology. *Tissue and Cell*; 44(1):1-6, 2012 doi: 10.1016/j.tice.2011.08.002 査読有
9. Ono N, Noda M, et al. Constitutively active pth/pthrp receptor specifically expressed in osteoblasts enhances bone formation induced by bone marrow ablation. *Journal of Cellular Physiology*; 227(2):408-15, 2012 doi: 10.1002/jcp.22986 査読有
 10. Nagao M, Noda M, et al. Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 108(43):17767-72, 2011 doi: 10.1073/pnas.1109402108 査読有
 11. Kondo H, Noda M, et al. MURF1 deficiency suppresses unloading-induced effects on osteoblasts and osteoclasts to lead to bone loss. *Journal of Cellular Biochemistry*; 112(12):3525-30, 2011 doi: 10.1002/jcb.23327 査読有
 12. Kawamata A, Noda M, et al. Dok-1 and Dok-2 deficiency induces osteopenia via regulation of osteoclasts. *Journal of Cellular Physiology*; 226(12):3087-93, 2011 doi: 10.1002/jcp.22909 査読有
 13. Morishita M, Noda M, et al. Osteopontin deficiency enhances parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor (PPR) signaling-induced alteration in tooth formation and odontoblastic morphology. *Tissue and Cell*; 43:196-200, 2011 doi: 10.1016/j.tice.2011.02.003 査読有
 14. Seo S, Noda M, et al. Cas-L regulates myeloid cell motility and suppresses progression of leukemia induced by p210Bcr/Abl. *Cancer Science*; 102(12):2109-2117, 2011 doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02066.x 査読有
 15. Hanyu R, Noda M, et al. Per-1 is a specific clock gene regulated by parathyroid hormone (PTH) signaling in osteoblasts and is functional for the transcriptional events induced by PTH. *Journal of Cellular Biochemistry*; 112 : 433-438, 2011 doi: 10.1002/jcb.22957 査読有
 16. Kamolratanakul P, Noda M, et al. Nanogel-based scaffold delivery of prostaglandin E(2) receptor-specific agonist in combination with a low dose of growth factor heals critical-size bone defects in mice. *Arthritis Rheum*; 63(4):1021-33, 2011 doi: 10.1002/art.30151 査読有
 17. Nagao M, Noda M, et al. Schnurri-2 deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy. *Journal of Cellular Physiology* ; 226 : 573-578, 2011 doi: 10.1002/jcp.22521 査読有
- [学会発表] (計 47 件)
1. 野田政樹 骨粗鬆症とテリパラチド 栃木県骨粗鬆症フォーラム 特別講演 2013年2月27日 栃木 日本
 2. 野田政樹 廃用性骨萎縮のメカニズム 第18回埼玉県骨粗鬆症研究会 特別講演 2012年11月10日 埼玉 日本
 3. 野田政樹 不動性骨粗鬆症のメカニズム Osteopontin Biology 第14回日本骨粗鬆症学会 骨ドック・健診分科会 特別講演 2012年9月27日 新潟 日本
 4. 野田政樹 Osteopontin Biology in Bone FASEB Summer Research Conferences 2012年8月5日 Saxtons River, VT, USA
 5. 野田政樹 骨の力学的刺激への応答性の制御機構 昭和大学 歯学部歯科矯正学教室 特別講義 2012年2月21日 東京 日本
 6. 野田政樹 Control of Osteoblastic Function via Local and Central Mechanisms The American Society for Cell Biology Annual Meeting 2011年12月3日 Denver, CO, USA
 7. 野田政樹 骨のメカニカルストレス応答の細胞生物学 第19回顎顔面バイオメカニクス学会大会 特別講演 2011年11月13日 大阪 日本
 8. 野田政樹 BMPにおける骨形成とEP4 第18回BMP研究会 特別講演 2011年7月31日 大阪 日本
 9. 野田政樹 骨粗鬆症の新しい治療 並区医師会整形外科医会 講演会 2011年5月23日 東京 日本
 10. Moriya S, Noda M, et al. Parathyroid hormone stimulates Tob1 expression in osteoblastic cells in vitro and in vivo, The 34th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, MN, USA, October 12 - 15, 2012
 11. Shirakawa J, Noda M, et al. PTH Enhances Mechanical Stress-induced Osteoblast Proliferation in Calvarial Derived Osteoblasts via Up-regulation of CyclinD1 Expression, The 34th

- Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, MN, USA, October 12 - 15, 2012
12. Kawasaki M, Noda M, et al. The expression of Ift88 is dose-dependently decreased in cultured chondrocytes ATDC5 when treated with TGF- β 1, The 34th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, MN, USA, October 12 - 15, 2012
 13. Watanabe C, Noda M, et al. Cnot3(Ccr4-not complex subunit3), a regulator of mRNA stability, regulates bone mass and gene expression related to osteoclast formation, The 34th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, MN, USA, October 12 - 15, 2012
 14. Aryal S, Noda M, et al. Nck, an actin cytoskeleton modulator, controls expression of osteocytic genes, phosphate homeostasis by regulating FGF 23 expression in bone and maintains bone mass, The 34th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, MN, USA, October 12 - 15, 2012
 15. Notomi T, Noda M, et al. Lysosomal calcium channel, TPC2, regulates osteoclastogenesis via generation of intracellular Ca²⁺ response and subsequent NFATc1 localization: a novel mechanism of osteoclastic Ca²⁺ signaling, The 34th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, MN, USA, October 12 - 15, 2012
 16. Hayata T, Noda M, et al. Limb- and Sternum-Specific Inactivation of Dullard Gene Causes Severe Defects in Skeletal Development via Alteration of TGF- β Signaling, The 34th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, MN, USA, October 12 - 15, 2012
 17. Nakamoto T, Noda M, et al. Chondrocyte Metabolism in Inflammatory Arthritis is regulated by CIZ, The 34th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, MN, USA, October 12 - 15, 2012
 18. Ezura Y, Noda M, et al. Identification of Signature Genes Selectively Expressed in Mesenchymal Stem Cells Derived from Synovial Joint Tissues, The 34th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, MN, USA, October 12 - 15, 2012
 19. Hayata T, Noda M, et al. Limb- and sternum-specific inactivation of Dullard gene causes severe defects in skeletal development via alteration of TGF- β signaling, 1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting with the ANZBMS 22nd Annual Scientific Meeting, Perth, Australia, September 2-5, 2012
 20. Watanabe C, Noda M, et al. Analysis of high turnover type bone loss due to haploinsufficiency of Cnot3, a subunit of Ccr4-not complex(mRNA seadenylase), 1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting with the ANZBMS 22nd Annual Scientific Meeting, Perth, Australia, September 2-5, 2012
 21. Watanabe C, Noda M, et al. Cnot3 (Ccr4-not complex subunit 3) controls bone mass via regulating expression of genes including those related to osteoclastic activity. The 2nd Tri-University Consortium on Oral Science and Education, Beijing, China, July 27-28, 2012
 22. Kawasaki M, Noda M, et al. Expression of Ift88, a Cilia Component Gene, is Under Temporal Regulation Along with the Differentiation of Chondrocytic Cell Line ATDC5, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 23. Watanabe C, Noda M, et al. Cnot3, a Crucial Factor of mRNA Stability, Controls Osteoblastic Differentiation, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 24. Suzuki T, Noda M, et al. TRPV4 Deficiency Suppresses Fluid Flow Induced Activation of Calcium Oscillation in a Manner Dependent on Osteoblastic Differentiation, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San

- Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
25. Miyajima D, Noda M, et al. Conditional Profilin1 Deficiency in Multiple Cell Lineages of Mesenchyme Origin Based on Prx1-Cre System Severely Disrupts Axial and Appendicular Skeletal Development, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 26. Aryal S, Noda M, et al. Nck, Actin Cytoskeleton Protein, Supports Osteoblastic Bone Increment and Suppresses Osteoclastic Bone Loss, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 27. Sakuma T, Noda M, et al. Role of CIZ in Melanoma Activity for Metastasis, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 28. Nagao M, Noda M, et al. Sympathetic Control of Bone Mass Regulated By Osteopontin, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 29. Notomi T, Noda M, et al. Opto-Functional Control of Intracellular RANKL Transport/Secretion in Osteoblasts to Enhance Coupling With Osteoclasts Based on Photo-Energy Conversion of Molecularly-Engineered Channel-Rhodopsin , The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 30. Hayata T, Noda M, et al. Dullard Is a Novel Common Negative Regulator of BMP Signaling in Osteoblasts and Chondrocytes Acting at Smad1 Level Independently of Caveolae-Proteasome Pathway, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 31. Nakamoto T, Noda M, et al. Molecular Mechanism of CIZ Actions to Exacerbate Inflammation in Serum-induced Arthritis Based on Formation of Positive Feedback Loop with IL-1 Beta, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 32. Ezura Y, Noda M, et al. Identification of the Differentially Methylated Promoter and Intronic CpG Sites in the Human Synovium and Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells, The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, CA, USA, September 16 - 20, 2011
 33. Hayata T, Noda M, et al. Inactivation of Dullard in the mouse limb and sternum displays reartdatio of ossification in sdeletogenesis, KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, September 8-9, 2011
 34. Nagao M, Noda M, et al. Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin, The 93rd Annual Meeting & Expo, Boston, MA, USA, June 4-7, 2011
 35. Hanyu R, Noda M, et al. Anabolic action of PTH signaling on bone activated expression of a clock gene, Per-1, The 1st International Academy of Sportology, Tokyo, Japan, March 5, 2011
 36. 平林恭子、野田政樹、他 $\beta 2$ アドレナリン受容体による PTH 受容体シグナル制御の解析 第 22 回日本歯科医学会総会 11 月 9 日-11 日, 2012 大阪 日本
 37. 守屋秀一、野田政樹、他 骨芽細胞における G タンパク質共役型受容体(GPCR) による RANKL 制御の検討 GPCR control of RANKL expression in osteoblasts 第 30 回日本骨代謝学会 7 月 19 日-21 日, 2012
 38. 白川純平、野田政樹、他 PTH 及びメカニカルストレスによる骨芽細胞におけるサイクリン D1 発現の検討 Expression of cyclin D1 in osteoblasts by PTH and mechanical stress 第 30 回日本骨代謝学会 7 月 19 日-21 日, 2012
 39. 川崎真希理、野田政樹、他 一次繊毛タンパク Bbs3 は骨代謝に関与する Ciliary protein Bbs3 is involved in bone metabolism 第 30 回日本骨代謝学会 7 月 19 日-21 日, 2012
 40. Smriti Aryal A.C, 野田政樹、他 骨芽

- 細胞におけるアクチン細胞骨格調整因子、Nck の欠損は骨芽細胞の遊走と骨形成を阻害す Deficiency of Nck, an Actin Cytoskeleton Modulator in the Osteoblast Inhibits Osteoblast Migration and Suppresses Bone Formation 第30回日本骨代謝学会 7月19日-21日, 2012
41. 渡辺千穂、野田政樹、他 骨量制御の新転写後性分子機構: mRNA deadenylase である Ccr4-not complex 構成因子 Cnot3 の欠失による高回転型の骨量減少の解析 Molecular mechanisms underlying mRNA stability in bone metabolism: Role of Ccr4-not complex subunit3(Cnot3) 第30回日本骨代謝学会 7月19日-21日, 2012
42. 納富拓也、野田政樹、他 Two Pore Channel 2 を介したリソソーム由来 Ca²⁺による新たな破骨細胞分化制御機構 Lysosomal calcium channel, TPC2, regulates osteoclastogenesis via regulation of intracellular calcium response 第30回日本骨代謝学会 7月19日-21日, 2012
43. 中元哲也、野田政樹、他 PTH の骨形成促進作用はシャトリングタンパク質 CIZ によって抑制される Anabolic Action of PTH/PTHrP Receptor Signaling in Bone is Suppressed by a Nucleocytoplasmic Shuttling Protein CIZ 第30回日本骨代謝学会 7月19日-21日, 2012
44. 早田匡芳、野田政樹、他 四肢及び胸骨特異的Dullard 遺伝子欠損マウスは骨化遅延を示す Limb- and Sternum-Specific Inactivation of Dullard Gene Causes Retardation of Ossification 第30回日本骨代謝学会 7月19日-21日, 2012
45. 江面陽一、野田政樹、他 ヒト骨髄および滑膜由来間葉系細胞において異なる CpG メチル化を示す遺伝子群の探索と骨軟骨細胞分化の制御に関わる転写因子群の抽出: RUNX2 および RUNX3, DLX5, ALX4 遺伝子 Identification of Differentially Methylated Transcription Factor Genes in the Human Synovium and Bone Marrow Derived Mesenchymal Cells: RUNX2, RUNX3, DLX5, and ALX4 Genes 第30回日本骨代謝学会 7月19日-21日, 2012
46. 宮嶋大輔、野田政樹、他 四肢-胸郭間葉系細胞における Profilin1 欠失マウスは重度骨格形成不全を示す Profilin1-deficient mice in

limb-thoracic mesenchyme exhibit severe defects in skeletal development 第56回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会 10月21日-23日, 2011 大阪 日本

47. 佐久間朋美、野田政樹、他 悪性黒色腫細胞の転移における CIZ の促進的作用 第65回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 4月21日-22日, 2011 東京、日本

[その他]
ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/mri/section/advanced/mp/index.html>

プレスリリース
「骨粗鬆症の為の骨を作るメカニズムの発見」2012年4月24日
東京医科歯科大学 プレスリリース
<http://www.tmd.ac.jp/press-release/20120419/index.html>

新聞
2012年5月11日「骨粗鬆症における骨形成促進薬のメカニズム解明」科学新聞
2012年4月25日「骨粗しょう症 骨形成治療に2受容体必須」化学工業日報
2011年10月17日「骨粗鬆症 仕組み一部解明」朝日新聞
2011年10月19日「骨粗しょう症 原因物質を解明 東京医科歯科大 マウスで実験」日経産業新聞
2011年10月21日「運動刺激ないと骨委縮 関与分子の機能を特定」科学新聞

6. 研究組織
(1) 研究代表者
野田 政樹 (NODA MASAKI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 50231725