

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592921

研究課題名(和文)メカニカルストレスによる顎堤の骨吸収メカニズムの解明

研究課題名(英文)A study for bone resorption of jaw at mechanical stress

研究代表者

諸井 亮司 (MOROI, RYOJI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70325471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：顎堤の骨吸収は、機械的刺激による骨造成と骨吸収の不均衡が一つの原因と考えられる。近年、荷重や張力などの機械的刺激による骨芽細胞や破骨細胞への分子レベルでの影響を検討することが可能となってきた。そこで本研究では、機械的刺激による破骨細胞の分子レベルでの変化を明らかにすることを目的に、周期性伸展刺激がMC3T3-E1細胞およびRAW264.7細胞に与える影響について検討した。本研究の結果より、圧縮や伸展などのメカニカルストレスが骨芽細胞と破骨細胞に作用した際には、骨芽細胞と破骨細胞の反応はそれぞれの力に対して異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mechanical loading conditions result in alteration in bone mineral density and quantity, which may be partly attributed to an imbalance in bone formation and resorption. To investigate the effect of mechanical loading (compress and stretch) on osteoblast and osteoclast differentiation, we used a stretch system to culture MC3T3-E1 and RAW264.7 cells. The expressions of Runx2, EphB4, MMP9 and TACE mRNA in MC3T3-E1 cells were enhanced under compressive force, while the expressions of Osterix, Coll and EphB4 mRNA were inhibited under stretch force. On the other hand, compressive force inhibited the enhancement of TRAP and DC-STAMP mRNA in RAW264.7 cells by RANKL. Stretch force had no effect on the enhancement of DC-STAMP mRNA expression by RANKL.

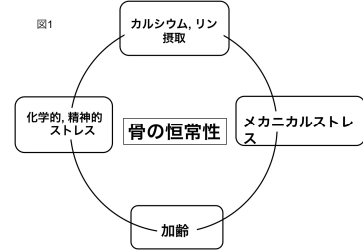
These results, taken together, demonstrate that the responses of MC3T3-E1 and RAW264.7 cells to compressive and stretch force are different.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨吸収 メカニカルストレス RANKL 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

抜歯後の歯槽骨レベルの低下、義歯床下の顎堤の骨吸収、歯周病やインプラント周囲炎による歯槽骨吸収、骨移植後の骨吸収を抑制することは補綴処置を長期間成功する上で非常に重要である。骨の恒常性は様々な因子によってバランスが取られているが、このバランスが崩れると骨吸収に傾く(図 1, 2)。外来刺激(メカニカルストレス、細菌、金属イオンなど)による骨吸収や炎症性骨吸収では、破骨細胞が活性化され骨吸収が促進されていると考えられている。この破骨細胞を主に活性化する因子が



Receptor Activator of NF-kB Ligand (RANKL)である(図 2)。RANKL は破骨細胞前駆体細胞膜上の RANK 分子に結合し破骨細胞の分化を促進する(図 2)。RANKL-RANK のシグナルは TNF-Associated Factor (TRAF)2, TRAF5,

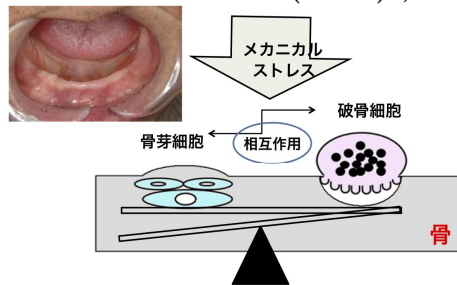


図2 メカニカルストレスによる骨芽細胞と破骨細胞のアンバランス

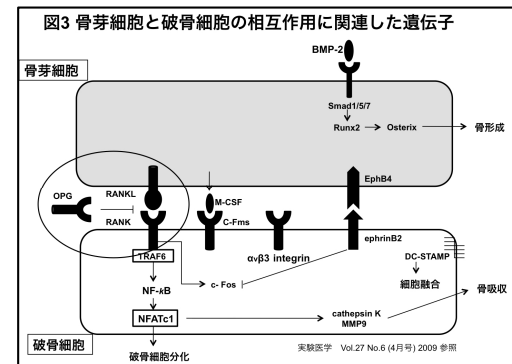
TRAF6 などを介して核内に伝達される。RANKL シグナルは破骨細胞前駆体上の RANK に結合し、TRAF 6などを介して核内に伝達される。

この RANK をコードする遺伝子が先天的に変異する場合があります。遺伝子の変異部位によって、広範性骨格性高ホスファターゼ症、家族性広汎性骨溶解症あるいは骨パジェット病と呼ばれる骨の疾患が見られる。その他にも難聴、歯の喪失、高カルシウム血症などが見られる。このように補綴領域のみならず全身疾患に関連した分野で RANKL に関連した骨吸収の解明とその対応が重要である。

この RANKL は骨芽細胞をはじめ歯肉上皮細胞や T 細胞、B 細胞などが恒常的または刺激に反応して発現している。さらに最近、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に EphB4 と ephrinB2 の結合の重要性が指摘されている。そこで本研究では、骨の恒常性を保っている因子(図 1)のなかで特に補綴領域に関連したメカニカルストレス(周期性伸展刺激)による破骨細胞の反応(RANK と ephrinB2 分子の発現)と骨芽細胞における RANKL と EphB4 発現機構を解析する。

さらにメカニカルストレスによる直接的な破骨細胞への影響を検討し、そのメカノレセプターについて探索する。本研究成果はメカニカルストレスに関連した義歯床下やインプラント周囲の骨吸収機構の解明の一助となると考えられる。また、将来的に骨吸収抑制物質を開発する上で重要な手がかりとなりうる。

圧力や張力などのメカニカルストレスによる骨芽細胞や破骨細胞への分子レベルでの影響が、近年、国内外で検討され始めている。我々は、微小重力環境を作り出すことができる 3 次元クリノスタット培養装置(以下クリノスタット)を利用して、微小重力環境が骨芽細胞および破骨細胞の分化に与える影響および骨吸収に関連したマーカー遺伝子の発現変化を検討し報告してきた。また、インプラント周囲の骨吸収に破骨細胞が深く関与し RANKL と OPG という分子が重要な役割を果たしているデータを得ている。これらの骨吸収には、RANKL 分子が重要であり、種々の外来刺激に反応して骨芽細胞が発現する RANKL が、この骨吸収を制御している可能性が高いと考えている。



申請者(研究代表者)は、1992年より九州大学歯学部口腔解剖学教室にて破骨細胞の分化メカニズムの研究に着手し、その後、2001年にハーバード大学歯学部/フォーサイス研究所サイトカインバイオロジー教室(Prof. Li YP)に留学し、破骨細胞と骨吸収の研究を発展させた。さらに、研究分担者は歯槽骨吸収の抑制法の開発に取り組んでいる。このような破骨細胞の研究に実績がある研究グループを組織し、以下の仮説をたてて立証を行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯科補綴物装着下でのメカニカルストレスによる歯槽骨の骨吸収メカニズムを分子レベルで解明し将来的には骨吸収抑制方法への開発へと発展させることである。はじめにメカニカルストレス(周

期性伸展刺激)下での培養骨芽細胞における骨吸収関連遺伝子である RANKL と EphB4 の発現について詳細に検討する。次に培養破骨細胞にメカニカルストレスを負荷し、破骨細胞の増殖、融合および分化に与える影響について分子生物学的手法を用いて解析する。以上からメカニカルストレスによる骨芽細胞と破骨細胞の相互作用による歯槽骨の吸収メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

使用細胞株および細胞培養

培養細胞として、マウス破骨細胞前駆細胞様細胞株 RAW264.7 細胞 (広島大学島津先生より供与) とマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞 (the European Collection of Cell Cultures より購入) を使用した。

RAW264.7 細胞は, antibiotic mixture (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10% ウシ胎仔血清 (FBS) (Biological Industries, Haemek), 1.5 g/L 炭酸水素ナトリウム (Invitrogen) を含む α -Minimum Essential Medium (α -MEM) (Sigma, St. Louis, MO) を使用し, 37°C, 5% CO₂ 気相下で培養した。MC3T3-E1 細胞は, antibiotic mixture, FBS, 50 μ g/ml L-アスコルビン酸 (Sigma) を含む α -MEM を使用し, 37°C, 5% CO₂ 気相下で培養した。

培養細胞伸展システムを用いた RAW264.7 細胞と MC3T3-E1 細胞の培養

培養には 4 ウェルのシリコン膜チャンパー (STB-CH-4W, STREX 社, 東京) (以下チャンパー) を用いた。細胞接着性を高めるため, 細胞播種前にコラーゲン酸性溶液 (ウシ真皮酸可溶性コラーゲン, Atelocollagen IAC-50, KOKEN, 東京) をチャンパーにコーティングした。コーティングは, コラーゲン酸性溶液を, phosphate buffered saline (PBS) 溶液で 0.03% (wt/vol) に調整し, チャンパーの底面が完全に覆われるようにコラーゲン希釈液を 600 μ l 注ぎ, CO₂ インキュベーター内で 37°C にて 24 時間静置して行った。その後, 浮遊コラーゲンを取り除くため, PBS 溶液でチャンパーを 2 回洗浄した。このようにコラーゲン前処理を行ったチャンパー上に, 各細胞を播種した。

圧縮および伸展刺激は, 培養細胞伸展システム (STB-140, STREX 社, 東京) を用いて, 5% の周期性機械刺激を, 6 秒間で 1 往復, その後 2 秒休止というスケジュールで, 培養細胞に継続的に負荷した。

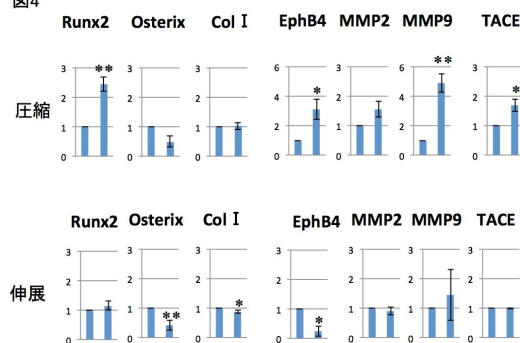
チャンパー上に RAW264.7 細胞を 6.3 x

10³ 個/ウェルの濃度で播種し, 2 日間の前培養を行った後, 50 ng/ml の sRANKL 存在下で更に 3 日間培養後に, 圧縮率または伸展率 5% の周期性機械刺激の負荷を開始した。同様に, MC3T3-E1 細胞を 6.3 x 10⁴ 個/ウェルの濃度で播種し, 3 日後に培養細胞伸展システムを用いて, 圧縮率または伸展率 5% の周期性機械刺激の負荷を開始した。

伸展率 5% の周期性機械刺激の負荷後に, real-time quantitative RT-PCR を行った。

4. 研究成果

図4

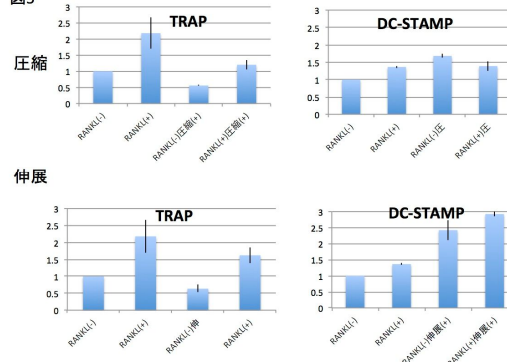


周期性伸展刺激が MC3T3-E1 細胞の分化および骨吸収関連遺伝子の発現に与える影響

圧縮率または伸展率 5% の周期性機械刺激が MC3T3-E1 細胞における RUNX2, Osterix, ColI, EphB4, MMP2, MMP9 および TACE mRNA の発現に与える影響を, real-time quantitative RT-PCR 法を用いて検討した (図 4)。

その結果, 圧縮率 5% の周期性機械刺激は, MC3T3-E1 細胞の Runx2, EphB4, MMP9 および TACE mRNA の発現を有意に促進した (図 4 p < 0.01 または 0.05)。一方, 伸展率 5% の周期性機械刺激は, MC3T3-E1 細胞における Osterix, ColI および EphB4 mRNA の発現を有意に抑制した (図 4 p < 0.01 または 0.05)。

図5



周期性伸展刺激が RANKL に依存した RAW264.7 細胞の分化および骨吸収関連遺伝子の発現に与える影響

圧縮率または伸展率 5%の周期性機械刺激が RANKL を添加した RAW264.7 細胞における TRAP と DC-STAMP mRNA の発現に与える影響を、real-time quantitative RT-PCR 法を用いて検討した。

その結果、RANKL は RAW264.7 細胞における TRAP と DC-STAMP mRNA の発現を促進した。圧縮率 5%の周期性機械刺激は、RANKL による TRAP と DC-STAMP mRNA の増強を抑制した。一方、伸展率 5%の周期性機械刺激、RANKL による DC-STAMP mRNA の増強を抑制しなかった (図 5)。

以上より、圧縮や伸展などのメカニカルストレスが骨芽細胞と破骨細胞に作用した際には、骨芽細胞と破骨細胞の反応はそれぞれの力に対して異な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 1 件)

周期性伸展刺激が RAW264.7 細胞と MC3T3-E1 細胞に与える影響

牧平清超, 峯裕一, 首藤崇裕, 寺田善博, 二川浩樹

老年歯科医学 27(2) 77~86, 2012

[学会発表](計 6 件)

動物モデルを用いたチタン製インプラント周囲組織中のチタンに関する解析

和智貴紀, 首藤崇裕, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超

日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー
2014 年 8 月 8 日 鹿児島県鹿児島市

ラット実験モデルを用いたインプラント周囲粘膜炎の解析

首藤崇裕, 和智貴紀, 片山洋子, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超

日本補綴歯科学会第 123 回学術大会
2014 年 5 月 24-25 日

宮城県仙台市

(ポスター発表)

インプラント体表面からの溶出チタンの検討

和智貴紀, 首藤崇裕, 中村優介, 的野良就, 篠原義憲, 諸井亮司, 牧平清超

2014 年 5 月 24-25 日 宮城県仙台市
(ポスター発表)

チタンイオン存在下で LPS が歯周組織に与える影響

和智貴紀, 首藤崇裕, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超

日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー
2013 年 8 月 30~31 日 長崎県長崎市

チタンイオンと LPS が歯周組織に与える影響

和智貴紀, 首藤崇裕, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 栗田賢一, 牧平清超

日本補綴歯科学会九州支部学術大会 2013 年 8 月 24~25 日 佐賀県佐賀市

周期性伸展刺激に対する破骨細胞の反応

和智貴紀, 牧平清超, 首藤崇裕, 峯裕一, 諸井亮司, 二川浩樹, 寺田善博

日本補綴歯科学会中国四国・九州支部合同学術大会 2012 年 9 月 1-2 日 広島県広島市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者
諸井亮司

(2)研究分担者
牧平清超
坂井貴子

(3)連携研究者