

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593099

研究課題名(和文) SHIPノックアウトマウスを用いたメカニカルストレス誘導骨代謝に関する研究

研究課題名(英文) Role of bone metabolism caused by mechanical stress in SHIP KO mice

## 研究代表者

吉松 昌子 (YOSHIMATSU, Masako)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：20420630

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)： SHIPは免疫応答の場においてB細胞レセプターのシグナル伝達に重要な役割を示す。免疫と骨代謝は密接に関係しているといわれているが、SHIPも同様に骨代謝においても近年その役割を解明されつつある。われわれは、in vitroにおいて、SHIPがTNF- $\alpha$ の関わる破骨細胞形成を負に制御する可能性を示した。in vivoにおけるメカニカル誘導破骨細胞形成では、SHIPノックアウトマウスとコントロールマウスに有意な差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)： SHIP (SH2-containing inositol-5'-phosphatase) plays an important role for signal transduction of B cell receptor in immunoreaction. In bone metabolism, closely associated with immunology, SHIP also has been researched in recent years. We showed that SHIP might negatively regulate TNF- $\alpha$  mediated osteoclastogenesis in vitro. We also investigated the effect of SHIP caused by methanical stress using an orthodontic tooth movement model in vivo. The amount of tooth movement in SHIP knockout mice wasn't significantly increased compared with control mice.

研究分野：矯正

キーワード：SHIP TNF- $\alpha$  破骨細胞 矯正

## 1. 研究開始当初の背景

矯正臨床における歯の移動や顎骨の成長誘導は、骨のリモデリングを利用した治療である。これまで、多くの研究者が骨代謝に関連するいくつかの因子や、直接的に骨形成・吸収作用を担う骨芽細胞・破骨細胞について、その解析のため試行錯誤してきた。我々もその一部分ではあるが骨代謝の解明を続けている。

我々は近年 TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成について研究を行ってきた。マウスの上顎臼歯近心移動モデルを構築し、歯の移動時 TNF- $\alpha$  が重要な役割を示すことを報告した (Yoshimatsu et al; JBMM 2006, Kitaura, Yoshimatsu et al; JDR 2008)。TNF- $\alpha$  は歯根膜腔内に存在し、歯根圧迫側の破骨細胞形成を促し、その結果歯の移動を引き起こすのである。また IL-12、IL-18、IFN- $\gamma$  などのサイトカインが TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成抑制作用を示すことを確認した (Yoshimatsu et al; Bone 2009, Yoshimatsu et al; Arch Oral Biol 2011, 他 3 報)。これらのサイトカインは破骨細胞をアポトーシスに導いてしまうのである。

その後研究を始めた SHIP は、発見当初免疫系に関する因子として紹介された (Liu et al; Semin Immunol 1997)。近年、免疫系の多くのシグナルが骨代謝にも深く関与していることがわかってきていること、SHIP ノックアウトマウスは重篤な骨粗鬆症になったという報告があること (Takeshita et al; Nat Med 2002) から、これまで研究を進めてきた TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成への SHIP の関わりについて研究することとした。

## 2. 研究の目的

これまでに、SHIP ノックアウトマウスの骨髄細胞において、コントロールマウスと比較して TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成を促進することを確認した。マウス大腿骨より採取した骨髄細胞に M-CSF と TNF- $\alpha$  を投与して培養したところ SHIP ノックアウトマウスの骨髄細胞

においてコントロールと比較して多核破骨細胞が多く形成されたのだ。このことから、SHIP が TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成を抑制していることが *in vitro* において示唆された。しかし、実際の矯正臨床において組織が矯正力、すなわちメカニカルストレスを受けた環境下で破骨細胞が形成される中、SHIP がどのような役割を果たしているのか、また破骨細胞分化過程のどこに SHIP が作用しているのか未だ不明である。本研究では、SHIP の *in vivo* における作用を検討・解析していくことを目的とした。

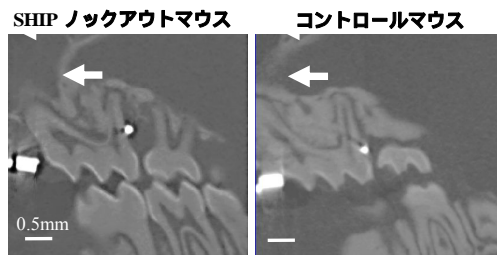
## 3. 研究の方法

マウスの矯正学的歯の移動実験モデルは、過去に我々が確立した方法 (Yoshimatsu et al; JBMM 2006) を改良し使用した。上顎切歯と左側第一臼歯間に NiTi closed coil spring を装着し第一臼歯を近心移動する方法である。装置装着後、経時的に歯の移動様相を 3D マイクロ CT にて撮影して歯の移動距離を計測し、SHIP ノックアウトマウスとコントロールマウスを比較した。また、歯の移動後、歯を含む組織を経時的に採取して通法に従って脱灰・パラフィン包埋・薄切後パラフィン切片標本作製し、TRAP 染色により破骨細胞形成様相を観察した。コントロールマウスにおいては、SHIP の免疫染色を行いその組織学的観察を行った。

次に、それぞれのマウスの頭蓋骨粘膜下に TNF- $\alpha$  (1.5  $\mu$ g/日) を 5 日間投与した後、上記と同様組織切片標本作製し、TRAP 染色にて破骨細胞形成を比較した。

## 4. 研究成果

我々は、SHIP ノックアウトマウス大腿骨の骨髄細胞から TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成を行い、SHIP がその破骨細胞形成を負に制御することを *in vitro* において確認した。*in vivo* においては、まず SHIP ノックアウトマウスに



上顎第一白歯近心移動 14 日後のマイクロ CT 画像  
(矢印：歯の移動方向)

おける矯正学的歯の移動距離を経時的に観察した。その結果、コントロールマウスと比較して歯の移動距離は同等であった(上図)。移動した歯の周囲組織の TRAP 染色において歯根圧迫側の TRAP 陽性細胞数は SHIP ノックアウトマウスとコントロールマウス間で有意な差は認められなかった。また、マウス頭蓋骨粘膜下に TNF- $\alpha$  を投与した実験において、頭蓋縫合部組織における TRAP 陽性細胞数は SHIP ノックアウトマウスとコントロールマウス間に有意な差は認められなかった。我々の行った条件下においては、SHIP はメカニカルストレス誘導破骨細胞形成や TNF- $\alpha$  誘導破骨細胞形成に重要な役割を果たしていない可能性が示唆された。

#### 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 5 件)

Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y,

Kohara H, Morita Y, Yoshida N: IL-12 inhibits lipopolysaccharide stimulated osteoclastogenesis in mice. J Immunol Res.

2015 : 214878, 8 pages (2015), 査読有

Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T: Effect of cytokines on osteoclast formation and bone resorption during mechanical force loading of the periodontal membrane.

Scientific World Journal. 2014 : 617032, 7 pages (2014), 査読有

Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H,

Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T:

Immunological reaction in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. Clin Dev Immunol. 2013 : 181849, 8 pages (2013), 査読有

北浦英樹 : 最新の骨粗鬆症学 骨粗鬆症の最新知見 TNF- $\alpha$ . 日本臨床. 71(2) : 141 - 145 (2013), 査読無

Kohara H, Kitaura H, Yoshimatsu M,

Fujimura Y, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N:

Inhibitory effect of interferon- $\gamma$  on experimental tooth movement in mice. J Interferon Cytokine Res. 32 (9) : 426 - 31 (2012), 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

吉松昌子, 北浦英樹, 藤村裕治、小原悠、森田幸子、吉田教明 : LPS による破骨細胞形成に対する IL-12 の抑制機序 . 第 72 回日本矯正歯科学会, キッセイ文化ホール, 長野県松本市, 10 月 7-9 日, 2013

Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N: Effects of IL-12 on mechanical loadong induced bone resorption. 2012 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis (USA), Oct 12-15, 2012

Kohara H, Kitaura H, Yoshimatsu M, Fujimura Y, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N: IFN- $\gamma$  inhibits mechanical stress-induced osteoclastogenesis and bone resorption. 2012 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis (USA), Oct 12-15, 2012

吉松昌子, 北浦英樹, 小原悠, 森田幸子, 藤村裕治 : IL-12 がメカニカルストレスによる骨吸収に及ぼす影響 . 第 30 回日本骨代謝学会, 新宿京王プラザホテル, 東京都新宿区, 7 月 19-21 日, 2012

吉松昌子, 北浦英樹, 藤村裕治, 小原悠,  
森田幸子, 吉田教明: IL-12 が LPS 誘導破  
骨細胞形成に及ぼす影響. 第 71 回日本矯  
正歯科学会, 盛岡市民文化ホール, 岩手県  
盛岡市, 9 月 26-28 日, 2012

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉松 昌子 (YOSHIMATSU, Masako)  
長崎大学・病院(歯学系)・助教  
研究者番号: 20420630

### (2) 研究分担者

北浦 英樹 (KITAURA, Hideki)  
東北大学・歯学研究科(研究院)・准教授  
研究者番号: 60295087

佛坂 齊社 (HOTOKEZAKA, Hitoshi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
准教授  
研究者番号: 90199513

藤村 裕治 (FUJIMURA, Yuji)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
助教  
研究者番号: 70448504