

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792283

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答が歯の移動に果たす役割について

研究課題名(英文)The possible role of endoplasmic reticulum stress in orthodontic tooth movement

研究代表者

村上 隆(MURAKAMI, TAKASHI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00534786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：歯の移動における詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。一方、細胞は小胞体ストレスに反応し、生存維持や細胞壊死を誘導することが明らかになってきた。本研究の目的は、実験的歯の移動モデルを用いて、歯根膜や歯槽骨における小胞体ストレスの関与を検討することであった。本研究の結果、骨添加時および低酸素状況下において、小胞体ストレスマーカーの発現を認めたことから、歯の移動時に小胞体ストレスが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The detailed mechanisms of orthodontic tooth movement have not been revealed. On the other hand, it was revealed that endoplasmic reticulum stress induced that cell survival and cell necrosis. The aim of this study was to examine the participation of the endoplasmic reticulum stress in periodontal membrane and the alveolar bone using an experimental tooth movement. Because the endoplasmic reticulum stress marker expressed in bone addition and the hypoxia situation, it was suggested that endoplasmic reticulum stress participated in the orthodontic tooth movement.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 / 矯正・小児系歯科

キーワード：小胞体ストレス 歯の移動

1. 研究開始当初の背景

歯に矯正力が加わると、最初に歯根膜が圧縮される。そして、圧縮された歯根膜細胞は、周辺の毛細血管の圧縮などにより虚血状態となり、やがて歯根膜変性に硝子様変性が生じることが知られている。このような矯正力による歯根膜の初期反応は、歯槽骨の代謝回転を亢進させる引き金となり、歯が歯槽骨内を移動することを可能にする。一方、過度な矯正力が歯周組織に負荷された場合、外傷性咬合における歯周組織の反応で見られるように、歯周組織に障害が生じることがある。

これまでにも、このような矯正的歯の移動初期における生体反応のメカニズムの解明はなされてきたが、これらの反応が炎症様反応であること以外、未だ大きな知見は得られていない。そのため、これまで歯の移動によって生じる副作用を予防するための有効な方策がなかった。

申請者はこれまで、一貫してメカニカルストレスが生じる組織における組織反応を検討してきた。特に、軟骨特異的に発現する新規遺伝子として *Ten-m/0dz3* を同定し、その発現を解析した。また、骨折の治癒機転における *Sox9* や *Runx2* の発現を検討し、メカニカルストレスと骨折治癒組織の治癒のメカニズムの解明を行ってきた。

ところで、小胞体ストレスは、細胞で作られるタンパク質が低酸素や低 pH 状態下にて変性し、小胞体に蓄積することである。小胞体ストレスは細胞の正常な生理機能を妨げるため、細胞にはその障害を回避し、恒常性を維持する小胞体ストレス応答という仕組みが備わっている。この不調により糖尿病、心臓疾患、神経変性疾患をはじめ様々な疾患の発症・進展にも関与することが報告されており、最近注目を集めて

いる生命現象の一つである。

申請者の所属する研究室では、骨の発生における小胞体ストレス応答の果たす役割を既に検討しており、頭蓋を用いた *in vivo* の実験系において、石灰化とともに小胞体ストレスマーカーやシャペロン分子が、mRNA レベルとタンパクレベルのいずれにおいても亢進することを見出し現在論文作成中である(その一部は平成 23 年度の歯科基礎医学会で報告)。

一方、矯正力により圧縮された歯根膜組織や歯槽骨においては、虚血による低酸素状態などの細胞周囲の微小環境は、一般的な骨の形成面における環境よりもさらに過酷であることが想像される。

そこでこのような所見と、我々のこれまでの成果を併せて、実験的歯の移動の初期反応として、歯根膜と歯槽骨において小胞体ストレス応答が関与するという着想に至った。

2. 研究の目的

矯正歯科治療中、歯に矯正力が加わると、歯根膜や歯槽骨が圧迫され虚血や低酸素が生じ、炎症様反応が惹起される。しかし、矯正的歯の移動における詳細な分子メカニズムは未だ明らかにされていない。一方、小胞体ストレスは、栄養飢餓、虚血、低酸素や遺伝子変異などによって生じた変性タンパク質が小胞体に蓄積し細胞にストレスが生じることである。近年、細胞は小胞体ストレスに反応し、変性タンパクを除去することで生存維持に働くと同時に、ストレスの強さによってはアポトーシスを積極的に誘導することが明らかになってきた。本研究は、実験的歯の移動モデルを用いて、そのような微小環境における歯根膜や歯槽骨の小胞体ストレス応答を検討する。

歯の移動において、小胞体ストレス応答がいつ、どの部位で起きているかを明らかにする。さらに、その役割について検討する。また、小胞体ストレス応答を補佐するシャペロン分子についても検討する。具体的には、次のサブテーマで実施する；

1) 歯の移動における小胞体ストレスの発現動態を明らかにする。

実験的歯の移動モデルおよびヒト歯根膜細胞を用いて、低酸素状態の細胞における小胞体ストレスの時間的・部位的分布を *in vivo*、*in vitro* 両面から探索することにより、細胞レベルでのストレス反応を詳細に把握する。

2) 歯の移動における小胞体ストレス応答の機能的役割を明らかにする。

RNAi を用いた機能抑制実験を行うことにより、小胞体ストレス応答が歯の移動初期において果たす役割について検討する。また、その経路についても探索する。

3. 研究の方法

本研究では、矯正歯の移動において、未だ解明されていない小胞体ストレス応答の果たす役割を解明する事を目的とし、*in vivo*、*in vitro* 双方からアプローチする。*in vivo* では、実験的歯の移動モデルを用いて、歯の移動において歯根膜のどの部位が圧迫によって低酸素状態となっているのか観察を行い、それに伴う、小胞体ストレスマーカーやシャペロン分子 mRNA の発現動態を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解明する。*in vitro* では歯の移動における小胞体ストレス応答の機能的役割を解明する為に、ヒト歯根膜から得た歯根膜細胞を低酸素状態にて培養し、その状態でメカニカルストレスを負荷することにより、細胞レベルでの小胞体応答を制御する分子を探索する。さらに、

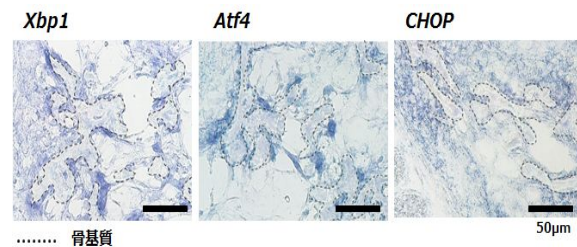
siRNA を用いた機能抑制実験を行うことにより、その経路を探索する。

4. 研究成果

(1) 骨基質表層における小胞体ストレスマーカーの発現

胎生 17.5 日齢の WT 上顎骨組織中における小胞体ストレスマーカーである *Xbp1*、*Atf4*、*CHOP* mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法にて観察した。

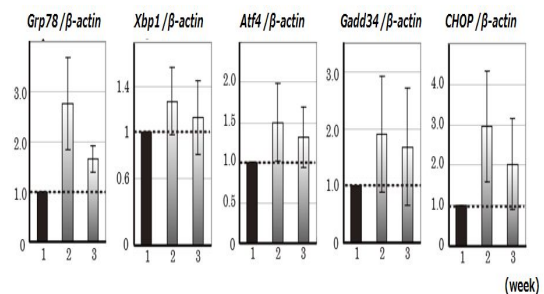
Xbp1、*Atf4* mRNA は、上顎骨海綿骨の基質表層部 (図破線) 近傍に強く発現していた。*CHOP* mRNA の発現も同様に、上顎骨海綿骨の基質表層部 (図破線) 近傍に認められた。しかし、骨基質内部に小胞体ストレスマーカーの発現は認められなかった。



(2) 骨芽細胞の長期培養に伴う小胞体ストレスマーカーの発現

胎生 19.0 日齢の WT 頭蓋骨から単離した骨芽細胞を長期培養し、小胞体ストレスマーカーの発現を定量的 RT-PCR 法にて測定した。

Xbp1、*Grp78*、*Atf4*、*Gadd34*、*CHOP* mRNA の発現量は、培養 2 週目に最も増加しており、3 週目にはやや減少していた。特に *Grp78* mRNA の発現量が他の小胞体ストレスマーカーと比較し著しく増加していた。



(3) 骨基質表層における低酸素マーカーの発現

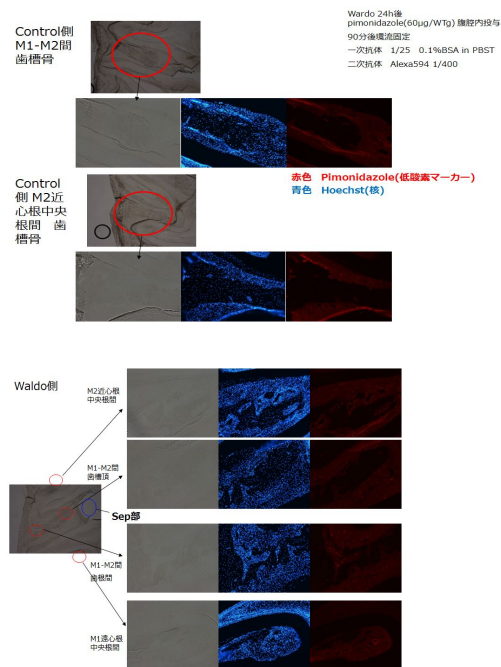
生後0日齢のWT上顎骨組織中における酸素濃度勾配を観察するため、抗pimonidazoleモノクローナル抗体MAB1を用いた蛍光免疫染色法を行った。

上顎骨海綿骨の基質表層にMAB1陽性反応が認められた。

(4) Waldo法にて矯正力負荷時の歯根周囲の低酸素状況確認

7週齢のSDラット上顎M1-M2間において、実験的歯の移動における酸素濃度勾配を観察するため、pimonidazoleモノクローナル抗体MAB1を用いた蛍光免疫染色法を行った。

Waldo側において、周囲歯槽骨にMAB1陽性反応が認められた。低酸素マーカーであるpimonidazoleが発現していた。

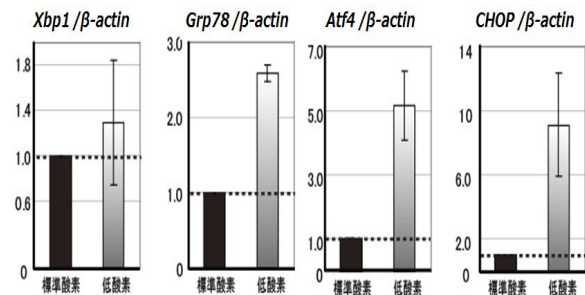


(5) 低酸素刺激に伴う小胞体ストレスマーカーの変動

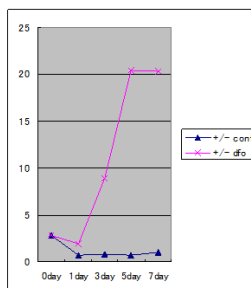
胎生19.0日齢のWT頭蓋骨から単離した骨芽細胞を用い、長期培養後の低酸素刺激に伴う小胞体ストレスマーカーの挙動を定量的

RT-PCR法にて測定した。

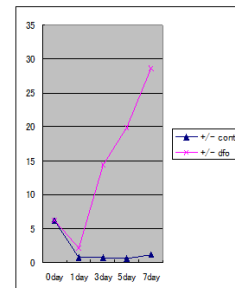
低酸素刺激に伴い、Xbp1、Grp78、Atf4、CHOP mRNAの発現量は増加していた。特に、Atf4、CHOP mRNAの発現が著しく増加していた。



Atf4



CHOP



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 隆 (MURAKAMI TAKASHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号: 00534786

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

柳田 剛志 (YANAGITA TAKESHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90534793

上岡 寛 (KAMIOKA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教

授

研究者番号：80253219