

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25463194

研究課題名(和文) 歯の萌出経路形成における歯槽骨骨吸収メカニズムの解明

研究課題名(英文) The elucidation of the alveolar bone bone resorption mechanism in the eruption course formation of the tooth

研究代表者

森川 和政 (MORIKAWA, KAZUMASA)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：70514686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：イノシトール1,4,5-三リン酸受容体(IP3R)は、イノシトール1,4,5-三リン酸(IP3)の受容体であると共に、細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアに局在するCa<sup>2+</sup>チャネルである。IP3Rのサブタイプの一つであるIP3R-III型は、現在までに得られたデータより、ポドゾームにおいてアクチン細胞骨格の調節に重要な役割を果たしていることが示唆され、また歯槽骨骨吸収においても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors (IP3Rs) are Ca<sup>2+</sup> channels that localize to intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. Analysis of the experimental data strongly suggest IP3R type III may be related to regulation of an actin cytoskeleton in podosomes, actin-rich adhesion structures in osteoclasts and may be associated with the alveolar bone bone resorption.

研究分野：小児歯学

キーワード：破骨細胞 歯槽骨 骨吸収 萌出 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

小児歯科医療は、小児の口腔領域の健全な発育と健康の維持を目的としている。成長発育期は、顎顔面部の成長発育が盛んな中、乳歯から永久歯への交換が行なわれる時期である。日常の小児歯科臨床においては、乳歯外傷や齲蝕に伴う感染により永久歯萌出不全を惹起する症例にしばしば遭遇する時期でもある。この時期のアプローチによっては、不正咬合を防止することが可能であり、永久歯列の咬合関係を確立するために大きな影響を与えることができる。歯の萌出には、萌出経路の形成が重要で、歯を覆っている歯槽骨に破骨細胞の骨吸収がうまく作用しないと歯の埋伏による歯列不正など不正咬合を引き起こす可能性が高くなる。萌出経路の形成には破骨細胞が必須であり、個々の歯の萌出時期にその萌出経路が形成されなければ歯は萌出できない。例えば、破骨細胞のプロトンポンプに非可逆的に結合するパフィロマイシンを萌出中の歯の歯小窩に注入することで萌出を止めたり、大理石病においては破骨細胞の分化を刺激する因子である CSF-1 が欠如して萌出経路の骨を取り除くメカニズムが存在しないため萌出が阻害される、といった報告がある。また、破骨細胞の骨吸収活性には細胞接着、酸分泌、タンパク質分解酵素が深く関わっていることが知られているが、細胞接着については不明な点が多い。

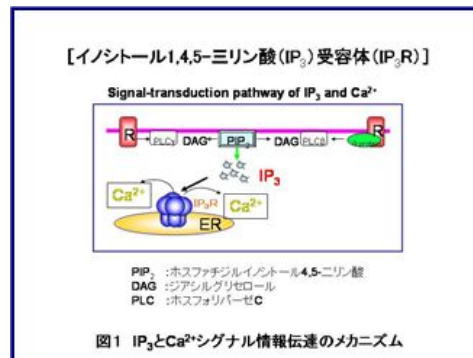
私は、大学院入学時より、ラット破骨細胞におけるイノシトール 1,4,5-三リン酸(IP<sub>3</sub>)受容体(IP<sub>3</sub>R)の局在についての研究を行ってきた。IP<sub>3</sub>は細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストア(小胞体)から Ca<sup>2+</sup>を放出するセカンドメッセンジャーであり、形態変化、分泌、遺伝子発現等の細胞の機能にとって重要な働きを持っている(図1)。IP<sub>3</sub>RはIP<sub>3</sub>の受容体であると共に、細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアに局在する Ca<sup>2+</sup>チャネルで、組織や発生時期に特異的な三つのサブタイ

プ(型、型、型)がある。IP<sub>3</sub>Rは、当初、小胞体に存在すると考えられてきたが、現在では形質膜にも認められており、形質膜に発現する IP<sub>3</sub>Rは細胞骨格、細胞接着の構築に関与していることが報告されている。

一方、破骨細胞の骨基質への接着は骨吸収の重要なステップの一つであり、接着に関わる構造は古くから in vitro においてはアクチンを多く含むポドゾームと呼ばれる構造が相当すると考えられてきた(図2:arrow)。細胞と細胞外基質間の相互作用により、細胞の形態変化、運動、接着が成立し、それらの現象は、アクチン細胞骨格の調節が重要な因子となっている。

研究の結果、私は、IP<sub>3</sub>Rのサブタイプのひとつである IP<sub>3</sub>R-型の局在がこのポドゾーム発現部位と高い相同性を認め、破骨細胞の細胞接着に関与している可能性を示唆した<sup>1)</sup>(図3,4)。

また、現在まで、IP<sub>3</sub>Rアンタゴニストであるゼストスポンギン C(XSC)、IP<sub>3</sub>Rアゴニストである Adenophostin A を用いた実験を行い、破骨細胞の骨吸収能および、細胞骨格、接着構造への影響の検討をすすめてきた。



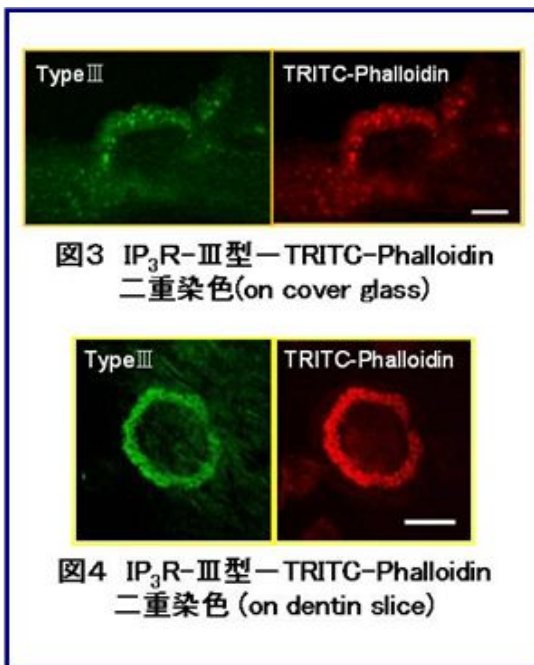


図3 IP<sub>3</sub>R-Ⅲ型—TRITC-Phalloidin  
二重染色(on cover glass)

図4 IP<sub>3</sub>R-Ⅲ型—TRITC-Phalloidin  
二重染色(on dentin slice)

【参考文献】1) Morikawa, K., Goto, T., Tanimura, A., Kobayashi, S. and Maki, K.: *Acta Histochem Cytochem*, 41: 7-13, 2008.

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、最近、イノシトール1,4,5-三リン酸(IP<sub>3</sub>)受容体(IP<sub>3</sub>R)が破骨細胞の細胞接着に関与している可能性を示唆する報告を行なった。本研究では、現在までの研究を踏まえ、歯の萌出経路形成において重要な働きを持つ破骨細胞でのIP<sub>3</sub>Rの役割を免疫組織学、生化学的にさらに解明し、歯槽骨の骨吸収による歯の萌出に関わるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究計画は、歯の萌出経路形成に関わる破骨細胞でのIP<sub>3</sub>R-型の役割の解明およびIP<sub>3</sub>R-型の細胞接着との関わりを解明するために、まず、現在までに行っているIP<sub>3</sub>Rアンタゴニストおよびアゴニストを破骨細胞に作用させる実験をさらにすすめ、IP<sub>3</sub>RアンタゴニストであるゼストスポンギンCおよびアゴニストであるAdenophostin Aを作用させた破骨細胞におけるインテグリンの細胞内ドメインに形成される接着複合体を構成するSrcやCas、Pyk2とIP<sub>3</sub>R-型との局在

についてin vitroおよびin vivoで明らかにする。さらにIP<sub>3</sub>R-型が破骨細胞の形質膜に発現することをタンパク、遺伝子レベルで解析し、細胞接着部位であるポドゾームとの関連を解明する。

(1)破骨細胞におけるインテグリンの細胞内ドメインに形成される接着複合体を構成するSrcやCas、Pyk2とIP<sub>3</sub>R-型との局在についてIP<sub>3</sub>RアンタゴニストであるゼストスポンギンCおよびアゴニストであるAdenophostin Aを用いて明らかにする。

### 実験1 ラット破骨細胞様細胞の分離

7週齢ラット脛骨より右の写真のように脛骨骨端部分からMEM溶液を注入して骨髓細胞を回収し、FBS、M-CSF、RANKL、活性型VD3を含むMEM溶液で一週間培養し、破骨細胞を形成する(Morikawa K, et al. *Acta Histochem. Cytochem.* 41: 7-13, 2008)。

### 実験2 IP<sub>3</sub>Rアンタゴニストを用いた実験(in vitro)

ラット骨髓細胞より破骨細胞を形成し(実験1参照)免疫蛍光染色法を用いて、IP<sub>3</sub>RアンタゴニストであるゼストスポンギンCを作用させた破骨細胞におけるインテグリンの細胞内ドメインに形成される接着複合体を構成するSrcやCas、Pyk2とIP<sub>3</sub>R-型との局在について共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。ゼストスポンギンCの濃度を設定・添加し、ゼストスポンギンCの存在下、非存在下における細胞接着部位であるポドゾームへの影響、変化についても共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

### 実験3 IP<sub>3</sub>Rアゴニストを用いた実験(in vitro)

ラット骨髓細胞より破骨細胞を形成し(実験1参照)免疫蛍光染色法を用いて、アゴニストであるAdenophostin Aを作用させた破骨細胞におけるインテグリンの細胞内ドメインに形成される接着複合体を構成するSrcやCas、Pyk2とIP<sub>3</sub>R-型との局在について共焦

点レーザー顕微鏡にて観察する。Adenophostin A の濃度量を設定・添加し、Adenophostin A の存在下、非存在下における細胞接着部位であるポドゾームへの影響、変化についても共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

(2) 新生児ラットを用いて、歯の萌出経路形成に関わる破骨細胞での  $IP_3R$ - 型の発現と接着複合体を構成する Src や Cas、Pyk2 と  $IP_3R$ - 型との局在について  $IP_3R$  アンタゴニストであるゼストスポンギン C およびアゴニストである Adenophostin A を用いて in vivo 実験にて明らかにする。また、ラット破骨細胞を用いて、以前の研究で RT-PCR 法による破骨細胞における遺伝子発現と免疫蛍光染色法による局在について研究を行なったが、前回の研究と同様に今回の研究では、破骨細胞全体における発現ではなく、破骨細胞の細胞接着部位であるポドゾームが局在する形質膜のみでの  $IP_3R$ - 型の発現を解明する。

実験 1 歯の萌出時の破骨細胞における  $IP_3R$  アンタゴニストを用いた実験 (in vivo) 新生児ラットから歯槽骨組織切片を作成し、免疫蛍光染色法を用いて、歯の萌出経路形成に関わる破骨細胞に  $IP_3R$  アンタゴニストであるゼストスポンギン C を作用させ、破骨細胞のインテグリンの細胞内ドメインに形成される接着複合体を構成する Src や Cas、Pyk2 と  $IP_3R$ - 型との局在について共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

実験 2 歯の萌出時の破骨細胞における  $IP_3R$  アゴニストを用いた実験 (in vivo) 新生児ラットから歯槽骨組織切片を作成し、免疫蛍光染色法を用いて、歯の萌出経路形成に関わる破骨細胞に  $IP_3R$  アゴニストである Adenophostin A を作用させ、破骨細胞のインテグリンの細胞内ドメインに形成される接着複合体を構成する Src や Cas、Pyk2 と  $IP_3R$ - 型との局在について共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

### 実験 3 遺伝子解析 (RT-PCR 法)

破骨細胞の形質膜の RNA を抽出し、 $IP_3R$ - 型の遺伝子発現を定量する (Morikawa K, et al. *Acta Histochem. Cytochem.* 41: 7-13, 2008)。

### 実験 4 膜不透過性ビオチン化試薬を用いた形質膜タンパクの分離による解析

ラット骨髄細胞より破骨細胞を形成し、膜不透過性ビオチン化試薬である Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (PIERCE) を用いて選択的に外側表面をビオチン化して形質膜タンパクを分離し、 $IP_3R$ - 型に特異的な抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロットティング法によって分析する。

### 実験 5 破骨細胞の細胞骨格画分による解析

実験 4 と同様に、ラット骨髄細胞から破骨細胞を形成した後、detergent-soluble fraction (細胞質) と detergent-insoluble fraction (細胞骨格) に画分して、 $IP_3R$ - 型に特異的な抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロットティング法によって分析する (Shyu JF, et al. *Bone* 40: 1329-1342, 2007)。

## 4. 研究成果

萌出不全に伴う埋伏歯、萌出性腐骨といった萌出障害は小児歯科臨床において重要な課題である。しかしながら、その原因の一つである歯槽骨の骨吸収メカニズムは十分に解明されていない。また、破骨細胞の分化についてはかなり研究が進んでいるが、骨吸収活性において重要な過程である細胞接着に関わるポドゾームについては不明な点が多い。以前に私は、 $IP_3R$ - 型が破骨細胞の細胞接着 (ポドゾーム) に関与している可能性を示唆する報告を世界で初めて行なった。

本研究の結果により、 $IP_3R$ - 型と破骨細胞の細胞接着との関わりが局在の面からだけでなく、機能の面からも明らかとなり、 $IP_3R$ -

型がポドゾームにおいてアクチン細胞骨格の調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、歯槽骨骨吸収メカニズムの

解明が大きく発展するものと考えられる。

現在、実験データを解析し、学会発表・論文投稿を予定している。

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

森川 和政 (MORIKAWA, Kazumasa)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：70514686

##### (2) 研究分担者

牧 憲司 (MAKI, Kenshi)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60209400

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )