

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463220

研究課題名(和文)破骨細胞前駆細胞に着目した咬合性外傷メカニズム解明のための基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for analysis of occlusal trauma mechanism using in vitro osteoclastogenesis assay

研究代表者

鵜飼 孝 (UKAI, Takashi)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：20295091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：咬合性外傷の骨破壊をコントロールするには、破骨細胞の分化機構の解明が重要である。TNF α 単独刺激では不可能であるが、RANKL前刺激があれば吸収能を持った破骨細胞に分化することができる。まず機能を持った破骨細胞分化に必要なRANKL前刺激条件を決定した。この条件で、破骨細胞前駆細胞はTRAF6を発現した。またRANKL前刺激時にTRAF6を抑制すると、TNF α 刺激による破骨細胞形成は抑制された。

以上よりTNF α による吸収能を持った破骨細胞形成には、破骨細胞前駆細胞のTRAF6が活性化されるだけのRANKL前刺激が重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)： RANKL pre-stimulation before stimulation of TNF α can induce active osteoclast formation. We showed the condition of RANKL pre-stimulation for forming of active osteoclasts. In this condition, osteoclast precursors expressed TRAF6. Moreover, blocking of TRAF6 at RANKL pre-stimulation inhibited TNF α inducing active osteoclast formation.

These results suggest RANKL pre-stimulation that TRAF6 is activated is important for forming of TNF α inducing active osteoclasts.

研究分野：歯周病学

キーワード：咬合性外傷 破骨細胞 TNF RANKL

1. 研究開始当初の背景

外傷性咬合は歯周炎による歯槽骨破壊進行に大きな影響を与えていると考えられている。そのコントロールは歯周炎の治療や予防において重要であると考えられるが、どのようなメカニズムで咬合性外傷の骨吸収が進んでいくのか未だ明らかになっていない。我々はこれまで咬合性外傷と炎症性歯周炎モデルを用いた *in vivo* の研究や、*in vitro* における破骨細胞形成への炎症性細胞ならびに炎症性メディエーターの関与を調べてきた。

破骨細胞はマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) と破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) 存在下で骨髄マクロファージ (BMM) から分化させることができる。RANKL 刺激により破骨細胞前駆細胞は酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 陽性細胞となり、さらにそれらが融合することで多核の破骨細胞へと分化する。我々は破骨細胞の形成が進行しないような低濃度の RANKL で前刺激した BMM を用いた場合では、一般的に破骨細胞分化を促進しない T 細胞、CD40 ligand や IFN γ が LPS 存在下において破骨細胞形成の促進作用を持つことを明らかにした (Bone, Ozaki Y, Ukai T *et.al.* 2009, *J Periodontal Res*, Yokoyama M, Ukai T *et.al.* 2011, *J Periodontal Res*, Ayon Haro ER, Ukai T *et.al.* 2011)。このことより、低濃度の RANKL であっても破骨細胞前駆細胞に作用した場合、破骨細胞分化に与える影響が大きいことが伺える。しかし、低濃度の RANKL 刺激を受けた破骨細胞前駆細胞の機能の解析は不十分である。また歯根膜組

織でのこれら細胞の分布や、外傷性咬合を付与した時の破骨細胞前駆細胞の状態の変化ならびに炎症性メディエーターの分布は不明である。これらを明らかにできれば咬合性外傷の骨破壊メカニズムの解明につながるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

外傷性咬合は垂直性骨吸収を誘発しやすいので歯根膜側の骨吸収メカニズムの理解が重要と考え、今回の研究では歯根膜における破骨細胞前駆細胞に注目した。そこで歯根膜にどのような状態の破骨細胞前駆細胞が存在するのか、また外傷性咬合を付与した時の前破骨細胞の動態と炎症性メディエーターの関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

我々は正常に機能している歯の歯根膜組織には RANKL 刺激を受けた破骨細胞前駆細胞が存在し、外傷性咬合付与により産生されるであろうサイトカインや細菌感染による炎症反応刺激により破骨細胞形成が急速に進行するのではないかと考えた。

正常歯根膜に存在する破骨細胞前駆細胞の状態として以下の3つの可能性が考えられる。

- (1) RANKL 刺激を受け TRAP 陽性細胞などの破骨細胞分化途中の細胞
- (2) RANKL 刺激を受けてはいるが、そのままでは破骨細胞形成にまでは至らない細胞
- (3) RANKL 刺激を受けていない細胞

そこで今回の研究では以下の様に研究を進める。

RANKL 前刺激の有無により上記 1~3 に一致する細胞群を BMM から作製し、各細胞とそれらを特徴づける発現マーカーを同定する。

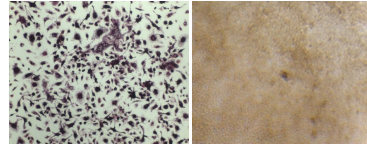
上記の破骨細胞前駆細胞の発現マーカーを正常マウス歯根膜において免疫組織学的に確認する。

マウスに外傷性咬合を付与した時の歯根膜組織における炎症性細胞の浸潤や炎症性メディエーターの発現と破骨細胞の出現の関連を組織学的に検討する。上記 1~3 の細胞群から破骨細胞への分化における炎症性細胞や、炎症性メディエーターの関与を検討する。

4. 研究成果

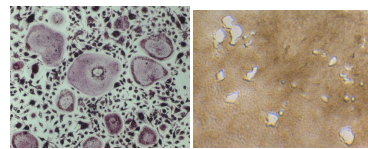
(1) 咬合性外傷の骨破壊をコントロールするのに、我々は破骨細胞の分化制御が重要と考えた。炎症性サイトカインの TNF α は骨吸収促進に重要なサイトカインであるが、その作用解明はいまだ十分でない。特に破骨細胞の機能発現への関与は不明な点が多い。実際、TNF α 単独刺激では吸収能を持った破骨細胞に分化できない。我々はまず TNF による破骨細胞形成への影響を検討した。これまでの報告通り、TNF 単独では濃度を上げることで多核の TRAP 陽性細胞は形成されるが、これは吸収能を持っていなかった。しかし、RANKL 前刺激を受けた破骨細胞前駆細胞は、その後の RANKL 刺激がなくても TNF 刺激で吸収能を持った破骨細胞に分化することを明らかにして学会報告を行い、その成果は Arch Oral Biol に掲載された。

TNF α のみの刺激時の TRAP 染色像と吸収窩の形成状態



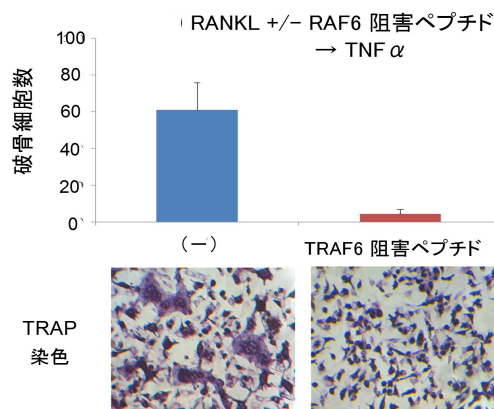
吸収窩は認められない

RANKL 前刺激後に TNF α で刺激した時の TRAP 染色像と吸収窩の形成状態



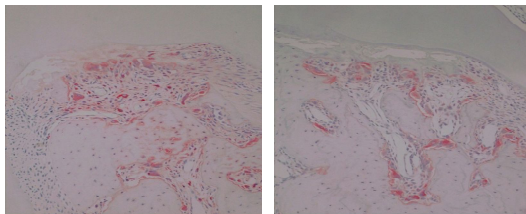
多くの吸収窩が認められる

(2) 破骨細胞分化には RANKL のレセプターである RANK のアダプタータンパクである TRAF6 の活性化が重要であることが報告されている。そこで、RANKL 前刺激を受けた破骨細胞前駆細胞の TRAF6 発現に注目して、その発現状態を蛍光免疫染色で確認したところ、RANKL 前刺激を受けて、TNF α により吸収能を持った破骨細胞に分化できる前駆細胞は TRAF6 を発現していた。さらに RANKL 前刺激時に TRAF6 のプロッキングペプチドを用いて TRAF6 の活性化を抑制した時の TNF α による破骨細胞形成能を検討したところ、TNF α 刺激による破骨細胞形成は抑制された。これらより、TNF α による吸収能を持った破骨細胞形成のための RANKL 前刺激では、破骨細胞前駆細胞の TRAF6 が活性化されることが重要であることが示唆された。以上の結果は、平成 28 年度歯科医学会総会にて発表した。



(3) 当初、予定していたマウス咬合性外傷モデルではなく、これまでに確立しているラット咬合性外傷モデルを用いた。正常ラットならびにT細胞の欠損したヌードラット上顎第一臼歯にワイヤーを装着して対合の下顎臼歯に外傷咬合を付与した。3日後の骨吸収状態を確認すると、正常ラットとヌードラットで破骨細胞の形成状態に大きな変化は見られなかった。これより、咬合性外傷の骨吸収では炎症性骨吸収と異なり、T細胞の影響は大きくないことが示唆された。この結果は日本歯科保存学会誌に掲載された。

外傷性咬合付与時の骨吸収状態

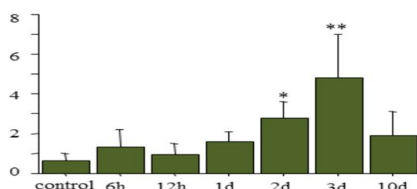


正常ラット

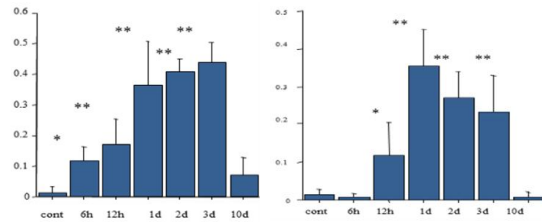
ヌードラット

(4) 咬合性外傷時の破骨細胞形成に関与する因子としてRANKLと血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に注目し、その発現状態を経時的に確認したところ、破骨細胞形成前にこれらの因子が血管内皮細胞で増加するのが確認された。この結果は国際学会APSPで発表した。

経時的な破骨細胞の出現変化



血管内皮細胞における経時的な VEGF と RANKL の出現変化



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2件)

Yamashita Y, Ukai T, Nakamura H, Yoshinaga Y, Kobayashi H, Takamori Y, Noguchi S, Yoshimura A, Hara Y. RANKL pretreatment plays an important role in the differentiation of pit-forming osteoclasts induced by TNF- α on murine bone marrow macrophages. Arch Oral Biol. (査読有) 60(9):1273-82, 2015. (corresponding author)

中村弘隆, 鵜飼 孝, 吉永泰周, 白石千秋, 吉永美穂, 吉村篤利, 原 宜興: T細胞は咬合性外傷で起こる骨吸収に関与しない. 日歯保誌. (査読有) 58(1), 35-41, 2015. (論文代表者)

[学会発表](計7件)

・鵜飼 孝, 山下恭徳, 原 宜興: 破骨細胞前駆細胞へのRANKL前刺激はTNFによる吸収能をもった破骨細胞分化に重要である. 第23回日本歯科医学会総会, (国際会議場, 福岡市), 10月22日, 2016.

・山下恭徳, 鵜飼孝, 中村弘隆, 小林弘樹, 高森雄三, 野口恵司, 吉村篤利, 原宜興: マウス骨髄マクロファージにおいて RANKL 前刺激は TNF-a 刺激による吸収活性を持つ破骨細胞の分化に重要な役割をはたす, 平成 27 年度

日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会, (アケ口ス福岡, 福岡市), 11月16日, 2015.

. Ukai T, Yamashita Y, Nakamura H, Yoshimura A, Hara Y: Vascular endothelial cells promotes bone destruction in rat occlusal trauma. 11th APSP meeting, (Bali, Indonesia), October.8, 2015.

. Yamashita Y, Ukai T, Takamori Y, Noguchi S, Montenegro Raudales JL, Nakamura H, Ozaki Y, Shiraishi C, Yoshimura A, Hara Y: RANKL priming accelerates osteoclast formation with resorptive activity in TNF-alpha- stimulated murine bone marrow macrophages independent of RANKL, 100th American Academy of Periodontology (AAP), (San Francisco, CA, USA), September 20. 2014.

. 山下恭徳, 鵜飼 孝: RANKL 前刺激を受けた破骨細胞前駆細胞は TNF- 刺激により RANKL 非依存的に骨吸収活性をもった破骨細胞形成を形成する, 第 35 回日本炎症・再生医学会・第 1 回日本骨免疫会議, (万国津梁館, 沖縄県), 7月4日, 2014.

. 山下恭徳, 鵜飼 孝, 吉村篤利, 金子高士, 白石千秋, 吉永美穂, 吉永泰周, 原 宜興: TNF- 刺激により破骨細胞形成が促進される RANKL 前刺激条件の検討, 日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会(第 139 回), (秋田県総合生活文化会館, 秋田市), 10月17日, 2013.

. 山下 恭徳, 鵜飼 孝, 原 宜興: TNF 刺激により破骨細胞形成が促進される RANKL 前刺激条件の検討, 平成 25 年度日本歯周病学会九州五大学・日本

臨床歯周病学会九州支部合同研修会, (九州歯科大学講堂, 北九州市), 11月10日, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜飼 孝 (UKAI, Takashi)
長崎大学・病院 (歯学系)・講師
研究者番号: 20295091

(2) 研究分担者

原 宜興 (HARA, Yoshitaka)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・教授
研究者番号: 60159100