

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592407

研究課題名(和文) MyD88ノックアウトマウスを用いた矯正学的歯の移動における炎症様反応機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of inflammatory reaction of orthodontic tooth movement in MyD88 knockout mice

研究代表者

前田 綾 (MAEDA AYA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10457666

研究成果の概要(和文)：MyD88ノックアウトマウスから単離された骨芽細胞に機械的刺激を付与した後、ケモカインの発現を解析した。骨芽細胞において、MyD88は機械的刺激によるケモカイン(MIP-2およびMCP-1)の発現と、MAPキナーゼの活性化に関与することが示された。このことから、MyD88は免疫反応だけでなく、機械的刺激による炎症様反応にも関与し、矯正力による歯の移動に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In osteoblast isolated from MyD88 knockout mice, chemokine expressions induced by mechanical stress were examined. MyD88 is involved in the gene expression of MIP-2 or MCP-1 and MAP kinase activations by mechanical stresses in osteoblast. These results suggest that MyD88 plays a role not only in immune reactions but also in inflammatory reactions by mechanical stresses and may be important in orthodontic tooth movement.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

## 1. 研究開始当初の背景

歯の移動には歯周組織の炎症様反応が関与しているが、炎症様反応抑制による歯の移動

への影響は十分に解明されていない。

近年、炎症反応において Toll 様受容体 (TLR) が注目されてきた。TLR は種々の病原

体特有の分子構造の認識に関与し、TLR のシグナルにより interleukin (IL) -1, IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が誘導されるなど、自然免疫と獲得免疫両面に重要な役割を果たすことが分かっている。現在、TLR は病原体に関する免疫応答のみならず機械的刺激によるシグナル伝達機構への関与も注目されており、血管内皮細胞などで幅広い研究が行なわれている。従って、TLR は矯正学的歯の移動における炎症様反応にも関与している可能性が考えられるが、明らかではない。

申請者らは以前、*in vitro* において、機械的刺激によるヒト歯根膜細胞の IL-8 産生に IL-1 が必要であることを報告した (Maeda, Matsuguchi et al., J Dent Res. 2007)。このことは、矯正力により最も早期に影響を受ける歯根膜において、IL-1 は矯正力による歯の移動の重要な炎症性メディエーターであることを示唆している。しかし、*in vivo* の実験において、IL-1 を抑制したラットの歯の移動では移動速度と破骨細胞は減少するものの歯は移動することから、IL-1 受容体ファミリー以外の炎症反応経路が示唆され、これに TLR が関与している可能性が考えられる。TLR は歯周組織の線維芽細胞にも発現しており、*Porphyromonas gingivalis* など口腔内常在菌からの TLR を介したシグナルが下流アダプター因子である MyD88 を介して伝達され、炎症が生じることが分かっているが、MyD88 や TLR が矯正力による骨の改造に関わる炎症様反応に関与しているか調べた研究は無く、これらの役割は明らかでない。

## 2. 研究の目的

初期の炎症反応に重要な MyD88 の欠損 (MyD88 (-/-)) マウスを利用して炎症様反応抑制下における機械的刺激による歯周組織の改造状況を明らかにし、主に病原体に関する炎症反応に関与するとされる TLR からのシグナルが機械的刺激による歯の移動時の歯周組織の改造にどのように関与するかを明らかにすることである。

さらに骨芽細胞においても実験を行い、MyD88 欠損マウスと野生 (WT) マウスの骨芽細胞の結果と比較することで、細胞レベルでの MyD88

や TLR の機械的刺激に対する役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) *in vivo* の実験系では、MyD88 欠損マウスと野生マウスの歯に様々な大きさの矯正力を加え、炎症様反応抑制下での歯の移動距離、歯周組織改造の状態 (サイトカイン、ケモカイン、RANKL/OPG, オステオポンチン (OPN), 破骨細胞) と歯根吸収を観察し、さらに IL-1 レセプターを阻害した野生マウスでも同様の実験を行い、MyD88 欠損マウスと比較する計画であった。MyD88 欠損マウス (MyD88 (-/-)) は、MyD88 (+/-) C57/BL6 マウスを交配し、出産されたマウスの遺伝子をスクリーニングして MyD88 (-/-) C57/BL6 マウスを選別し、次に MyD88 (-/-) C57/BL6 マウス同士を交配し MyD88 (-/-) C57/BL6 マウスを蓄積した。しかし、予備実験の結果、MyD88 欠損マウスの存命期間が極めて短いことから実験続行不可であったため、*in vitro* の実験系のみ行うこととした。

(2) *in vitro* では骨芽細胞の機械的刺激に対する MyD88 と TLR の役割を明らかにする。

### ①ケモカイン mRNA 発現の動態について

MyD88 (-/-) マウスから単離した骨芽細胞に機械的刺激を負荷し、炎症や歯の移動に関連するサイトカインやケモカイン産生を解析し、さらに WT マウスから単離した骨芽細胞と比較する。

具体的には以下の方法で実験を行った。

C57/BL6 マウスを屠殺し、頭蓋骨を無菌下で摘出後、洗浄後に骨片を細断する。細断した骨片を 37°C、20 分間 4 回 コラゲナーゼで骨表面の軟組織を除去する。コラゲナーゼ処理後、骨片を 1~2 週間培養し、outgrowth した骨芽細胞を採取して培養実験に使用する。

MyD88 (+/+) (WT) と MyD88 (+/-) および MyD88 (-/-) の C57BL/6 新生仔マウスから単離した骨芽細胞を 1 週間分化し、遠心力により発生させた圧刺激 (10gf/cm<sup>2</sup>, 20min) を負荷した。刺激開始から 4 時間後に total RNA をトライゾールで回収し、各種ケモカイン macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 (MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -2), monocyte

chemotactic protein-1 (MCP-1) および regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) の mRNA の発現を、リアルタイム PCR で定量した。また、骨芽細胞の分化レベルが同定度であるか確認するため、骨形成能として alkaline phosphatase (ALP) の mRNA の発現をリアルタイム PCR で定量した。

#### ②機械的刺激による骨芽細胞の細胞シグナル伝達機構について

細胞シグナル伝達経路を調べるため、機械的刺激に関与する可能性がある MAP キナーゼのリン酸化と NF- $\kappa$ B タンパク活性化について解析する。

具体的には以下の方法で実験を行った。

①と同様の骨芽細胞に圧刺激 (10gf/cm<sup>2</sup>, 20min) を負荷し、負荷後直ちに細胞を回収し、MAP キナーゼ (ERK, p38, JNK) のリン酸化と I $\kappa$ B タンパク量を Western blot 法で解析した。

これらの実験を WT と MyD88 (+/-) および MyD88 (-/-) の骨芽細胞の結果と比較することで、細胞レベルでの MyD88 や TLR の機械的刺激に対する役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

### ①の結果

• WT の骨芽細胞では、定常的に MIP-2, MCP-1, RANTES の遺伝子発現が認められ、機械的刺激後にいずれも増加した。

• MyD88 (-/-) の骨芽細胞では、MCP-1 と RANTES の定常的な発現量は WT と同等あるいはわずかに高値であったが、MIP-2 の発現量は有意に低かった。機械的刺激後では、MIP-2 発現の有意な増加は認められず、MCP-1 の発現は増加したものの、WT と比較すると増加率は有意に小さかった。一方、機械的刺激により RANTES の発現は WT と同程度に増加した。

• MIP-1 $\alpha$  と  $\beta$  の mRNA は、いずれの細胞においても測定限界以下であった。

• 実験に用いた細胞において、ALP の mRNA 量に差は認められず、骨芽細胞分化の程度に差はなかった。

### ②の結果

• WT の骨芽細胞では、機械的刺激により 3 種類の MAP キナーゼはリン酸化が認められた

• MyD88 (-/-) の骨芽細胞では、機械的刺激により 3 種類の MAP キナーゼのリン酸化が認められたが、WT と比較していずれもリン酸化量は減少していた。

• I $\kappa$ B タンパク量は、WT と MyD88 (-/-) のどちらの骨芽細胞においても発現していたが、機械的刺激による変化は認められなかった。

### (考察)

本研究により、MyD88 は MIP-2 の定常的発現と機械的刺激による MIP-2 および MCP-1 の発現に関与しており、また、機械的刺激によるケモカインの発現誘導および MAP キナーゼ活性化には、少なくとも部分的に MyD88 を介しているが、NF- $\kappa$ B 経路は介さないことが示された。このことから、MyD88 は免疫反応だけでなく、機械的刺激による炎症様反応にも関与し、矯正力による歯の移動に重要である可能性が示唆された。また、機械的刺激による骨芽細胞の MyD88 を介したケモカインの発現を誘導するシグナル伝達経路としては、MyD88 を直接刺激するシグナル経路と、MAP キナーゼ活性による IL-1 を介したシグナルを経由し、MyD88 を間接的に介す伝達経路が示唆される。このことから、このシグナル伝達経路のさらに詳細な解明が今後必要であると考えられる。

## 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 6 件)

①Bandow K, Maeda A, Kakimoto K, Kusuyama J, Shamoto M, Ohnishi T, Matsuguchi T. Molecular mechanisms of the inhibitory effect of lipopolysaccharide (LPS) on osteoblast differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2010;26:755-61 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- ① 前田綾, 坂東健二郎, 上原沢子, 宮脇正二, 松口徹也. MyD88 シグナル経路は機械的刺激による骨芽細胞のケモカイン発現誘導に関与する. 第69回日本矯正歯科学会学術大会, 平成22年9月27-29日(2010), 横浜.
- ② 岡本敦子, 大西智和, 福永智広, 前田綾, 宮脇正一, 松口徹也. 歯周炎モデルマウスにおける矯正的歯の移動度の減弱. 第67回日本矯正歯科学会学術大会, 平成20年9月16-18日(2008), 幕張.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 綾 (MAEDA AYA)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：10457666

### (2) 研究分担者

松口 徹也 (MATSUGUCHI TETSUYA)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：10303629

宮脇 正一 (MIYAWAKI SHOICHI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：80295807

吉田 礼子 (YOSHIDA REIKO)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：60244258

友成 博 (TOMONARI HIROSHI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：70398288