

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 中田 樹里
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第404号
学位授与の日付 平成30年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 The effect of ROCK inhibitors on bone remodeling and rat experimental tooth movement
(ROCK 阻害剤の骨代謝およびラットを用いた実験的歯の移動への効果)

論文審査委員 主査 教授 齋藤 功
副査 教授 佐伯 万騎男
副査 教授 魚島 勝美

博士論文の要旨

今回提出された博士論文の要旨においては下記のとおりである。

【背景および目的】

骨組織は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収によって絶えずリモデリングを行い、動的平衡が維持されている。リモデリングは骨の機能と形態を維持するために不可欠であり、リモデリングの調節機構が崩れると様々な骨疾患が引き起こされる。一方、矯正歯科治療における歯の移動期には、歯根膜の圧迫側で破骨細胞による骨吸収が、牽引側で骨芽細胞による骨添加が生じている。活発な骨リモデリングを引き起こす薬剤の発見ならびに投与が可能になれば、歯の移動速度の上昇あるいは効率的な歯の移動への応用が期待される。そこで本研究では、標的分子が明白な低分子化合物と既存の抗がん剤から構成されている標準阻害剤キットを用いて化合物スクリーニングを行い、骨代謝に影響を与える薬剤の探索を試みるとともに、実験的歯の移動期における薬剤投与の効果について検討した。

【試料および方法】

破骨細胞分化への影響を調べるために、RAW264.7 細胞に RANKL 存在下で標準阻害剤キット 1~4 (化学療法基盤支援活動)の薬剤を添加して 5 日間培養した。培養後、TRAP 染色を行うとともに多核化している TRAP 陽性細胞を破骨細胞としてカウントし、各薬剤の分化への影響を評価した。分化促進効果が高かった ROCK 阻害剤である HA-1077、Y27632 については、7 週齢雄生 ddY マウス大腿骨骨髄細胞を用いて破骨細胞分化への影響も評価した。また、ROCK 阻害剤の骨芽細胞分化への影響を検証するために、マウス骨芽細胞前駆細胞の MC3T3-E1 細胞および 7 週齢雄生 ddY マウス大腿骨骨髄細胞を用いて分化誘導を行い、アリザリンレット染色法を用いて細胞のカルシウム沈着能を評価した。さらに、8 週齢雄生 SD ラット頭蓋骨正中欠損モデルを用いて骨形成への影響について解析した。骨欠損部に $0.5 \mu\text{M}$ の薬剤を含有したアテロコラーゲンスポンジを填入し、週に 2 度 $50 \mu\text{L}$ ずつスポンジ部へ薬剤を注入した。スポンジ填入 4 週後にマイクロ CT を用いて骨形成を評価した。標本は 4%EDTA にて 4 週間脱灰後、厚さ $5 \mu\text{m}$ のパラフィン切片を作製して組織学的解析を行った。TRAP 染色にて破骨細胞、RUNX2 免疫組織化学染色にて骨芽細胞をそれぞれ観察した。続いて、8 週齢雄生 SD ラットの上顎切歯と右側第一臼歯をコイルスプリングにて連結し、第一臼歯に 25g の矯正力を付与した歯の移動モデルを作製し、0、3、5 日目に $10 \mu\text{l}$ の ROCK 阻害剤を第一臼歯口蓋側歯周組織に注入して、移動開始 7 日目にマイクロ CT を用いて歯の移動距離を評価した。反対側を対照群とした。

【結果】

化合物スクリーニングで破骨細胞分化促進効果をもつ薬剤を 8 種類、抑制効果をもつ薬剤を 7 種類見いだした。ROCK 阻害剤 (HA-1077、Y27632) 添加群は、RAW264.7 細胞とマウス大腿骨骨髄細胞の両方において破骨細胞分化促進効果を示した。骨芽細胞分化については、MC3T3-E1 細胞およびマウス大腿骨骨髄由来細胞の両方において促進作用が認められ、Y27632 添加下では、骨芽細胞の分化と成熟を制御する血管内皮細胞成長因子である Vegfa の発現が上昇した。また、ラット頭蓋骨正中欠損モデルにおいては、コントロール群と比較し ROCK 阻害剤添加群では骨

欠損部の骨形成が促進され、組織学的解析では、薬液添加群の新生骨部において顕著な骨芽細胞および破骨細胞の局在が観察された。一方、ラット臼歯の移動モデルを用いた検討では、対照群と比較し薬液添加群において歯の移動距離が有意に増加した。

【考察】

本研究では、破骨細胞分化に影響を与える化合物スクリーニングによって得られた ROCK 阻害剤に着目し、骨代謝および矯正学的歯の移動への影響について解析を行った。ROCK とは、Rho タンパクの下流にあるリン酸化酵素であり、細胞の移動や平滑筋細胞の収縮など様々な細胞運動に関与している。以前の報告では、Y-27632 が骨芽細胞分化を促進したことが示されているが、本研究においても同様な結果が得られた。また、骨欠損部における骨形成促進も観察された。骨組織の修復は、炎症期、修復期（軟性反骨期、硬性反骨期）、リモデリング期から構成され、好中球、マクロファージ、骨芽前駆細胞や破骨前駆細胞など様々な細胞が関与している。血管新生はこれらの細胞が必要な部位に遊走するために不可欠であり、骨形成と高い相関性があると報告されている。本研究では Y-27632 添加下において、血管内皮細胞成長因子である Vegfa の発現の上昇が認められた。ROCK 阻害剤は骨芽細胞および破骨細胞分化を促進すると同時に、組織の血管新生を刺激することで骨リモデリングに必要な細胞の遊走をも促進する可能性が示唆された。さらに、ラットを用いた実験的歯の移動時における骨改造現象においても破骨細胞と骨芽細胞の相互作用が必要であることから、ROCK 阻害剤添加群においては活発な骨リモデリングが引き起こされることで歯の移動が促進したと推察される。

審査結果の要旨

骨組織は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収によって絶えず代謝が行われ、動的平衡が維持されている。骨リモデリングは骨の機能と形態を維持するために不可欠であり、この調節機構が崩れると骨粗鬆症や大理石病など様々な骨疾患が引き起こされる。一方、矯正歯科治療における歯の移動時には、歯根膜の圧白側で破骨細胞による骨吸収が、牽引側で骨芽細胞による骨添加が生じている。活発な骨リモデリングを引き起こす薬剤の発見ならびに投与が可能になれば、歯の移動速度の上昇あるいは効率的な歯の移動への応用が期待される。これまでの報告では、活性型ビタミン D3、プロスタグランジン、オステオカルシン、副甲状腺ホルモン(PTH)の投与により、矯正学的歯の移動の促進報告があったが、いずれも予測される副作用のため臨床応用に至っていない。本研究の化合物スクリーニングで得られたヒット化合物である ROCK 阻害剤は、現在循環器系疾患に使用されている薬剤であり、今後臨床応用が期待できる薬剤であるため、本研究の結果は重要な意義があると思われる。

本研究では、RAW264.7 細胞株を用いて化合物スクリーニングを行った結果、破骨細胞分化促進効果が高い ROCK 阻害剤を見出した。ROCK 阻害剤は、骨芽細胞分化に対しても促進効果を示し、Y-27632 添加下では骨芽細胞の分化と成熟を制御する血管内皮細胞成長因子 (VEGF) の発現が上昇した。また、ラット頭蓋骨欠損修復モデルにおいては、ROCK 阻害剤添加群では骨修復が促進され、組織学的解析では新生骨部において顕著な破骨細胞および骨芽細胞の局在が観察された。さらに、ラット実験的歯の移動モデルを用いた検討では、対照群と比較し薬液添加群において歯の移動距離が有意に増加した。これらの結果より、ROCK 阻害剤は骨修復および実験的歯の移動の移動速度を促進することが示唆された。

本研究の化合物スクリーニングにて得られたヒット化合物である ROCK 阻害剤のターゲットは、Rho キナーゼであり、細胞の移動や平滑筋細胞の収縮など様々な細胞運動に関与している。また、現在循環器疾患の治療薬として臨床応用されている。本研究の結果から、ROCK 阻害剤は破骨細胞分化のマスター転写因子である NFAT を活性化させ、VEGF の発現上昇を通して骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された。骨修復、実験的歯の移動の移動速度促進効果を示した作用機序としては以下の二つが提示された。一つ目としては、骨代謝に必要な破骨細胞および骨芽細胞の分化と成熟そのものを促進する作用機序である。二つ目は、骨芽前駆細胞自身の VEGF 分泌を活性化させることで、組織の血管新生を刺激し、骨代謝に不可欠な細胞の遊走を活性化する機序である。本研究では、ROCK 阻害剤は骨代謝に必要な細胞分化および遊走の両方を促進する可能性が示唆された。本阻害剤は 20 年以上にわたり臨床で使用されている薬剤であるため、今後の骨疾患および矯正歯科治療における臨床応用が期待できる。

最終結論として、化合物スクリーニングより得られた ROCK 阻害剤の *in vitro* での破骨細胞および骨芽細胞分化への効果を明らかにしたと同時に、*in vivo* における骨修復と実験的歯の移動への影響についても示した。本薬剤は将来的に臨床応用が期待されるものであり、本研究は学位論文として価値のあるものであることを認める。