

令和元年6月19日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20674

研究課題名(和文)最終糖化産物とリポ多糖による骨細胞スクレロチンの発現調節と骨代謝への影響

研究課題名(英文)Effect of AGE and P-LPS on sclerotin expression in osteocytes

研究代表者

坂本 英次郎(SAKAMOTO, Eijiro)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：70771624

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): 歯周病は糖尿病の合併症である。最終糖化産物(AGE)は糖尿病合併症の原因物質とされ、歯周病原最近P.gingivalis由来リポ多糖(P-LPS)は骨代謝を抑制することが明らかになっている。そこでAGEとP-LPSが骨細胞機能に与える影響について調べた。AGEとP-LPSは骨細胞におけるSOSTの発現を増加させた。このメカニズムにはRAGE、TLR2、MAPK経路、NF-kBが深く関与していた。さらに発現誘導されたSOSTは骨芽細胞の分化を抑制した。この反応はスクレロチン抗体によって回復した。以上の結果より、糖尿病関連歯周炎の悪化においてはSOSTが重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国の糖尿病患者は予備軍を含めると200万人と言われている。また一方、歯周病は成人の80%が何らかの歯周病の症状をもつと言われており、ともに極めて罹患率の高い疾患である。すでに明らかになっているように歯周病は糖尿病の合併症の1つであり、その原因解明と治療法の確立は急務と考える。本研究ではその原因がスクレロチンの過剰分泌にあることを見出し、さらにその中和抗体によって抑制された骨代謝機能が回復することを明らかにした。スクレロチン抗体はすでに骨粗鬆症の治療薬として開発が進んでおり、今後歯周病の治療にも適応が広がる可能性を示した。

研究成果の概要(英文): Periodontitis is one of the diabetes complication. Advanced glycation-end product (AGE) causes several diabetes complication, and LPS from P.gingivalis was clarified to inhibit the osteoblastic differentiation. Therefore, we investigated effect of AGE and P-LPS on the function of osteocytes.

AGE and P-LPS increased sclerotin (SOST) expression in osteocytes. The mechanisms of SOST expression was related to RAGE, TLR2, MAPK and NF-kB. Moreover, AGE-associated SOST inhibited osteoblastic differentiation, and it was recovered by SOST antibody. These results suggested that AGE and P-LPS have important roles in aggravation of diabetes-related periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：糖尿病 歯周病 糖尿病関連歯周炎 糖尿病合併症 最終糖化産物 リポ多糖 スクレロチン スクレロチン抗体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は糖尿病の合併症の 1 つであり(糖尿病関連歯周炎)、糖尿病患者においては歯周病を発症しやすく、重症化しやすいことが知られている。我が国では糖尿病患者数は予備軍も含めると約 2000 万人と推定され、歯周病においても成人の約 80%が何らかの歯周病症状をもつと言われており、ともに極めて罹患率の高い生活習慣病である。このため、糖尿病関連歯周炎の病態、進展メカニズム、治療法をいち早く確立することは急務であると考えられる。

糖尿病最終糖化産物(AGE)は還元糖とアルブミンをはじめとする蛋白質が非酵素的に結合し、糖尿病患者の局所組織に蓄積する。また AGE は糖尿病合併症、悪性腫瘍、アルツハイマー病などの悪化・進展に深く関与していると言われており、一方、歯周病は主に細菌による感染を起点とする慢性炎症性疾患であり、特に歯周病原細菌の 1 種である *P.gingivalis* 由来りポ多糖(P-LPS)は種々の細胞に悪影響を与えることが明らかになっている。

近年、骨細胞の機能について様々なことが明らかになってきた。骨細胞は骨組織中に含まれる細胞成分のうち 90-95%を占めるとされており、最も多いことが知られている。骨細胞は破骨細胞分化因子である RANKL、骨芽細胞分化抑制因子であるスクレロスチン、Dkk1 などを発現し、骨代謝に深く関与していることが報告されている。また骨細胞から分泌される FGF23 は腎臓における近位尿管のリン再吸収に関与しており、内分泌機関としての役割も注目されている。

しかし糖尿病歯周炎における骨細胞の働きについては不明な点が多い。実験的糖尿病関連歯周炎モデルラットにおいては、歯槽骨内にスクレロスチンの発現が増加している。さらに AGE で刺激を行なった骨細胞はスクレロスチンの発現が増強したとの報告もある。これらの報告は、骨細胞由来スクレロスチンが何らかの重要な役割を果たしていることを示唆しているが、そのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。そこで我々は、AGE と P-LPS の相互作用に着目し、糖尿病関連歯周炎における骨細胞由来スクレロスチンからアプローチを行うこととした。

### 2. 研究の目的

糖尿病関連歯周炎の増悪メカニズムを明らかにするため、AGE と P-LPS が骨細胞由来スクレロスチンの発現に与える影響について検討することとした。

### 3. 研究の方法

まず AGE と P-LPS を添加した培地で骨細胞を培養し、スクレロスチンや他の炎症関連因子の発現について検討した。骨細胞はマウス骨細胞株 MLO-Y4-A2 を使用し、サブコンフルエントまで培養した後、AGE と P-LPS を一定期間作用させた。刺激を行なった骨細胞から総 RNA および培地上清と細胞画分蛋白を抽出し、骨代謝関連因子、炎症関連因子、AGE 受容体(RAGE)、P-LPS の受容体(TLR2)の発現について定量的リアルタイム PCR、ELISA、ウェスタンブロット法で検討した。

また、AGE と P-LPS のシグナル伝達経路を調べるため、RAGE と TLR2 をノックダウンした細胞を作成し、同様に AGE と P-LPS を作用させてスクレロスチンの発現に影響があるか検討を行なった。次に AGE と P-LPS を作用させた細胞から全細胞蛋白を抽出し、MAPK、NF- $\kappa$ B の活性についてウェスタンブロット法で検討を行なった。この結果をもとに MAPK および NF- $\kappa$ B 阻害剤で前処理を行なった細胞に AGE と P-LPS で刺激を行い、スクレロスチンの発現に影響を与えるか検討した。

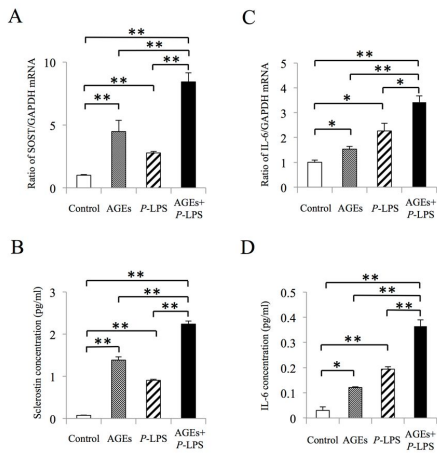
さらに、AGE によって発現誘導されたスクレロスチンの骨芽細胞への影響を調べるため、骨細胞-骨芽細胞共培養系を用いて骨芽細胞の分化について検討した。前述の方法と同様に骨細胞をサブコンフルエントまで培養した後、AGE と P-LPS で刺激を行いスクレロスチンの発現を誘導した。AGE と P-LPS を完全に取り除いた後、スクレロスチンの発現誘導した骨細胞と、通常のアスコルビン酸、 $\beta$ -グリセロリン酸を添加した分化培地で培養した骨芽細胞を、共培養用プレートを用いて組み合わせた。その後一定期間共培養させた後、骨芽細胞におけるアルカリホスファターゼ活性を測定すると共に、骨芽細胞の分化において必須因子である Runx2 の発現について検討した。それらの結果をもとに、AGE と P-LPS 誘導性スクレロスチンが骨芽細胞に与える影響を確認するため、スクレロスチン抗体を添加して同様の実験を行なった。

### 4. 研究成果

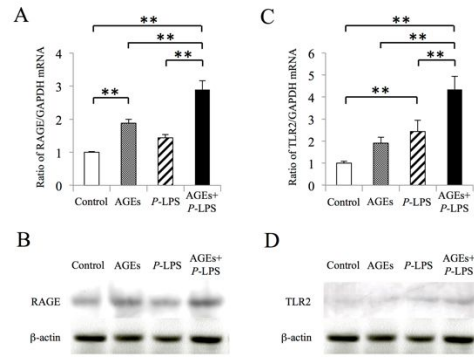
AGE は骨細胞におけるスクレロスチンと IL-6 の発現を増加したが、この作用は P-LPS 共存下でさらに増強した。一方、AGE の刺激により RAGE の発現が、P-LPS の添加により TLR2 の発現がそれぞれ増加したが、共刺激を行うとさらに発現は増強した(図.1, 2)。この結果により、AGE と P-LPS は骨細胞における RAGE と TLR2 の発現を増強し、スクレロスチンの発現に影響を与えることが主たる作用と考えられた。

RAGE と TLR2 をノックダウンするとスクレロスチンの発現は抑制された。AGE と P-LPS を添加すると骨細胞における MAPK 経路と NF- $\kappa$ B の活性化が認められたが、両者のシグナル伝達経路には違いがあった(図.3, 4)。AGE と P-LPS の作用には RAGE と TLR2 の発現が必須であるが、細胞内シグナル伝達経路が異なり、これが AGE と P-LPS の相加的効果に繋がっているのではないかと考えられた。

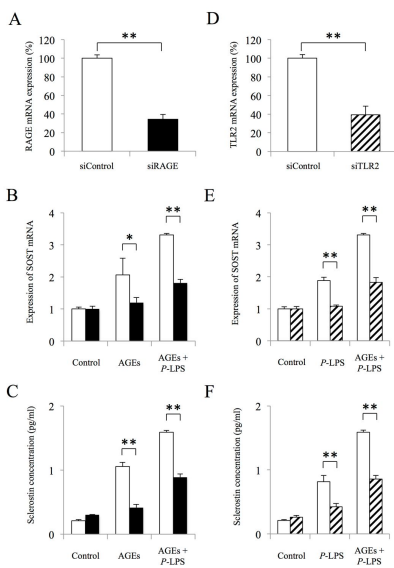
AGE と P-LPS によりスクレロスチンの発現を誘導した骨細胞と骨芽細胞を共培養すると、骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性、分化因子である Runx2 の発現が抑制された。この



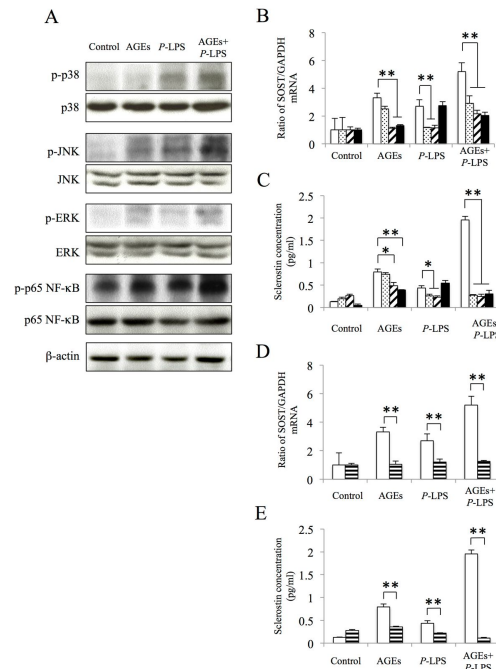
(図.1) AGE と P-LPS が骨細胞におけるスクレロスチンと IL-6 発現に及ぼす影響



(図.2) AGE と P-LPS が骨細胞における RAGE と TLR2 発現に及ぼす影響

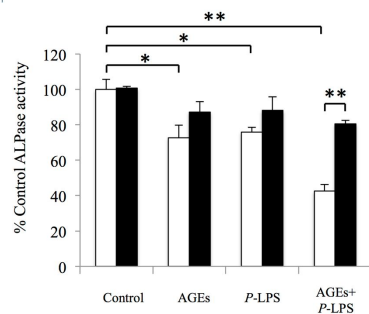


(図.3) RAGE と TLR2 のノックダウンが骨細胞におけるスクレロスチン発現に及ぼす影響



(図.4) AGE と LPS が MAPK および NF-kB の活性化に及ぼす影響

作用は、スクレロスチン抗体を添加すると回復される傾向にあった。これらの結果により、糖尿病関連歯周炎においては AGE と P-LPS は相加的に骨細胞におけるスクレロスチンと IL-6 発現を増加し、骨芽細胞の分化を抑制することが考えられる。またスクレロスチン抗体はこれらの作用を抑制する効果が認められ、糖尿病関連歯周炎の治療薬としての可能性が示唆された (図.5)。スクレロスチン抗体はすでに骨粗鬆症の治療薬として開発が進んでおり、歯周病治療への転用も不可能ではないと考える。



(図.5) AGE と P-LPS 誘導性スクレロスチンが骨芽細胞の ALP 活性に及ぼす影響と、中和抗体の作用 (白: 中和抗体なし, 黒: 中和抗体あり)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

#1 Advanced glycation end-product 2 and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide increase sclerostin expression in mouse osteocyte-like cells.

Sakamoto E, Kido JI, Takagi R, Inagaki Y, Naruishi K, Nagata T, Yumoto H

Bone. 2019 May;122:22-30. doi: 10.1016, 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

#1 AGEs and LPS inhibit osteoblastic differentiation via sclerostin in osteocytes, International Association for Dental Research, Jul. 2018

Eijiro Sakamoto, Yuji Inagaki, Ryosuke Takagi, Jun-ichi Kido, Hiromichi Yumoto

#2 終末糖化産物と LPS は骨細胞由来スクレロスチンを介し骨芽細胞分化を抑制する, 第 148 回春季日本歯科保存学会学術大会, 2018 年 6 月

坂本 英次郎, 高木 亮輔, 稲垣 裕司, 木戸 淳一, 湯本 浩通

#3 最終糖化産物と LPS は MAPK および NF-κB を介してマウス骨細胞のスクレロスチン発現を調節する, 第 60 回春季日本歯周病学会学術大会, 2017 年 5 月

坂本 英次郎, 稲垣 裕司, 木戸 淳一, 高木 亮輔, 成石 浩司, 永田 俊彦

#4 AGE and Porphyromonas gingivalis-LPS Increase Sclerostin Expression in Osteocytes, International Association for Dental Research, Mar. 2017

Eijiro Sakamoto, Yuji Inagaki, Jun-ichi Kido, Ryosuke Takagi, Koji Naruishi and Toshihiko Nagata

#5 マウス骨細胞株 MLO-Y4-A2 のスクレロスチン発現における最終糖化産物および LPS の影響, 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2016 年 10 月

坂本 英次郎, 稲垣 裕司, 木戸 淳一, 高木 亮輔, 生田 貴久, 成石 浩司, 永田俊彦

#6 骨細胞培養系における AGE と LPS 刺激によるスクレロスチンの発現上昇, 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 2016 年 5 月

稲垣 裕司, 坂本 英次郎, 木戸 淳一, 梶浦 由加里, 永田 俊彦

#7 糖尿病関連歯周炎の歯槽骨破壊におけるスクレロスチンの役割, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月

坂本 英次郎, 稲垣 裕司, 木戸 淳一, 梶浦 由加里, Lew Jung-Hwan, 永田 俊彦

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：木戸 淳一

ローマ字氏名：KIDO Jun-ichi

研究協力者氏名：稲垣 裕司

ローマ字氏名：INAGAKI Yuji

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。