

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17306

研究課題名(和文) 脂肪細胞に発現するCXCL12の破骨細胞形成および矯正学的歯の移動への影響

研究課題名(英文) Effects of CXCL12 expressed in adipocytes on osteoclastogenesis and orthodontic tooth movement

研究代表者

島 和弘 (Shima, Kazuhiro)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：40792148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CXCL12は破骨細胞分化に対し促進効果を示すことがわかった。このことは、CXCL12が発現する脂肪細胞の多い肥満の患者では、破骨細胞分化および骨吸収が促進される可能性を示唆した。In vitro においても、RANKLによる破骨細胞形成、TNF による破骨細胞形成に促進作用を示すことが確認された。活性化された脂肪細胞から産生されるCXCL12はin vivoにおいても破骨細胞形成および骨吸収を促進させると考えられる。これらのことは肥満を有する患者の矯正治療による歯の移動に影響する可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生活習慣病が社会的な問題となっている。その中で肥満および肥満に伴う代謝異常によるメタボリックシンドロームが特に問題視されている。肥満の有病率は年々増加しており、矯正治療においても肥満の患者は増加してきている。肥満には脂肪細胞が関与していることが知られている。脂肪細胞は、骨髄ニッチに存在し、肥満、骨吸収の増加する骨粗鬆症、関節リウマチ、骨転移性の癌の際に著しく増加することが知られている。このことから、脂肪細胞と破骨細胞の関係を調べることは重要なことだと考えられる。

研究成果の概要(英文)：CXCL12 belongs to the family of CXC chemokines. Lipopolysaccharide (LPS) induces inflammation-induced osteoclastogenesis and bone resorption, and in recent years, stimulatory effects of CXCL12 on bone resorption have also been reported. LPS was administered with or without CXCL12 onto mouse calvariae by daily subcutaneous injection. Numbers of osteoclasts and bone resorption were significantly elevated in mice co-administered LPS and CXCL12 compared with mice administered LPS alone. These in vitro results confirmed a direct stimulatory effect of CXCL12 on RANKL- and TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis. Our results suggest that CXCL12 enhances LPS-induced osteoclastogenesis and bone resorption in vivo through a combination of increasing LPS-induced TNF- $\alpha$  production by macrophages, increasing RANKL production by osteoblasts, and direct enhancement of osteoclastogenesis.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：CXCL12 破骨細胞

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

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病が社会的な問題となっている。その中で肥満および肥満に伴う代謝異常によるメタボリックシンドロームが特に問題視されている。肥満の有病率は年々増加しており、矯正治療においても肥満の患者は増加してきている。肥満には脂肪細胞が関与していることが知られている。脂肪細胞は、骨髄ニッチに存在し、肥満、骨吸収の増加する骨粗鬆症、関節リウマチ、骨転移性の癌の際に著しく増加することが知られている。このことから、脂肪細胞と破骨細胞の関係を調べることは重要なことだと考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、現代病として生活習慣病が問題視されてきている。その中の一つに肥満がある。肥満のメカニズムの一つとして脂肪細胞が活性化して肥大や増殖をすることが挙げられる。最近の研究で、脂肪細胞は、破骨細胞形成に関連することが分かってきた。また、脂肪細胞が発現している CXCL12 は破骨細胞形成を促進することが新しく発見された。

一方、矯正学的歯の移動は歯槽骨のリモデリングにより歯の移動が起こる。このリモデリングには破骨細胞による骨吸収が重要な役割を果たしている。これらのことから肥満の患者に矯正治療を行った際に矯正学的歯の移動に影響が出る可能性がある。そこで本研究では脂肪細胞が分泌する CXCL12 の破骨細胞形成および矯正学的歯の移動に対する関連性を調べるのが目的である。

## 3. 研究の方法

### 1. 破骨細胞形成および骨吸収に対する CXCL12 の *in vivo* での解析

#### TNF- $\alpha$ による破骨細胞形成に対する CXCL12 の作用の組織学的検討

野生型マウス (C57BL6/J、8 週齢雄) の頭蓋部に TNF- $\alpha$  (1.5  $\mu$ g/100 $\mu$ l) および CXCL12 (SDF-1 /CXCL12、和光株式会社、大阪、日本) (1mg/kg) を組み合わせたもの、または TNF- $\alpha$  単独のものを 5 日間連続で注入し、*in vivo* での破骨細胞形成を行う。評価は頭蓋冠の組織切片の TRAP 染色を行い、頭蓋骨縫合部の破骨細胞の数を比較する。また、CXCL12 の作用を濃度依存的に検討するため、CXCL12 の濃度を変え TNF- $\alpha$  と組み合わせて注射し、TRAP 陽性細胞の破骨細胞形成を濃度依存的に検討する。

#### TNF- $\alpha$ による破骨細胞形成に対する CXCL12 の作用の生化学的検討

マウス頭蓋骨に TNF- $\alpha$  および CXCL12 を組み合わせたもの、または TNF- $\alpha$  単独のものを 5 日連続で注入し、頭蓋骨を液体窒素で凍結して粉碎、そこから RNA 抽出を行い、破骨細胞形成マーカーである TRAP、cathepsin K、MMP9、 $\alpha$ 3 integrin、Calcitonin receptor の mRNA の遺伝子発現量を real-time PCR 法を用いて定量的に測定し比較検討する。さらに、破骨細胞形成必須因子である RANKL の発現についても検討する。

#### TNF- $\alpha$ による骨吸収に対する CXCL12 の影響の検討

マウス頭蓋骨に TNF- $\alpha$  および CXCL12 を組み合わせたものおよび TNF- $\alpha$  単独のものを注射し、骨吸収像をマイクロ CT を用いて撮影し、骨吸収を評価する。さらに、マウスより血液を採取し、骨吸収マーカーである CTX 血中濃度を比較評価する。

## **TNF- $\alpha$ による骨吸収に対する CXCL12 のレセプターである CXCR4 の遺伝子欠損マウスを用いた検討**

野生型マウスと CXCR4 の遺伝子欠損マウスの頭蓋部に TNF- $\alpha$  (1.5  $\mu$ g/100  $\mu$ l) を 5 日間連続で注入し *in vivo* での破骨細胞形成を行う。評価は、頭蓋冠の組織切片の TRAP 染色を行い、頭蓋骨縫合部の破骨細胞の数を測定、RNA より real-time PCR にて破骨細胞形成マーカーの測定、骨吸収像のマイクロ CT 撮影にて破骨細胞形成および骨吸収を比較する。

### **2. CXCL12 の破骨細胞形成に対する *in vitro* での解析**

#### **CXCL12 の破骨細胞形成への影響**

マウスの大腿骨および脛骨より骨髓細胞を採取し、骨髓細胞を M-CSF 100ng/ml の濃度で 3 日間培養し、付着細胞を破骨細胞前駆細胞として集め、その細胞を M-CSF 50ng/ml の存在下で TNF- $\alpha$ 、さらに CXCL12 を加えて 3 日間培養し、CXCL12 を加えずに培養したものと破骨細胞形成への影響を比較検討する。破骨細胞形成マーカーである TRAP、cathepsin K、MMP9、 $\alpha$ 3 integrin、Calcitonin receptor の mRNA の遺伝子発現量を real-time PCR 法を用いて定量的に測定し評価する。

#### **CXCL12 の破骨細胞形成のシグナル伝達に対する影響での解析**

破骨細胞形成のシグナル伝達に対する影響を調べるためウエスタンブロット法で解析を行う。破骨細胞前駆細胞を TNF- $\alpha$  と CXCL12 を組み合わせたものおよび TNF- $\alpha$  単独で作用させ、TNF- $\alpha$  の下流での活性化に対する CXCL12 の作用を解析するため、MAPKs (JNK、p-38、ERK)、NF- $\kappa$ B、AKT のリン酸化をウエスタンブロット法にて比較し評価する。

#### **CXCL12 のレセプターである CXCR4 の遺伝子欠損マウスを用いた CXCL12 の破骨細胞形成への影響の解析**

CXCL12 のレセプターである CXCR4 の遺伝子欠損マウスを実験に用いる。CXCR4 の遺伝子欠損マウスと野生型マウスの大腿骨から骨髓細胞を採取し M-CSF で 3 日間培養する。その後、付着細胞を回収しこれを破骨細胞前駆細胞として実験に用いる。破骨細胞前駆細胞に M-CSF、TNF- $\alpha$ 、さらに骨髓細胞から分離した脂肪細胞を組み合わせて培養し破骨細胞を分化誘導させ破骨細胞形成に対する CXCL12 の影響を比較検討する。破骨細胞形成の評価は TRAP 染色により行う。

### **3. CXCL12 のストローマ細胞に対する影響の *in vitro* での解析**

マウスより取り出した全骨髓細胞を 10cm ディッシュに  $1.0 \times 10^7$  個播種し、10% FBS、100IU/ml penicillin G および 100 $\mu$ g/ml streptomycin が含まれた D-MEM 10ml を加え 2 週間培養する。浮遊細胞を除去し、付着細胞をストローマ細胞として使用する。TNF- $\alpha$  および CXCL12 を組み合わせたものおよび TNF- $\alpha$  単独で 3 日間培養し破骨細胞形成必須因子である RANKL の mRNA の遺伝子発現量を real-time PCR 法を用いて定量的に測定し比較評価する。さらに TNF- $\alpha$  の下流での活性化を解析するため、MAPKs、NF- $\kappa$ B、AKT のリン酸化をウエスタンブロット法にて比較評価する。

### **4. CXCL12 の歯の移動に対する影響**

#### **CXCL12 の投与による歯の移動の解析**

野生型マウスの上顎切歯と左側第一臼歯間に 10gf の NiTi クローズドコイルスプリングを全身麻酔下(セボフルランの吸引)で装着し(図参照)左側第一臼歯を近心移動する。左側第一大臼歯類側皮下にマイクロシリンジを用いて CXCL12 を注入し 12 日後に歯の移動距離を測定した後に屠殺し顎骨部をとり、組織切片を作成後、TRAP で染色を行い、破骨細胞形成を評価する。さらに CXCL12 の濃度依存的な検討も行う。

#### CXCR4 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの矯正学的歯の移動による CXCL12 の関連性の解析

上記の方法を利用し、CXCR4 の遺伝子欠損マウスと野生型マウスの歯の移動量および破骨細胞形成の比較検討を行う。

#### 4 . 研究成果

C57BL6/J マウス頭蓋骨皮下に LPS10 または 100(10 or 100 $\mu$ g/100 $\mu$ l) および CXCL12(5 $\mu$ g/100 $\mu$ l)を毎日 5 日間投与し、6 日目に屠殺し、組織切片を作製した。低濃度 LPS 単独では、コントロールと比較して有意な破骨細胞形成は認められなかった。高濃度 LPS 単独では破骨細胞形成が多く認められた。低濃度 LPS に CXCL12 を混合して投与すると有意に破骨細胞形成が促進した。また、CXCL12 の主要な受容体である CXCR4 の阻害薬である AMD3100 を、低濃度 LPS と CXCL12 を混合すると、有意に破骨細胞形成は抑制された。また、mRNA を採取し、破骨細胞マーカーである TRAP、カテプシン K をリアルタイム PCR にて解析したところ、低濃度 LPS と同時に CXCL12 を投与したものではそれぞれの発現が有意に増加した。また、破骨細胞形成必須因子である RANKL の発現、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  でも、低濃度 LPS と同時に CXCL12 を投与したものでは増加した。また、マウス頭蓋骨をマイクロ CT 撮影し、骨吸収を評価したところ低濃度 LPS と同時に CXCL12 を投与したものでは骨吸収が増加した。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1) Effect of Anti-c-fms Antibody on Osteoclast Formation and Proliferation of Osteoclast Precursor In Vitro.

Aseel Marahleh, Hideki Kitaura, Masahiko Ishida, Kazuhiro Shima, Akiko Kishikawa, Saika Ogawa, Wei-Ren Shen, Jiawei Qi, Fumitoshi Ohori, Takahiro Noguchi, Yasuhiko Nara, Itaru Mizoguchi, JOVE ISSUE 145 DOI: 10.3791/59089 PUBLISHED:3/18/2019

2) DPP-4 inhibitor impedes lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption in vivo.

Ishida M, Shen WR, Kimura K, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S, Qi J, Ohori F, Noguchi T, Marahleh A, Kitaura H, Biomedicine & Pharmacotherapy 109 (2019) 242–253

3) Analytical cellular pathology (Amsterdam) 2018 8047610 2018 年 [査読有り]

## The Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Exendin-4 Inhibits

Lipopolysaccharide-Induced Osteoclast Formation and Bone Resorption via Inhibition of TNF- $\alpha$  Expression in Macrophages.

Shen WR, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S, Qi J, Kitaura H

Journal of immunology research 5783639 2018年 [査読有り]

4) C-X-C Motif Chemokine 12 Enhances Lipopolysaccharide-Induced Osteoclastogenesis and Bone Resorption In Vivo.

Shima K, Kimura K, Ishida M, Kishikawa A, Ogawa S, Qi J, Shen WR, Ohori F, Noguchi T, Marahleh A, Kitaura H

Calcified tissue international 103(4) 431-442 2018年10月 [査読有り]

5) Role of Muramyl Dipeptide in Lipopolysaccharide-Mediated Biological Activity and Osteoclast Activity.

Kitaura H, Ishida M, Kimura K, Sugisawa H, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S, Qi J, Shen WR

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 島和弘、木村桂介、石田匡彦、岸川明子、小川紗衣香、齊嘉煒、沈威任、大堀文俊、野口隆弘、Aseel Marahleh、北浦英樹：CXCL12の破骨細胞形成、骨吸収および破骨細胞関連サイトカインの発現への影響についての検討、第77回日本矯正歯科学会大会、横浜(2018)
- 2) 島和弘、木村桂介、石田匡彦、杉澤晴紀、越智由美子、岸川明子、小川紗衣香、齊嘉煒、沈威任、北浦英樹：破骨細胞形成および骨吸収に対する脂肪細胞に発現するケモカインCXCL12の作用の検討、第76回日本矯正歯科学会大会、札幌(2017)

## 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：

ローマ字氏名：

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。