

平成 21 年 2 月 6 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18592052

研究課題名(和文) 歯周関連疾患発症機序における RANKL の生理的意義：分子薬理学的研究

研究課題名(英文) Physiological significance of RANKL on the pathogenetic mechanism in Periodontitis-related disease: Molecular Pharmacological Research

研究代表者

茂木 眞希雄(MOGI MAKIO)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：00174334

研究成果の概要：目的 1) *in vivo* 研究としてヒト歯肉溝滲出液(GCF)中ならびに顎関節症滑液中の骨代謝関連因子の探求、とくに RANKL との関連性が強い破骨細胞由来 Cathepsin-K の定量 2) *in vitro* 病態モデル(炎症性サイトカイン処理マウス骨芽細胞)により、惹起される RANKL ならびにアポトーシスを誘導する caspase を中心としたシグナルカスケードの分子機構の解明 3) 病態モデル(炎症性サイトカイン処理マウス骨芽細胞ならびにストローマ細胞)により、惹起される OPG 産生抑制シグナルカスケードの分子機構の解明 4) 骨芽細胞の分化・増殖における osteoprotegerin(OPG) の新規な生理的役割について詳細な基礎的な検討を行い、新たな歯周関連疾患治療戦略の構築をめざすことを目的とした。

結果 1) 健常者、顎関節症の disk displacement with reduction, disk displacement without reduction, osteoarthritis の 4 群から滑液を得て RANKL, OPG, RANKL/OPG ratio を測定した。ヒト顎関節症、とくに osteoarthritis 患者滑液中に RANKL が存在し、OPG 量が健常者と比較して統計的有差を持って低下を示し、有意に RANKL/OPG ratio が亢進することを初めて明示した。Osteoarthritis 患者滑液が *in vitro* でヒト末梢単球からの破骨細胞形成ならびに活性化能を持つことを確認し、Osteoarthritis の骨破壊の機序に RANKL/OPG が関わる可能性を初めて明示した(Wakita, Mogi et al., J. Dent. Res.)。

2) 健常者 GCF との比較から、ヒト歯肉溝滲出液 GCF 中の破骨細胞由来と考えられるプロテアーゼ Cathepsin-K と破骨細胞分化誘導因子 RANKL 濃度が歯周病の進行・ステージにより上昇変動が見られ、両者とも統計的有意な増加ならびに相互に相関を認めた(Mogi, M. et al., Archs Oral Biol., 2007)。

3) マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞において、炎症性サイトカイン誘導アポトーシスシグナルは、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの活性化を伴うことを明らかに、iNOS 依

存性アポトーシス細胞死システムの誘導を調節する上で p38MAP キナーゼカスケードが、重要な役割を担うことを明示した (Kuzushima, Mogi et al., Archs Oral Biol).

4) OPG-knockout mouse における血中 RANKL および OPG の変化と骨代謝異常の関連性について精査し、OPG-knockout mouse 血中 RANKL 濃度の顕著な増大を発見した。本実験結果は OPG の新規な生理的役割として膜結合型 RANKL の可溶性型 RANKL への移行を調節するユニークな作用を持つことを初めて明示した (Nakamichi et al., J. Immunol., 2007)。

5) ヒト gingivitis 患者歯肉溝滲出液 (GCF) 中のサイトカインの変動を健常者 GCF サンプルとの比較探索を行ない、EGF superfamily の transformng growth factor- α が特異的に gingivitis 群において低下している事を明らかにした (Mogi et al., J. Immunoassay Immunochem., 2009)

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
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：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞、RANKL,OPG

1. 研究開始当初の背景

骨破壊を伴う歯周関連疾患の病因ならびに病態の進行要因を探る新たなアプローチとして、骨芽細胞と破骨細胞の機能変化が着目されつつある。骨芽細胞は、RANKL、OPG、M-CSF などの産生を介して、破骨細胞の分化と増殖を制御する中心的役割を担う。特に、近年存在が明示された骨芽細胞由来破骨細胞分化因子 RANKL ならびに破骨細胞分化抑制因子 OPG は、破骨細胞の分化、増殖、活性化ならびにアポトーシ

の調節因子として重要な役割を担っており、両者の厳密な産生制御にて正常な骨代謝が営まれている。よって、骨芽細胞における RANKL の産生機序の解明、ならびに骨破壊疾患である歯周関連疾患の病態ならびに進行との関連性を探求することは、歯周疾患の新たな治療戦略を探る上で急務である。また、歯周疾患に伴い病巣で爆発的に産生誘導される炎症性サイトカインの被曝により、骨芽細胞は RANKL 産生ならびにアポトーシスが惹起されるが、アポト

ーシスが歯周病の病態進行に関与するか否かは現時点で明らかにされていない。

さらに、骨芽細胞の機能変化、とくに OPG 産生抑制が、骨破壊を伴う歯周関連疾患の病因ならびに病態の原因となる可能性があり、実際、歯周病患者歯肉溝浸出液中の OPG タンパクの顕著な減少を確認している (Mogi et al., J. Dent. Res, 2004)。しかし国内外の多くの研究が RANKL の産生変動に着目している中、OPG の動態に焦点をあてた病態歯科医学研究はほとんど行われていない。よって骨芽細胞における OPG の産生機序の解明、ならびに OPG と骨破壊疾患である歯周関連疾患の病態との関連性を探求することも求められている。前回のプロジェクトで、ヒト歯肉溝浸出液中の TNF- α 受容体ファミリー (RANKL と OPG) は歯周病の進行・ステージとともに統計的有意な RANKL の亢進と、それとは逆相関に OPG の減少を認め、ヒト歯周病に伴う骨破壊に RANKL/OPG 存在比が深く関与する可能性を初めて明示した。慢性関節リウマチにおける結果 (Kotake, Mogi et al., Arthritis & Rheumatism, 2001) ならびに歯周病の結果 (Mogi et al., J. Dent. Res., 2004) から、骨破壊疾患の病態進行の一助として RANKL/OPG のバランスが崩れることで異常な osteoclastogenesis の亢進が局所的に起こり、骨吸収を惹起させるという仮説を提示した。さらに、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 は、血清除去により 24 時間までに細胞増殖は停止し、細胞周期 G0/G1-arrest を伴うアポトーシスが惹起されることを確認し、20S proteasome から NF- κ B の活性化、cdk-6 の減少、caspase の活性化に至る高度に制御されたシグナルカスケードの存在を明示した (Mogi et al., Bone, 2004)。

2. 研究の目的

本研究では、1) in vivo 研究としてヒト歯肉溝浸出液 (GCF) 中ならびに顎関節症滑液中の骨代謝関連因子の探求、とくに RANKL との関連性が強い破骨細胞由来 Cathepsin-K の定量 2) in vitro 病態モデル (炎症性サイトカイン処理マウス骨芽細胞) により、惹起される RANKL ならびにアポトーシスを誘導する caspase を中心としたシグナルカスケードの分子機構の解明 3) 病態モデル (炎症性サイトカイン処理マウス骨芽細胞ならびにストローマ細胞) により、惹起される OPG 産生抑制シグナルカスケードの分子機構の解明 4) 骨芽細胞の分化・増殖における OPG の新規な役割について詳細な基礎的な検討を行い、新たな歯周関連疾患治療戦略の構築を目的とする。

3. 研究の方法

発表論文に記載した。

4. 研究成果 2006-2007

1) マウスの骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞において、炎症性サイトカイン誘導アポトーシスシグナルは、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの活性化を伴うことを明らかにした。炎症性サイトカインは、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の活性化を伴う細胞死シグナルを強力に惹起した。RT-PCR 法による遺伝子解析にて、サイトカインは、iNOS mRNA の誘導が認められ、さらに細胞内 NO 産生を誘導した。p38MAP キナーゼの特異的酵素阻害剤である SB203580 は、iNOS mRNA および、その酵素産物である NO 誘導を強力に抑制したうえで、アポトーシスの指標となる DNA fragmentation の誘導も用量依存的に抑制した。古典的な MAP キナーゼの上流域に存在する MEK の特異的酵素阻害剤 PD98059 は、サイ

トカインによる NO 産生, iNOSmRNA の誘導ならびに DNA fragmentation の誘導に関し抑制効果を示さなかった。以上の結果は, サイトカイン処理された骨芽細胞において, iNOS 依存性アポトーシス細胞死システムの誘導を調節する上で p38MAP キナーゼカスケードが, 重要な役割を担うことを明示した (Kuzushima, Mogi et al., Archs Oral Biol).

2) 歯科領域の骨破壊疾患として歯周病とならんで顎関節症がある。顎関節症の病態解明を試みるために、健常者、顎関節症の disk displacement with reduction, disk displacement without reduction, osteoarthritis の 4 群から滑液を得て RANKL, OPG, RANKL/OPG ratio を測定した。ヒト顎関節症、とくに osteoarthritis 患者滑液中に RANKL が存在し、OPG 量が健常者と比較して統計的有差を持って低下を示し、結果として有意に RANKL/OPG ratio が亢進することを初めて明示した。更に Osteoarthritis 患者滑液が in vitro でヒト末梢単球からの破骨細胞形成ならびに活性化能を持つことを確認した。これらが OPG あるいは anti-RANKL-IgG 添加にて抑えられることを確認し、Osteoarthritis の骨破壊の機序に RANKL/OPG が関わる可能性を初めて明示した (Wakita, Mogi et al., J. Dent. Res.)。

研究成果 2007-2008

1) 健常者 GCF との比較から、ヒト歯肉溝滲出液 GCF 中の破骨細胞由来と考えられるプロテアーゼ Cathepsin-K と破骨細胞分化誘導因子 RANKL 濃度が歯周病の進行・ステージにより上昇変動が見られ、両者とも統計的有意な増加ならびに相互に相関を認めた (Mogi, M. et al., Archs Oral Biol., 2007)。本実験結果は、私が J. Dent. Res. (2003) に報告した実

験結果を追試するだけでなく、間接証明として、GCF 中の RANKL 濃度の亢進が実際に in vivo にて破骨細胞の分化誘導に通じる事、つまりヒト歯周病に伴う骨破壊に RANKL 亢進による破骨細胞形成が深く関与する可能性を示唆した。

(2) OPG-knockout mouse における血中 RANKL および OPG の変化と骨代謝異常の関連性について精査した。その結果, OPG-knockout mouse 血中 RANKL 濃度の顕著な増大を発見した。本実験結果は OPG の新規な生理的役割として膜結合型 RANKL の可溶性型 RANKL への移行を調節するユニークな作用を持つことを初めて明示した (Nakamichi et al., J. Immunol., 2007)。

研究成果 2008-2009

2006-2008 の実験結果を踏まえて総括的な考察を行い、さらなる本研究の進展を摸索するための付加的な実験を行った。

ヒト gingivitis 患者歯肉溝滲出液 (GCF) 中のサイトカインの変動を健常者 GCF サンプルとの比較探索を行ない、EGF superfamily の transformng growth factor- α が特異的に gingivitis 群において低下している事を明らかにした (Mogi et al., J. Immunoassay Immunochem., 2009)。研究の一部に関し、さらに現在 1 報投稿中である。

総括 骨破壊疾患である関節リウマチならびに歯周病疾患の発症あるいは病態進行に RANKL と OPG が関わる可能性を世界に先駆けて、本研究室にて明らかにした (Kotake, Udagawa, Mogi et al., Arthritis & Rheumatism, 2001; Mogi et al., J. Dent. Res., 2004)。骨芽細胞にアポトーシスが誘導

されるか否かの検討は、MC3T3-E1 がセラミドの蓄積により細胞死に陥ること (Bone 19:193, 1996; Journal of Bone and Mineral Research 11: 200, 1996; 12: 412, 1997) 以外はほとんど行われていない。さらに in vivo 研究、とくにヒト病態歯科医学研究は立ち遅れている。また、国内外において骨芽細胞由来 OPG のシグナルカスケードに着目し、骨破壊疾患、特に歯周病の発症機序と関わる可能性を模索した研究は、現時点で行われていない。本研究で得られた結果の総括的な考察を行い、今後さらなる本研究の進展を模索するため、研究を継続中である。

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 5 件)

1) Wakita, T., Mogi, M., Kurita, K. Togari, A. Increase in RANKL:OPG ratio in synovial of patients with TMJ disorder. **Journal of Dental Research** 85(7),627-632, 2006. 査読有り

2) Kuzushima, M., Mogi, M., Togari, A. Cytokine-induced nitric oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: involvement of p38MAP kinase. **Archives of Oral Biology** 51(11),1048-1053, 2006. 査読有り

3) Nakamichi, Y., Udagawa, N., Kobayashi, Y., Nakamura, M., Yamamoto, Y., Yamashita, T., Mizoguchi, T., Sato, M., Mogi, M., Pnenninger, J.M., Takahashi, N. Osteoprotegerin Reduces the Serum Level of Receptor Activator of NF-kB Ligand Derived from Osteoblasts. **Journal of Immunology** 178(1), 192-200, 2007. 査読有り

4) Mogi, M., Ootogoto, J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with Periodontitis.

Archives of Oral Biology 52, 894-898, 2007. 査読有り

5) Ootogoto, J., Mogi, M. Drop in transforming growth factor- α and osteoprotegerin level in gingival crevicular fluid from patients with gingivitis. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, in press 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者
茂木 眞希雄 (MOGI MAKIO)
愛知学院大学・薬学部・准教授
研究者番号：00174334

(2) 研究分担者
森田 あや美
愛知学院大学・薬学部・助教
研究者番号：70301629

(3) 連携研究者