

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目： 基盤研究（B）
研究期間： 2007～2008
課題番号： 19390516
研究課題名（和文）：骨吸収の分子遺伝子解析とプロピオン酸菌発酵物質を用いた骨吸収抑制法の創出
研究課題名（英文）： <i>Molecular and genetic analysis of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoporosis and control of inhibition of bone resorption by 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA)</i>
研究代表者： 菅原 利夫（SUGAHARA TOSHIO） 愛知学院大学・歯学部・客員教授 研究者番号：10116048

研究成果の概要：免疫抑制剤 FK506 投与による骨粗鬆症に対するプロピオン酸菌の発酵産物（PC）である新規なビフィズス菌増殖因子 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) の効果の検討した。

1. DHNA の骨粗鬆症改善効果を証明した。
2. この効果は FK506 投与により増加した B 細胞を減少させ、減少した T 細胞を増加させることにより起こると考えられた。
3. 骨髄から、マイクロアレイを用いた網羅的解析を行ない、対照群と比較し発現差が認められたのは、骨免疫に関与している 2487 個の遺伝子であった。

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・外科系歯学

キーワード： 骨粗鬆症、ビフィズス菌、プロピオン酸、DHNA、骨免疫、骨吸収

1. 研究開始当初の背景

急速な高齢化社会への移行に伴い、加齢による骨粗鬆症の増加は患者の QOL を著しく低下させている。ヒトの骨量は 18 歳ごろをピークに、加齢とともに骨組織は減少し、その結果として骨折を起こしやすくなる。本邦での寝たきりの原因の第 1 位が脳卒中、第 2 位が老衰、第 3 位が骨粗鬆症による骨折であることから、骨粗鬆症は高齢社会が抱える問題の一つとなっている。また、歯科・口腔外科の分野においても骨移植あるいは骨再生による骨が予期しない吸収をおこし、初期の目的を達しない現象がみられる。これに対応するための手法としては骨吸収のメカニズムを詳細に解析して骨の吸収、破壊を防止する

ことである。このため利用頻度の高い食品に添加でき、骨粗鬆症が改善できる物質の開発が望まれていた。私達の研究グループは、スイスチーズのスターターであるプロピオン酸菌の発酵産物（PC）から、新規なビフィズス菌増殖因子 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) を見出した。この DHNA は近年骨量改善作用を持つことで注目されているビタミン K2 と同じナフトキノ骨格を有している。

2. 研究の目的

JC1-ICR マウスに FK506 を投与し、実験的に骨粗鬆症を発症させ、DHNA の骨への改善効果を形態学的、生化学的、遺伝学的に検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物モデルの作製法

実験動物には、6週齢 JC1-ICR 雄性マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) を用い、対照群に生理食塩水 10ml/kg/day を腹腔内投与し、0.002% DMSO 溶液 10ml/kg/day を経口投与、FK506 群には FK506 (Astellas, Tokyo, Japan) を 1mg/kg/day 腹腔内投与し、0.002% DMSO 溶液 10ml/kg/day を経口投与、FK506・DHNA 群には FK506 を 1mg/kg/day 腹腔内投与し、DHNA を 0.002% DMSO に溶解し、DHNA の投与量が 1mg/kg/day となるように調節して、この DHNA 溶液を 10ml/kg/day 経口投与した。

各群 10 匹ずつ 5 週間の連日投与を行った。また FK506 の投与量は実際にヒトに対して用いられている投与量 1.0mg/kg/day をマウス体重に換算し投与した。投与終了の翌日にエーテル麻酔下で眼窩下静脈叢より血液を採取し、頸椎脱臼により屠殺後、腸間リンパ節、頸骨、大腿骨を摘出した。この実験は岡山大学歯学部動物実験管理委員会の承諾を得て行った。

(2) 動物実験による DHNA の骨粗鬆症への改善効果の測定方法

薬剤投与期間中に 1 週間間隔で各個体の体重および各群の飼料摂取量を測定した。

(3) 骨組織切片の作製と観察法

摘出した大腿骨のヘマトキシリン - エオジン (HE) 染色は通法に従って行った。また破骨細胞観察のために Acid Phosphatase Leukocyte (sigma-Aldrich, St-Louis, USA) を用いて、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を行った。反応後、メチルグリーン (Vector Laboratories, Burlingame, USA) で核染色を行った。さらに本研究では B 細胞全体の関係について検討を行うために、B 細胞分化過程でほとんどの B 系統細胞に表現する表面抗原である CD45 R を選択した。

(4) CT によるマウス大腿骨の骨密度の撮影法

各群のマウスを屠殺後、70%エタノールで固定し、仰臥位で大腿骨を実験動物用 X 線 CT (LA Theta) を用いてスライス間隔を 1mm で CT 撮影を行い、皮質骨、海綿骨 (骨染) の骨密度を Peripheral

Quantitative Computed Tomography (PQCT) 法を用いて測定した。

(5) 血液生化学的検討法

眼窩下静脈叢から採取した血液を用いて、血中尿素窒素 (BUN)、血中クレアチニン (Cr)、血清カルシウム濃度 (Ca) 測定および炎症性サイトカインである IL-1 β , IL-6, TNF- α を測定した。

(6) リンパ球に占める B 細胞、T 細胞の割合の検討

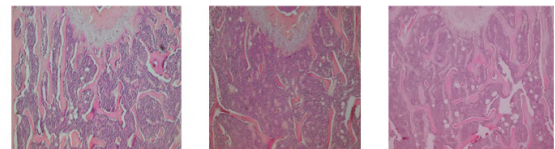
マウスの腸間膜リンパ節からリンパ球を採取した。フローサイトメーターを用いて B 細胞、T 細胞を計測した。

4. 研究成果

(1) 大腿骨の組織学的観察

H-E 染色による形態変化観察の結果

FK506 群では対照群と比較して、骨端軟骨の骨幹側に観察される骨梁が少ない傾向にあった。しかし、FK506、DHNA 群では骨端軟骨の骨幹側に観察される骨梁は FK506 群より多いが対照群ほどは観察されなかった。

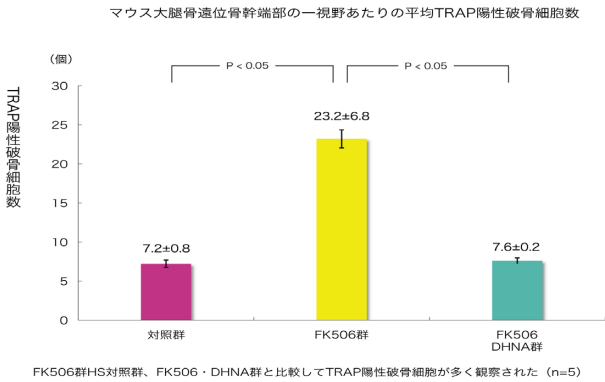


(対照群) (実験群1) (実験群2)

顕微鏡写真 (マウス大腿骨遠位骨幹端部の H-E 染色像)

(2) TRAP 染色の結果

対照群、FK506 群および FK506、DHNA 群にそれぞれ TRAP 陽性破骨細胞が観察され、FK506 群での TRAP 陽性細胞が他の群より多く観察された。一視野あたりの TRAP 陽性細胞の平均細胞数の有意差検定を行ったところ、FK506 群は対照群および FK506、DHNA 群と比較して明らかに増加していた ($p < 0.05$)。対照群と FK506、DHNA 群では差は認められなかった。



FK506群HS対照群、FK506・DHNA群と比較してTRAP陽性破骨細胞が多く観察された。(n=5)

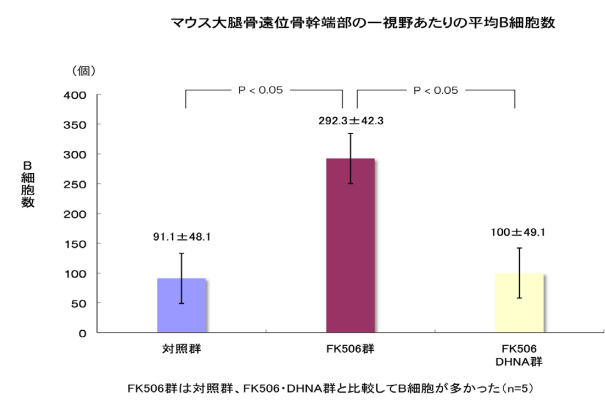
マウス大腿骨遠位骨幹端部の一視野あたりの平均TRAP陽性細胞の数

これらのことからFK506投与による骨粗鬆症をDHNAを投与することにより、軟骨層から骨新生部位での海面骨の骨吸収が抑制されることが明らかになった。またDHNA投与でのFK506骨吸収抑制効果はTRAP陽性破骨細胞の増加を抑制することを明らかにした。

(3) 免疫組織化学的染色によるT細胞、B細胞の観察結果

対照群、FK506群およびFK506、DHNA群でそれぞれB細胞を観察することができた。FK506群では骨端軟骨の骨幹側や骨髓内にB細胞が増加している傾向を認めた。

また、一視野あたりのB細胞の細胞数を計測し有意差検定を行ったところ、FK506、DHNA群と比較しB細胞数が明らかに増加していた(p<0.05)。しかし、対照群とFK506、DHNA群では差はなかった。



FK506群は対照群、FK506・DHNA群と比較してB細胞が多かった。(n=5)

(4) B細胞と破骨細胞の位置関係

対照群およびFK506、DHNA群と比較してB細胞が多くみられたFK506群において、B細胞は

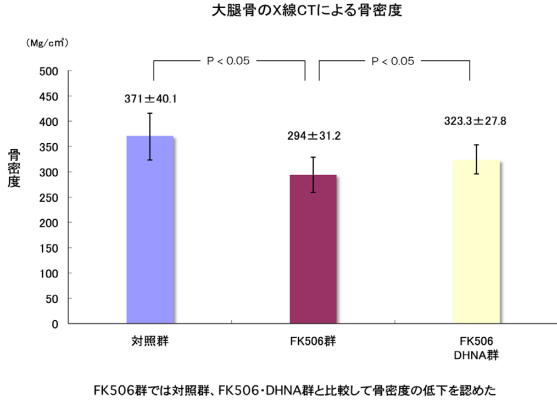
TRAP陽性破骨細胞の近傍に集積しているのが観察された。

FK506を投与するとRANKLは増加した。RANKLはT細胞だけではなく、B細胞や骨芽細胞上にも発現するという報告もあることから、B細胞による関与も考えられるため。TRAP陽性破骨細胞とB細胞との局在を検討した結果、FK506群である骨粗鬆症モデルではTRAP陽性破骨細胞の近傍にB細胞の局在を認め、TRAP陽性破骨細胞の発現にB細胞も関与していることが示唆された。

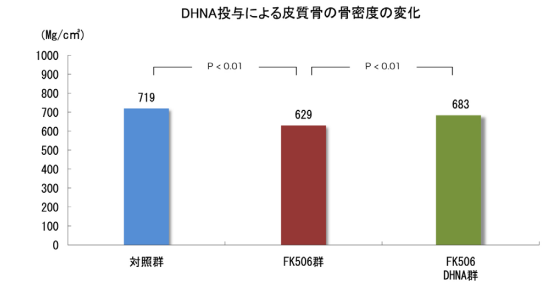
(5) CT骨密度測定による評価

FK506群は対照群およびFK506、DHNA群と比較して、骨密度の低下を認めたが(P<0.05)、対照群とFK506、DHNA群では差は認められなかった。対照群に比べてFK506群では骨内部に吸収が進み、透過性が増していた。しかしFK506、DHNA群ではFK506群と比較して骨吸収が抑制され、海面骨の吸収が回復していた。

これらのことから、H・E染色での観察と同様にFK506を投与することにより有意に骨が減少し、DHNAを投与することでこの骨粗鬆症が有意に回復することが明らかになった。



FK506群では対照群、FK506・DHNA群と比較して骨密度の低下を認めた



FK506投与による皮質骨および海面骨の骨密度の低下がDHNAの投与により有意に改善されることが明らかになった。

大腿骨の骨密度の計測結果

(6) 血液生化学的検討結果

① 生液生化学的検討結果

血清中の TRAP 濃度、RANKL 濃度ともに FK506 群では対照群および FK506、DHNA 群と比較して高い値を示した ($p < 0.05$)。しかし対照群と FK506、DHNA 群では差が認められなかった。

② マウスの血清生化学的検討結果

5 週投与後のマウスの血清より Cr, BUN, Ca の濃度および炎症性サイトカインの計測を行った。

Cr は FK506 群で上昇を認め、FK506、DHNA 群、対照群と比較し有意差がみられた ($p < 0.01$)。一方、FK506、DHNA 群では対照群と比較し有意差は認められなかった。

BUN は FK506 群で上昇を認め、FK506、DHNA 群、対照群と比較し有意差が認められた ($p < 0.05$)。FK506、DHNA 群では対照群と比較して有意差は認められなかった。

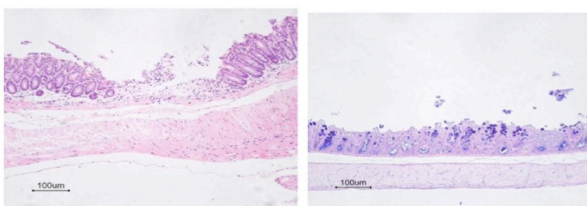
Ca は FK506 群で上昇を認め、FK506、DHNA 群、対照群と比較し有意差を認めた ($p < 0.01$)。FK506、DHNA 群、対照群間に有意差は認めなかった。また、炎症性サイトカインである IL-1 β , IL-6, TNF- α の計測結果は IL-1 β は FK506 群で上昇を認め、FK506、DHNA 群、対照群と比較し有意差が認められた ($p < 0.05$)。

IL-6 は FK506 群で上昇を認め、FK506、DHNA 群、対照群と比較し有意差が認められた ($p < 0.05$)。

TNF- α は FK506 群で上昇を認め、FK506、DHNA 群、対照群と比較し有意差が認められた ($p < 0.05$)。

(7) 大腸組織観察法と結果

H・E 染色により、5 週投与後のマウスの大腸組織を観察した。FK506 群では対照群と比較し大腸組織の粘膜は薄く、吸収上皮層の剥離、表皮の壊死、萎縮が認められた。一方、FK506、DHNA 群では大腸組織の損傷は軽度であった。



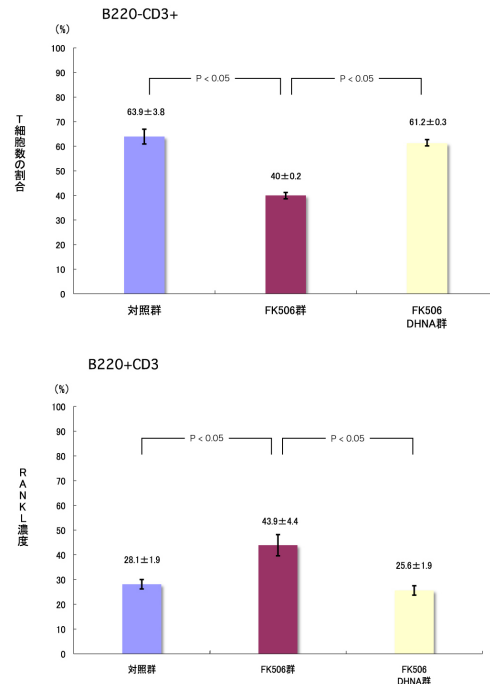
FK506群の大腸粘膜組織の組織像

大腸の粘膜

(8) 腸間膜リンパ節における T 細胞、B 細胞の比率に与える影響

腸間膜リンパ節から抽出したリンパ球の B 細胞、T 細胞の割合において、FK506 群では対照群、FK506、DHNA 群と比較して有意に B 細胞は高い値を示し、逆に T 細胞は低い値を示した ($p < 0.05$)。また B 細胞、T 細胞の割合が FK506、DHNA 群では対照群と差がなかった。

FACSCaliburによる腸間膜リンパ節におけるT細胞、B細胞の占める割合



B220-CD3+はT細胞(左)、B220+CD3-はB細胞(右)を示す。
FK506群は対照群、FK506-DHNA群と比較してB細胞の割合が多く、T細胞の割合が少ない(n=5)

FACS Calibur による腸間膜リンパ節における T・B 細胞

これは減少した T 細胞の機能を同じ免疫細胞の B 細胞が増加し、免疫機能を補ったものと考察した。さらに、DHNA 投与により減少した T 細胞が若干増加し、逆に B 細胞は減少する傾向であった。すなわち、免疫抑制剤により全身的に T、B 細胞が増減し、DHNA により異常になった免疫細胞数を補正していると思われた。

(9) FK506 投与マウスの骨髄内遺伝子発現のマイクロアレイを用いた網羅的解析

最後に FK506 投与マウスの骨髄から、マイクロアレイを用いた網羅的解析を行ない、20371 個の遺伝子について発現解析をした。FK506 投与により

up regulatedあるいはdown regulatedされた遺伝子を検索した結果、対照群と比較し2倍以上の発現差が認められたのは、2487個の遺伝子であった。

(まとめ)

- ① FK506 投与により発症した骨粗鬆症モデルマウスに DHNA を投与すると骨梁の減少が改善され、骨吸収の抑制効果がみられた。
- ② FK506 投与によりマウスの体重は減少するが、DHNA 投与による体重の変化は認められなかった。
- ③ FK506 骨粗鬆症による骨梁減少部位では RANKL 陽性多核細胞(破骨細胞)が増加するが、DHNA 投与により破骨細胞の増加が抑制されていた。
- ④ FK506 による骨梁減少部位には B 細胞が多くみられ、その近傍に RANKL 陽性多核細胞の集積が観察された。
- ⑤ FK506 投与により腸間膜リンパ節から抽出した T 細胞と B 細胞の割合は、FK506 投与により T 細胞は減少し、B 細胞は増加するという免疫状態の変化を認めたが、DHNA 投与により T,B 細胞数の割合が補正された。
- ⑥ FK506 投与によって発生した腎障害、大腸炎等の障害が DHNA 投与により改善された。
- ⑦ FK506 投与により骨吸収作用を有する IL-1, IL-6, TNF- α の炎症性サイトカインの上昇を DHNA は抑制した。
- ⑧ RANKL, M-CSF 添加培養実験において、FK506 による破骨細胞の分化、形成の促進が DHNA 投与により抑制された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Mishima K., Yamada T., Sugii A., Matsumura T., Sugahara T.: Application of a novel method to analyze lip motion to cleft lip patients before and after lip repair. Dentomaxillofacial Radiology, 2009(in press)(査読有)
- ② Hirata. A., Sugahara. T. and Nakamura, H.: Localization of Runx2, osterix and osteopontin in tooth root formation in Rat Molars. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 57: 397-403, 2009 Jan 5 [Epub ahead of print](査読有)
- ③ Ueno T., Honda K, Hirata A., Kagawa T, Kanou M, Shirasu N, Sugahara T.: A histological comparison of bone induced from grafted periosteum with bone induced from grafted bone marrow in the rat calvarial defect model, Acta Histochemica

110(3),217-223 2008(査読有)

- ④ A.Hirata., H.Imura, T.Yamada, T.Ueno., E.Yamachika, N.Moritani, T.Matsumura., T.Kagawa, K.Mishima., T.Sugahara.: Hepkacenn ranase contributes to palate fusion by degradind perlecan. . Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. Vol 36,(1),173 2008(査読有)
- ⑤ MK Frederic, T Yamai, N Mizukawa, Y Kaneda, N Katase, M Gunduz, H Nagatsuka, T.Sugahara.: Expression of human β -defensin -1,-2,and -3 in non-inflamed pseudocyst, mucocoeles. Oral Diseases 14,652-657 2008(査読有)
- ⑥ Fujiwara. K., Yamada,T., Mishima.K., Imura, H., Sugahara.T., Morphological and immunohistochemical study on cleft palate induced by 2,3,7,8 - Tetrachlorodibenzo - p - dioxin in mice Congenital Anomalies 48(2), 68-73 2008(査読有)
- ⑦ Katsuaki Mishima., Tomohiro YAMADA, Asuka SUGII, Hideto IMURA and Toshio SUGAHARA.: Relationships between nasalance scores and nasopharyngeal shapes in cleft palate patients,J Cranio-Maxillofacial Surgery 36(1), 11-14 2008(査読有)
- ⑧ Katsuaki Mishima., Asuka SUGII, Tomohiro YAMADA, Hideto IMURA and Toshio SUGAHARA.: Dialectal and gender differences in nasalance scores in a Japanese population.J Cranio-Maxillofacial Surgery 2008b,36(1), 8-10 2008(査読有)
- ⑨ Ueno. T., Honda, K., Hirata. A., Kagawa, T., Kanou, M., Shirasu, N., Sawaki, M., Yamachika, E., Mizukawa, N. and Sugahara. T.: Histological comparison of bone induced from autogenously grafted periosteum with bone induced from autogenously grafted bone marrow in the rat calvarial defect model., Acta Histochemica 110: 217-223, 2008(査読有)
- ⑩ Yamada,T., Fujiwara. K., Mishima.K., Imura, H., Sugahara.T.: Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the development of the murine palate in organ culture, Asian J Oral Maxillofac Surg 19(4),192-196 2007(査読有)
- ⑪ Ueno. T., Sakata, Y., Hirata. A., Kagawa, T., Kanou, M., Shirasu, N., Sawaki, M., Fukunaga, J., Mizukawa, N. and Sugahara. T.: The evaluation of bone formation of the whole tissue periosteum transplantation in combination with beta-tricalcium phosphate (TCP). Annals of Plastic Surgery 59: 707-712, 2007(査読有)
- ⑫ Ueno. T., Kagawa, T., Kanou, M., Shirasu, N., Sawaki, M., Imura, H., Hirata. A., Yamachika, E., Mizukawa, N. and Sugahara. T.: Evaluation of Osteogenic Potential of Cultured Periosteum Derived Cells-Preliminary Animal Study-. Journal of Hard Tissue Biology 16: 50-53, 2007(査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① ヘパラナーゼは基底膜パールカンより bFGF を遊離することで口蓋突起癒合に関与する

平田あずみ、井村英人、山田朋弘、植野高章、山近英樹、森谷徳文、松村達志、香川智正、三島克章、菅原利夫、第53回 日本口腔外科学会総会、平成20年 10月20 - 21日 徳島市

- ② Dental Implant treatment for the patients with Cleft Lip and Palate.
K.Minami, H.Imura, T.Niimi, H.Furukawa, K.Fujiwara, Y.Mori, T.Sugahara, N.Natsume: 8th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery 2008. November 3rd-7th, 2008. Thailand
- ③ TCDD exposed fused palates had various phenomena.
H.Imura, T.Yamada, A.Hirata, K.Mishima, K.Minami, H.Furukawa, T., Niimi, K.Fujiwara, N.Natsume, T.Sugahara, 8th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery 2008. November 3rd-7th, 2008. Thailand
- ④ Heparanase contributes to palate fusion by degrading perlecan.
A.Hirata, H.Imura, T.Yamada, T.Ueno, E.Yamachika, N.Moritani, T.Matsumura, T.Kagawa, K.Mishima, T.Sugahara, 19th Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, September 9th-12th 2008, Bologna, Italy
- ⑤ Osteogenic potential of grafted periosteum and bone marrow.
T.Ueno, A.Hirata, T.Kagawa, M.Wakita, M.Kanou, N.Shirasu, M.Sawaki, M.Moritani, Y.Yamachika, M.Mizukawa, T.Sugahara, 19th Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, September 9th-12th 2008, Bologna, Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 利夫 (SUGAHARA TOSHIO)
愛知学院大学・歯学部・客員教授
研究者番号：10116048

(2) 研究分担者

三島 克章 (MISHIMA KATSUAKI)
岡山大学病院・口腔外科・講師
研究者番号：60304317

植野 高章 (UENO TAKAAKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60335619

平田 あずみ (HIRATA AZUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40263587

松村 達志 (MATSUMURA TATSUSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70432648

南 克浩 (MINAMI KATSUHIRO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70346162

藤原 久美子 (FUJIWARA KUMIKO)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号：60404737