

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593139

研究課題名(和文) 歯周病、特に破骨細胞の機能に及ぼす高脂血症の影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the influence of hyperlipidemia to give to a function of osteoclast caused by the periodontal disease

研究代表者

大城 希美子 (Ohgi, Kimiko)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：50610979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織の広範囲な炎症や歯周病原菌と全身疾患との関連性が注目されている。そこで、破骨細胞が脂質異常により受ける影響を検討した。

高脂血症治療薬・スタチンによって破骨細胞の酸分泌にかかわるイオン輸送が抑制されたことから、スタチンが酸分泌を抑制する可能性があることが明らかとなった。破骨細胞前駆細胞に対し歯周病原細菌の受容体、TLR2及びTLR4のリガンドと、脂質異常症の原因物質、酸化LDLとで刺激すると破骨細胞数が増加したことより、TLRsと酸化LDLとが相互に作用するシグナルの存在の可能性が示された。ともに生活習慣病である脂質異常症と歯周病との合併により破骨細胞の分化が亢進する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease caused by bacterial infection is usually associated with metabolic disease contained with dyslipidemia. It was an aim to clarify what kind of influence osteoclast came under by dyslipidemia.

Both hypolipidemic agent, statin and drug for treatment of osteoporosis, nitrogen-containing bisphosphonates suppressed acid activated Cl⁻ currents using whole cell patch clamp on osteoclasts, meaning inhibition of extruding H⁺ and Cl⁻ on resorbing bone. Number of osteoclasts was increased by stimulation with the ligands of TLR2 or TLR4 which are receptors of periodontal pathogens, and oxLDL which is receptor caused to dyslipidemia. The result suggested the possibility that bone resorption may be progressing when periodontitis and dyslipidemia are complication.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：破骨細胞 歯周炎 脂質異常症

1. 研究開始当初の背景

歯周病の病態が明らかになるにつれ、全身疾患との関連性が注目され、疫学的にも報告 (Yamashita et al., 2007; Maeno et al., 2010) されるようになった。メタボリックシンドローム等を増悪させる (Shimazaki et al., 2007) ことから、歯周病は単なる口腔慢性感染症ではなく、全身疾患として捉えるべきだという考えが広まりつつある。歯周病がこれらメタボリックシンドロームを増悪させる経路としては、歯周病原性細菌が血中に侵入 (Kinane et al., 2005) 歯周病により惹起された炎症性サイトカインによる影響 (Saito et al., 2004)、が考えられ、そのメカニズムも解明されつつある。

最近、歯周病と高脂血症が合併すると動脈硬化を増悪させる、という *in vivo* の報告 (Maekawa et al., 2011) がなされ、注目を浴びている。酸化 LDL の曝露があると、T リンパ球による破骨細胞分化誘導因子・RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) 産生が上昇する (Graham et al., 2009)。一方では、酸化 LDL が RANKL signaling を阻害するという報告もある (Mazière et al., 2009)。また *in vitro* での破骨細胞形成は、酸化 LDL 存在下では促進 (Tintut et al., 2002) され、コレステロール除去条件下では抑制 (増原 et al., 2008) されるように、破骨細胞の分化は細胞外コレステロールに依存する (岡安 et al., 2011) ことが明らかになった。このように、高脂血症による歯周病への影響が注目されつつあるが、その機序には依然として不明な点もある。

2. 研究の目的

骨リモデリングは骨芽細胞と破骨細胞の活性のバランスにより恒常性を保っているが、骨破壊性疾患の原因は、主に破骨細胞の骨吸収亢進によって起こっている。現在、歯周再生療法や破骨細胞の活性化因子については多くの報告がなされているが、破骨細胞の酸分泌機構に関する情報は非常に少ない。そこで、破骨細胞のイオン輸送がコレステロールの直接的な曝露によってどのように変化するかを動的に捉え、細胞内シグナルへの関わりを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

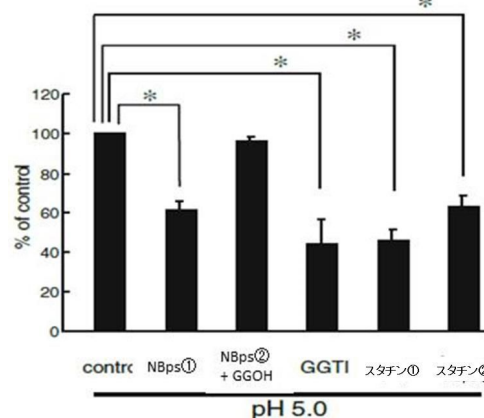
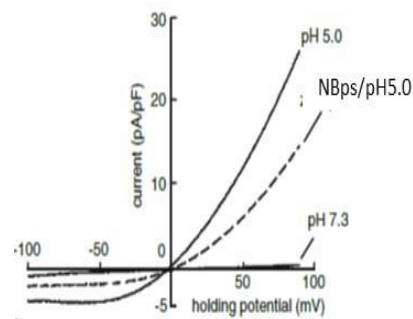
(1) 破骨細胞は、Raw264.7 細胞、マウス骨髄細胞および脾臓より分化誘導した。

(2) 骨吸収時における HCl 分泌能の指標として、イオン輸送の変化をホールセルパッチクランプ法を用いて検討した。遺伝子発現や破骨細胞の分化などは、western blot 法、RT-PCR 法、real-time PCR 法、免疫染色法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 我々は、破骨細胞は細胞外液の酸性化

により Cl⁻ 輸送 (酸活性化 Cl⁻ 輸送) が増加することをホールセルパッチクランプ法を用いて既に確認している。これは、破骨細胞の骨吸収に関与するイオン輸送を示している。脂質異常症治療薬であるスタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害する。骨粗鬆症治療薬である窒素含有ビスフォスフォネート (NBps) も HMG-CoA 還元酵素の下流に位置するファルネシル二リン酸合成酵素 (Fdps) を阻害する。そこで、今回、細胞外液に NBps を添加すると、酸活性化 Cl⁻ 輸送が抑制することを明らかとした。しかし、阻害部位の異なる非 NBps を添加しても酸活性化 Cl⁻ 輸送は抑制されなかった。スタチンを細胞外液に添加することで、NBps 同様に酸活性化 Cl⁻ 輸送が抑制された。また、Fdps の下流にあるグラニルグラニル酸 (GGOH) と NBps とを共に細胞外液に添加すると、NBps による酸活性化 Cl⁻ 輸送の抑制が阻害された。更に、Fdps の下流部位を抑制するグラニルグラニル化阻害剤 (GGTI) を添加しても酸活性化 Cl⁻ 輸送は抑制された。

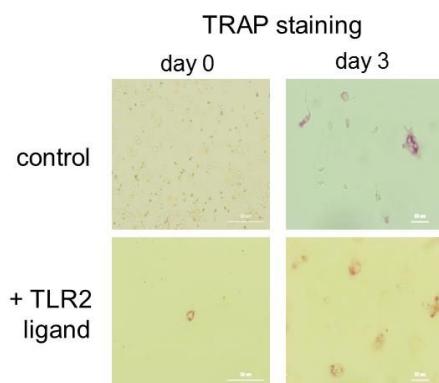


以上により、脂質異常症治療薬も NBp 同様に、破骨細胞の酸分泌を抑制することにより、骨吸収を抑制することが明らかとなった。

(2) 歯周病原性細菌の破骨細胞における受容体は Toll like receptor (TLR)2 や TLR4 である。そこで、TLR 刺激と脂質異常症の原因物質である酸化 LDL との関わりを検討した。骨髄細胞を macrophage colony stimulating

factor (M-CSF)で破骨前駆細胞に誘導する際に TLR2 や TLR4 のリガンドを添加し、その後、receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)にて成熟破骨細胞まで誘導しても破骨細胞数に影響はなかった。しかし、RANKL 刺激時に酸化 LDL を添加すると、破骨細胞数が増加した。

以上により、歯周病原細菌が血管に侵入し、更に血管内に脂質異常が起きている場合には、破骨細胞の分化が進み、歯槽骨の吸収が進行する可能性が示唆された。



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)

堤 貴司、福島秀文、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、岡部幸司、歯根膜を介する歯槽骨の吸収調節機構、The Nippon Dental Review、Vol.860、2014、pp.147-149

<http://www.hyoron.co.jp/book/b182985.html>

岡部幸司、大城希美子、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、福島秀文、破骨細胞や破歯細胞が硬組織を吸収する酸分泌の仕組み、The Nippon Dental Review、Vol.859、2014、pp.145-147

<http://www.hyoron.co.jp/book/b182986.html>

福島秀文、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、高田圭介、岡部幸司、破歯細胞と歯牙交換機構、The Nippon Dental Review、Vol.858、2014、pp.149-151

<http://www.hyoron.co.jp/book/b182987.html>

Ohgi K, Kajiya H, Okamoto F, Nagaoka Y, Onitsuka T, Nagai A, Sakagami R, Okabe K, A novel inhibitory mechanism of nitrogen-containing bisphosphonate on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts、Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 査読有、Vol.386、2013、pp.589-98

doi: 10.1007/s00210-013-0857-0

Okabe K, Okamoto F, Kajiya H, Odontoclasts and calcitonin、Clin Calcium、査読有、Vol.22、2012、pp.19-26、doi: CliCa12011926

[学会発表](計8件)

大城希美子、永井淳、森南奈、村上弘、坂上竜資、脂質異常による破骨細胞への影響、日本歯周病学会、2014年10月19日、神戸国際展示場(神戸市)

長岡 良礼、鍛冶屋 浩、佐々木 三奈、永沼 香織、永嶌 勝之、岡本 富士雄、福島 秀文、岡部 幸司、ビスホスホネート製剤による破骨細胞の形成阻害のプレニル化合物による回復作用、歯科基礎医学会、2014年9月25~27日、福岡国際会議場(福岡市)

佐々木三奈、鍛冶屋浩、永嶌勝之、長岡良礼、永沼香織、大城希美子、岡本富士雄、福島秀文、岡部幸司、ヒト正常角化細胞における活性酸素種はp16プロモーター領域のメチル化を介して細胞老化を誘導する、歯科基礎医学会、2014年9月25~27日、福岡国際会議場(福岡市)

長岡 良礼、鍛冶屋 浩、岡本 富士雄、福島 秀文、岡部 幸司、窒素含有ビスホスホネート製剤(NBP)による破骨細胞の融合阻害を介する分化阻害作用、日本骨代謝学会、2014年7月24日~26日、大阪国際会議場(大阪市)

森南奈、永井淳、大城希美子、鬼塚得也、福島忠雄、坂上竜資、異なる分子量を用いた DNA/プロタミン複合体の基礎的性質、日本歯周病学会、2014年5月23~24日、長良川国際会議場(岐阜市)

鍛冶屋浩、大城希美子、岡本富士雄、岡部幸司、ファーネシル合成酵素による破骨細胞 Cl⁻輸送体調節、日本生理学会、2014年3月16~18日、鹿児島大学(鹿児島市)

永井淳、大城希美子、佐野しおり、丸尾直樹、廣松亮、村上弘、福田章、笹本実、鬼塚得也、坂上竜資、慢性歯周炎患者と健常ヒト歯肉溝の歯肉縁下プラーク細菌群集構造の比較、日本歯周病学会、2013年5月30日~6月1日、タワーホール船堀(東京都)

大城希美子、岡部幸司、佐野しおり、森南奈、村上弘、廣松亮、丸尾直樹、笹本実、加治木聡、古賀めぐみ、鬼塚得也、永井淳、坂上竜資、窒素含有ビスホスフォネート(NBPs)は破骨細胞の骨吸収形態だけでなく、酸分泌も抑制する、九州五大学研修会、2012年10月28日、アクロス福岡(福岡市)

[その他]
ホームページ等

<http://www.fdcnet.ac.jp/col/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大城希美子 (Ohgi, Kimiko)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50610979

(2)研究分担者

坂上竜資 (Sakagami, Ryuji)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50215612

岡部幸司 (Okabe, Koji)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：8022404

永井淳 (Nagai, Atsushi)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70252989

(辞退：平成 26 年 9 月 17 日)