

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593171

研究課題名(和文)口臭物質の歯槽骨吸収機序の解明：歯周炎幹細胞モデルによる分子標的予防法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of the alveolar bone absorption mechanism by the oral malodorous compounds .

研究代表者

今井 敏夫 (IMAI, TOSHIO)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：90120617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は骨髄幹細胞の分化機構に対する硫化水素の作用解明を目的とした。骨髄幹細胞は、幹細胞分離装置を用いてマウスの大腿骨から単離した。さらに幹細胞から CD114 (+) 陽性細胞 (BMC-CD117 (+)) を磁気分離システムで単離した。BMC-CD117 (+) には NFAT1 とアグリカンネオエピトープが認められた。BMC-CD117 (+) を硫化水素存在下で培養したところ、破骨細胞の分化マーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性の多核細胞の出現が認められた。硫化水素は骨髄幹細胞からの破骨細胞の分化を誘導したことから、口臭物質である硫化水素は歯槽骨吸収の危険因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to elucidate the effect of hydrogen sulfide on the differentiation mechanism of bone marrow stem cells. Bone marrow stem cells were isolated from mouse femur using stem cell separation device. CD114 (+) positive cells (BMC-CD117 (+)) were isolated from the stem cells using a Magnetic separation system. NFAT1 and Aggrecan Neopeptide were present in the BMC-CD117 (+). BMC-CD117 (+) were cultured for 3 days with hydrogen sulfide. Multinucleated cells of tartrate-resistant acid phosphatase-positive that is a differentiation marker of osteoclast were significantly observed. Hydrogen sulfide was induced differentiation of osteoclasts from bone marrow stem cells, suggesting that it is a risk factor for alveolar bone resorption.

研究分野：衛生学

キーワード：マウス骨髄幹細胞 破骨細胞 骨芽細胞 硫化水素 口臭

## 1. 研究開始当初の背景

慢性の歯周炎は軟組織の炎症のみならず歯槽骨吸収が特徴的病態である。しかし歯槽骨吸収に関する分子レベルでの研究は軟組織に比べ遥かに少ない。歯周炎発生には口腔内細菌の LPS が深く関わっていることは知られている。さらに口腔細菌が産生する口臭原因物質(揮発性硫黄化合物:硫化水素、メチルメルカプタン)はLPSと同様の pathways にて歯周病原性を発揮する。その上、生理的濃度で作用し濃度制御も容易である。かつ LPS 実験とは異なり一定濃度で数週間以上、硫化水素などを供給し続け in vivo 実験に近い条件設定が可能な in vitro 歯周病研究モデルともなる。我々は、歯周ポケット内濃度より低い揮発性硫黄化合物が、歯肉線維芽細胞のコラーゲン合成の阻害や分解、genomic レベルの DNA 損傷そしてアポトーシスを惹起すると報告した(Yaegaki K, Jpn Dent Sci Rev, 44, 100-108, 2008、Yaegaki K, et al. J Periodontal Res 81, 1317-1323, 2010)。また歯肉上皮細胞、ケラチノサイト幹細胞にもアポトーシスや genomic DNA 損傷を惹起すると報告した(Calenic B, et al. J Periodontal Res 45:31-37, 2010, J Periodont, 81, 1317-1323, 2010)。また最近、上皮幹細胞では上皮細胞の2倍以上の頻度でアポトーシスが惹起されることを発見した(J Periodontal Res, 2010. Clin Oral Invest, 2010.)。以上の結果は、硫化水素が歯肉内縁上皮バリアーに機能障害をもたらす歯周病の原因となることを強く示唆している。一方、硫化水素は歯肉粘膜透過性が極めて高く、歯槽骨への直接的影響が指摘されている(Ng and Tonzetich, J Dent Res. 63:994-997, 1984.)。そこで研究代表者は硫化水素の歯槽骨吸収過程に及ぼす影響について検討した(平成17-18年科学研究補助金基盤研究(C))。その結果、硫化水素が骨芽細胞の増殖を阻害し、そのシグナルは MAPKs

を介して行なわれていることを明らかにした(2007年・2009年 IADR 発表、J Periodontol, 2009)。さらに硫化水素は骨芽細胞(MC3T3-E1)の p53、ミトコンドリア経路、caspase-8 を活性化してアポトーシスを誘導することも明らかにした(J Breath Res. 2012 ;6:017104.)。以上より、生理的口臭の原因物質・硫化水素は歯槽骨吸収の要因になること考えた。次に研究代表者らは、低濃度硫化水素による破骨細胞(RAW264)の分化機能への影響を検索したところ、生理的口臭レベルの硫化水素が、破骨細胞の骨吸収能を顕著に促進することを発見した。さらに、この骨吸収における細胞内シグナル伝達には MAPK ファミリーのうち ERK1/2 および p38 が関与していることを見いだした(J Periodontol, 81, 2010.)。次に硫化水素に細胞内シグナル伝達機構を詳細に検討するため MAPK ファミリー上流域の PKC について検索したところ、硫化水素により PKC のリン酸化が誘導することを見出した。これらの結果は硫化水素が破骨細胞を活性化していることを強く示唆する。(21-23年科学研究補助金 基盤研究(C))

## 2. 研究の目的

硫化水素は直接的に破骨細胞の分化機能を誘導することが示唆された。一般的に破骨細胞への分化には、M-CSF、RANKL などの破骨細胞分化因子が必須である。ところが、硫化水素は、破骨細胞これら分化因子を必要としない。今まで歯周病原菌代謝産物が直接、破骨細胞分化因子として作用するとの報告は他に無い。さらに生理的口臭程度の濃度で発生することから、歯周炎初期の骨吸収に関与するとも考えられる。前述のごとく、これまでの我々の研究は口臭原因物質(硫化水素)の作用を、各前駆細胞以降での分化と機能についてエビデンスを蓄積してきた。一般に骨形成あるいは修復時には骨髄から2種の幹細胞が供給される。すなわち骨髄幹細胞から

骨芽前駆細胞、破骨前駆細胞へと分化が進み、それぞれ造骨あるいは破骨の機能を発揮する。しかし両幹細胞から骨芽前駆細胞あるいは破骨前駆細胞への分化初期過程における、口臭原因物質（硫化水素）の影響について分子機序はいまだ不明である。本研究では、特に幹細胞からの骨細胞への分化初期に対する分子基盤を解明することを主目的とする。すなわち、骨髄細胞から幹細胞を分離し破骨細胞への分化初期における硫化水素の作用機序を分化マーカーの発現とその遺伝子の発現について検討した。

### 3. 研究の方法

(1)骨髄幹細胞の分離。6 - 10 週齢マウス (Jcl-ICR) をネブタール腹腔内投与後、頸椎脱臼を施し、大腿骨を採取する。骨の両端を切断し、骨髄を洗い出す。この細胞溶液を PBS(-)で3回遠心洗浄をおこない、さらに Pre-Separation filters(MACS)を通し、細胞塊を除去した。細胞溶液を間葉系幹細胞分離デバイス (kaneka) を用いて間葉系幹細胞溶液および血球系幹細胞溶液として分離回収した。血液系幹細胞溶液を 10%FCS 含有-MEM にて dish に播種し 12 時間培養した。非付着細胞を洗浄除去後、新鮮培地に交換しさらに培養を続けた。2-4 代継代培養を繰り返した。この細胞を CD117 Micro Beads mouse (MACS) と混和し細胞溶液中の CD117 陽性細胞と Micro Beads を反応させた。次に混和細胞溶液を MACS Separator(MACS) に固定したカラムを通した。CD117 陽性細胞はカラムに保持される。洗浄後、磁場を外して細胞を回収した。これを CD117(+) 幹細胞 (BMC-CD117(+)) として実験に共した。

#### (2)分化マーカーの検出

破骨細胞の分化マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ活性 (TRAcP) は TRACP&ALP double-stain kit (TAKARA) を用いて染色後、TRACP 陽性細胞を計測した。さらに幹細胞のマーカーとして Acan (Agc1)、破骨細胞の分化マーカーとして NFAT1 を蛍

光抗体免疫染色後蛍光顕微鏡にてその局在を観察した。NFAT1 については Western blot 法にて発現量を比較した。

(3)RT-PCR。細胞からのRNA抽出は RNeasy Micro Kit(QIAGEN)を用いた。c- DNAの合成は SuperScript 3 First-Strand Synthesis Systems for RT-PCR(Invitogen)を用いた。遺伝子発現レベルはSYBR Green qPCR Master Mix を用いた。TRAPのプライマーは Forward CTTGCGACCATTGTTAGC、Reverse GAGTCCTCAG ATCCATAGTGを用い、カテプシンKのプライマーは Forward : AATTGTGACCGTGATAA TGTG、Reverse GCAGGCGTTGTTCTTATTC を用いた。

(4)細胞への硫化水素処理。細胞は硫化水素処理チャンバー内に静置し、八重垣らの方法に準じ、チャンバー内に 5%CO<sub>2</sub>含有硫化水素ガスを挿入して 37 環境下で培養した。

### 4. 研究成果

#### (1)骨髄幹細胞の分離

骨髄細胞から CD117 抗体による Magnetic separation 法にて BMC-CD117(+)の分離能を検討するため、分離法後の BMC-CD117(+), BMC-CD117(-)両細胞の CD117 の表面局在を蛍光免疫染色にて調べた。その結果 BMC-CD117(+)は BMC-CD117(-)に比べ、強い蛍光像が認められた (図 1)。このことは Magnetic separation 法によって得られた細胞は細胞表面上の CD117 リッチな細胞集団であることを示している。

#### (2) BMC-CD117(+)の特性について

BMC-CD117(+)が幹細胞の特性と破骨細胞の特性を保持しているかを検討した。幹細胞のマーカーである Aggrecan Neopeptide(Novus biological)および破骨細胞のマーカーである NFAT1(Cell signaling)の1次抗体で免疫染色を施し、BMC-CD117(-)と比較検討した。BMC-CD117(+)は細胞質内に Aggrecan Neopeptide の強い蛍光像が認められたが、BMC-CD117(-)にはその蛍光像は極めて少な

いものであった。

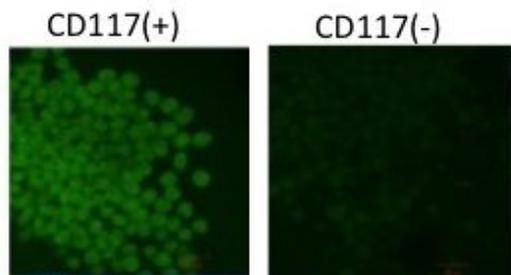


図1. Magnetic separation後の CD117抗体の蛍光免疫染色像

また NFAT1 でも BMC-CD117(+)の蛍光像は BMC-CD117(-)に比べて強い蛍光像が認められた(図2)。これらの結果は BMC-CD117(+)が幹細胞の特性と破骨細胞の特性とを保持していると考えられた。

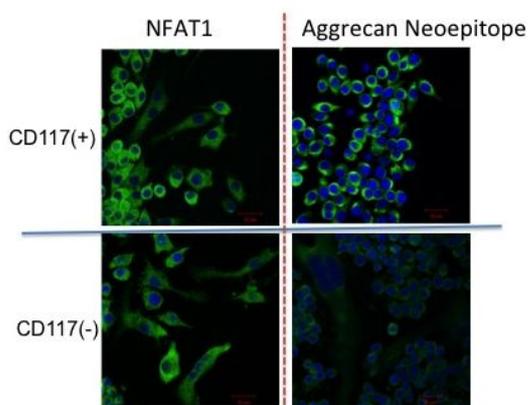


図2. BMCの NFAT1とAggrecan Neoepitopeの蛍光免疫染色像

### (3) 硫化水素が誘導する分化について

硫化水素処理3日後の TRAcP 多核細胞を計測した(図3)。BMC-CD117(+)では、硫化水素処理によって TRAcP 陽性細胞数は、非処理群に比べて 2.5 倍もの高値を示した。一方、BMC-CD117(-)の硫化水素処理では、非硫化水素処理群に比べ、TRAcP 多核細胞は多いものの、BMC-CD117(+)の硫化水素処理群のわずか 30%程度にとどまっていた。さらに TRAcP の形態変化を観察すると、BMC-CD117(+)の硫化水素処理群における TRAcP 陽性の多核細胞は 1細胞あたりの大きさが、他の細胞群に比べ、極めて大きな形態を示した(図4)。

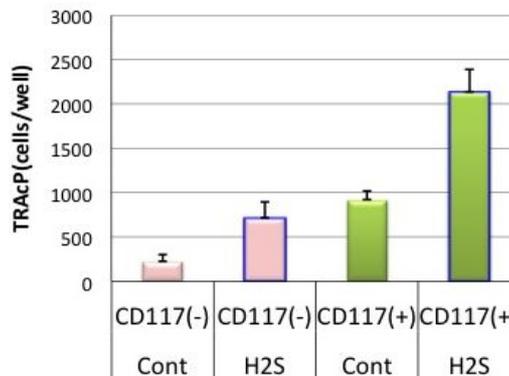


図3. 硫化水素が誘導する TRAcP細胞数

これらの結果は硫化水素は BMC-CD117(+)の破骨細胞への分化を誘導していること、さらにその誘導には細胞表面の CD117 が関与していることを強く示唆している。

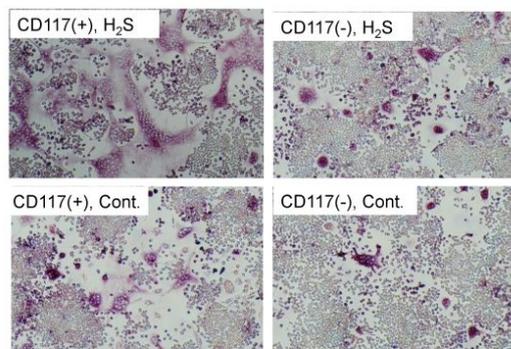


図4. BMC-CD117(+), BMC-CD117(-)の硫化水素処理後の TRAcP染色像

### (4) 硫化水素によるシグナル伝達経路

硫化水素による BMC-CD117(+)の破骨細胞への分化誘導のシグナル分子として NFAT1 の発現レベルを Western blot 比較した。BMC-CD117(+)を硫化水素処理した NFAT1 の発現量は非処理群に比べ明らかに高かった(図5)。このことは硫化水素による分化誘導には細胞内シグナル分子 NFAT1 が関連していることを示唆している。次にこれらの分化事象を遺伝子発現レベルで検討した。すなわち、TRAcP およびカテプシン K の m-RNA の発現を RT-PCR 法で比較した。硫化水素(ドナーとして NaHS)を3時間まで処理したが、BMC-CD117(+)細胞では処理群と非処理群との間で顕著な差異は認められなかった。

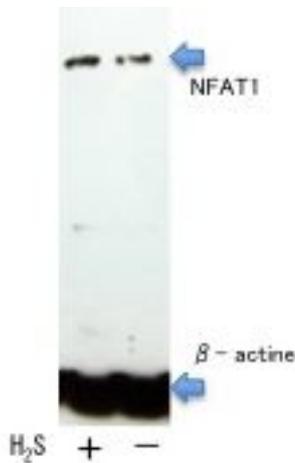


図5. H<sub>2</sub>Sが誘導するBMC-CD117(+)  
のNFAT1

< 引用文献 >

Yaegaki K, Qian W, Murata T, et al.  
Oral malodorous compound causes  
apoptosis and genomic DNA damage  
in human gingival fibroblasts. *J  
Periodont Res.* 2008;43:391-9.

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

今井 敏夫, 伊井 久貴, 岡田 実緒,  
那須 優則, 八重垣 健: 揮発性硫黄化  
合物による骨髄間葉系幹細胞の破骨  
細胞への分化誘導, 口腔衛生学会雑誌,  
64:197, 2014.

今井敏夫, 那須優則, 八重垣 健: 硫  
化水素は骨髄幹細胞から破骨細胞を  
分化誘導する, *J Oral Biosci*, 56  
(Supple): 188, 2014.

〔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:  
出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井敏夫 (IMAI TOSHIO)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号: 90120617

(2) 研究分担者

八重垣 健 (YAEGAKI KEN)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号: 401664688

鴨田 剛司 (KAMODA TAKESHI)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師  
研究者番号: 00366767

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: