

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462854

研究課題名(和文) F-spondinによる歯槽骨吸収抑制に関する検討

研究課題名(英文) Effect of F-spondin on the inhibition of alveolar bone resorption

研究代表者

北川 雅恵 (Kitagawa, Masae)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：10403627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞と同様に硬組織を形成するセメント芽細胞では、F-spondinは石灰化形成促進だけでなく、LPS刺激に対するIL-6発現やPGE2の産生を抑制し、破骨細胞分化を抑制する。本研究では、骨芽細胞に対するF-spondinの抗炎症作用および歯槽骨吸収抑制について検討した。F-spondinは、骨芽細胞においてもIL-6発現を抑制することがin vitroの検討で示された。In vivoにおいてF-spondin過剰発現トランスジェニックマウスでは炎症による歯周骨吸収を抑制したが、F-spondinペプチド単独で歯周炎を制御することは難しかった。

研究成果の概要(英文)：In cementblast forming hard tissue as osteoblast, F-spondin not only promotes calcification but also inhibits IL-6 expression and PGE2 production stimulated by LPS, and it suppresses osteoclast differentiation. In this study, we examined effects of F-spondin on the anti-inflammatory reaction to osteoblast and the inhibition of alveolar bone resorption. In osteoblasts, F-spondin suppressed IL-6 expression in vitro study. In vivo study, the alveolar bone resorption caused by inflammation was suppressed in the F-spondin overexpressing transgenic mice, but it was difficult to control the periodontitis by use of F-spondin peptide in vivo study.

研究分野：口腔病理学

キーワード：F-spondin 骨芽細胞 IL-6 抗炎症作用

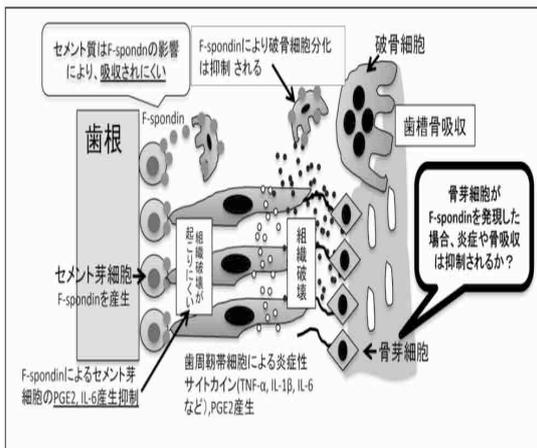
1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでの研究で、歯周組織を構成する細胞のうちセメント芽細胞に着目し、その特性を明らかにすることを目的として、ヒトセメント芽細胞株を樹立し(Kitagawa et al., Bone, 2006)、セメント芽細胞特異的遺伝子として F-spondin を同定した (Kitagawa et al., BBRC, 2006)。さらに、F-spondin はセメント芽細胞の分化を BMP7 の発現を介して制御することを報告した (Kitagawa et al., BBRC, 2012)。

ヒトセメント芽細胞に歯周病原細菌の *aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a) 由来 lipopolisaccharide (LPS) を作用させたところ、F-spondin の発現が増加し、炎症性サイトカインのうち IL-6 の発現が低下した。逆に、siRNA により F-spondin の発現をノックダウンさせると IL-6 の発現は増加した。また、同一個体由来の歯周靭帯細胞に F-spondin を過剰発現させると、A.a-LPS 刺激、非刺激ともに IL-6 の発現抑制が認められた。さらに、F-spondin 過剰発現株の培養上清中のプロスタグランジン E2(PGE2)の産生が抑制された。歯周炎において、PGE2 には血管透過性亢進、発熱、疼痛、免疫抑制作用、IL-1 やコラゲナーゼ産生の調節、骨吸収作用などの生理作用が分かっており、実験的にもプロスタグランジン阻害薬を用いると歯肉の炎症状態や歯槽骨の吸収量が少ないことが報告されている (J. Clin. Periodontol.1983)。IL-6 は B 細胞の分化や破骨細胞形成、PGE2 の生成による骨吸収促進に関わっており、PGE2 により IL-6 の発現が誘導されるという報告もある (Am. J. Physiol. 2010)。

骨の吸収に直接関わる細胞として破骨細胞に関しては、既に、連携研究者である岡により F-spondin が破骨細胞の分化を抑制することを報告している (Oka H. et al., J Periodontal, 2010)。

従って、F-spondin が骨芽細胞で発現あるいは周囲に存在することにより、炎症による歯周組織破壊や骨吸収を抑制することができるのではないかと考えるに至った。



2. 研究の目的

セメント芽細胞は、骨芽細胞と同様に硬組織形成能や遺伝子およびタンパク質発現において類似した特徴をする。セメント芽細胞では F-spondin は、石灰化形成促進だけでなく、LPS 刺激に対する IL-6 発現や PGE2 の産生を抑制し、破骨細胞分化を抑制することが示された。そこで、本研究では F-spondin の機能に注目して、骨芽細胞に F-spondin を発現させることにより歯槽骨吸収を抑制できるか、さらに、臨床への応用を考慮して F-spondin ペプチドを用いて炎症および歯槽骨吸収が抑制できるかを in vitro および in vivo において検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) F-spondin 過剰発現による検討

①In vitro での検討：骨芽細胞の F-spondin 過剰発現株を作製し、歯周病原細菌由来 LPS を用いて、破骨細胞誘導因子や炎症性サイトカインの発現を検討する。

②In vivo での検討：F-spondin のトランスジェニックマウスを用いて、根尖性歯周炎を作製し、歯槽骨吸収や炎症の程度を比較する。

(2) F-spondin ペプチドを用いた検討

①In vitro での検討：骨芽細胞に F-spondin ペプチドを添加し、歯周病原細菌由来 LPS を用いて、破骨細胞誘導因子や炎症性サイトカインの発現に対する影響を検討する。

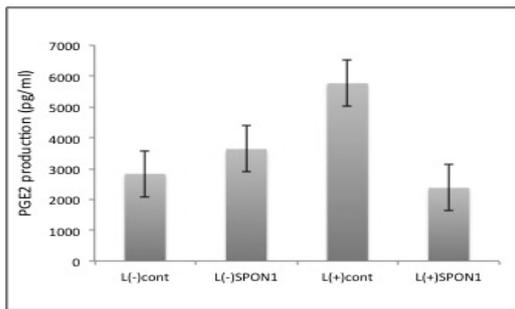
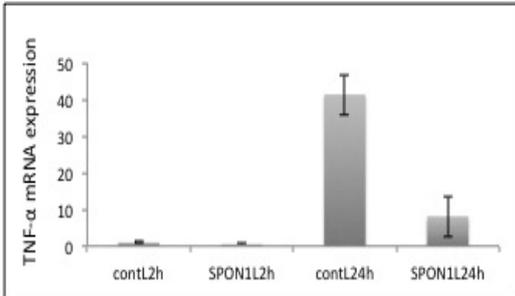
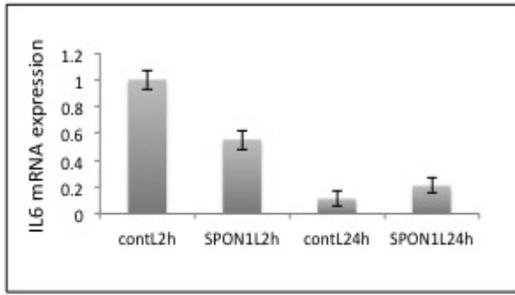
②In vivo での検討：マウスに作製した根尖性歯周炎に対して F-spondin ペプチドを添加し、歯槽骨吸収や炎症の程度を比較する。

4. 研究成果

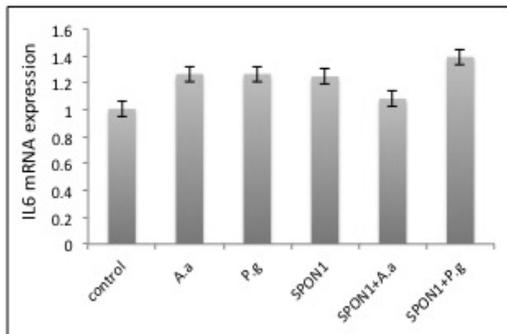
(1) F-spondin 過剰発現による検討

①In vitro での検討

F-spondin 過剰発現骨芽細胞株を作製し、検討を行なった。F-spondin 発現ベクターを骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞および ST2 細胞に transfection し、形態、増殖、分化について検討を行なったところ、F-spondin 過剰発現株では親株と比較して細胞形態や増殖能に有意な差はなかった。分化についてはアルカリフォスファターゼの mRNA 発現の増加がみられたが、その他の石灰化関連のマーカータでは変化がみられなかった。次に、歯周病原細菌 (*A. a* および *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*)) の LPS を用いて炎症性サイトカインの発現や PGE2 の産生を検討した。MC3T3-E1 細胞では、F-spondin 過剰発現株において LPS 刺激後 2 時間で IL-6 mRNA 発現の低下や刺激後 24 時間で TNF- $\alpha$  の低下が認められた。また、刺激後 24 時間で培養上清中への PGE2 の産生低下もみられた。



ST2 細胞においては、IL-6 の発現抑制は軽度みられたが、TNF- $\alpha$  および PGE2 に有意な変化は認められなかった。

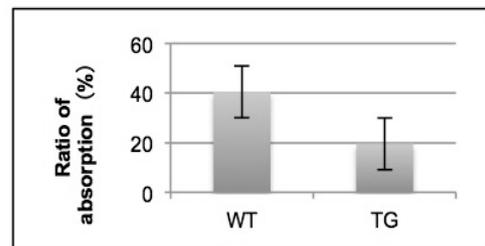
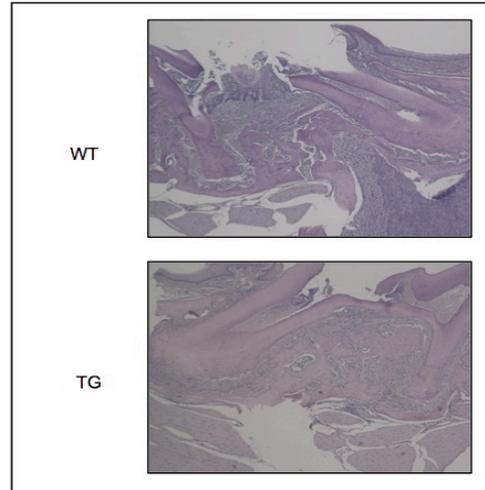


以上より、IL-6 の発現抑制は2つの骨芽細胞株で同様に生じ、セメント芽細胞の反応と一致していたが、細胞により抑制の程度が異なっていた。その他の炎症性サイトカインの mRNA 発現や PGE2 発現については2つの細胞で反応が一致しておらず、細胞の種類による影響と考えた。

## ② In vivo での検討

F-spondin トランスジェニックマウスを用いて根尖性歯周炎を作製し、in vivo において、LPS の刺激に対する影響を検討したところ、F-spondin 過剰発現マウスでは、好中球数の減少や歯槽骨吸収の抑制、成熟破骨細胞の減少が認められた。

以上より、F-spondin 過剰発現によりセメント芽細胞だけでなく骨芽細胞においても抗炎症効果を示し、骨吸収を抑制する可能性が明らかとなった。

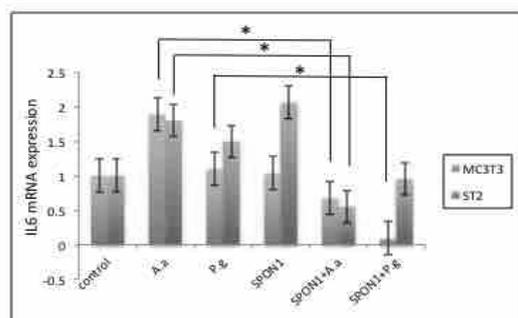


よって、F-spondin は IL-6 発現を抑制し、炎症を介した歯周組織破壊を抑制する可能性が示されたことから、次に、F-spondin ペプチドを用いてその歯周組織破壊抑制効果について検討した。

## (2) F-spondin ペプチドを用いた検討

### ① In vitro での検討

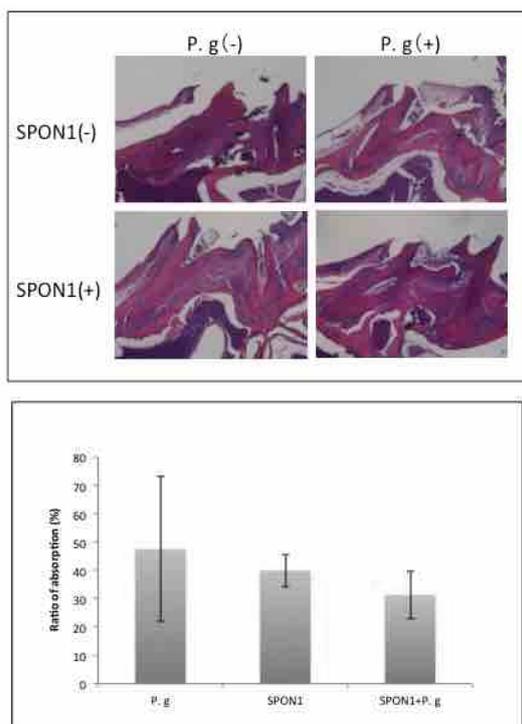
F-spondin 合成ペプチドを R&D より購入し、骨芽細胞に対する抗炎症作用について検討を行った。IL-6 mRNA については F-spondin ペプチドの  $1 \mu\text{g/ml}$  の濃度では、単独でも発現が増加し、A.a および P.g の LPS によりさらに反応が増強された。そこで、濃度を再検討したところ、 $100 \text{ ng/ml}$  で F-spondin ペプチドは単独でも軽度に IL-6 の発現を増加させるが、LPS 刺激による IL-6 の発現をコントロールと同程度まで有意に抑制することが明らかとなった。



F-spondin ペプチドでは、F-spondin 過剰発現時にみられた TNF- $\alpha$  mRNA の変化は骨芽細胞株である MC3T3E-1 細胞および ST-2 細胞でいずれも認められなかった。また、IL1- $\beta$  や PGE2 についてもペプチドでは炎症抑制は認められなかった。

## ②In vivo での検討

In vitro の結果より 100ng/ml F-spondin ペプチドを前処理し、根尖性歯周炎を作製した。術後 4 週で組織を回収し、HE 染色を行い、組織学的に評価した。F-spondin ペプチドは、LPS 刺激により生じる炎症細胞浸潤や骨組織吸収を軽度抑制していたが、吸収抑制の程度に有意差は認められなかった。



以上の結果より、F-spondin の発現および F-spondin ペプチドは in vitro において骨芽細胞と同様に IL-6 の発現を抑制することが明らかとなった。その他の炎症性サイトカインの発現に対する影響は細胞の種類や F-spondin ペプチドの濃度により異なる反応を示した。

セメント芽細胞で特異的に発現する F-spondin を骨芽細胞に強発現させることにより IL-6 発現を抑制し、歯槽骨吸収を抑制したが、F-spondin ペプチド単独で歯周炎を制御することは難しく、臨床応用を目指す場合には他の抗炎症剤などと併用することで、より強い効果が期待できると考えた。

今後は、セメント芽細胞や骨芽細胞以外の細胞で、F-spondin を発現、作用させた場合の細胞分化や抗炎症作用への影響も今後検討していきたいと考えている。

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

1. Tsukimoto S., Kitagawa M., Miyauchi M., Takata T., F-spondin protects cementum from destruction by lipopolysaccharide, the 2nd Meeting of the International Association of Dental Research-Asia Pacific Region, 21-23 Aug 2013, Bangkok, Thailand.
2. Kitagawa M., Miyauchi M., Takata T.: Effect of F-spondin on LPS-induced periodontal inflammation and bone destruction: 5th Hiroshima conference on education and science in dentistry, 12 Oct 2013, Hiroshima.
3. 北川雅恵, 宮内睦美, 岡 広子, 外丸祐介, 高田 隆: セメント芽細胞が発現する F-spondin の抗炎症作用に関する検討: 第 55 回歯科基礎医学会, 9 月 22 日 2013, 岡山.
4. 岡 広子, 北川雅恵, 高田 隆: F-spondin は歯周組織の硬組織破壊を抑制する: 第 55 回歯科基礎医学会, 9 月 22 日 2013, 岡山.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北川 雅恵 (KITAGAWA MASAE)  
 広島大学・病院 (歯)・助教  
 研究者番号: 1 0 4 0 3 6 2 7

### (2) 研究分担者

高田 隆 (TAKATA TAKASHI)  
 広島大学・医歯薬保健学研究院 (歯)・教授  
 研究者番号: 1 0 1 5 4 7 8 3

宮内 睦美 (MIYAUCHI MUTSUMI)  
 広島大学・医歯薬保健学研究院 (歯)・准教授  
 研究者番号: 5 0 1 6 9 2 6 5

### (3) 連携研究者

岡 広子 (OKA HIROKO)  
 広島大学・医歯薬保健学研究院 (歯)・特任講師  
 研究者番号: 6 0 4 5 2 5 8 8