

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670895

研究課題名(和文)酸化LDL受容体LOX-1を標的分子とした新規歯周病治療法の確立を目指して

研究課題名(英文) Trial study for the establishment of the new therapeutical method for periodontal disease that targets oxidation LDL receptor LOX-1.

研究代表者

羽毛田 慈之 (HAKEDA, Yoshiyuki)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：90164772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くの疫学研究は歯周病と動脈硬化症に正の相関を示している。本研究から、アテローム性動脈硬化の責任遺伝子であるレクチン様酸化LDL受容体-1 (LOX-1)が前破骨細胞の細胞融合抑制し破骨細胞分化を負に調節することが明らかとなった。In vivo歯周病動物実験モデルの確立を試みたが、現時点では確立できなかった。そこで代わりに、マウス頭蓋骨にLPSを注射して誘導する炎症性骨破壊モデルを用いた。その結果、LOX-1欠損マウスでは、破骨細胞分化のトリガー分子であるRANKL発現の低下と並行して、炎症性骨吸収が減少した。このように、LOX-1を標的にすることで歯周病に対する新しい治療法の道が開けた。

研究成果の概要(英文)：Increasing epidemiological studies indicate the close relationship between arteriosclerosis and periodontitis. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) was originally discovered as a responsible gene for atherosclerosis. In vitro osteoclast formation assay showed that LOX-1 negatively regulates osteoclasts differentiation by suppressing the cell-cell fusion of preosteoclasts. In this study, we attempted to develop an in vivo periodontitis model using mice. However, the development unfortunately does not still establish. Alternatively, we employed an in vivo inflammatory bone destruction model induced by daily lipopolysaccharide-injection into mouse calvariae. The inflammation-induced bone destruction was reduced by LOX-1 deficiency, in parallel with decreased expression of RANKL, a trigger molecule for osteoclast differentiation, in inflamed bones. Thus, the LOX-1 targeting could open a new therapeutical method for inflammatory periodontitis.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：炎症性骨吸収 破骨細胞 歯周病

## 1. 研究開始当初の背景

従来、歯周病による歯槽骨の吸収に対する対策として、口腔衛生指導・歯周基本治療などの予防的アプローチや、失われた歯槽骨に対する自家骨移植やGBR法などの骨造成術が用いられてきたが、骨吸収を抑制する直接的な手法がないこと、十分な量・強度と長期的安定性を有する骨再生法もないなどの理由から、満足のいく治療結果は得られていない。日常臨床において加齢変化や歯牙の喪失による歯槽骨の減少、歯周病による歯槽骨吸収、再生骨や移植骨の炎症性の吸収は頻繁におこることから、このような場合に使用できる低侵襲かつ確実な骨吸収抑制法の開発が臨床で求められており、この中でも炎症性骨吸収の抑制は急務である。一方近年、多くの疫学的研究結果から歯周病と動脈硬化症の相関関係があることを示す知見が蓄積されつつあり、動脈硬化症の危険因子として知られる酸化LDLが動脈硬化巣や循環血中に存在するばかりでなく、歯周ポケット内の歯肉溝滲出液中にも存在し、末梢血よりも17倍高値であるとの報告もある (Sakiyama Y, et al. 2010)。これは、骨形成と骨吸収という動的平衡によって維持されるべき歯槽骨に対して、酸化LDLが炎症性骨吸収を促進する可能性を示している。酸化LDLの作用を仲介する受容体としては一連のスカベンジャー受容体が同定されているが、中でも本研究の共同研究者である Sawamura らによって報告された LOX-1 (Lectin-like oxidized LDL receptor-1) は血管内皮細胞における主要な酸化LDL受容体として初めて同定された (Nature, 1997) が、生体内における生理学的役割や病態におけるリガンドについての詳細は明らかになっていない。これらの炎症下における骨形成・骨吸収を担う細胞における役割を明らかにすることは、LOX-1の炎症性骨吸収の病態理解を深めるとともに、治療薬や処置法の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

歯槽骨は歯牙を支持する最も根本的な歯周組織であり、咀嚼、構音、審美などの口腔組織が果たすべき機能において重要な役割を果たす。低侵襲かつ確実な歯槽骨吸収抑制法の開発が臨床で求められる場面は多く、中でも炎症性骨吸収の抑制は強く望まれる。骨吸収の主体となる破骨細胞は正常時と炎症病態で異なる機構で活性化されうるが、これまで我々は脂質関連受容体の破骨細胞形成に対する役割に注目し研究を重ねた結果、酸化低比重リポ脂質 (酸化LDL) の受容体である LOX-1 (Lectin-like oxidized LDL receptor-1) が骨吸収抑制の創薬ターゲットになりうることに着眼している。本研究の目的は、炎症性骨疾患に対し高効率で確実な骨吸収抑制を実現するため、破骨細胞に対する LOX-1 の臨床的意義、特に、炎症性骨破壊に対する役割を明らかにし、歯周病治療への応用を目指すこ

とである。

## 3. 研究の方法

### (1) LOX-1 KOおよびSRA KO マウス

LOX-1 KO は共同研究者 沢村達也 (信州大学) が作製した。ホモ欠損マウスと同腹の野生型マウス (WT) もしくは雄で週齢のマッチした C57BL/6 野生型マウスを実験に供した。すべてのマウスは SPF 飼育室にて飼育された。なお、本研究は明海大学歯学部動物実験倫理委員会によって承認された。

### (2) *In vitro* における破骨細胞形成系

*In vitro* における破骨細胞形成は、4~8 週齢のオスの野生型 C57BL/6 マウスおよび LOX-1 遺伝子欠損マウスの大腿骨および脛骨を無菌的に取り出し、得た骨髄細胞を M-CSF (100 ng/ml) 存在下で 3 日間培養した。培養後、非付着細胞の間質細胞を除去し、得られた M-CSF 依存性モノサイト・マクロファージを破骨細胞の前駆細胞とし、以下の実験に供した。回収した破骨細胞前駆細胞を M-CSF (20 ng/ml), sRANKL (10 ng/ml) を含む  $\alpha$ -MEM/10% FBS もしくは  $\alpha$ -MEM/10% FBS 培地で培養した。培養終了後に、細胞を固定し、破骨細胞のマーカー酵素である TRAP 活性を染色した。その後、3 核以上の TRAP 陽性の多核細胞 (MNCs) を破骨細胞と見なし、その数を顕微鏡下で測定し、各種因子の破骨細胞形成に対する効果を検討した。また、TRAP 陽性 MNCs の面積と最大幅径を画像測定した。さらに、TRAP 陽性 MNCs の 1 細胞中に含まれる核数 (fusion index) を計測した。

### (3) RT-PCR および定量 real time-PCR 法

各種条件で破骨細胞前駆細胞を培養した後、total RNA を調製し、その total RNA (1  $\mu$ g) より cDNA を合成した。その cDNA を用いて種々の mRNA 量を RT-PCR および定量 real time-PCR で定量した。

### (4) Western blotting 分析

等量のタンパク質を含むサンプルを SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) で展開し、転写後、各種抗体を用いた Western blotting 分析を行った。

### (5) 歯周炎病態モデルの作製

歯周炎病態モデルとしてマウスを用いた。Kimura らの報告 (Oral Diseases 2014) の方法に基づき、辺縁性歯周炎モデルとして、下顎第一大臼歯の近心歯肉溝内に lipopolysaccharide (LPS) 試薬を投与し、歯周炎病態モデルマウスの作製を試みた。

### (6) Lipopolysaccharide (LPS) の頭蓋骨骨膜下投与による炎症性骨破壊の *in vivo* 実験モデルを確立と LOX-1 KO マウスでの評価

炎症性骨破壊 *in vivo* 実験モデルとして、野生型および LOX-1 KO マウスの頭蓋骨頂部の

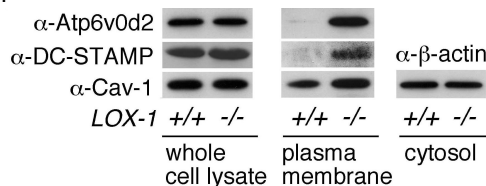
骨膜下に 100 µg/day の LPS を 5 日間連続で投与した。そこで、投与部位を中心に一定面積の頭蓋骨を切り出し、二等分し、片方に TRAP 染色を施し、もう片方の骨片から RNA を抽出する。抽出した RNA から常法に従って cDNA を作製し、TRAP などの種々の破骨細胞分化関連遺伝子の発現を定量 real-time RT PCR で測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) LOX-1 の破骨細胞形成に対する役割

野生型(WT)マウスと LOX-1 KO マウスの骨髄細胞からの破骨細胞形成系から LOX-1 の破骨細胞形成に対する作用を評価すると、LOX-1 KO マウスの破骨細胞形成は、TRAP 陽性の多核の破骨細胞形成が有意に野生型と比較して促進していた。そこで、形成された TRAP 陽性多核破骨細胞の最大幅径、面積および 1 個の破骨細胞に含まれる核数 (fusion index) を計測した。その結果、LOX-1 が欠損することによって、前破骨細胞から多核の破骨細胞が形成される 2 日から 3 日にかけて、破骨細胞の最大幅径および面積が大きく増加した。そして、単核の前破骨細胞の細胞融合の頻度を示す fusion index において、野生型の破骨細胞よりも LOX-1 KO 破骨細胞は著明に高値を示した。そして、この LOX-1 の作用は抗 LOX-1 抗体で打ち消された。これらの結果から、LOX-1 は破骨細胞の細胞融合をふに調節していることが明らかとなった。しかし、破骨細胞分化及び機能関連タンパク質の発現には、LOX-1 欠損で影響は出なかった。しかし、前破骨細胞の細胞膜上での細胞融合タンパク質の蓄積が LOX-1 欠損前破骨細胞で顕著に観察された。すなわち、LOX-1 は破骨細胞の細胞融合タンパク質の細胞膜への輸送を阻害することが考えられた。

図 1



##### (2) 歯周炎病態モデル作成の試み

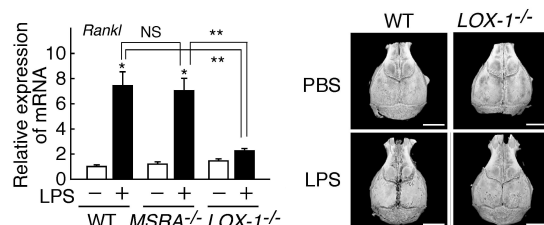
辺縁性歯周炎モデル作製法として、Kimuraらの報告(Oral Diseases 2014)の方法に基づき、LOX-1 KO マウスおよび野生型マウスの下顎左側第一大臼歯の近心歯肉 (舌側歯肉溝) に LPS 試薬を投与し歯周炎病態モデルマウスの作製を試みた。しかしながら、本方法では歯周炎モデルの完成には至らず、今後さらなる改良が必要であった。

##### (3) LPS 頭蓋骨骨膜下投与による炎症性骨破壊に対する LOX-1 の役割

前述の辺縁性歯周炎モデルの作成が完成

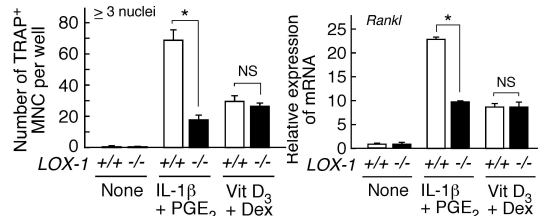
しなかったことから、LPS を頭蓋骨に投与する LPS 誘導炎症性骨破壊モデル実験に切り替えて実験を続行した。LOX-1 KO マウスでは RANKL 発現上昇が WT マウスに比べ低下し、それと並行して骨吸収上昇も低下した (図 2)。さらに、野生型マウスでの LPS で誘導される炎症性骨吸収は LOX-1 のデコイ受容体である可溶性 LOX-1 で減少した。

図 2



さらに、WT 骨芽細胞(OB)と WT 破骨細胞前駆細胞 (OCpre) の共存培養において IL-1 と PGE2 処理で大きく促進した OC 形成は、LOX-1 KO OB と WT OCpre の共存培養で減少した。これと一致して、OB の IL-1 と PGE2 処理または LPS による RANKL 発現が WT に比べ LOX-1 KO OB で低下した (図 3)。これらは炎症部位での RANKL 発現が LOX-1 に依存していることを示すと同時に、LOX-1 依存性 RANKL 発現細胞の 1 つとして骨芽細胞が考えられた。

図 3



以上の結果から、炎症性骨破壊部位における骨芽細胞の RANKL 発現は LOX-1 に依存することが明らかとなった。本研究から LOX-1 が歯周炎による歯槽骨吸収に対して治療ターゲットになりうることを示唆された。

#### 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 1 件)

Nakayachi M, Ito J, Hayashida C, Ohyama Y, Kakino A, Okayasu M, Sato T, Ogasawara T, Kaneda T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 abrogation causes resistance to inflammatory bone destruction in mice, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state. Bone. (査読有) 2015

Jun;75:170-82.  
doi:10.1016/j.bone.2015.02.025

〔学会発表〕(計 7 件)

Nakayachi M, Ito J, Okayasu M, Hayashida C, Sato T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Role of lectin-like oxidized low-density of lipoprotein receptor-1 in regulating osteoclastogenesis and inflammatory bone destruction. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, Japan. May, 2013

Nakayachi M, Ito J, Okayasu M, Hayashida C, Sato T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Lectin-like Oxidized Low-density of Lipoprotein Receptor-1 Is Involved in RANKL-production Elevated by Lipopolysaccharide-injection on Mouse Calvaria and thereby Contributes to Inflammatory Bone Destruction. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, Maryland, USA. October, 2013

伊東順太, 中谷地舞, 林田千代美, 岡安麻里, 大山洋子, 佐藤卓也, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1(LOX-1)の破骨細胞形成と炎症性骨破壊に対する役割の解明. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山. 2013 年 9 月

中谷地舞, 伊東順太, 岡安麻里, 須田直人, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1)の破骨細胞形成および炎症性骨吸収に果たす役割. 第 72 回日本矯正歯科学会大会, 松本. 2013 年 10 月  
中谷地舞, 伊東順太, 岡安麻里, 須田直人, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1)欠損マウスは骨量を減少させるが炎症性骨吸収に抵抗を示す. 第 73 回日本矯正歯科学会大会.幕張. 千葉. 2014 年 10 月

伊東順太, 林田千代美, 大山洋子, 佐藤卓也, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1)欠損は定常状態における破骨細胞形成を促進するが, LPS 誘導炎症性骨破壊には抵抗性を示す. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会.京王プラザ(新宿). 2015 年 7 月

伊東順太, 林田千代美, 大山洋子, 佐藤卓也, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1)欠損は定常状態における破骨細胞形成を促進するが, LPS 誘導炎症性骨破壊には抵抗性を示す.第 57 回歯科基礎医学会学術大会.朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟) 2015 年 9 月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
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

羽毛田 慈之 (HAKEDA, Yoshiyuki)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号: 90164772

(2)研究分担者

岡安 麻里 (OKAYASU, Mari)  
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医  
研究者番号: 10610941

申 基喆 (SHIN, Kitetsu)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号: 40187555

(3)連携研究者

( )

研究者番号: