

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11833

研究課題名(和文)破骨細胞と骨芽細胞のクロストーク(骨カップリング)を標的とした新規歯周治療の開発

研究課題名(英文) Development of a new periodontal treatment targeting the cross talk between osteoclast and osteoblast

研究代表者

稲垣 裕司 (INAGAKI, Yuji)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：50380019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞と骨芽細胞にLPS、IL-6、TNF- α を添加してephrinA2、EphA2、S1P1、SPHK1のタンパク質発現を調べた結果、破骨細胞ではLPS、IL-6、TNF- α によってephrinA2、EphA2、S1P1、SPHK1の発現が上昇した。また骨芽細胞ではLPSによってEphB4の発現が低下した。次に破骨細胞と骨芽細胞の骨カップリングファクター発現に影響を与える物質を探索した結果、漢方製剤のカンロインが、EphA2、EphrinB2、Sema4D、SPHK1の発現を抑制した。さらに歯周炎モデルラットを用いてその歯槽骨吸収に対する効果を検討したところ、骨吸収を有意に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、歯周病における歯槽骨破壊が骨カップリング機構の破綻によるものであることを示すために、歯周病原因子が骨カップリングファクターの発現に対してどのような影響を与えるか検討したものである。本研究の結果、歯周病原因子が破骨細胞や骨芽細胞の骨カップリングファクターの発現に対して影響を与えることが明らかになり、骨カップリング機構が歯周治療の新たな標的となり得ることを示すことができた。また破骨細胞の分化を抑制し、骨カップリングファクターの発現に対して影響を与える物質を見出し、歯周薬物治療の新たなシーズを提供することができた。

研究成果の概要(英文)：The effects of LPS and inflammatory cytokines on the osteoclast-osteoblast coupling signals were examined, the expressions of ephrinA2, EphA2, S1P1 and SPHK1 were increased by LPS, IL-6 and TNF- α in osteoclasts. On the other hand, the expression of EphB4 was decreased by LPS in osteoblasts.

When substances that affect the osteoclast-osteoblast coupling signals were searched in vitro, Kanroin, a traditional Japanese herbal medicine, suppressed the expression of EphA2, EphrinB2, Sema4D and SPHK1 in a murine pre-osteoclastic cell line. Furthermore, the inhibitory effects of Kanroin on alveolar bone resorption were examined in vivo, Kanroin significantly suppressed the alveolar bone resorption in experimental rat periodontitis.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯周病 骨カップリング 破骨細胞 骨芽細胞 ephrin Eph

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周病原菌とそれに対する免疫反応が原因で、骨吸収と骨形成のバランスが崩れることによって引き起こされる疾患である。通常、破骨細胞によって吸収された骨は骨芽細胞によって埋め戻されるが (= 骨リモデリング)、そこには骨吸収量と骨形成量を均衡させるカップリングと呼ばれるメカニズムが働いていて、破骨細胞と骨芽細胞の間に様々な分子 = カップリングファクターが介在している。代表的な例として成熟破骨細胞に発現している ephrinB2 とその受容体の EphB4 が挙げられる。EphB4 は骨芽細胞にのみ発現しており、ephrinB2 と EphB4 を介した破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用 (クロストーク) で生じた両方向性シグナルによって、骨吸収が抑制されて骨形成が促進する (Zhao C et al, 2006, Cell Metab)。また ephrinA2 も破骨細胞に高発現し、ephrinA2 の受容体である EphA2 は破骨細胞と骨芽細胞の両方に発現している。ephrinA2 と EphA2 の相互作用が起こると破骨細胞分化が促進され、骨芽細胞分化は抑制される (Irie N et al, 2009, J Biol Chem)。一方、血漿中に多量に存在するスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は SPHK1 という酵素によって合成され、S1P 受容体を介して破骨細胞の分化調節において重要な役割を果たす。近年、S1P が破骨細胞から分泌され、骨芽細胞を活性化することが示唆された (Ikeda K and Takeshi ta S, 2014, J Bone Metab)。また Semaphorin もカップリングファクターとして骨代謝制御における役割が注目されている。破骨細胞が産生する Sema4D は骨芽細胞分化を抑制し、骨芽細胞が産生する Sema3A は破骨細胞分化を抑制すると考えられている (Boyce BF, 2013, J Dent Res)。

このように骨リモデリングを破骨細胞もしくは骨芽細胞の一方のみでは論じることができなくなっているにもかかわらず、従来の歯周病研究では破骨細胞と骨芽細胞のクロストークに着目した報告は少なく、骨カップリング機構を標的とした治療へのアプローチはほとんど存在しない。

2. 研究の目的

骨の恒常性を支える骨リモデリングにおいて、破骨細胞と骨芽細胞のクロストーク (骨カップリング機構) の重要性が示され、その破綻がさまざまな骨疾患を引き起こすと考えられている。本研究では歯周病を骨カップリングの異常・破綻による疾患 (歯周病における歯槽骨破壊が骨カップリング機構の破綻によるもの) として捉え、歯周病原因子が骨カップリング機構に対してどのような影響を与えているか明らかにすることを目的とした。そして骨カップリング機構を標的とした物質を探索し、新規の歯周薬物治療の可能性も検討した。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞および骨芽細胞の骨カップリングファクター発現に対する歯周病原因子の影響

破骨細胞の培養系および骨芽細胞の培養系に、歯周病原因子の LPS や炎症性サイトカインを添加して骨カップリングファクターの発現を *in vitro* で調べた。まず、マウス骨髄から破骨前駆細胞を採取して α -MEM 培地にて培養し、M-CSF 10 ng/ml と sRANKL 50 ng/ml を用いて成熟破骨細胞に分化・誘導した。この破骨細胞の培養系に *Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS、炎症性サイトカインの IL-6、TNF- α を 10 ng/ml 添加して 5 日間培養し、細胞を回収して骨カップリングファクターの ephrinA2、EphA2、S1P1 および SPHK1 のタンパク質発現レベルをウェスタンブロットング法により調べた。

次に、マウス大腿骨から骨髄を採取して α -MEM 培地にて培養し、 α -グリセロリン酸 10 mM とアスコルビン酸 50 μ g/ml を用いて骨芽細胞に分化誘導した。上記同様、この骨芽細胞の培

養系に LPS、IL-6、TNF- α を添加して、骨カップリングファクターの EphB4 のタンパク質発現レベルをウェスタンブロッティング法により調べた。

(2) 骨カップリングファクターの発現に影響を与える物質の探索

破骨細胞として Raw264.7 を、骨芽細胞として MC3T3-E1 のセルラインを用いて、骨カップリングファクターの発現に影響を与える物質を *in vitro* で探索した。まず、Raw264.7 を α -MEM 培地に播種し、sRANKL 50 ng/ml を加えて破骨細胞に分化誘導した。そして候補物質を培地に添加して 5 日間培養した後、TRAP 染色を行い、形成された多核細胞の数を計測した。また細胞を回収して、EphrinB2 や Sema4D などの破骨細胞に特異的に発現する骨カップリングファクター、および S1P 合成酵素である SPHK1 などのタンパク質発現レベルをウェスタンブロッティング法により調べた。

次に MC3T3-E1 を候補物質添加 / 非添加で石灰化誘導培地 (α -グリセロリン酸 10mM とアスコルビン酸 50 μ g/ml を添加した α -MEM 培地) にて 14~21 日間培養した後、アリザリンレッド染色を行い、形成された石灰化結節を計測した。

(3) 歯周炎モデルラットを用いた歯槽骨吸収抑制の確認

歯周炎モデルラットを用いて、*in vitro* で効果が認められた候補物質の歯槽骨吸収抑制効果を *in vivo* で検討した。8 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、候補物質を毎日経口投与した投与群と非投与群に分けた。そしてラットの上顎右側第 2 臼歯を 5-0 ナイロン糸で結紮して片側に歯周炎を惹起した後、投与を開始した。結紮 20 日目に歯周組織を採取し、非結紮の左側第 2 臼歯を対照側としてマイクロ CT 解析を行い、両群の歯槽骨吸収レベルを比較した (図 1)。

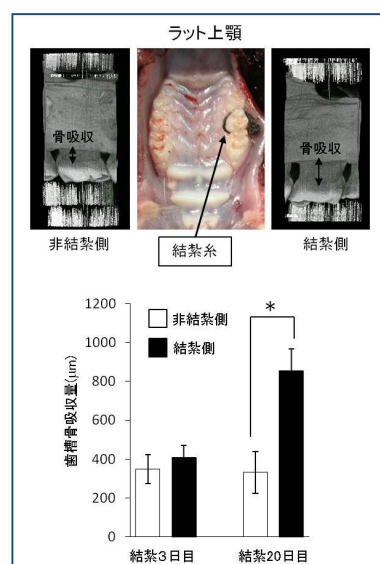


図 1 ; 歯周炎モデルラットにおける歯槽骨吸収量の検討

4 . 研究成果

(1) 破骨細胞では LPS、IL-6、TNF- α の刺激によって ephrinA2 や EphA2 の発現が上昇し、また S1P1 および SPHK1 の発現も上昇した。また骨芽細胞では LPS の刺激によって EphB4 の発現が低下した。

以上の結果から、歯周病原因子が骨カップリングファクターの発現に対して影響を与えることが明らかになった。

(2) 漢方製剤で歯周炎に効能・効果があるとされているカンロイン (Gan-Lu-Yin) が、0.05 mg/ml の低濃度で RANKL 誘導性の破骨細胞分化を有意に抑制した。さらに EphA2、破骨細胞に特異的に発現する EphrinB2 や Sema4D などの骨カップリングファクター、および S1P 合成酵素である SPHK1 も抑制した (図 2)。

骨芽細胞に対しては、カンロイン 0.01~0.2 mg/ml の範囲で石灰化結節の形成が濃度依存的に増加した。

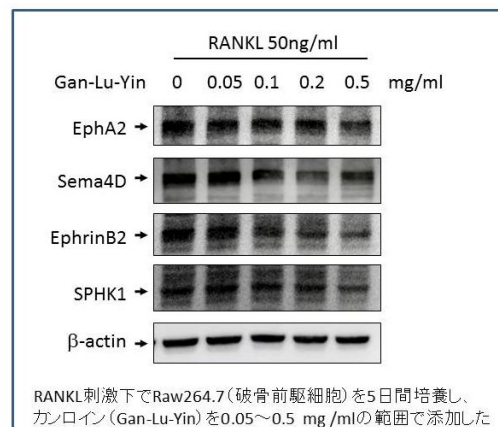


図 2 ; 破骨細胞の骨カップリングファクター発現に対するカンロインの影響

以上の結果から、カンロインは破骨細胞の分化を抑制し、骨カップリングファクターの発現に対して影響を与えるとともに、骨芽細胞の石灰化を亢進した。

(3) カンロイン投与群は、非投与群と比較して有意な歯槽骨吸収抑制が認められた ($P<0.01$)。また両群の末梢血と大腿骨を採取して解析したところ、投与群で血中 NTx-1 濃度の有意な低下を示したが、血中 Osteocalcin 濃度や骨密度について両群間で有意な差は認められなかった。さらに体重に対する影響も認められなかった。

以上の結果から、カンロインは歯周炎局所の歯槽骨吸収を抑制したが、全身の骨代謝に対する影響はなかった。

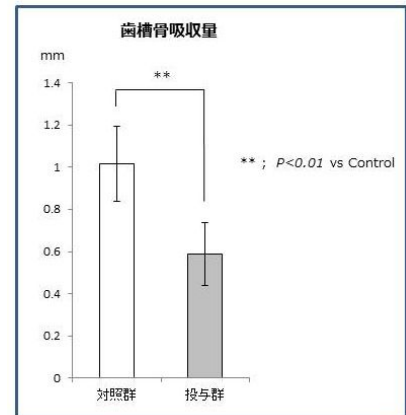


図3；歯周炎モデルラットの歯槽骨吸収に対するカンロイン投与の効果

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3件)

稲垣裕司、高木亮輔、西川泰史、木戸理恵、坂本英次郎、成石浩司、木戸淳一、湯本浩通、甘露飲エキスは破骨細胞の分化制御を介してラット実験的歯周炎の歯槽骨吸収を抑制する、第149回日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会、2018年11月

Yuji Inagaki, Kohei Nonaka, Ryosuke Takagi, Yasufumi Nishikawa, Rie Kido, Eijiro Sakamoto, Koji Naruishi, Jun-ichi Kido, Hiromichi Yumoto, Kanroin Extracts Prevent Alveolar Bone Resorption in Experimental Rat Periodontitis., 96th General Session & Exhibition of the IADR (International Association for Dental Research), July 2018

稲垣裕司、野中康平、高木亮輔、西川泰史、木戸理恵、坂本英次郎、成石浩司、木戸淳一、湯本浩通、甘露飲エキス配合製剤はラット実験的歯周炎において歯槽骨吸収を抑制する、第61回春季日本歯周病学会学術大会、2018年6月

6．研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：寺町 順平

ローマ字氏名：(TERAMACHI, junpei)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。