

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659979

研究課題名（和文） 無重力環境下での骨芽細胞の遺伝子発現と分化機能発現に及ぼす  
歯周病原性因子の影響研究課題名（英文） Effect of periodontopathic factors on osteoblastic differentiation  
of rat bone-marrow cells cultured under simulated microgravity

研究代表者

永田 俊彦 (NAGATA TOSHIHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10127847

研究成果の概要（和文）：

本研究では培養骨芽細胞を用いて、模擬無重力環境下で骨芽細胞の石灰化能や遺伝子発現がどのように変動するか、さらに歯周病原性因子である *P. gingivalis* 由来リポ多糖 (*P*-LPS) を培地に添加した場合にどのように変動するかについて調べた。その結果、培養骨芽細胞では模擬無重力環境下で石灰化指標は上昇し、これらは *P*-LPS で抑制される可能性が示された。また DNA マイクロアレイ解析を行って遺伝子の変動を網羅的に解析した結果、無重力環境下での歯周炎における key molecule としてカスパーゼ 12 を同定した。

研究成果の概要（英文）：

This study investigated the effect of periodontopathic factors on osteoblastic differentiation of cultured rat bone-marrow cells under simulated microgravity. Experimental conditions were made up using 3D-clinostat for the simulated microgravity and lipopolysaccharide from *P. gingivalis* (*P*-LPS) for the periodontopathic factor. Osteoblastic differentiation of bone marrow cells was progressed by the microgravity, showing increases of bone-associated gene expression and bone-nodule formation in culture. These markers were inhibited by the addition of *P*-LPS. DNA-microarray analysis revealed an increase of gene expression of caspase, a molecule associated with endoplasmic reticulum stress. These results suggest that *P*-LPS may affect on osteoblastic differentiation under the microgravity condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・歯周治療系歯学

キーワード： 模擬無重力, 3D クリノスタット, 骨芽細胞, 歯周病原性因子

## 1. 研究開始当初の背景

宇宙空間で骨が脆くなり筋機能が激しく低下するという現象は一般的によく知られている。宇宙空間における骨喪失は“骨芽細胞の機能低下”や“骨形成の減少”に起因する部分が多く、宇宙空間（無重力環境）を想

定したラットの尾部懸垂実験（tail-suspension rat）では、骨量が減少し脛骨組織内に脂肪細胞の増加が認められる。一方、口腔組織の構造や機能に無重力がどのような影響を及ぼすかについては未知の部分が多い。

歯周組織に着目すると、骨が失われやすい宇宙環境で歯周組織も生理的变化を受けると推測される。なぜなら、通常的环境(重力下)で歯根膜や歯槽骨は強い咬合力や感染に対抗すべく代謝回転が速く、特に歯根膜でのコラーゲン合成能は皮膚の4倍速く、また固有歯槽骨での骨代謝も活発である。そこに無重力という大気圧のかからない環境下では、これらの代謝回転や骨の細胞機能は著しく低下し、また歯周病原性因子に対する細胞の応答性も大きく変動する可能性が考えられる。このように、無重力下では歯槽骨吸収が一般骨以上に進行し、歯周組織に慢性炎症がある場合には歯槽骨吸収はさらに加速されると推測される。

## 2. 研究の目的

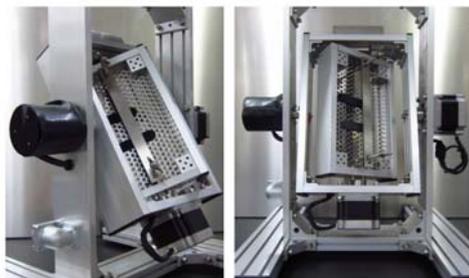
本研究の目的は、宇宙医学における歯周病の基礎的知見を得ることである。そしてその知見を航空宇宙環境での歯周病の予知や予防に役立てることを目的とする。無重力と歯周病原性因子によって特定の遺伝子の発現が変化し歯槽骨吸収に深く関わっているという結果が得られたならば、その分子の産生を調節する薬剤開発が宇宙での歯周病予防策の一つにつながる可能性がある。

## 3. 研究の方法

まず培養骨髄細胞を用いて骨芽細胞への分化および石灰化に対する模擬無重力環境の影響、模擬無重力環境で歯周病原性因子添加による影響を調べ、さらに株化骨芽細胞を用いて同様の検討を行った。

5週齢Wistarラットの大腿骨より骨髄細胞を採取し、アスコルビン酸(ASA)、 $\beta$ -グリセロリン酸( $\beta$ -GP)、デキサメタゾン(Dex)を培地に加えて骨芽細胞に分化させた後、培養フラスコに播種した。そして3Dクリノスタット(株式会社エイ・イー・エス)を用いて細胞に模擬無重力環境を付与し、72時間培養した(図1)。

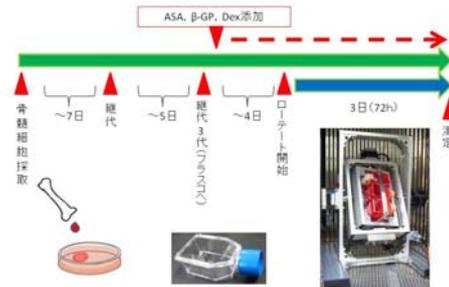
図1



また、歯周病原性因子として *P. gingivalis* 由来リポ多糖 (*P*-LPS, Invivogen) を培地に

50-1000  $\mu$ g/ml の濃度で添加し、①模擬無重力群、②模擬無重力・*P*-LPS 添加群、③重力付与対照群、④重力付与・*P*-LPS 添加群の4群を設定した。培養終了後、細胞を回収してアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定、骨マーカー(オステオポンチン; OPN, オステオカルシン; OCN, *cbfa-1*) および炎症性マーカー(IL-6、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) の mRNA 発現について RT-PCR 法を用いて調べた(図2)。また株化骨芽細胞の MC3T3-E1 細胞を用いて同様の検討を行った。

図2

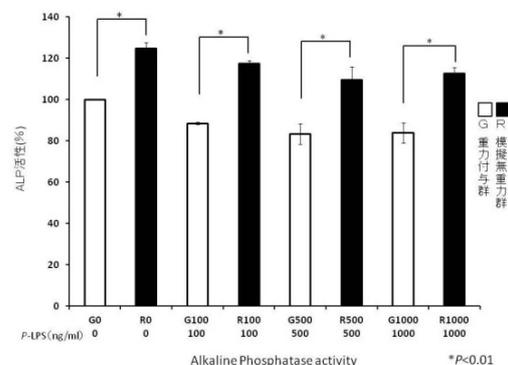


次にラット大腿骨由来の培養骨髄細胞を用いて、模擬無重力環境および模擬無重力環境で *P*-LPS 添加により影響を受ける遺伝子を網羅的に調べた。培養および模擬無重力付与は上記と同じ条件で行い、*P*-LPS は 500  $\mu$ g/ml の濃度で添加した。培養終了後、細胞から総 RNA を抽出して cDNA を合成し、DNA マイクロアレイ (Agilent Whole Genome 4 $\times$ 44) により遺伝子の変動を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 重力付与対照群と比較して、模擬無重力群では ALP 活性およびオステオカルシンの発現が上昇した。これらは *P*-LPS 濃度依存的に減少し、何れの濃度においても模擬無重力環境の方が酵素活性および遺伝子発現量は高かった(図3、図4)。

図3



一方、炎症性マーカーでは IL-6 および

IL-1 $\beta$  の発現が模擬無重力・P-LPS 添加群で上昇した (図 5)。

図 4

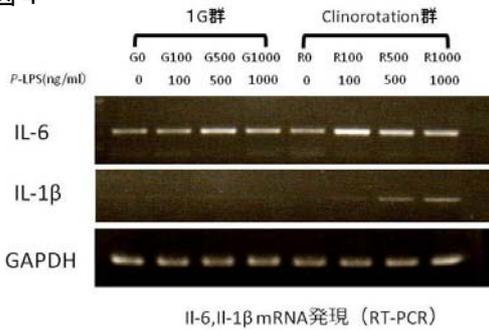
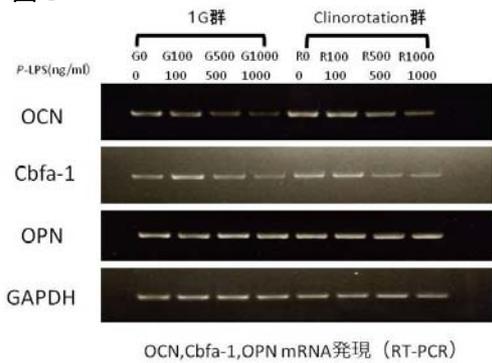


図 5



MC3T3-E1 細胞においても、培養骨髄細胞と同様の結果が示された。

(2) DNA マイクロアレイにより遺伝子の変動を解析した結果、骨代謝マーカの場合、P-LPS 添加、非添加にかかわらず重力付与群と無重力群の間で 2 倍以上発現が変動した遺伝子は認められなかった (表 1、表 2)。

表 1

マイクロアレイ解析 LPS(-) GO vs. R0

fold	up/down	GeneSymbol	GeneName
1.864169	up	Tnfrsf11b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (OPG)
1.391757	up	Bmp3	bone morphogenetic protein 3
1.34751	up	Bmp4	bone morphogenetic protein 4
1.167942	up	Runtx2	runt-related transcription factor 2 (cbfa-1)
1.063145	up	Runtx2	runt-related transcription factor 2 (cbfa-1)
-1.01407	down	Bmp2	bone morphogenetic protein 2
-1.02207	down	Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
-1.05021	down	Bglap	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (OCN)
-1.12754	down	Sp7	Sp7 transcription factor (osterix)
-1.20344	down	Col1a1	collagen, type I, alpha 1
-1.21866	down	Sparc	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
-1.23039	down	Spp1	secreted phosphoprotein 1 (OPN)
-1.24965	down	Col1a2	collagen, type I, alpha 2
-1.26121	down	Postn	periostin, osteoblast specific factor
-1.42821	down	Col1a1	collagen, type I, alpha 1
-2.28145	down	Tnfrsf11a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a (RANK)

一方、P-LPS 添加、非添加ともに模擬無重力の付与によりアポトーシスに関与するカスパーゼ 12 の遺伝子発現が約 2 倍上昇した。小胞体ストレスが過大になるとカスパーゼ 12 が活性化することが知られていることから、骨芽細胞の無重力環境での小胞体ストレス増加が示唆された。また、重力や荷重によ

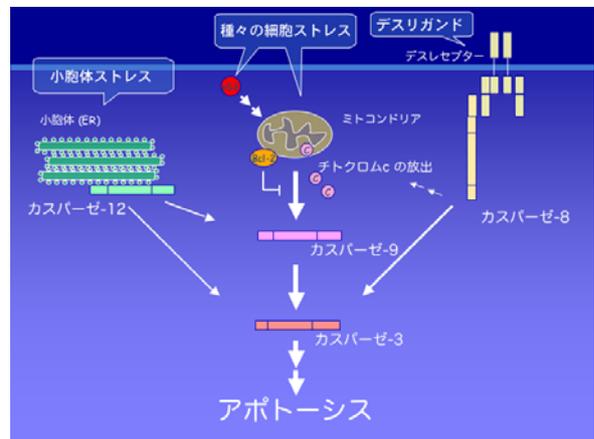
る刺激を受けると発現するペリオスチンが模擬無重力の付与により抑制された。

表 2

マイクロアレイ解析 500ng/ml LPS G500 vs. R500

fold	up/down	GeneSymbol	GeneName
1.932864	up	Tnfrsf11a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a (RANK)
1.671661	up	Bglap	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (OCN)
1.533581	up	Tnfrsf11b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (OPG)
1.388896	up	Runtx2	runt-related transcription factor 2 (cbfa-1)
1.273352	up	Bmp3	bone morphogenetic protein 3
1.223747	up	Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
1.071597	up	Sparc	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
1.071348	up	Runtx2	runt-related transcription factor 2 (cbfa-1)
1.060263	up	Col1a1	collagen, type I, alpha 1
1.049103	up	Col1a2	collagen, type I, alpha 2
1.0081	up	Sp7	Sp7 transcription factor (osterix)
1.003613	up	Spp1	secreted phosphoprotein 1 (OPN)
-1.04666	down	Col1a1	collagen, type I, alpha 1
-1.05464	down	Runtx2	runt-related transcription factor 2 (cbfa-1)
-1.0735	down	Bmp4	bone morphogenetic protein 4
-1.12721	down	Postn	periostin, osteoblast specific factor
-1.13007	down	Bmp2	bone morphogenetic protein 2

(3) 本研究では培養骨芽細胞を用いて模擬無重力実験を行った。すなわち模擬無重力環境下で骨芽細胞の石灰化能や遺伝子発現がどう変動するか、さらに歯周病原性因子を培地に添加した場合にどう変動するかについて調べた。その結果、当初予想した結果と異なり、培養骨芽細胞では模擬無重力環境下で石灰化指標は上昇し、これらは P-LPS で抑制される可能性が示された。本研究結果の解釈については、今後更なる検討が必要である。また DNA マイクロアレイ解析を行って遺伝子の変動を網羅的に解析した結果、無重力環境下での歯周炎における key molecule としてカスパーゼ 12 を同定した。



出典 Wikipedia

## 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 1 件)

① 生田貴久

「模擬無重力下での培養骨芽細胞の分化発現に及ぼす歯周病原性因子の影響」

第 55 回秋季日本歯周病学会学術大会

2012 年 9 月 23 日(日)

つくば国際会議場（茨城県つくば市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 俊彦 (NAGATA TOSHIHIKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：10127847

(2) 研究分担者

稲垣 裕司 (INAGAKI YUJI)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：50380019

(3) 研究分担者

板東 美香 (BANDO MIKA)  
徳島大学・病院・医員  
研究者番号：10510000