

平成30年6月22日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11397

研究課題名(和文) 歯周炎における骨細胞の新たな機能の解明

研究課題名(英文) Novel role of osteocytes in periodontal disease

研究代表者

瀬名 浩太郎 (Sena, Kotaro)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：60701117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、骨細胞が骨代謝において中心的な役割を果たすと報告され、歯周疾患においても骨細胞が重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、歯周病原細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* より抽出された lipopolysaccharide (Pg-LPS) が骨細胞においてどのようにサイトカインを誘導するのか、そのメカニズムを解明した。さらに、マイグロアレイにより、Pg-LPSにより誘導される遺伝子の網羅的解析を行った。本研究より、骨細胞が進行した歯周疾患の歯槽骨吸収においても、歯周病原細菌に対するサイトカイン産生を介し、主要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, osteocytes have been reported to play an important role in bone metabolism which indicates osteocytes may play a role in periodontal disease. In this project, we determined the mechanism how lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas gingivalis* (Pg-LPS) induced cytokine production by osteocytes. We further performed global analyses for Pg-LPS induced gene expression. Current findings suggest involvement of osteocytes in advanced periodontal disease with alveolar bone resorption by inducing cytokine production in response to periodontal pathogen.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は我が国においても極めて高い罹患率を示す口腔疾患である。平成 23 年度の歯科実態調査によると、我が国において、歯周疾患を有する人は加齢とともに増加する傾向があり、年齢階級別に見ると、45～49 歳では約 87% に達する。従って、歯周疾患の病態メカニズムの解明により導かれる新規の予防法、診断法や治療法の社会的意義は極めて高いと考えられる。歯周疾患における歯周組織破壊の原因は、機械的刺激の関与もあげられるが、主としてプラーク中の歯周病原性細菌の外膜成分の一つである lipopolysaccharide (LPS) である。今日まで、この LPS が歯周組織を構成している種々の細胞を刺激し、歯周組織破壊が起こると考えられているが、骨細胞については不明である。

骨細胞は骨組織のなかでも 90% 以上を占め、もっとも数が多く長寿命の細胞であるにもかかわらず、長い間その機能についての研究は行われてこなかった。骨組織に存在する骨芽細胞および破骨細胞と比較して著しく研究が行われていなかった背景には、同細胞が石灰化した骨基質中に埋まっており、多くの研究者が骨細胞は活性をもたない細胞と考えていたからである。しかしながら、Bonewald らの骨細胞株の樹立等により、*in vitro* においても骨細胞を対象とした研究が可能となった。さらに、近年、Wnt シグナリングを阻害することにより骨形成を制御する sclerostin (スクレロスチン) が骨細胞で特異的に発現され、sclerostin をターゲットとした新規薬剤 (抗 sclerostin 抗体) の前臨床試験において良好な結果が得られ、その後の臨床研究が進んでいることや、長年、骨のリモデリング (形成と吸収) を制御する RANK/RANKL/OPG 系路のうち、receptor activator factor- B ligand (RANKL) が骨芽細胞だけでなく骨細胞由来のものも骨代謝に主要な働きをすると報告された。これら骨細胞に関わる新しい知見より、骨細胞が骨形成および骨吸収において重要な役割を果たすと注目を集めているが歯周炎の病態における役割は明らかになってない。

## 2. 研究の目的

骨細胞の歯周病原性細菌への応答やそのメカニズムを解明し、骨細胞由来のサイトカインをターゲットとした歯周疾患の新たな診断及び治療法の検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨細胞

骨細胞として、マウスの頭蓋冠を酵素処理し、採取した初代培養のものと、マウス由来の骨細胞株を使用した。

### (2) 歯周病原性細菌由来 LPS

Invivogen 社より購入した *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 菌由来の LPS (Pg-LPS) を使用した。

### (3) リアルタイム polymerase chain reaction (real-time PCR) 法

LPS に対するレセプターおよび関連分子、骨細胞マーカー遺伝子について、各遺伝子に対する特異的なプライマーを用い、遺伝子発現量の解析を行った。

### (4) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法

市販されている ELISA キットを使用し、骨細胞を Pg-LPS にて刺激後のサイトカイン産生量を解析した。得られたデータは総タンパク量により補正を行った。

### (5) TLR に対する中和抗体

培養骨細胞中に TLR に対する中和抗体を添加し、骨細胞に対する歯周病原性細菌由来の LPS の作用に関わる受容体の同定を行った。

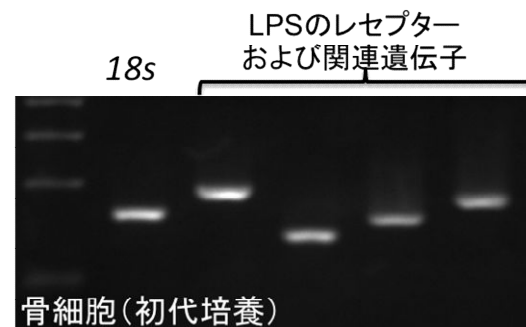
### (6) DNA マイクロアレイ

骨細胞を歯周病原性細菌由来の LPS にて刺激後、発現量が変化する mRNA の網羅的解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 骨細胞における LPS に対するレセプターやその関連分子の発現

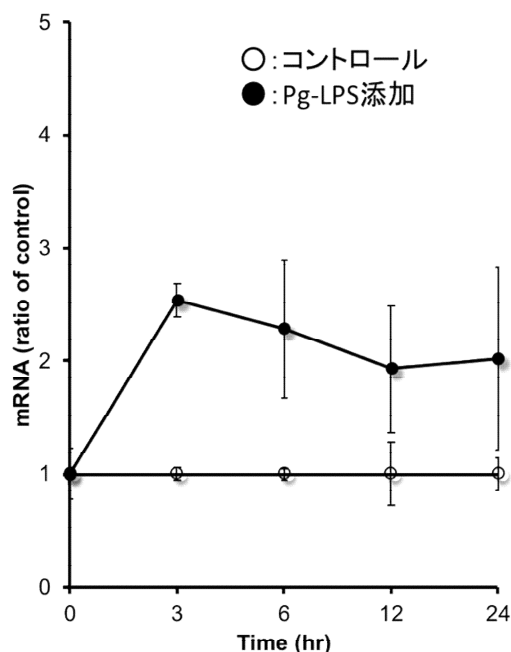
初代培養の骨細胞および骨細胞株のいずれにおいても、LPS に対するレセプターやその関連分子の発現を認めた (下図参照)。このことより、骨細胞が LPS に応答する受容体や関連分子を発現することを確認した。



### (2) 歯周病原性細菌由来 LPS に対する骨細胞のサイトカイン産生

骨細胞を Pg-LPS にて刺激を行った後、3、6、12、24 時間後に破骨細胞分化に関わるサイトカインの遺伝子発現レベルを解析し、コントロールとの比較を行った。Pg-LPS 添加により、骨細胞における RANKL の mRNA 発現レベルはコントロールに比べ、有意に高くなり (次項の図参照)、タンパク産生量においても同様の知見が得られた。このことより、骨細胞は Pg-LPS 刺激により、破骨細胞分化に

関わるサイトカインの産生を促し、進行した歯周炎において歯槽骨の吸収を促す可能性が示唆される。



(3) 骨細胞の歯周病原性細菌由来 LPS に対する作用の受容体の同定

骨細胞を Pg-LPS にて刺激を行う際に、LPS のレセプターに対する中和抗体を添加することにより、レセプターの同定を行った。

(4) 骨細胞の歯周病原性細菌由来 LPS により誘導される遺伝子の網羅的解析

骨細胞を Pg-LPS にて刺激後 3 時間後および 24 時間後における 2 万以上の mRNA 発現の変化を解析した。

有意に発現量が変化した遺伝子の中には過去に骨細胞や LPS に応答するといった報告のない、新規の遺伝子を含んでおり、今後さらなる解析を進めている。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Shirakata Y, Miron RJ, Shinohara Y, Nakamura T, Sena K, Horai N, Bosshardt DD, Noguchi K, Sculean A. Healing of two-wall intra-bony defects treated with a novel EMD-liquid-A pre-clinical study in monkeys. J Clin Periodontol. 査読有 44, 2017, 1264-1273. doi: 10.1111/jcpe.12825.

2. Takeuchi N, Shirakata Y, Shinohara Y, Sena K, Noguchi K. Periodontal wound healing following reciprocal autologous root transplantation in class III

furcation defects. J Periodontal Implant Sci. 査読有 47, 2017, 352-362. doi: 10.5051/jpis.2017.47.6.352.

3. Furue K, Sena K, Sakoda K, Nakamura T, Noguchi K. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in bone morphogenetic protein 9-stimulated osteogenic differentiation and stromal cell-derived factor 1 production in human periodontal ligament fibroblasts. Eur J Oral Sci. 査読有 125, 2017, 119-126. doi: 10.1111/eos.12336.

4. Shirakata Y, Miron RJ, Nakamura T, Sena K, Shinohara Y, Horai N, Bosshardt DD, Noguchi K, Sculean A. Effects of EMD liquid (Osteogain) on periodontal healing in class III furcation defects in monkeys. J Clin Periodontol. 査読有 44, 2017, 298-307. doi: 10.1111/jcpe.12663.

5. Moran MM, Sena K, McNulty MA, Sumner DR, Viridi AS. Intramembranous bone regeneration and implant placement using mechanical femoral marrow ablation: rodent models. Bonekey Rep. 査読有 5, 2016, 837. doi: 10.1038/bonekey.2016.61.

6. Shirakata Y, Sculean A, Shinohara Y, Sena K, Takeuchi N, Bosshardt DD, Noguchi K. Healing of localized gingival recessions treated with a coronally advanced flap alone or combined with an enamel matrix derivative and a porcine acellular dermal matrix: a preclinical study. Clin Oral Investig. 査読有 20, 2016, 1791-800. doi: 10.1007/s00784-015-1680-4.

7. Fuchigami S, Nakamura T, Furue K, Sena K, Shinohara Y, Noguchi K. Recombinant human bone morphogenetic protein-9 potently induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. Eur J Oral Sci. 査読有 124, 2016, 151-7. doi: 10.1111/eos.12249.

8. Moran MM, Viridi AS, Sena K, Mazzone SR, McNulty MA, Sumner DR. Intramembranous bone regeneration differs among common inbred mouse strains following marrow ablation. J Orthop Res. 査読有 33, 2015, 1374-81. doi: 10.1002/jor.22901.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 瀬名 浩太郎、古江 きらら、野口 和行、*Porphyromonas gingivalis* 由来

lipopolysaccharide の骨細胞への影響、第  
59 回春季日本歯周病学会学術大会、平成 28  
年 5 月 20 日、鹿児島（鹿児島）

〔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：  
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

瀬名 浩太郎 (SENA Kotaro)  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教  
研究者番号： 60701117

### (2) 研究分担者

迫田 賢二 (SAKODA Kenji)  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教  
研究者番号： 70419654

### (3) 連携研究者

町頭 三保 (MACHIGASHIRA Miho)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究  
員  
研究者番号： 80253897

### (4) 研究協力者

( )