

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11400

研究課題名(和文) 糖代謝産物が歯周組織に及ぼす影響の解析と新規歯周組織再生誘導材の開発

研究課題名(英文) Influence of glycometabolism on periodontal tissue and development of material to regenerate periodontal tissue

研究代表者

前田 豊信 (Maeda, Toyonobu)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号：10382756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周周囲組織の細胞に外因性の乳酸、ヒドロキシ酪酸、ヒドロキシイソ酪酸、グリコール酸、酒石酸、プロピオン酸、マレイン酸を添加すると、GPR81受容体を介して、細胞分化が制御された。これは、シトシンの脱メチル化を促進するメチル化シトシンヒドロキシラーゼの活性制御によるものであることと、wnt経路の制御によるものであることが示唆された。さらに、これらの一部は細胞内に取り込まれ、脂質とアミノ酸代謝能を調整することを見出した。しかしながら、この現象は、同じ間葉系細胞であっても、線維芽細胞では確認が出来なかった。

研究成果の概要(英文)：Exogenous lactic acid, hydroxybutyric acid, hydroxyisobutyric acid, glycolic acid, tartaric acid, propionic acid and/or maleic acid added to the medium promoted cell differentiation through the periodontal tissue GPR 81 receptor. Our results suggested that some of these mechanisms are due to TET (catalyzes the conversion of the modified DNA 5-mC to 5-hmC) activity control and/or control of wnt pathway activity. Furthermore, we found that some of these are metabolized inside the cells and regulate lipid and amino acid metabolic functions.

研究分野：口腔生化学

キーワード：乳酸 ヒドロキシ酪酸 細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

現在のところ 2 型糖尿病と骨代謝の間には関連がないとされている (Tuominen JT et al. Diabetes Care. 1999.) が、大規模調査 (Schwartz AV et al. J Clin Endocrinol Metab. 2001) では 2 型糖尿病は骨折リスクの 1 つである。これは、1990 年代に行われた 2 型糖尿病と歯周疾患の大規模調査 (Shlossman M et al. J Am Dent Assoc. 1990 121: Emrich LJ et al. J Periodontol. 1991 62:) とも一致する。この原因について、歯肉溝滲出液中のサイトカイン (アディポカイン) 量が原因の 1 つとされる (Maedler K et al. Diabetes. 2001)。しかしながら、未だ間葉組織分化とエネルギー代謝との関連を調査した報告は殆ど存在しない。

そこで、代表者らは、歯由来幹細胞の口蓋裂部移植における MTA の役割 (若手 (B) 研究課題番号: 25870663) において、糖中間代謝産物のなかから骨再生促進能を有する物質を *in vitro* と *in vivo* でスクリーニングを行い数種類の候補物質を同定し、これらの徐放性高分子化合物を合成した。

現在、歯周病に伴う組織破壊を回復する組織再生誘導法として、GTR メンブレン、エナメルマトリックス誘導体、 $\beta$ -tricalcium phosphate と rhPDGF やカルボキシメチルなどとの混合体などを用いるが開発されている。しかしながら、いずれの方法にも、適応の範囲、価格、術式、物質安定性の観点から短所が存在する。そこで、本研究は、上記の成果を基にして糖中間代謝産物のうち骨形成促進作用がある物質の歯周組織再生誘導能を検証し、新規歯周組織再生誘導材の開発を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究は、代表者らが発見した GPR81 リガンドの骨分化促進能を手掛かりとして、比較的安定性が高く安価である糖・脂質中間代謝産物から、歯周組織再生誘導能を有する物質を数種類特定することと、エネルギー代謝と細胞分化・組織再生機構を解明することを目的としている。本研究の成果は、歯周組織の再生誘導を速め、もしくは円滑に行えるようになることで、将来の歯周病治療に貢献できると考える。

### 3. 研究の方法

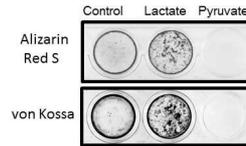
細胞培養は、ヒト歯肉線維細胞と初代骨髄細胞とマウス歯肉線維細胞、歯肉上皮細胞、骨芽細胞、前駆脂肪細胞、未分化間葉細胞およびラット初代歯髄細胞、初代歯肉細胞、初代骨髄細胞などを用いた。実験動物は、SD 系、Wistar 系ラットと、C57BL/6 マウスを用いた。

ノックアウト細胞は、CRISPR / Cas9 により作成し、Tet On と Tet Off システムはタカラバイオ社のものを購入し使用した。リコンビナントペプチドは、E.coli BL21 と

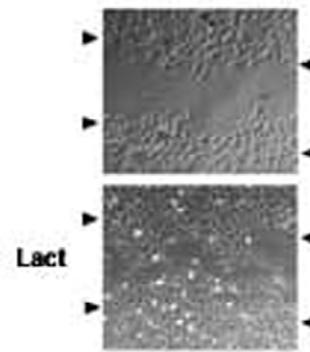
Brevibacillus 発現系 (ヒゲタ醤油株式会社) を用いて作成し、ファウエスタンプロット、EMSA や Pull down assay に供した。解析は、RT-qPCR やウエスタンプロット、ルシフェラーゼアッセイ、ELISA、免疫染色などによって行った。

### 4. 研究成果

骨芽細胞に、外因性の乳酸を添加すると、GPR81 を介して働いて細胞分化と運動が促進された。その結果、有意な石灰化促進を示した。これは、

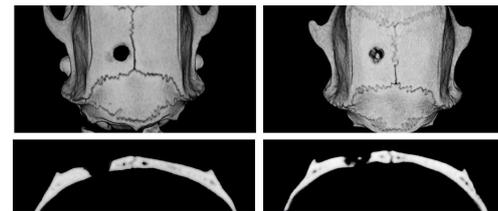


Monocarboxylate transporter (MCT) の抑制剤である、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid の添加では抑制を受けなかった。

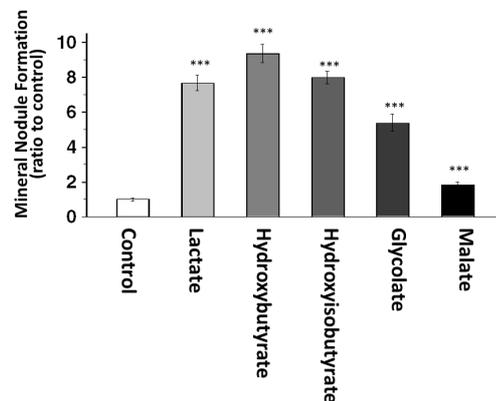


また、ラット頭蓋骨

に開けた欠損の近傍に平均分子量を調整したポリ L 乳酸を適応した結果、有意な治癒促進を示した。

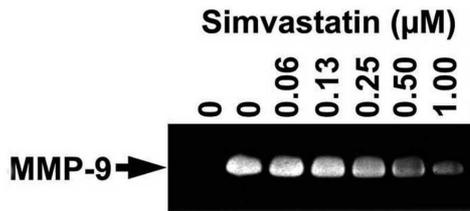


さらに、GPR81 のノックダウンの結果から、代謝産物が細胞内に輸送されなくても、同様の結果が得られた。ここから、歯槽骨再生に有効な物質を解析したところ、乳酸以外にヒドロキシ酪酸、ヒドロキシ酪酸、グリコール酸、酒石酸、プロピオン酸、マレイン酸

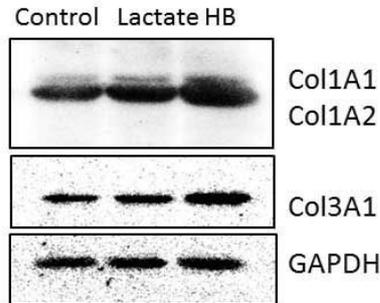


に同定した。しかしながら、細胞内でヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼの強制発現を検討したところ、骨形成促進作用は認められなかった。

この代謝産物は、骨形成分化マーカー発現制御を伴うものであった。また、細胞自身が乳酸産生を増加させることで、細胞骨格の変化をもたらし上皮由来細胞が間葉系細胞の形

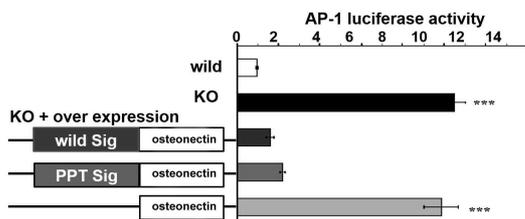


態に変化した。これは、Rho の活性化からホスホリパーゼ D1 の活性化を介し、マトリックス金属プロテアーゼ 9 の合成・分泌に影響を及ぼしていることが分かった。それにも関わらず、乳酸・ヒドロキシ酪酸の添加で、細胞外に蓄積されたコラーゲン合成量は増加した。

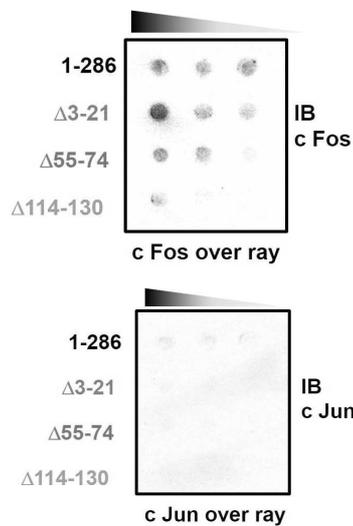


GPR81 の増加で、発現が誘導され分泌タンパク質のうち、オステオネクチンに焦点をあてた。オステオネクチンのノックアウト細胞は骨形成を抑制し、脂肪分化を優位に促進した。また、このノックアウト細胞には、AP-1 活性が優位に増加していた。そこでオステオネクチンを強制発現させたレスキューした実験を行った。その結果、オステオネクチンシグナルペプチドを野生型のものに N 末にプレプロトリプシンリーダーを添加したものの強制発現は、AP-1 活性を野生型細胞と同等に低下させた。

一方でシグナルペプチドを欠損させた強制発現では、Mock と同等に高 AP-1 活性を維持していた。このことから、オステオネクチンは分泌後に何らかの方法により細胞内に取り込まれて、AP-1 活性を抑制しているこ

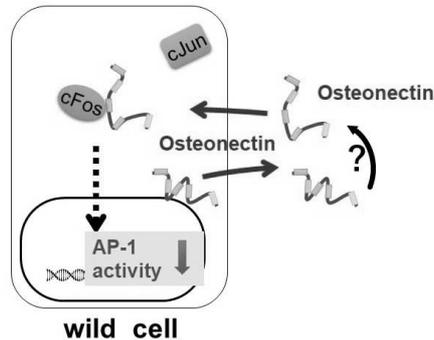


とが分かった。そこで in vitro でファウエスタンプロットと EMSA で解析を行った結

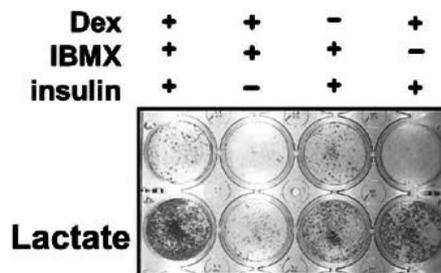


果、オステオネクチンは Fos と直接結合することが判明したが、Jun との結合は認められなかった。ミュレーションとその Tet On 発現株の実験からオステオネクチンの細胞増殖や、血管新生を刺激

するドメインに關与する領域が重要であることが分かった。



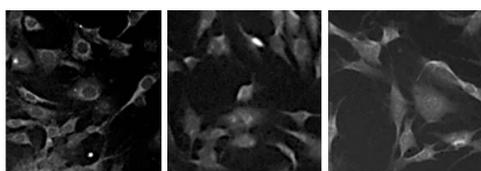
GPR81 リガンドの作用は細胞によって異なっていた。脂肪細胞と前駆脂肪細胞への GPR81 リガンドの応用では、GPR81 を介して抗インスリン様の効果を示し、細胞内のサイクリック AMP 濃度を抑制した。さらに、脂肪分解を抑制し、脂肪蓄積を増加させた。また Peroxisome Proliferator-Activated Receptor の発現が変化し、Lipoprotein lipase の発現も短時間ながら変化することを突き止めた。さらに、GPR81 リガンドは 3-イソブチル-1-メチルキサンチンもしくは、グルココルチコイドを欠乏させた培養状態では、脂肪合成を増強させた。また、膜貫通能を有する cAMP 添加で、GPR81 リガンド添



加作用は消去された。このことは、GPR81 リガンドが脂肪蓄積作用において、細胞内に

取り込まれて作用するのではなく、その受容体を介して作用していることの補強となる。また、この機構は、wntの古典経路を介して行われることが判明した。その一方で、GPR81 リガンドは、線維芽細胞の培養においてFGFsとその受容体の発現などの変化を及ぼさなかった。これらことは、GPR81 リガンドがダイレクトリプログラミングもしくはティッシュエンジニアリングのTipとして十分な可能性を有していることを示唆している。

GPR81 リガンドである乳酸やヒドロキシ



Control Lactate HB

酪酸は、脂肪酸代謝や糖・アミノ酸代謝と密接に関連しているため、未分化間葉細胞分化における、アミノ酸の影響を解析した。その結果、セリン、システインやアラニンなどピルビン酸に合流するアミノ酸とアセチルCoAに代謝されるアミノ酸であるリシン、ロイシンよりも2-オキソグルタル酸の供給に繋がるグルタミン、あるいはスクシニルCoAへ代謝されるバリンの方が、さらにはフマル酸を供給するチロシンフェニルアラニンの方が、骨分化に及ぼす影響が大きかった。また細胞透過性のあるクエン酸回路中間代謝産物を用いることでも検証を行った。この影響はTET遺伝子の発現量に変化を及ぼしていた。そこで、GPR81 リガンドである、乳酸などを輸送するMCT1, MCT4のノックアウトや強制発現により、骨分化とTETへの影響の解析を行った。その結果、特定のクエン酸回路中間代謝産物を過剰に蓄積することで、骨芽細胞の分化を制御することができた(結果未発表)。

また、一部の細胞でGPR81のノックアウトを行うと、ペブルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)の発現を有意に抑制することが判明した。当初、この現象はCRISPRのオフターゲットによるものではないかと想定していたが、数種のgRNAとクローンを試しても同様であった。この現象と関連してSREBP1, SREBP2, Foxoの調節が行われていることが分かってきた(結果未発表)。

##### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Kato Yasumasa, Maeda Toyonobu, Suzuki Atsuko, Baba Yuh, Cancer metabolism: New insights into classic characteristics, Japanese Dental Science Review, 査読有り, 54巻, 2018年, 8~21. DOI: 10.1016/j.jdsr.2017.08.003

Maeda Toyonobu, Suzuki Atsuko, Koga Kaori, Miyamoto Chihiro, Maehata Yojiro, Ozawa Shigeyuki, Hata Ryu-Ichiro, Nagashima Yoji, Nabeshima Kazuki, Miyazaki Kaoru, Kato Yasumasa, TRPM5 mediates acidic extracellular pH signaling and TRPM5 inhibition reduces spontaneous metastasis in mouse B16-BL6 melanoma cells, Oncotarget, 査読有り, 8巻, 2017年, 78312~78326. DOI: 10.18632/oncotarget.20826

Baba Y, Maeda T, Suzuki A, Takada S, Fujii M, Kato Y, Deguelin Potentiates Apoptotic Activity of an EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor (AG1478) in PIK3CA-Mutated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, International Journal of Molecular Sciences, 査読有り, 18巻, 2017年, pii: E262. DOI: 10.3390/ijms18020262.

Maeda T, Yuzawa S, Suzuki A, Baba Y, Nishimura Y, Kato Y, RhoA mediates the expression of acidic extracellular pH-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA through phospholipase D1 in mouse metastatic B16-BL6 melanoma cells. International Journal of Oncology, 査読有り, 48巻, 2016年, 1251~1257. DOI: 10.3892/ijo.2016.3322.

[学会発表](計10件)

角田隆太, 前田豊信, 鈴木厚子, 櫻井裕子, 遊佐淳子, 加藤靖正, Concentrated Growth Factorsによる骨代謝能への影響, 第59回歯科基礎医学会, 2017年

前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正, マウスB16メラノーマ細胞では、酸性細胞外pHによって誘導されるMMP-9 mRNAの発現は、PLD1を介す, 第59回歯科基礎医学会, 2017年

前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正, 酸性細胞外pHシグナルを標的とした癌転移抑制の試み, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017年

前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正, SPARCはAP-1活性を抑制して、骨形成を誘導する., 第26回日本がん転移学会, 2017年

前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正, Pak6/7の酸性細胞外pHにより誘導されるMMP-9合成における役割, 第48回日本結合組織学会, 2016年

前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正, オステオネクチンはAP-1活性を抑制して脂肪細胞分

化を抑制する .第 58 回歯科基礎医学会 ,2016 年

前田豊信、長岡正博、鈴木厚子、加藤靖正、鈴木恵子、フィットケミカルの生体調節機能に関する研究 ペチュニジンの骨形成促進作用 , 第 58 回歯科基礎医学会, 2016 年

前田豊信、鈴木厚子、加藤靖正, SPARC は in vitro で AP-1 活性を抑制して脂肪細胞分化を抑制する ., 第 89 回日本生化学会, 2016 年

鈴木 厚子, 前田 豊信, 湯澤 仁, 加藤 靖正, 酸性細胞外 pH は, EMT を促進誘導する微小細胞外環境因子として機能するか?, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年

前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤仁, 加藤靖正, Atf6 is involved in mineral trioxide aggregate-induced osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells ., 第 47 回日本結合組織学会学術大会, 2015 年

〔図書〕(計 1 件)

加藤 靖正・前田 豊信・鈴木 厚子, 北隆館, 月刊「細胞」2018 年 5 月号, 2018 年, 5

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 骨形成促進剤及び骨形成促進装置  
発明者: 加藤靖正、前田豊信、鈴木厚子、藤山敬至、塩沢 亜弥  
権利者: 加藤靖正、前田豊信、多木化学株式会社  
種類: 特許  
番号: 2015-212328  
出願年月日: 2016 年 3 月 18 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ohu-u.ac.jp/faculty/dental/course/ksk.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 豊信 (MAEDA, Toyonobu)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号: 10382756

(2)研究分担者

大須賀 謙二 (OHSUGA Kenji)

奥羽大学・歯学部・講師

研究者番号: 90347948

羽鳥 智也 (HATORI Tomoya)

奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号: 10738165

(3)連携研究者

加藤 靖正 (KATO Yasumasa)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号: 50214408

鈴木 厚子 (SUZUKI Atsuko)

奥羽大学・歯学部・講師

研究者番号: 90405986

湯澤 仁 (YUZAWA Satoshi)

奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号: 40706397

(4)研究協力者

角田隆太 (SUMIDA Ryuta)

川嶋 雅之 (KAWASHIMA Masayuki)