

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11432

研究課題名(和文)口臭物質による歯槽骨吸収を制御するメカニカルストレスの生理学的役割

研究課題名(英文)Physiological role of mechanical stress in alveolar bone resorption induced by the oral malodorous compounds.

研究代表者

今井 敏夫 (IMAI, TOSHIO)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：90120617

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)：口臭原因物質(硫化水素)による歯槽骨吸収機構の中で歯槽骨が日常におかれるメカニカルストレス(伸展刺激)が与える影響を解明することを目的とした。伸展刺激は伸縮可能なシリコン製培養器(SW)を用いた。SWをPoly-L-Lysine、Fibronectin、コラーゲンIで処理後、破骨細胞RAW264を播種しRANKLで分化誘導した。プラスチック培養器に比べTRAP陽性細胞の出現はわずかであった。骨芽細胞MC3T3-E1はSWをマトリゲルで処理した培養器で増殖・分化能が認められた。硫化水素処理したMC3T3-E1に伸展刺激を与えたところ、ERK1/2が重要な役割を担っていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：It was aimed to elucidate the effect of mechanical stress on alveolar bone resorption by the oral malodorous compounds (hydrogen sulfide). Alveolar bone is routinely exposed to mechanical stress. A stretchable silicone vessel (SW) was used for the stretch stress. After coating SW with Poly-L-Lysine, Fibronectin, Collagen I, osteoclastic cells RAW 264 was seeded and induced the differentiation by RANKL. TRAP positive cells was observed only a little compared to the plastic dish. Cell proliferation and differentiation of osteoblastic cells MC3T3-E1 was observed in SW coated with Matrigel. It was suggested that ERK 1/2 plays an important role in its mechanism when hydrogen sulfide treated MC 3 T 3 - E 1 is on the stretch stress.

研究分野：生理学

キーワード：口臭物質 歯槽骨吸収 メカニカルストレス 破骨細胞 骨芽細胞 細胞内シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

慢性の歯周炎は歯肉炎と異なり歯槽骨吸収が特徴的病態である。しかし歯槽骨吸収に関する分子レベルでの研究は軟組織に比べ遥かに少ない。歯周炎発生には口腔内細菌のLPSが深く関わっていることは知られている。さらに口腔細菌が産生する口臭原因物質(揮発性硫黄化合物:硫化水素、メチルメルカプタン)はLPSと同様のシグナル伝達機構を介して歯周病原性を発揮する。その上、本研究の実験モデルでは生理的濃度・病的濃度でも硫化水素の濃度制御が容易であり、LPS実験とは異なり一定濃度で数週間以上の継続的曝露環境の設定が可能である。従って生理的濃度に設定すれば歯周炎のみならずageing研究も可能である。一方、日常的な咀嚼のみならず会話、無意識に発生する咬合・グライディングなどによって機械的圧縮刺激が歯槽骨では継続的に発生している。このことを考慮すると、メカニカルストレスを加える培養細胞伸展システムと組み合わせることで、より現実的な*in vivo*環境を再現した歯周炎研究モデルとなる。Yaegakiらは、歯周ポケット内濃度より低い揮発性硫黄化合物が、歯肉線維芽細胞のコラーゲン合成の阻害や分解、genomicレベルのDNA損傷そしてアポトーシスを惹起すると報告した(Yaegaki K, Jpn Dent Sci Rev, 44,100-108, 2008, Yaegaki K, et al. J Periodontol Res 81, 1317-1323,2010)。また歯肉上皮細胞、ケラチノサイト幹細胞にもアポトーシスやgenomic DNA損傷を惹起すると報告されている(Calenic B, et al. J Periodontol Res 45:31-37, 2010, J Periodontol, 81, 1317-1323,2010)。また近年、上皮幹細胞では上皮細胞の2倍以上の頻度でアポトーシスが惹起されることを発見した

(J.Periodontol Res, 2010. Clin Oral Invest, 2010.)。以上の結果は、硫化水素が歯肉内縁上皮バリアーに機能障害をもたらす歯周炎あるいは歯槽骨吸収の原因となることを強く示唆している。一方、硫化水素は歯肉粘膜透過性が極めて高く、歯槽骨への直接的影響が指摘されている(Ng and Tonzetich, J Dent Res. 63:994-997, 1984.)。そこで我々は硫化水素の歯槽骨吸収過程に及ぼす影響について検討した。その結果、硫化水素が骨芽細胞の増殖を阻害し、そのシグナルはMAPKsを介して行なわれていることを明らかにした(J.Periodontol, 2009)。さらに硫化水素は骨芽細胞(MC3T3-E1)のp53、ミトコンドリア経路、caspase-8を活性化してアポトーシスを誘導することも明らかにした(J.Periodontol Res, 2012. 47:365-73.)。以上より、生理的口臭の原因物質・硫化水素は歯槽骨吸収の誘発・増悪因子と結論した。我々は、低濃度硫化水素による破骨細胞(RAW264)の分化機能への影響を検索したところ、生理的口臭レベルの硫化水素が、破骨細胞の骨吸収能を顕著に促進することを発見した。さらに、この骨吸収における細胞内シグナル伝達にはMAPK経路が

関与していることを見いだした(J Periodontol, 81, 2010.)。その結果から、我々は、ヒト生体組織に近い条件下における硫化水素の破骨細胞へ影響、特に骨吸収機能への作用機序を明らかにするため、マウス骨髄から骨髄幹細胞を分離して硫化水素を作用させたところ、その酒石酸抵抗性多核細胞の有意な増加を確認し、これにはNFATc1が関与する事を報告した(平成24-26年科学研究補助金 基盤研究(C)、歯科基礎医学会総会発表、2014年)。以上の事実は、硫化水素は破骨細胞分化誘発因子として、直接的に破骨細胞を分化誘導する」ことを示す。

## 2. 研究の目的

歯周病原菌の代謝産物が直接、破骨細胞分化因子として作用するとの報告は他に無い。破骨細胞への分化には、M-CSF、RANKLなどの破骨細胞分化因子が必須である。ところが、硫化水素は、従来の報告されている破骨細胞分化因子の非存在下で分化誘導する。硫化水素が細菌のLPSと異なり、破骨細胞分化誘発因子となる事実は硫化水素がLPSより遥かに直接的で強い骨吸収能があることを示す。一方、骨リモデリングはメカニカルストレス応答が関与すると考えられている(Sawada Y, Cell, 127:1015-1026, 2005)。歯槽骨は咀嚼等により常にメカニカルストレスを受けており、破骨細胞、骨芽細胞はその最前線におかれている。骨芽細胞にメカニカルストレスを与えると骨芽細胞のPGE2産生を増加させ、そのオートクリン作用によって骨形成が促進すると報告がある(Reich KM, Calcif. Tissue. Int, 52,62-66,1993、飯谷太良、日大歯学、88,59-65,2014)。一方で、破骨細胞の分化を抑制するとの報告もあり(Guo, D, Mol Med Rep, 3, 173-178, 2010)、いまだ骨組織におけるメカニカルストレスの生理学的役割は不明である。臨床的には骨形成の低下あるいは骨吸収の促進が大きな問題になる。本研究は硫化水素により誘引された歯槽骨吸収にメカニカルストレスがどのように関与しているかを細胞分子レベルで解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞：破骨前駆細胞 RAW264 および骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 は -MEM、10%FCS、5 µg/ml ゲンタマイシン、2 mM-L-グルタミン培地にて 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。両細胞とも3日あるいは4日間隔で継代維持した。

メカニカルストレス：細胞へのメカニカルストレスは培養細胞伸展システム Shell Pa (Menicon life science)を用いた。ストレッチチャンパー(20mmX20mm)に各種のコatingsを施し、5 x 10<sup>4</sup>個の細胞を播種した。伸展率は2%として実施した。

硫化水素処理：細胞は 25cm<sup>2</sup> フラスコに播種しサブコンフルエントまで 5%CO<sub>2</sub> 環境下で培

養した。この細胞を 0.1ng/mlH<sub>2</sub>S、5%CO<sub>2</sub>、95% Air が継続的に流通する培養器内で 3 日間培養し、これを実験に共した。

ストレッチチャンバーのコーティング：細胞へのメカニカルストレスとして本研究では伸展ストレスを想定した。このシステムではシリコン樹脂製のストレッチチャンバーを用いることで、付着した細胞に伸展によるストレスを周期的に与えることができる。チャンバーには細胞播種前にコーティングを施した。コーティングはコラーゲン I コーティング(コスモバイオ)、Ply-L-Lysin(PLL) コーティング(コスモバイオ)、ファイブロネクチン(コスモバイオ)、マトリゲル<sup>R</sup>(CORNING)を用いた。コラーゲン I は 0.01N 塩酸溶液で希釈して 0.01%コラーゲン溶液としチャンバーに浸し、滅菌水にて 4 から 5 回洗浄、滅菌蒸留水を加え 37 °C、2 時間静置した。滅菌蒸留水を取り除き、チャンバーに細胞を播種した。PLL は滅菌水にて 10 µg/mlPLL に調整しチャンバーに浸した。37 °C で一晩静置、PLL を取り除き滅菌蒸留水で 2 回洗浄後に細胞を播種した。ファイブロネクチンは滅菌蒸留水に溶解後、PBS(-)にて 50 µg/ml に調製した。このファイブロネクチン溶液をチャンバーに浸し、室温で 1 時間静置。滅菌蒸留水にて洗浄後、細胞を播種した。マトリゲル<sup>R</sup>は無血清 -MEM 培地にて 20 倍に希釈し、チャンバーに浸し室温で 1 時間静置した。無血清 -MEM 培地で穏やかに洗浄後、細胞を播種した。

ウエスタンブロットング法：細胞は PBS(-) で洗浄後、Cell Lysis buffer(cell signaling)にて溶解した。この溶液を 14000rpm、20 分間高速遠心分離し(Eppendorf、5415R)、上清をウエスタンブロットング用の試料とした。試料はタンパク質量(Pierce BCA protein assay kit)し、タンパク質量を調整した。試料は SDS10%ポリアクリルアミドにて電気泳動し、PVDF に転写した。1 次抗体は p-ERK1/2、p-p38、p-JNK、p-PKC、-actin(以上 cell signaling)、TRPV1(proteintech)を用い、2 次抗体は anti-rabbit IgG HRP-linked 抗体 (cell signaling)を用いた。抗体反応後、洗浄し Supersignal<sup>TM</sup> West Dura(Thermo scientific)で 5 分間反応させた。溶液を取り除いて X 線フィルムに感光させた。

破骨細胞分化能：RAW264 細胞の破骨細胞分化能は RANKL の添加誘導による酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性細胞の出現により評価した。破骨細胞の検出は TRACP&ALP double-stain kit(Takara)を用いた。細胞は 3.7% formaldehyde で 10 分間固定処理した。精製水で 2 回洗浄後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性染色液を加えて 37 °C で 1~4 時間反応させた。精製水で 3 回洗浄し、倒立光学顕微鏡にて観察した。

骨芽細胞分化能：MC3T3-E1 の骨芽細胞への分化能は、細胞に 10mM β-グリセロリン酸を

添加し 48 時間後の nodule の形成能で評価した。

#### 4. 研究成果

破骨前駆細胞の分化：市販の細胞培養用の培養器はポリスチレン製の素材で出来ており、化学的には炭素 C と水素 H で構成されている。ところが本研究は培養細胞に伸展ストレスを加える環境設定が必要になった。すなわち、培養器に伸縮性が求められる。この伸縮性が可能となるのはシリコン製となる。シリコン表面は化学的には Si と酸素 O で構成されている。これら培養器の表面の官能基の違いが細胞の付着に影響しているかを検討した。

RAW264 細胞をポリスチレン製素材の 24well マルチウェル(PS)とシリコン製ストレッチチャンバー(SC)に播種し、培養器底面への付着能を比較した。PS では細胞の付着は極めて良く、播種 24 時間後には浮遊している細胞は認められなかった。細胞は底面に接着していることが確認された。さらに 48 時間培養後に破骨細胞分化因子である RANKL を加え培養したところ、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)陽性の多核巨細胞の出現が観察された。一方、SC では播種 24 時間後に浮遊した細胞が多数観察された。さらに 48 時間しても細胞増殖は認められなかった。これに伸展ストレスを加えたところ全ての細胞が底面から剥離した。このことから、SC にマトリックスコーティングを施すことにした。コーティング剤としてコラーゲン I、Ply-L-Lysin(PLL)、ファイブロネクチンの 3 種類を用いた。コラーゲン I、Ply-L-Lysin(PLL)、ファイブロネクチンコーティング群共に RAW264 の細胞付着性は PS に播種した細胞とほぼ同程度であった。その後 48 時間培養後の細胞増殖を経過観察し PS 群との差異は観察されなかった。そこで、RANKL を添加し破骨細胞への分化能について検討した。その結果、3 種のコーティング群共に TRAP 陽性細胞の出現は PS に比べ低いものであった。3 種のコーティング材をそれぞれ 2 種類ずつ混和してコーティングをおこない同様に分化能を評価したが、1 種コーティングと同様な結果を示した。次にこれらの結果が RAW264 細胞に特異的に生ずるか否かを検証するために、予備的実験として、マウス骨髄由来破骨前駆細胞を用いて分化能を評価した。しかしこの細胞に M-CSF 及び RANKL を添加しても破骨細胞分化誘導は認められた。以上の結果から、破骨前駆細胞から破骨細胞への分化過程には RANKL のような液性因子の他に、培養器材の持つ物理的要因が関与している可能性が考えられる。

骨芽細胞の分化：SC 上における MC3T3-E1 の付着、細胞増殖、分化条件を検討した。SC にマトリゲルでコーティングした条件下 MC3T3-E1 を播種し、継続的に経過観察した。細胞の付着、増殖ならびに細胞形態が PS における細胞状況が同様であった。そこで培養 7 日に石灰化誘導剤である β-グリセロリン

酸を添加して nodul 形成を確認した。次に伸展ストレスによる MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化過程を誘導するかを検討した。その結果伸展ストレスは MC3T3-E1 の nodul 形成が対照群に比べ高いことが明らかになった(図1)。

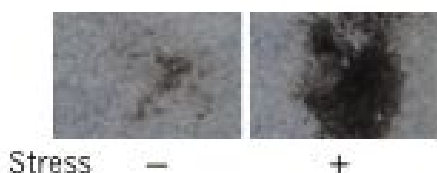


図1 伸展ストレスによるnodul形成

次に伸展ストレスによる MC3T3-E1 の分化機構にどのような細胞内シグナル伝達経路が関与しているかを検討した。PKC 経路、MAPK 経路として ERK1/2、p38、SAPK/JNK のリン酸化活性をウエスタンブロッティングで検索した。その結果、伸展ストレス群と対照群では p-PKC、p-p38 の出現に顕著な差は認められなかった。また p-SAPK/JNK はいずれの群とも出現は認められなかった。一方、p-ERK1/2 は伸展ストレス群が対照群に比べ培養3日目ですでに強い出現が認められ、さらに6日目でその差が顕著に認められた(図2)。

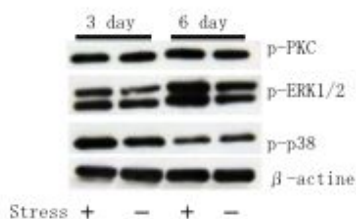


図2 伸展ストレスによる細胞内シグナルの変化

硫化水素処理後に伸展ストレスを与えた時の細胞内シグナル伝達として p-ERK1/2 の出現を検討した。硫化水素およびストレスを処理していない群(対照群)に比べ、硫化水素処理群の p-ERK1/2 の出現が強く認められた。硫化水素とストレスを合わせることで、ストレス単独より p-ERK1/2 の出現が強く認められた。硫化水素は Ca イオンチャネルである TRPV1 を活性化するとの報告があることから、MC3T3-E1 においても TRPV1 の出現が硫化水素あるいは伸展ストレスと関連するかを検索した。その結果、硫化水素処理により対照群に比べて TRPV1 の出現誘導が認められた。そしてその誘導は伸展ストレスによっても認められた。硫化水素処理した細胞に伸展ストレスを与えても TRPV1 の出現誘導は減少することなく維持された(図3)。

現在、伸展ストレスだけではなく圧縮ストレ

ス条件下、そして硫化水素の処理条件についても検討を加えて、その時の細胞内シグナルの動態の解明を進めている。

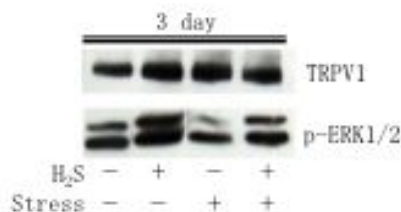


図3 伸展ストレスおよび硫化水素による細胞内シグナルの動態

## 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

今井 敏夫 (IMAI TOSHIO)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号：90120617

### (2) 研究分担者

那須 優則 (NASU MASANORI)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号：50130688

### (3) 連携研究者

八重垣 健 (YAEGAKI KEN)

研究者番号：40166468

日本歯科大学・生命歯学部・教授

(4)連携研究者

伊井 久貴 (II HISATAKA)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：00746604