

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20636

研究課題名(和文) 糖尿病製剤DPP-4阻害薬の破骨細胞形成および矯正学的歯の移動への影響の検討

研究課題名(英文) DPP-4 inhibitor impedes lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption

研究代表者

石田 匡彦 (ISHIDA, MASAHIKO)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80770891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DPP-4阻害薬は、*in vivo*にてLPSでの破骨細胞数、骨吸収、RANKLおよびTNF- α の発現が減少した。*In vitro*での破骨細胞形成では、DPP-4阻害薬の影響はなかった。さらにDPP-4阻害薬は、LPSによるRANKLの間質系細胞からの発現にも影響を与えなかった。しかしながら、TNF- α のマクロファージからの発現は抑制した。この結果より、DPP-4阻害薬は、破骨細胞形成に直接的には影響ないTNF- α を発現することでLPSの*in vivo*での破骨細胞形成を抑制することができた。

研究成果の概要(英文)：The effect of DPP-4 inhibition on LPS-induced osteoclast formation *in vivo*, we subcutaneously injected LPS with or without DPP-4 inhibitor into mouse calvariae. The mean number of TRAP-positive osteoclasts in the group that underwent LPS and DPP-4 inhibitor co-administration was significantly lower than in the group that underwent LPS administration alone. TRAP and cathepsin K mRNA expression levels were significantly lower in the LPS and DPP-4 inhibitor co-administered group, compared with the LPS-administered group. *In vitro*, there were no direct effects of DPP-4 inhibitor or DPP-4 on RANKL- and TNF- α -induced osteoclastogenesis, or LPS-induced RANKL expression in stromal cells. Nevertheless, macrophages from LPS and DPP-4 inhibitor co-administered mice exhibited lower TNF- α mRNA expression than macrophages from LPS-only mice. However, TNF- α mRNA expression was not reduced in LPS and DPP-4 inhibitor co-treated macrophages *in vitro*, compared with macrophages treated with LPS alone.

研究分野：矯正

キーワード：破骨細胞 DPP-4阻害薬

1. 研究開始当初の背景

近年、食事の欧米化に伴い糖尿病など生活習慣病を有する患者が問題となっている。それゆえ、矯正患者でも糖尿病患者の割合が増加している。糖尿病を抑制する治療薬としてインスリン抵抗性改善薬、スルフォニル尿素薬が多く使われ効果をあらわしてきた。しかしながら、血糖を抑える作用によって重症低血糖症に陥って痙攣を起こしたり、意識がなくなるケースが起きるなどの副作用も見られてきた。そこで新しく DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4) 阻害薬が近年開発され、低血糖による副作用が見られないことから DPP-4 阻害薬を使用する患者が増加している。

糖を摂取するとインスリン上昇作用が現れる。この作用を誘導するホルモンとしてインクレチンがある。食事により血糖値が上昇すると、腸からインクレチンが血液中に分泌され、それが膵臓の細胞に働きかけインスリンの分泌を促し血糖を下げることとなる。DPP-4 とはこのインクレチンを阻害する働きがあり、DPP-4 阻害薬はこの DPP-4 の働きを阻害することにより、インクレチンの分解を防ぎ、インスリンの働きを強めるものである。

糖尿病患者では破骨細胞形成が増加することが報告されており、糖尿病と破骨細胞が重要な関係があると考えられている (Pacios, S., et. Al, FASEB. J., 2012)。歯科矯正治療において、歯に矯正力を負荷させると歯は歯槽骨内を移動するが、この際、圧迫側では破骨細胞が出現し骨吸収が起こる。したがって、歯の移動において破骨細胞による骨吸収は重要である。破骨細胞分化は、M-CSF 存在下で RANKL が作用すると起こる。近年、TNF- α でも同様の作用があることがわかってきた。一方、矯正学的歯の移動には TNF- α による破骨細胞形成が重要であることが TNF 受容体欠損マウス (TNF- α receptor 1 and 2 deficient : TNFRs KO) を用いた実験で報告されている。(Kitaura, H., et. al, J. Dent. Res., 2008)。また、DPP-4 阻害薬は TNF- α を抑える効果が報告されている。(Hirakawa, H., et. Al, Plos one., 2015)。そこで我々は、この糖尿病治療薬である DPP-4 阻害薬が破骨細胞形成に対してどのような影響を与えるか、さらに DPP-4 阻害薬が TNF- α が関与する歯の移動にどのような影響を与えているのかを検証していく。これらの影響を知ることにより、糖尿病製剤を常用している患者では矯正学的歯の移動にどのような影響があるのかを知ることができ、治療に活用することにつながるかと考えている。これらのことが解明されれば、歯科領域全般および矯正歯科領域のみならず医療の発展に役に立つと考えている

2. 研究の目的

本研究では糖尿病製剤である Linagliptin が破骨細胞形成および骨吸収にどのような影響を及ぼすのかを検討する。

3. 研究の方法

(1). 破骨細胞形成および骨吸収に対する DPP-4 阻害薬の *in vivo* の解析 (28 年度)

LPS による破骨細胞形成に対する DPP 阻害薬の作用の組織学的検討

マウス (Wild type, C57BL6/J, 8 週齢雄) の頭蓋部に LPS (100 μ g / 100 μ l) および DPP-4 阻害薬 (NVP DPP 728, フナコシ株式会社、東京、日本) (1mg/kg) を組み合わせて 5 日間連続で注入し、頭蓋骨の組織切片を作製する。その後 TRAP 染色を行い、破骨細胞数を測定し、評価する。

濃度依存的評価

DPP 阻害薬の濃度依存的に検討するため、DPP-4 阻害薬の濃度を変え LPS と組み合わせて注射し、TRAP 陽性細胞の破骨細胞形成を濃度依存的に検討する。

TNF- α による破骨細胞形成に対する DPP 阻害薬の作用の生化学的検討

頭蓋骨を液体窒素で凍結して粉砕し、そこから RNA 抽出を行い、破骨細胞形成マーカーである TRAP, cathepsin K, MMP9, 3integrin, Calcitonin receptor の mRNA の遺伝子発現量を real-time PCR 法を用いて定量的に測定し、評価する。さらに、破骨細胞形成必須因子である RANKL の発現についても検討する。

TNF- α による骨吸収に対する DPP 阻害薬の評価

マウス頭蓋骨に TNF- α および DPP 阻害薬を組み合わせて注射し、骨吸収像をマイクロ CT を用いて撮影し、骨吸収を評価する。さらに、マウスより血液を採取し、骨吸収マーカーである CTX 血中濃度を評価する。

(2). DPP-4 阻害薬の破骨細胞形成に対する *in vitro* の解析 (29 年度)

DPP-4 阻害薬の破骨細胞形成への影響

マウスの大腿骨および脛骨より骨髓細胞を採取し、骨髓細胞を M-CSF 100ng/ml の濃度で 3 日間培養し、付着細胞を M-CSF 依存性マクロファージ (破骨細胞前駆細胞) として集め、その細胞を M-CSF 50ng/ml の存在下で RANKL もしくは TNF- α 、さらに DPP-4 阻害薬を加えて 3 日間培養し、破骨細胞形成にダイレクトな影響があるかについて調べる。破骨細胞形成は、M-CSF の存在下で TNF- α で可能であることが報告されている。

また、破骨細胞形成のシグナル伝達に対する影響を調べるためウエスタンブロット法にて解析を行う。TNF- α の下流での活性化を解析するため、MAPKs (JNK, p-38, ERK)、NF- κ B, AKT の経路への影響を評価する。さらに、破骨細胞形成マーカーである TRAP, cathepsin K, MMP9, 3integrin, Calcitonin receptor の mRNA の遺伝子発現量を real-time PCR 法を用いて定量的に測定し、評価する。

ストローマ細胞への影響 (RANKL の発現) について

マウスより取り出した全骨髓細胞を 10cm ディッシュに 1.0×10^7 個播種し、10% FBS、100IU/ml penicillin G および 100 μ g/ml streptomycin が含まれた D-MEM 10ml を加え 2 週間培養した。浮遊細胞を除去し、付着細胞をストローマ細胞として使用する。TNF- α および DPP-4 阻害薬を加え 3 日間培養し破骨細胞形成必須因子である RANKL の mRNA の遺伝子発現量を real-time PCR 法を用いて定量的に測定し、評価する。さらに TNF- α の下流での活性化を解析するため、MAPKs (JNK、p-38、ERK)、NF- κ B、AKT の経路への影響をウェスタンブロット法にて評価する。

(3) . DPP-4 阻害薬の歯の移動に対する影響 (29 年度)

マウス(Wild type、C57BL6/J、8 週齢雄)の上顎切歯と左側第一臼歯間に 10gf の NiTi クローズドコイルスプリングを全身麻酔下 (セボフルランの吸引) で装着し、左側第一臼歯を近心移動する。左側第一大臼歯頬側皮下にマイクロシリンジを用いて DPP-4 阻害薬を加えたもの注入し抑制効果を見る。歯の移動量は、歯科用シリコーン印象材を用いて経時的に上顎を印象採得し、各印象における第一臼歯と第二臼歯間距離を実体顕微鏡下で計測することにより測定する。12 日目に屠殺し顎骨部をとり、組織切片を作成し、TRAP で染色して、破骨細胞形成を評価する。さらに DPP-4 阻害薬の濃度依存的な検討も行う。また、矯正学的歯の移動後に抜歯を行い、圧迫測の局所より total RNA を採取し、real-time PCR にて TNF- α の産生がどのように変化するかを検討する。

4 . 研究成果

C57BL6/J マウス頭蓋骨皮下に LPS100 (100 μ g/100 μ l) および DPP-4 阻害剤 Linagliptin (30 μ g/100 μ l) を毎日 5 日間投与し、6 日目に屠殺し、組織切片を作製した。LPS 単独では破骨細胞形成が多く認められたが、同時に Linagliptin を投与したものでは破骨細胞形成が抑制されることが分かった。また、mRNA を採取し、破骨細胞マーカーである TRAP、カテプシン K をリアルタイム PCR にて解析したところ、同時に Linagliptin を投与したものではそれぞれの発現が抑制された。また、破骨細胞形成必須因子である RANKL の発現、炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 でも同時に Linagliptin を投与したものでは抑制された。また、マウス頭蓋骨をマイクロ CT 撮影し、骨吸収を評価したところ同時に Linagliptin を投与したものでは骨吸収が抑制された。さらに、骨吸収マーカーである CTX を ELISA キットにて解析したところ同様な結果が得られた。

In vitro では破骨細胞前駆細胞に TNF- α および RANKL の存在下で DPP-4 および Linagliptin を投与したものでは破骨細胞形成に直接的に影響を与えないことが認められた。さらに DPP-4 阻害薬は、LPS による RANKL の間質系細胞からの発現にも影響はなかった。しかしながら、TNF- α のマクロファージからの発現は抑制した。この結果より、DPP-4 阻害薬は、破骨細胞形成を直接的には影響ない TNF- α 発現を減少することで LPS の *in vivo*での破骨細胞形成を抑制することが示唆された

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 1 件)

(1) Saeed, J, Kitaura, H, Kimura, K, Ishida, M, Sugisawa, H, Ochi, Y, Kishikawa, A., Takano-Yamamoto T: IL-37 inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption *in vivo*. Immunol. Lett. S0165-2478(16)30049-9.

doi: 10.1016/j. 査読あり

[学会発表](計 9 件)

(1) Shen WR, Kimura K, Ishida M, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S, Qi J, Ohori F, Noguchi T, Marahleh A, Kitaura H., Inhibition of lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption *in vivo* by glucagon-like peptide-1 receptor agonist. International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2018, Sendai, Miyagi, Japan. Jan 13th-14th 2018.

(2) Qi J, Kimura K, Ishida M, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S, Shen WR, Ohori F, Noguchi T, Marahleh A, Kitaura H., Comparisons with and without retention in orthodontic relapse mouse models. International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2018, Sendai, Miyagi, Japan. Jan 13th-14th 2018.

(3)石田匡彦、木村桂介、島和弘、沈威任、北浦英樹：糖尿病治療薬 DPP-4 阻害薬による破骨細胞形成および骨吸収への影響について、第 76 回日本矯正歯科学会大会、札幌 (2017)

(4) Ochi Y, Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Saeed J, Kishikawa A, Qi J, Takano-Yamamoto T., Effect of IL-18 on mechanical loading-induced osteoclastogenesis and bone resorption. The 2017 Japan-NIH joint Symposium. Sendai, Japan. Feb 15th-17th 2017.

(5) Shen WR, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Ochi Y, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S., Qi J, Kitaura H., Exendin-4, a GLP-1

receptor agonist, suppresses inflammation-induced osteoclast formation and bone resorption. The 12th International Workshop on Biomaterials in Interface Science. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2017, Sendai, Miyagi, Japan. Aug 4th-5th 2017.

(6) Shen WR, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Ochi Y, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S., Qi J, Kitaura H., The effects of diabetic medicine exendin-4 for osteoclast formation and bone resorption. Sapporo, Japan. Oct 18th-20th 2017.

(7) 木村桂介、石田匡彦、島和弘、杉澤晴紀、越智由美子、岸川明子、小川紗衣香、齊嘉煒、沈威任、北浦英樹：脂肪酸受容体 GPR120 の破骨細胞形成および骨吸収との関連性の検討、第 76 回日本矯正歯科学会大会、札幌 (2017)

(8) 島和弘、木村桂介、石田匡彦、杉澤晴紀、越智由美子、岸川明子、小川紗衣香、齊嘉煒、沈威任、北浦英樹：破骨細胞形成および骨吸収に対する脂肪細胞に発現するケモカイン CXCL12 の作用の検討、第 76 回日本矯正歯科学会大会、札幌 (2017)

(9) 杉澤晴紀、北浦英樹、上田恭介、木村桂介、石田匡彦、越智由美子、岸川明子、小川紗衣香、山本照子：TiN コーティングを施した歯科矯正用ワイヤーの摩擦力の検討、第 76 回日本矯正歯科学会大会、札幌 (2017)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

石田 匡彦 (ISHIDA MASAHIKO)
東北大学大学院歯学研究科、助教
研究者番号：80770891

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()