

平成 30 年 5 月 31 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：16K20637

研究課題名(和文) 脂肪酸受容体GPR120の破骨細胞形成および矯正学的歯の移動に対する影響の検討

研究課題名(英文) Analysis for stimulation of GPR120 for osteoclast formation and orthodontic tooth movement

研究代表者

木村 桂介(Kimura, Keisuke)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70712909

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)：野生型マウスの頭蓋部皮下にPBS、LPS、LPS+DHA、LPS+DHA+AH7614、DHAを注射しLPSによる破骨細胞形成およびGPR120シグナルの破骨細胞形成抑制効果を確認した。マウスの頭蓋部皮下に上記試薬を投与し屠殺後、頭蓋骨の組織切片を作成しTRAP染色を行い頭蓋骨縫合部における破骨細胞形成を評価した。LPS単独で作用させた場合、TRAP染色陽性である破骨細胞が多数確認された。一方、同時にDHAを作用させた場合は破骨細胞数が有意に減少した。さらにGPR120の阻害剤であるAH7614と一緒に注射したもので破骨細胞形成が誘導され抑制効果が減弱することを確認した。

研究成果の概要(英文)：PBS, LPS, LPS+DHA, LPS+DHA+AH7614, and DHA were injected subcutaneously on the calvariae of wild-type mice to confirm the LPS-induced osteoclast formation and the inhibitive effect of GPR 120 signaling pathway on LPS-induced osteoclast formation. After supracalvarial injections of reagents, mice were euthanized for preparing paraffin sections of mouse calvaria. TRAP staining was then performed to evaluate osteoclast formation in the suture mesenchyme. In the LPS injection group, many TRAP positive osteoclasts were induced. On the other hand, there was a significant reduction of osteoclast number in the LPS+DHA injection group. In addition, the inhibitive effect of DHA on osteoclast formation was suppressed by selective GPR120 antagonist AH7614, which was shown in the LPS+DHA+AH7614 injection group.

研究分野：骨代謝

キーワード：GPR120 DHA 破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、現代病として生活習慣病が問題視されてきている。その中の一つに肥満が挙げられる。遊離脂肪酸の受容体の一つに G protein-coupled receptor 120 (GPR120)があり最近の研究で、この GPR120 が欠損したマウスに高脂肪食を与えると肥満や脂肪肝を引き起こし肥満に関係していることが判明した。また、この GPR120 からのシグナル伝達によって破骨細胞形成が抑制されることも新しく発見された。

一方、矯正学的歯の移動は歯槽骨のリモデリングにより歯の移動が起こる。このリモデリングには破骨細胞による骨吸収が重要な役割を果たしている。これらのことから肥満の患者において矯正治療を行った際に矯正学的歯の移動に影響が出る可能性がある。そこで本研究では GPR120 と破骨細胞形成および矯正学的歯の移動に対する関連性を調べるのが目的である。

## 2. 研究の目的

近年、生活習慣病が社会的な問題となっている。その中の肥満および肥満に伴う脂肪肝、糖尿病など代謝異常が特に問題視されている。食事性肥満には遺伝的要因が関連すると考えられていたが、現在までにその原因遺伝子は不明だった。しかし、最近の研究でこの GPR120 遺伝子が欠損したマウスで肥満や脂肪肝などが発生し、この GPR120 が肥満に関与していることが発見された。また、この GPR120 は破骨細胞前駆細胞に多く発現しアゴニストである脂肪酸が結合すると NF- $\kappa$ B のシグナル経路を抑制し、それに付随して NFATc1 (破骨細胞形成マスター転写因子) のダウンレギュレーションを起こして破骨細胞形成を抑制することが分かった。また、この GPR120 のシグナル経路はアポトーシス促進因子に分類される Bim の発現の誘導を促進して、破骨細胞をアポトーシスへと誘導することが分かり破骨細胞分化に対して影響力を持つ可能性

が示唆されている (Kim,HJ.,et.al, J.Cell Physiol.,2015)。この破骨細胞形成に必須な因子として RANKL があげられるが、TNF- $\alpha$  によっても破骨細胞形成が誘導されることが報告されている (Kobayashi,K., et.al, J. Exp. Med.,2000)。また GPR120 と RANKL による破骨細胞形成との関連性は調べられているが GPR120 と TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成との関連は調べられていないのが現状である。一方、歯科矯正治療において、歯に矯正力を負荷させると歯根膜が圧迫され、圧迫側で破骨細胞が出現し骨が吸収され歯が移動する。この矯正学的歯の移動には TNF- $\alpha$  が関与していることが TNF 受容体欠損マウスを用いた実験で報告されている (Kitaura, H., et. al, J. Dent. Res., 2008)。以上のことから GPR120 が破骨細胞形成に影響を持つことから矯正学的歯の移動にも影響することが予想される。そこで本研究では GPR120 と TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成の関連性を明らかにする。その上で矯正学的歯の移動モデルを用いて歯の移動に対する GPR120 の影響を検討する。矯正学的歯の移動に対する GPR120 の影響が詳細にわかれば実際に肥満患者の矯正歯科治療を行う際にどのような影響があるのか解明できると考えている。

## 3. 研究の方法

### (1)GPR120 の RANKL および TNF- $\alpha$ による破骨細胞形成に対する影響の *in vitro* での解析。

野生型マウスの大腿骨から骨髓細胞を採取し、破骨細胞前駆細胞に分化させ M-CSF と TNF- $\alpha$  および RANKL を添加して破骨細胞形成を行う。その際に GPR120 もアゴニストである Docosahexaenoic acid(DHA)を加え GPR120 刺激の破骨細胞形成への影響を調べる。

### (2)GPR120 の LPS による破骨細胞形成および骨吸収に対する影響の *in vivo* での解析。

野生型マウスの頭蓋部皮下に LPS、DHA、GPR120 の阻害剤である AH7614 を注射し組織

切片を作成して破骨細胞形成への GPR120 の影響を調べる。

マウス頭蓋骨より mRNA を採取し破骨細胞形成マーカーの発現を調べる。

血中の骨吸収マーカーである Ⅰ型コラーゲン架橋 C 端テロペプチド (CTX-1) を調べ GPR120 の骨吸収に対する影響を調べる。

マウス頭蓋骨の  $\mu$ CT 撮影を行い頭蓋骨表面における骨吸収に対する影響を調べる。

#### 4. 研究成果

##### (1)GPR120 の RANKL および TNF- $\alpha$ による破骨細胞形成に対する影響の *in vitro* での解析。

破骨細胞形成の過程で分化が進むと破骨細胞上の GPR120 の発現が増加することが報告されている。骨髄細胞由来の破骨細胞前駆細胞に破骨細胞形成必須因子である M-CSF と RANKL を作用させると破骨細胞形成が誘導される。そこに GPR120 のアゴニストである DHA を追加し培養すると破骨細胞形成が抑制された。また、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  によっても破骨細胞が形成されることが知られている。そこで M-CSF と TNF- $\alpha$  で破骨細胞を誘導し、そこに同じように DHA を添加すると破骨細胞形成を抑制した。

##### (2)GPR120 の LPS による破骨細胞形成および骨吸収に対する影響の *in vivo* での解析。

野生型マウスの頭蓋部皮下に PBS、LPS、LPS+DHA、LPS+DHA+AH7614(GPR120 阻害薬)、DHA を 5 日間注射し 6 日目に屠殺した。頭蓋骨組織切片の TRAP 染色を行い破骨細胞形成を評価した。LPS を注射したマウスでは TRAP 陽性の破骨細胞が多数確認できた。しかしながら LPS と DHA を注射したものでは破骨細胞形成が抑制された。さらに GPR120 阻害薬である AH7614 を加えて注射すると DHA による破骨細胞抑制作用が減弱し破骨細胞が確認できた。

上記試薬を注射したマウス頭蓋骨より mRNA を採取し破骨細胞形成マーカーの発現を調べたところ RANK、TNF- $\alpha$  の mRNA の発現が LPS を注射したもので上昇した。また DHA を加え

ると mRNA の発現量が有意に減少した。

上記試薬を注射したマウスの血中の骨吸収マーカーである CTX-1 をエライザーにて確認したところ LPS を注射したもので上昇した。しかしながら DHA を加えると CTX-1 が有意に減少した。

同じように試薬を注射したマウス頭蓋骨をホルマリン固定後  $\mu$ CT 撮影を行い骨吸収に対する影響を調べた。LPS を注射したマウス頭蓋骨の表面が PBS 群と比較して粗造になっていた。一方で LPS と DHA を注射したものは骨の表面は滑沢なままであった。また AH7614 をさらに加えると破骨細胞吸収抑制効果が減弱して骨表面に骨吸収像が確認できた。

以上のことから脂肪酸受容体である GPR120 のシグナル刺激は *in vitro* および *in vivo* おいて破骨細胞形成を抑制した。GPR120 のノックアウトマウスは現在繁殖中で今後実験を進める予定である。

#### 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4件)

1. Sugisawa, H., Kitaura, H., Ueda, K., Kimura, K., Ishida, M., Ochi, Y., Kishikawa, A., Ogawa, S., Takano-Yamamoto T: Corrosion resistance and mechanical properties of titanium nitride plating on orthodontic wires. Dent. Mater. J. 30;37(2):286-292.(2018) 査読有り  
doi <https://doi.org/10.4012/dmj.2016-348>  
Dental Materials Journal
2. Shen WR., Kimura, K., Ishida, M., Kimura, K., Sugisawa, H., Kishikawa A, Shima, K., Ogawa S., Qi J, Kitaura H.: The glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption via inhibition of TNF- $\alpha$  expression in macrophages. J. Immunol. Res. Volume 2018, Article ID5783639, 10 pages(2018).  
doi <https://doi.org/10.1155/2018/5783639>  
Journal of Immunology Research 査読有
3. Kitaura, H., Ishida, M., Kimura, K., Sugisawa, H., Kishikawa A, Shima, K., Ogawa S., Qi J, Kitaura H., Shen WR: Role of muramyl dipeptide for lipopolysaccharide-mediated biological activity and osteoclast activity. Anal.

Cell. Pathol. Volume 2018, Article ID 8047610, 8 pages (2018)

doi <https://doi.org/10.1155/2018/8047610>

Analytical Cellular Pathology 査読有

4.木村桂介,杉澤晴紀,井田裕人,石田匡彦,島和弘,岸川明子,小川紗衣香,北浦英樹: 歯科矯正用Ni-Ti ワイヤーに対する表面コーティングによる耐食性の解析 東北矯正歯科学会雑誌、25(1):9-15 (2017) 査読有 [学会発表](計 9 件)

1.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. 2018.

2.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. 2018.

3.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. The 70th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society. Sapporo, Japan. 2017.

4.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 年

5.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 年

6.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 年

7.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 年

8.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. 2017.

9.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. 2017.

[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  
木村 桂介(Kimura, Keisuke)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号: 70712909

(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 ( )

