

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17242

研究課題名(和文) GLP-1受容体作動薬が及ぼす破骨細胞形成および骨吸収への影響

研究課題名(英文) GLP-1 receptor 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・大学院非常勤講師

研究者番号：80770891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GLP-1受容体作動薬を含むインクレチン関連糖尿病薬の破骨細胞形成、骨吸収およびそのメカニズムを解明するのが目的である。インクレチン関連糖尿病薬の破骨細胞形成における影響を *in vitro* および *in vivo* で評価した。インクレチン関連糖尿病薬は、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 *in vivo* での破骨細胞形成を抑制することがわかった。インクレチン関連糖尿病薬は TNF- α 発現を減少することから、TNF- α が関与している矯正学的歯の移動の際に影響がある可能性が考えられる。この結果より糖尿病治療中の患者の矯正治療には注意が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、歯科矯正領域において糖尿病を有する患者が増加している。糖尿病は生活習慣病の一つである。近年、新しい糖尿病治療薬として副作用の少ない GLP-1 受容体作動薬を含むインクレチン関連糖尿病薬を使用する患者が増加している。このことからインクレチン関連糖尿病薬を使用している糖尿病患者において、矯正学的歯の移動にどのような影響が及ぼされているのか解明されていない。現在、歯科矯正領域において糖尿病を有する患者に対する治療のメカニズムは解明されていないのが現状であり、解明は急務な課題である。糖尿病治療患者に対する矯正学的歯の移動のメカニズムを解明できれば、矯正歯科医療分野に与える波及効果は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the effect of incretin-related medicine, including GLP-1 receptor agonist, on osteoclast formation and bone resorption of mice. We investigated effect of incretin-related medicine for osteoclast formation and bone resorption *in vitro* and *in vivo*. We found that the incretin-related medicine may inhibit osteoclast formation and bone resorption by inhibiting TNF- α production. In conclusion, these may be one of the medicines to prevent bone resorption. Furthermore, we have to pay attention to patients who take it for diabetes treatment in our clinical practice.

研究分野：破骨細胞

キーワード：糖尿病 破骨細胞 糖尿病製剤 矯正学的歯の移動

1 . 研究開始当初の背景

近年、歯科矯正領域において食事の欧米化に伴い生活習慣病に罹患した患者が増加してきている。生活習慣病の1つである2型糖尿病は膵臓からのインスリン分泌不全、もしくはインスリン抵抗性により血中の血糖値が高くなる状態である。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引き起こす、意識がなくなるケースが起きるなどの重篤な副作用も見られてきた。そこで新しくインクレチン製剤が近年開発され、低血糖による昏睡などの副作用が見られないことからインクレチン製剤を使用する患者が増加している。インクレチン製剤は大きく二つに分けられ、GLP-1受容体作動薬を含むインクレチン関連糖尿病薬とDPP-4阻害薬である。

糖を摂取すると血糖値が上昇する。すると小腸よりインクレチンホルモンが血中に分泌され、膵臓の細胞に作用しインスリンが分泌され血糖値を下降させる。インクレチンホルモンはDPP-4によりすぐに分解されてしまい、膵臓へインクレチンホルモンが正常に作用しなくなることにより、膵臓からのインスリンの分泌量が減少する。その結果糖尿病患者では血糖値の下降が起こらず、血糖値が高い状態で維持されてしまう。一方、DPP-4阻害薬は、DPP-4からの分解を受けず、膵臓細胞のGLP-1受容体に直接結合してGLP-1と同様の作用を発揮し、インスリン分泌作用を増加するものである。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。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。また、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)。一方、インクレチン関連糖尿病薬はTNF- α の作用を抑える効果があるとの報告がある (J. Endocrinol 59(4):1030-7, 2010)。インクレチン関連糖尿病薬で破骨細胞形成の影響について解明できれば糖尿病患者薬剤治療時の矯正治療による歯の移動に与える影響を明らかにすることができ、矯正治療への対応の向上が期待される。

2 . 研究の目的

生活習慣病の1つである糖尿病患者は増加傾向であり、現在糖尿病を疑われるものは28年度厚生労働省の発表では2000万人を超える。近年、今までに起こっていた副作用を解決したインクレチン関連糖尿病薬の新しく開発され使用者が増加してきている。一方、矯正学的歯の移動にはTNF- α による破骨細胞形成が関与していることが知られており、このインクレチン関連糖尿病薬はTNF- α の作用を抑制すると報告されている(J. Endocrinol

59(4):1030-7, 2010)。現在までにインクレチン関連糖尿病薬の破骨細胞形成への影響を研究した報告は無い。さらに現在、糖尿病患者が服用している薬剤と矯正治療による歯の移動の影響に関する報告もまだなく、本研究は独創的である。インクレチン関連糖尿病薬が歯の移動に与える影響を解明し、また、インクレチン関連糖尿病薬が歯の移動による骨吸収に影響を与えるのかを検討することは歯科矯正領域では必須であり、非常に意義のある研究である。一方で、破骨細胞の形成は破骨細胞前駆細胞からの分化によるものが知られており、破骨細胞前駆細胞に M-CSF 存在下で RANKL が作用すると破骨細胞形成が起こる。近年では RANKL 以外にも TNF- α でも同様に破骨細胞形成が起こることも知られている。インクレチン関連糖尿病薬が直接的に破骨細胞に関与するのか、もしくは TNF- α が作用するストローマ細胞にどのような影響を与えるのかについての報告もなく、これらが解明されれば、糖尿病患者への矯正治療での対応はより一層向上し非常に意義のあることと考えられる。そこで本研究は、インクレチン関連糖尿病薬の破骨細胞形成、骨吸収およびそのメカニズムを解明するのが目的である。

3. 研究の方法

(1). 破骨細胞形成および骨吸収に対するインクレチン関連糖尿病薬の *in vivo* の解析

TNF- α による破骨細胞形成に対するインクレチン関連糖尿病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 TNF- α (1.5 μ g/100 μ l) およびインクレチン関連糖尿病薬を組み合わせ、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

インクレチン関連糖尿病薬の濃度依存的に検討するため、インクレチン関連糖尿病薬の濃度を変え TNF- α と組み合わせ、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インクレチン関連糖尿病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碎し、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、 β 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インクレチン関連糖尿病薬の評価

マウス頭蓋骨に TNF- α およびインクレチン関連糖尿病薬を組み合わせ、注射し、骨吸収像を図のようにマイクロ 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) インクレチン関連糖尿病薬の破骨細胞形成に対する *in vitro* の解析

インクレチン関連糖尿病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 、さらにインクレチン関連糖尿病薬を加えて 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。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、 β 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 およびインクレチン関連糖尿病薬を加え 3 日間培養し TNF- α で誘導される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エスタンブロット法にて評価する。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞形成に対するインクレチン関連糖尿病薬の影響

LPS が引き起こす破骨細胞形成をインクレチン関連糖尿病薬が抑制させることが認められた。

(2) 骨吸収に対するインクレチン関連糖尿病薬の影響

LPS が引き起こす骨吸収をインクレチン関連糖尿病薬が抑制させることが認められた。

(3) 炎症性サイトカイン発現に対するインクレチン関連糖尿病薬の影響

LPS が引き起こす炎症性サイトカインである TNF- α の発現をインクレチン関連糖尿病薬が抑制することを認めた。同様に RANKL、M-CSF および血清中の TNF- α の発現でも同様な結果が認められた。

(4) *in vitro* での破骨細胞形成への影響

インクレチン関連糖尿病薬は破骨細胞形成に関して直接的に関与していないことが認められた。

(5) 腹腔内マクロファージによる TNF- α の発現への影響

In vivo ではインクレチン関連糖尿病薬を同時に作用させると抑制効果を認めたが、*in vitro*

では抑制効果を認めなかった。

本研究により、LPS によって引き起こされる破骨細胞形成および骨吸収をインクレチン関連糖尿病薬が抑制させることがわかった。破骨細胞形成マーカー、破骨細胞分化因子および破骨細胞形成必須因子である TRAP、cathepsinK、M-CSF および RANKL の発現をインクレチン関連糖尿病薬が抑制することが認められた。また、*in vitro* の bone marrow cell および bone marrow macrophage を使用した研究によりインクレチン関連糖尿病薬は破骨細胞形成に直接的な関与を示さないことを認めた。さらに腹腔内マクロファージによる TNF- α の発現では *in vivo* では TNF- α の発現が抑制されたが、*in vitro* では抑制されないことが認められた。以上の結果よりインクレチン関連糖尿病薬の抑制効果は、骨髄間質細胞における破骨細胞前駆体または M-CSF と RANKL 発現の分化と増殖に対する直接的な影響とは考えられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishida M, Shen WR, Kimura K, Kishikawa A, Shima K, Ogawa S, Qi J, Ohori F, Noguchi T, Marahleh A, Kitaura H.	4. 巻 109
2. 論文標題 DPP-4 inhibitor impedes lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption in vivo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 242-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田匡彦、沈威任、木村桂介、島和弘、北浦英樹
2. 発表標題 破骨細胞形成、骨吸収および破骨細胞関連サイトカインの発現への糖尿病治療薬DPP-4阻害剤の影響
3. 学会等名 日本矯正歯科学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考