

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592441

研究課題名（和文） 歯周組織再生に及ぼすアディポサイトカインの影響

研究課題名（英文） Effect of adipocytokines on periodontal regeneration

研究代表者

鎌田 愛子 (KAMADA AIKO)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：50140215

研究成果の概要（和文）：脂質代謝関連物質の動向を再生医療へ応用するために、歯周組織に及ぼすアディポサイトカインの影響を検索した。アディポサイトカインの中でもアディポネクチンが直接的に歯周組織に働き、アディポネクチンの作用不足は骨芽細胞の分化にも遺伝子発現レベルで抑制的に働くことが明らかになった。血中アディポネクチンが減少するメタボリックシンドロームでは硬組織形成が減速する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to apply adipocyte-derived biologically active molecules to tissue engineering, we investigated effect of adipocytokine on periodontal tissues. It was demonstrated that adiponectin, abundant adipocytokine, influenced to the tissues directly, and the failure of adiponectin action suppressed the progression of osteoblast differentiation. Therefore, low plasma adiponectin levels may cause not only insulin resistance and metabolic syndrome but also delay of bone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

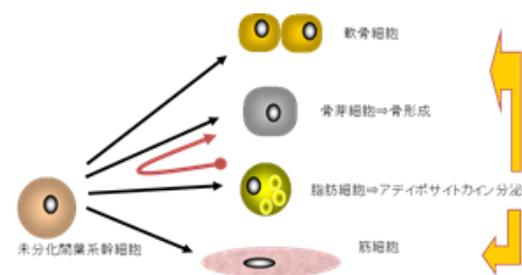
科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：再生医学、歯学、硬組織、アディポカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満により骨密度の増加をきたすことは良く知られていたが、おもに体重増加によって骨組織にメカニカルストレスがかかり、その結果として骨密度の増加が起こると考えられてきた。しかし、近年、脂肪組織が、単なるエネルギー貯蔵器官ではなく、内分泌臓器としてレプチン、アディポネクチンをはじめとしたさまざまな内分泌因子（アディポサイトカイン）を分泌していることが明らかになり、これらの因子が糖・脂質代謝のみならず、骨代謝への作用ももつことがわかってきた。また、骨髄組織においては加齢に伴い

脂肪髄化が進むことが知られており、これが、骨密度低下の一因になっていると考えられている。



骨芽細胞・脂肪細胞はともに間葉系幹細胞

を起源とし、間葉系幹細胞からこれらの細胞へのスイッチングに関して、加齢と伴に変化する調節機構として核内レセプターPPAR γ の存在が注目されており、アディポサイトカインの骨量調節の可能性とあわせて、脂質代謝関連分子による骨代謝調節作用の研究が急速に進展している。

(2) 歯科の領域では歯周組織再生が急務の課題として挙げられるが、歯周組織を構築する細胞のほとんどが、骨芽細胞と同様に間葉系幹細胞を起源としており、増殖・分化・代謝の過程で脂質代謝関連分子による調節を受けることは容易に考えられる。また、最近の全身疾患の研究から、正常な脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンはヒトの血液中に多く存在して、抗動脈硬化作用やインスリン抵抗性改善作用などの生理活性を有しており、肥満をきたす生活習慣（高脂肪食・運動不足など）によってその濃度が低下すると、血中の炎症性サイトカインTNF α がインスリン抵抗性に上昇し、生体を慢性の炎症状態に導き、メタボリックシンドロームを惹起することが明らかになってきている。脂肪細胞から合成分泌されたアディポサイトカインは血中に多量に存在することから、歯周組織再生にも重大な影響を及ぼすものと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 脂質代謝関連物質の動向を再生医療へ応用するために、歯周組織に及ぼすアディポサイトカインの影響を、まず、受容体の発現から検索する。

(2) 硬組織形成に関連するアディポサイトカインとその作用機序を明らかにする。

(3) 硬組織形成を促進する分子について、臨床応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯周組織より歯髓細胞・歯根膜細胞を単離培養し、実験に用いた。(大阪歯科大学「医の倫理委員会」承認)骨芽細胞分化の検討にはマウス前骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1およびヒト骨芽細胞用細胞株SaOS2を用いた。

(2) 培養細胞の遺伝子発現の検討のために、Total RNAを抽出精製し、real time RT-PCRを行った。

(3) アディポネクチン受容体の機能発現検討のためにアディポネクチン受容体AdipoR1およびAdipoR2のsiRNAを作製し、

細胞にトランスフェクトして、遺伝子発現を解析した。

(4) アディポネクチン機能ドメインの解析のために、マイクロアレイで遺伝子発現の網羅的な検索を行った。

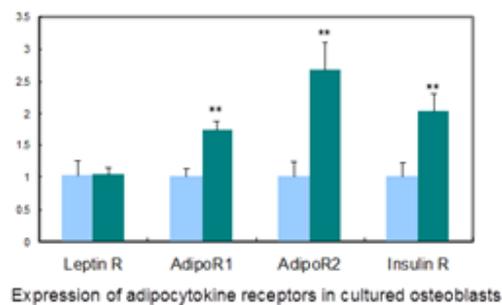
4. 研究成果

(1) 歯周組織由来細胞におけるアディポサイトカイン受容体の発現

ヒトの歯髓細胞および歯根膜細胞でアディポネクチン受容体およびレプチン受容体の発現を認めた。このことから歯周組織にアディポサイトカインの影響の及ぶことが示唆された。また、アディポネクチンおよびレプチン添加後の遺伝子発現を定量的に観察したところ、アディポネクチンが細胞の増殖や分化に関わることが明らかになった。

(2) 骨芽細胞におけるアディポサイトカイン受容体の発現

分化培地(DM; VC+ \square -グリセロリン酸)添加で分化誘導できるマウス前骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1を用い、DM非添加とDM添加による各アディポサイトカインレセプターの発現をreal time RT-PCRにて検討した。その結果、骨芽細胞の分化誘導で著明に発現が増加したのはアディポネクチン受容体で、レプチン受容体は変化せず、レプチンの直接的な作用は認められなかった。また、インスリン受容体の増加はアディポネクチンのインスリン感受性改善作用によるものと考えられた。

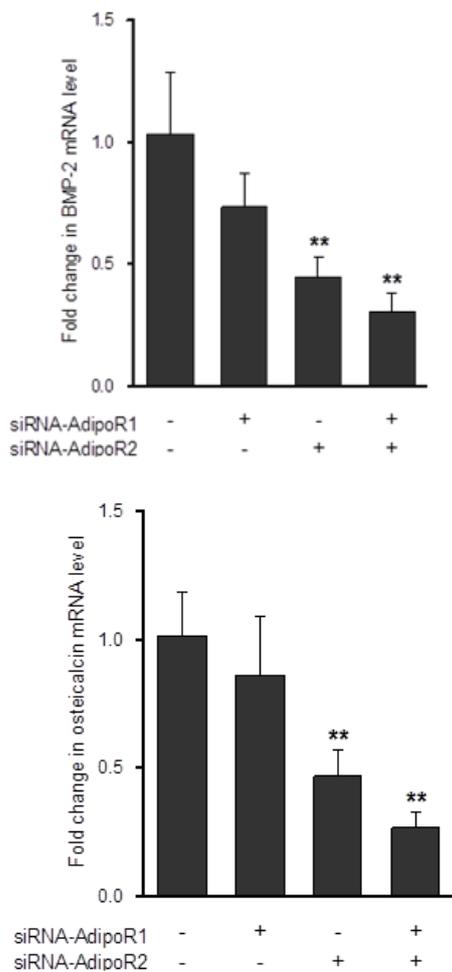


(3) アディポネクチンの作用

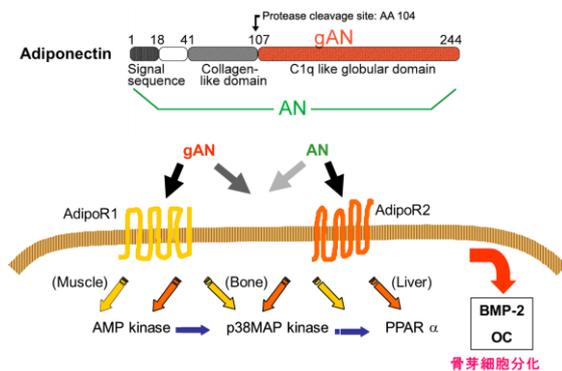
① アディポネクチン受容体の発現抑制

受容体発現の検討からアディポサイトカインの中でもアディポネクチンが骨代謝に直接的に関与することが示唆されたので、受容体のsiRNAを用いてこれを確認した。

その結果、アディポネクチン受容体AdipoR2の発現抑制はコラーゲンやRANKLの発現に影響を及ぼさなかったが、BMP-2やオステオカルシンの発現を著明に抑制した。

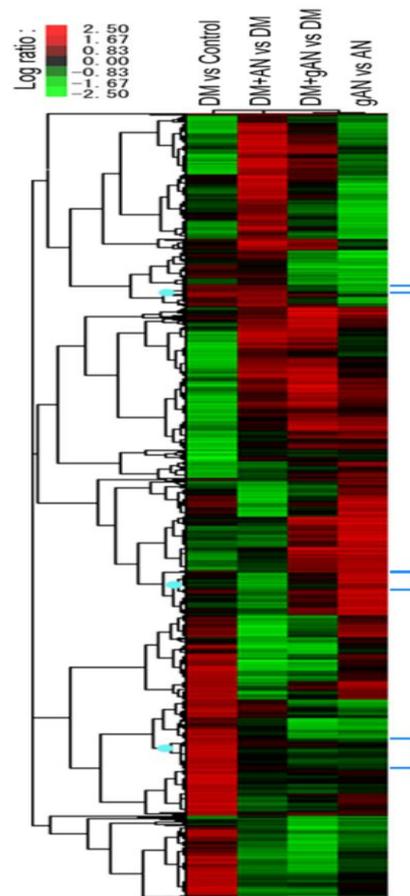


② アディポネクチン機能ドメインの役割
アディポネクチンは図に示すように2つの機能ドメインを持っている。C末端の球状ドメインはおもに AdipoR1 と、コラーゲン様ドメインを含む完全長のアディポネクチンは AdipoR2 と結合するといわれている。



そこで、完全長のアディポネクチン (AN) と球状ドメイン (gAN) を骨芽細胞に添加し、分化過程での遺伝子発現におよぼす影響をマイクロアレイで網羅的に観察した。発現の上昇したものを赤で、減少したものを緑であ

らわし、Heat Map を作成して可視化した。



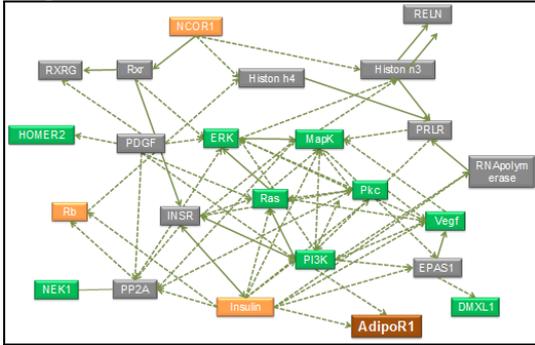
Map 上の特徴的なパターンを示す部分をクラスターに分類し、各クラスターで上昇している遺伝子の GO (gene ontology) term を抽出し、その機能を考察した。

分化培地添加で上昇する遺伝子群は骨芽細胞分化や細胞の成長に関連するものが多く、AN では Wnt のような骨代謝関連シグナル伝達系の遺伝子群やシグナル伝達の下流に位置する Jun に関連する遺伝子群が上昇していた。これに対し、gAN のみで上昇する遺伝子群は細胞形態や神経系および G タンパク質結合性受容体シグナル伝達系に関連していた。

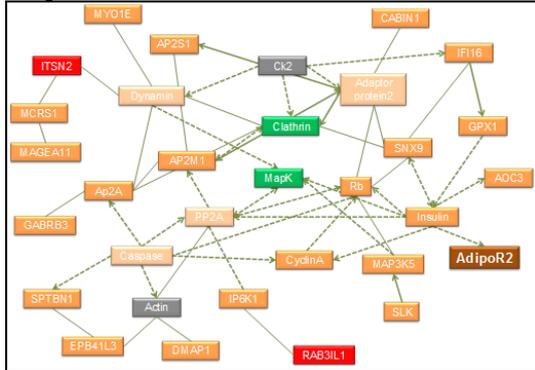
さらに、アディポネクチン受容体 AdipoR1、AdipoR2 および CDH13 が分類されるクラスターを抽出し、アディポネクチン受容体と類似の発現パターンを示す遺伝子群を mapping したところ、AdipoR1 を含むクラスターでは分化誘導刺激で減少する遺伝子が多いのに対し、AdipoR2 を含むクラスターでは多くの遺伝子が増加していた。CDH13 を含むクラスターでも上昇の傾向が見られた。

この結果から、骨芽細胞の分化誘導にはアディポネクチン受容体の中でも AdipoR2 や CDH13 が密接に関与することが考えられる。

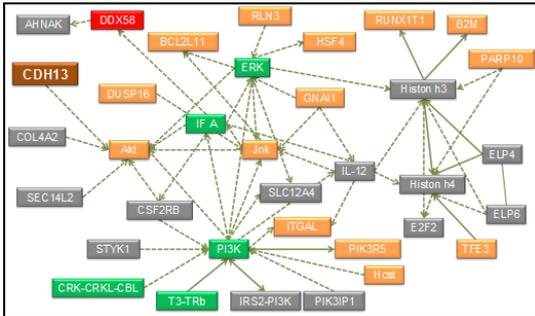
AdipoR1



AdipoR2



CDH13



(4) 再生への応用

① 完全長のアディポネクチンが骨芽細胞の分化に促進的に作用することが明らかになった。メタボリックシンドロームでは脂肪細胞におけるアディポネクチンの産生が著しく低下することが知られている。したがって、脂質代謝が異常な状態の患者に対し、歯周組織再生を試みる場合、血中アディポネクチン量、中でも完全長のアディポネクチン量が再生治療の予後に影響することが考えられる。

② アディポネクチンの機能ドメインで、球状ドメインは硬組織形成に抑制的に作用していた。完全長では促進的に作用することから、コラーゲン様ドメインが骨代謝に関与するものと考えられる。現在、硬組織形成促進因子にこのコラーゲン様ドメインが応用できないか、合成ペプチドを作成して検討を進めている。

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 6 件)

- ① メタボリックシンドロームと歯周疾患の発症. 池尾 隆, 鎌田愛子, 合田征司. 日本歯科医師会雑誌 査読無 63, 21-31, 2010.
- ② Effect of adiponectin on gene expression. TANABE K, KAMADA A, GODA S, IKEO T. J Oral Tissue Engin 査読有 7, 99-106, 2009.
- ③ Gene expression of adipocytokine receptors during osteoblastic differentiation. KAMADA A, IKEO T, YOSHIKAWA Y et al. (7 名) J Oral Tissue Engin 査読有 7, 53-60, 2009.
- ④ Failure of adiponectin action influences osteoblast-related gene expression. UENO M, KAMADA A, IKEO T. J Oral Tissue Engin 査読有 6, 159-166, 2009.
- ⑤ Influence of adipocytokines on differentiation of pro-osteoblastic cells. KAMADA A, IKEO T, YOSHIKAWA Y et al. (7 名) J Oral Tissue Engin 査読有 6, 17-23, 2008.

[学会発表] (計 12 件)

- ① KAMADA A, IKEO T et al. (4 名) Probable roles of adiponectin functional domains in osteoblastic differentiation. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2010, 2010 年 10 月 18 日, Toronto, CANADA.
- ② IKEO T, KAMADA A et al. (5 名) Expression of adiponectin receptors in osteoblastic cells. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2010, 2010 年 10 月 17 日, Toronto, CANADA.
- ③ KAMADA A, IKEO T et al. (4 名) Effect of Adiponectin Functional Domains on Osteoblast Differentiation. 88th International Association of Dental Research (IADR), 2010 年 7 月 15 日, Barcelona, SPAIN.
- ④ IKEO T, KAMADA A et al. (6 名) Relationship of gene expression between adiponectin receptors and osteoblastic differentiation markers. The 31st American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), 2009 年 9 月 14 日, Denver, CO, USA.
- ⑤ KAMADA A, IKEO T et al. (4 名) Effect of different forms of adiponectin on

gene expression profiles in osteoblasts.
The 31st American Society for Bone and
Mineral Research (ASBMR), 2009年9
月13日, Denver, CO, USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

鎌田 愛子 (KAMADA AIKO)
大阪歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：50140215

(2)研究分担者

岡崎 定司 (OKAZAKI JOJI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：80169094

池尾 隆 (IKEO TAKASHI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：40159603