

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 4 年 6 月 2 0 日現在

機関番号：3 2 6 2 2

研究種目：若手研究

研究期間：2020 ~ 2021

課題番号：2 0 K 1 8 5 1 5

研究課題名 (和文) モノカルボン酸トランスポーターを標的とした歯周病性骨破壊の制御

研究課題名 (英文) Regulation of Periodontal Bone Destruction by Targeting Monocarboxylate Transporters

研究代表者

今井 裕子 (Imai, Hiroko)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：1 0 8 4 9 1 9 4

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) : モノカルボン酸トランスポーター (MCT) は細胞膜に存在し、H⁺依存的に乳酸やピルビン酸などのモノカルボン酸を細胞内外に輸送する担体である。MCTはエネルギー代謝やpH調節に寄与することが知られている。本研究では、炎症性骨破壊におけるMCTの役割を明らかにすることを目的に研究を行った。マウス骨髄マクロファージにおいてMCT1をsiRNAで発現抑制すると破骨細胞形成は増加し、Nfatc1の発現は増加した。炎症性サイトカインであるIL-1 を添加すると、Mct1 siRNAによってNfatc1の発現は減少した。これらの結果からMCTの発現変化は炎症時の破骨細胞分化に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MCTはH⁺依存的に乳酸やピルビン酸などのモノカルボン酸を細胞内外に輸送する担体であることから、エネルギー代謝やpH調節に寄与することが知られていた。本研究はMCTの発現変化が破骨細胞分化に影響を与えること、さらに炎症性サイトカイン存在下の破骨細胞の遺伝子発現を変化させることを見出した。乳酸やピルビン酸はグルコースの代謝産物であり、歯周病増悪因子である糖尿病を基礎疾患として持つ歯周病患者の炎症性骨破壊に対してMCTを標的とした新規予防法及び治療法の開発につながる可能性を持つ。

研究成果の概要 (英文) : The monocarboxylic acid transporter (MCT) is present in the cell membrane and is a carrier that transports monocarboxylic acids such as lactic acid and pyruvate in an H⁺-dependent manner inside and outside the cell. MCTs are known to contribute to energy metabolism and pH regulation. The purpose of this study was to clarify the role of MCT in inflammatory bone destruction. Suppression of MCT1 expression by siRNA in mouse bone marrow macrophages increased osteoclast formation and increased Nfatc1 expression. Addition of the inflammatory cytokine IL-1 reduced Nfatc1 expression by Mct1 siRNA. These results suggest that changes in MCT expression may affect osteoclast differentiation during inflammation.

研究分野：歯周病

キーワード：MCT 歯周病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) モノカルボン酸トランスポーター (MCT) は 14 種類のサブタイプで構成されるファミリータンパク質であり、細胞膜に存在し、輸送される物質および水素イオン (H^+) 濃度に依存して細胞内外に物質を輸送する担体である。MCT はさまざまな物質を輸送し、筋肉、肝臓、神経細胞などで細胞のエネルギー代謝や細胞内 pH の恒常性維持に寄与すると考えられている。MCT のサブタイプによって輸送する物質は異なり、14 種類の MCT の中で、乳酸、ピルビン酸、ケトン体など、分子内にカルボキシ基をひとつ有するモノカルボン酸を輸送するのは MCT 1 から MCT 4 までの 4 種類である。

(2) 応募者は、マウス骨髄マクロファージを破骨細胞に RANKL で分化誘導する実験系で、MCT1~4 の阻害剤が破骨細胞分化に影響を与えることを発見した。さらに、siRNA を用いて遺伝子発現を抑制したところ、*Mct1* siRNA では破骨細胞分化が促進し、*Mct2* siRNA では逆に破骨細胞分化が抑制されることを見出した [Imai *et al.* Sci Rep. 2019 Oct 30;9(1):15608.]。MCT3 は網膜色素上皮と脈絡叢上皮にのみ発現しているため、マクロファージでの発現は確認できなかった。MCT4 は siRNA による破骨細胞分化への影響は認められなかった。MCT1 と MCT2 の発現変化が破骨細胞分化を変化させるというこの結果は MCT を標的とした骨代謝疾患の新規治療法の開発につながる可能性を持つと考えた。

2. 研究の目的

歯科における二大疾患の一つである歯周病は、歯周病原性細菌の感染に起因する歯周組織の炎症によって歯槽骨の吸収が生じ、歯が脱落する。この歯周病の病態の中核をなす炎症性骨破壊における MCT の役割を解析し、MCT を標的とした歯周病の新規予防・治療法を探索することを目的として研究を行った。また、MCT の基質である乳酸やピルビン酸はグルコースの代謝産物であり、糖尿病などの糖代謝異常疾患においてはその産生と細胞内濃度にも変化が生じていると考えられる。糖尿病は歯周疾患の増悪因子の一つであることから、炎症性骨吸収を引き起こす細胞である破骨細胞における糖代謝異常の影響を解析することも重要であると考え、実験を行った。

3. 研究の方法

6 週齢 ddY マウスの大腿骨および脛骨から骨髄細胞を分離した。10% ウシ胎児血清と 4000U/mL の M-CSF (マクロファージ・コロニー刺激因子) を含む培地 (α MEM) 中で骨髄細胞を 3 日間培養し、マクロファージ分画 (骨髄マクロファージ) を増殖させた。トリプシン処理で回収した骨髄マクロファージを 4000U/mL の M-CSF および 100 ng/mL の RANKL (receptor-activator of NF- κ B ligand) を含む、10%FBS 含有 α MEM 培地で 3 日間培養することで破骨細胞分化を誘導した。siRNA の導入はマクロファージ回収後に行い、siRNA 導入して 24 時間後に RANKL を添加した。炎症性サイトカインあるいは糖の添加は RANKL と同時に行った。破骨細胞形成の評価は TRAP 染色、破骨細胞分化のマスター遺伝子である *Nfatc1* の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で解析し、破骨細胞分化を評価した。

4. 研究成果

マクロファージに *Mct1* siRNA を導入し、炎症性サイトカインである IL-1 β 存在下で RANKL 刺激後 72 時間培養したところ Control siRNA に比べて *Mct1* siRNA を導入した細胞では *Nfatc1* の発現が減少した。炎症時でも MCT の遺伝子発現変化は破骨細胞分化関連遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性が考えられた。他の炎症性サイトカインで変化が見られるかは今後の検討課題である。

次に、歯周病を増悪させる因子の一つである糖尿病に着目し、高血糖状態を模して、高グルコース環境を設定して実験した。グルコースは解糖系の基質であり、MCT によって輸送される乳酸やピルビン酸の産生に影響を及ぼすと考えられる。培地中にグルコース (2.5mM、5mM、10mM) を添加すると破骨細胞分化が促進した。そこでさまざまな糖を培地中に添加したところ、スクロースは破骨細胞分化を抑制した。グルコースは水溶液中で六員環構造 (α 型、 β 型) と鎖状構造の平衡状態にあり、鎖状構造ではアルデヒド基を持つため還元性を示す。一方で、スクロースは非還元糖である。MCT によるモノカルボン酸の輸送は水素イオンの結合が必要であることから、培地中の糖の還元性によって破骨細胞分化が促進した可能性が考えられた。MCT は H^+ 依存的に乳酸やピルビン酸などのモノカルボン酸を細胞内外に輸送する担体であることから、エネルギー代謝や pH 調節に寄与することが知られていた。本研究はマクロファージにおける MCT の発現変化が破骨細胞分化に影響を与えること、さらに炎症性サイトカインまたは糖存在下のマクロファージにおける破骨細胞分化関連遺伝子の発現を変化させることを見出した。これらの結果から、乳酸やピルビン酸はグルコースの代謝産物であり、歯周病増悪因子である糖尿病を基礎疾患として持つ歯周病患者の炎症性骨破壊に対して MCT を標的とし

た新規予防法及び治療法の開発につながる可能性を持つことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|