

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18748

研究課題名(和文)脂質センサーGPR120の骨細胞を介する骨代謝および矯正学的歯の移動への影響

研究課題名(英文)Effect of lipid sensor GPR120 on osteocyte-mediated bone metabolism and orthodontic tooth movement

研究代表者

岸川 明子(Kishikawa, Akiko)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：10827273

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、TNF- α による破骨細胞形成および矯正学的歯の移動(OTM)に対するDHAの影響を検討した。TNF- α 単独、TNF- α およびDHAを注射した野生型(WT)およびGPR120欠損(KO)マウスの頭蓋骨内での破骨細胞形成と骨吸収を調べた。DHAは、WTマウスではTNF- α による破骨細胞形成と骨吸収を抑制したが、KOマウスでは効果を示さなかった。また、OTMに対するDHAの効果を検討した。また、DHAはWTマウスではOTMを抑制したが、KOマウスでは抑制しなかった。これらの結果から、DHAはGPR120を介して破骨細胞形成と骨吸収を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、n-3系不飽和脂肪酸の受容体としてG-Protein Coupled Receptor 120(GPR120)が同定され、GPR120欠損マウスでは高脂肪食による肥満が生じることからGPR120が食事性の肥満に関与していることが明らかになった。また、肥満男性は骨強度が低下することから、肥満が骨代謝にも影響を与えている可能性が示唆された。本研究は矯正歯科での肥満患者における矯正治療の臨床的な指針に役立てることができると考えられる。また、GPR120の破骨細胞および骨細胞における影響を明らかにすることができれば、肥満と骨代謝の関係を明らかにすることができ、医学の発展に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文):The present study was performed to investigate the influence of docosahexaenoic acid (DHA) on TNF- α -induced osteoclast formation and OTM in vivo. We examined osteoclast formation and bone resorption within the calvaria of both wild-type (WT) and G protein-coupled receptor 120-deficient (GPR120-KO) mice injected with PBS, TNF- α , TNF- α and DHA, or DHA. DHA inhibited TNF- α -induced osteoclast formation and bone resorption in WT mice, but had no effect in GPR120-KO mice. OTM experiments were performed in both mouse strains with or without regular injection of DHA, and the effects of DHA on osteoclast formation in the alveolar bones during OTM were examined. DHA also suppressed OTM in WT but not GPR120-KO mice. These results showed that DHA suppresses TNF- α -induced osteoclast formation and bone resorption via GPR120. TNF- α plays a crucial role in OTM, and therefore DHA may inhibit TNF- α -induced osteoclast formation and bone resorption in OTM.

研究分野：矯正歯科

キーワード：破骨細胞 GPR120 DHA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化に伴い、肥満やそれに伴う糖や脂質の代謝異常、これらに誘発される高血圧や糖尿病などの生活習慣病が、世界的に大きな問題となっている。近年、n-3系不飽和脂肪酸の受容体として GPR120 が発見され、GPR120 欠損マウスでは肥満や脂肪肝が生じることから、食事性の肥満との関連が明らかになった。一方、GPR120 は骨を作る骨芽細胞や骨を吸収する破骨細胞にも発現し、骨形成を促進し骨吸収を抑制することで骨代謝に影響を与えることが知られている。また、肥満男性は骨硬度が低下することから、肥満と骨代謝の関係についても注目されている。一方、骨細胞は、骨基質中に存在し、長い細胞突起を介して骨芽細胞や破骨細胞とネットワークを形成し、骨代謝に影響を与えられている。これまで、骨細胞は硬組織中に存在するため、その単離や機能解析が困難であった。近年の研究で、骨細胞に特異的に発現する dentin matrix protein 1 (DMP1) のプロモーター下流に蛍光蛋白を発現させる遺伝子組み換えマウスから、fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いて骨細胞を単離する方法が確立され、ここで初めて骨細胞において破骨細胞形成を誘導する RANKL がこれまで注目されていた骨芽細胞よりも強く発現していることが明らかになり、破骨細胞形成において骨細胞のはたらきがより重要であるという可能性が示された。しかし、骨細胞における GPR120 の働きについてはまだわかっていないのが現状である。以上のことから、骨芽細胞および破骨細胞に加え骨細胞における GPR120 の影響を調べることで、骨代謝における肥満の影響を解明できると考えられる。矯正学的歯の移動の際、TNF- α が圧迫側における破骨細胞形成に関与している。近年、骨細胞を欠損させたマウスでは、圧迫側における破骨細胞形成が減少し、歯の移動が減少したという報告があることから、矯正学的歯の移動における破骨細胞形成において骨細胞が非常に重要な働きをもつと考えられるようになった。肥満患者において矯正治療を行った際、肥満に付随した骨細胞における代謝異常により、矯正学的歯の移動に影響が与えられる可能性があると考えられる。このため、骨細胞における GPR120 刺激の影響と矯正学的歯の移動の関連性を調べることは、肥満患者の矯正治療を行う上で有意義であると考えられる。

2. 研究の目的

GPR120 からの刺激は、肥満および骨代謝の両方に関連している。GPR120 の破骨細胞および骨関連細胞を介した骨代謝への影響を調べた報告はほとんどなく、骨代謝と肥満の関係を解明するためには重要な研究である。また、*in vivo* での研究はほとんどないことから、マウスへの直接的な影響を調べることは、臨床的な観点から重要であると考えられる。このことから本研究は、GPR120 に結合する DHA の破骨細胞形成および矯正学的歯の移動に対する役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) TNF- α に誘導される破骨細胞形成における GPR120 の影響の解析

野生型マウスおよび GPR120 欠損マウス頭蓋部に TNF- α を 5 日間注入し *in vivo* での破骨細胞形成を行い、DHA の有無により破骨細胞数を評価した。さらに頭蓋骨よりトータル RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて、TRAP、RANKL および OPG の発現を比較検討した。さらに、骨吸収はマイクロ CT を用いて撮影し、骨の状態を評価した。

(2) 骨芽細胞への TNF- α 刺激に対する DHA の影響

新生マウス頭蓋骨より骨芽細胞を採取し TNF- α および DHA を作用させ RANKL および OPG の mRNA 発現を評価した。

(3) GPR120 欠損マウス由来骨芽細胞と野生型マウス由来破骨細胞前駆細胞における共培養実験

野生型マウスおよび GPR120 欠損マウスの頭蓋骨よりコラゲナーゼおよび EDTA を用いて骨芽細胞を採取し、これと野生型マウス由来破骨細胞前駆細胞を 1,25(OH)2D3 および Prostaglandin E2 (PGE2) を加えた α -MEM にて共培養を行った。この際、DHA を同時に投与した群との間で、破骨細胞形成を評価した。

(4) DHA の矯正学的歯の移動における影響

野生型マウスおよび GPR120 欠損マウスに上顎切歯と左側第一臼歯間に NiTi クローズドコイルスプリングを装着し第一臼歯に牽引力を 12 日間付与し、同時に DHA を投与し、歯の移動量および圧迫側破骨細胞形成を評価した。

4. 研究成果

(1) DHA は GPR120 活性化を介して *in vivo* で TNF- α により誘導される破骨細胞形成を抑制した。TNF- α によって誘導される破骨細胞形成が、GPR120 を介して DHA によって抑制されるかどうかを *in vivo* で検討した。TNF- α と DHA を WT および GPR120 欠損 (GPR120-KO) マウスの

頭蓋骨に注射した。5日間連続の TNF- α 注入後、組織切片上、頭蓋縫合部に多核の TRAP 陽性細胞が大量に認められた。一方、TNF- α および DHA を投与した WT マウスでは、TNF- α 単独投与に比べ、TRAP 陽性細胞の平均数が著しく減少した。一方、GPR120-KO マウスでは、DHA の抑制効果が減弱した。さらに、TNF- α および DHA を投与した WT マウスでは、TNF- α 単独投与に比べ、TRAP および RANKL mRNA レベルが有意に低下した。一方、GPR120-KO マウスに TNF- α および DHA を注入しても、TRAP や RANKL mRNA レベルに有意差は見られなかった。さらに頭蓋骨をマイクロ CT で解析すると DHA 投与で骨吸収が減少した。一方、GPR120-KO マウスに TNF- α および DHA を注入しても、骨吸収に有意差は見られなかった。

(2) DHA は GPR120 の活性化を介して TNF- α による骨芽細胞への RANKL 発現を抑制した

DHA が GPR120 の活性化を介して破骨細胞形成を抑制するメカニズムを明らかにするために、*in vitro* で骨芽細胞における RANKL mRNA の発現レベルを解析した。RANKL mRNA の発現量は、TNF- α で処理した群では、PBS または DHA のみで処理した群に比べ、高かった。一方、TNF- α と DHA の両方で処理した骨芽細胞は、TNF- α のみで処理した群と比較して、RANKL mRNA の発現レベルが低かった。一方、GPR120-KO 骨芽細胞を TNF- α で処理した場合と TNF- α に DHA を加えた場合で、RANKL mRNA の発現レベルは同程度であった。

(3) DHA は、骨芽細胞の GPR120 活性化を介して、共培養における TNF- α 増強破骨細胞形成を抑制した

TNF- α が骨芽細胞に RANKL を誘導し、破骨細胞形成を促進するかどうかを調べるために、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化に対する DHA の直接的影響を排除するために、GPR120-KO 破骨細胞前駆細胞を用いた。WT マウス由来の骨芽細胞、あるいは GPR120-KO および GPR120-KO 破骨細胞前駆細胞を PBS、TNF- α 、TNF- α および DHA、DHA を添加してプロスタグランジン E2 と 1,25(OH)2D3 存在下で培養を行なった。共培養において TRAP 陽性細胞数を計数した結果、WT の骨芽細胞を用いた共培養では DHA 処理に伴う TRAP 陽性細胞数の有意な減少が認められたが、GPR120-KO 骨芽細胞では認められなかった。

(4) DHA は GPR120 の活性化を介して OTM を抑制した

DHA を 12 日間投与した WT マウスと GPR120-KO マウスで、OTM を評価した。12 日目の OTM は、PBS あるいは DHA 投与した WT マウスの間で有意差があった。一方、PBS あるいは DHA 処理した GPR120-KO マウスの間では OTM に有意差は認められなかった。

上顎の組織切片を TRAP で染色し、破骨細胞を同定した。WT マウスでは 12 日目には TRAP 陽性細胞多く観察されたが、DHA 投与 WT マウスでは TRAP 陽性細胞は減少した。しかし、12 日目の TRAP 陽性細胞数は、DHA 処理した GPR120-KO マウスでは減少は見られなかった。

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
---------	---------