

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21592328

研究課題名（和文）  $\gamma$ -GTP を標的とした新規骨疾患治療法開発に関する検討研究課題名（英文） Exploratory study on the development of novel therapy targeting  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase

研究代表者

宮内 睦美 (MIYAUCHI MUTSUMI)

広島大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50169265

研究成果の概要（和文）：

慢性肝疾患患者では著明な高  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT)血症と続発性骨粗鬆症が起こる。GGT は最近新たに同定された破骨細胞形成促進因子である。本研究の目的は血清 GGT の上昇と骨量減少との関連性を調べ、そのメカニズムを明らかにすることである。BDL モデル動物では、血清 GGT 値の上昇に伴い、著明な破骨細胞増加を伴う骨量減少がみられ、GGT 中和抗体 (AGT3) 処理はそれを有意に改善した。In vitro で GGT は骨芽細胞を介した破骨細胞形成を促進し、骨芽細胞分化を抑制した。また、歯周組織での GGT 上昇は歯槽骨破壊を誘導し、抗体投与は歯槽骨破壊を抑制した。

GGT 中和抗体 (AGT3) は肝疾患に伴う骨粗鬆症や歯周病の治療薬として有効であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Cholestatic liver diseases often manifest the increased levels of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) and secondary osteoporosis. GGT is known as a novel bone resorbing factor that stimulates osteoclast formation. The aim of this study was to elucidate the mechanisms by which GGT causes bone reduction.

In BDL rats with elevation of serum GGT level, bone reduction with increase of osteoclasts was evident. These changes were significantly attenuated by AGT3. In vitro study showed significant upregulation of osteoclastogenesis via osteoblasts and inhibition of osteoblast differentiation with GGT stimulation. Moreover upregulation of GGT in periodontal tissue induced alveolar bone destruction with osteoclastogenesis, whereas antibody treatment reduced it. Therefore managing the elevated GGT by AGT3 may become a novel therapeutic agent for secondary osteoporosis and periodontitis in cholestatic liver diseases.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔病理学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード： $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, 慢性肝疾患, 二次性骨粗鬆症, 抗体治療, 骨量減少, 破骨細胞性骨吸収, 骨芽細胞分化, 歯周炎

## 1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患において、2次的骨粗鬆症が起こり病的骨折の可能性が高まること知られている。また、肝疾患と歯周炎の状態の正の相関を示唆する疫学的報告もある。

近年、新飯田らは、GGTが100IU程度の低濃度で、その酵素活性に依存せずに骨髄間質細胞におけるreceptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)の発現を誘導し、破骨細胞形成を促進する新規の骨吸収刺激因子であることをみだし、血清GGTの上昇に警鐘を鳴らしている。よって、肝疾患患者における血清GGTの上昇は破骨細胞を活性化し、骨粗鬆症や歯周病における歯槽骨破壊などの骨破壊性疾患のリスクファクターとなる可能性がある。この点を明らかに出来ればGGTを標的とした新規骨疾患治療法開発に繋がると考える。しかしながら、今日までGGTと骨代謝とを結びつけた報告は少なく、慢性胆道性肝疾患に伴うGGTの上昇と骨量減少との関係やGGTが歯周炎に及ぼす影響について調べた研究は皆無である

## 2. 研究の目的

①高GGT血症モデルを用い、GGT上昇と骨量減少の関連性を明らかにし、GGTの骨吸収活性中和抗体による治療効果を検討する。②In vitroでGGTの破骨細胞形成や骨芽細胞形成におよぼす影響を調べ、骨量減少を誘導するメカニズムを明らかにする。③肝疾患に伴う血清GGTの上昇が歯周炎に伴う歯周組織破壊の増悪因子となるかを検討する事を目的としている。最終的にはGGTを標的とした新規骨疾患治療方法や歯周病治療方法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. 高GGT血症モデル(胆道結紮(BDL)ラット)を用いた検討

高GGT血症が骨量減少におよぼす影響を検討し、GGTの骨吸収活性部位に対する抗体(AGT3)がGGTの誘導する骨量減少におよぼす改善効果について下記の評価項目について解析する。

①DEXAによる骨密度の測定、② $\mu$ CTによる大腿骨遠心端部の計測、③大腿骨遠心骨端部の組織計測学的観察、④TRAP染色による破骨細胞数の計測、⑤血清GGT値の測定、⑥骨組織におけるRANKL, OPG, IL-6, TNF- $\alpha$ のRT-PCRによる検出を行いSham operationを行った対照群(SO群)と比較検討する。

### 2. 高GGT血症モデルにおけるLPS誘導歯槽骨破壊の検討

①組織学的変化、②TRAP染色による破骨細胞数の検討

### 3. GGTが骨芽細胞に及ぼす影響の検討

①GGT刺激による破骨細胞形成に関わる因子(RANKL, OPG, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ など)や破骨細胞の局所への動員に関わる因子(MCP-1, MIP-2)の発現の変化をmRNA(RT-PCR)や蛋白(ELISA)レベルで検討する

②GGT刺激が骨芽細胞分化マーカー(ALPase, BSP)発現や石灰化能におよぼす影響についてmRNA(RT-PCR)や蛋白(ELISA)レベルで検討する。

## 4. 研究成果

### 1. 胆道結紮(BDL)ラットを用いた検討

Table1はSO群とBDL群におけるGGTを含む肝疾患マーカーやビリルビン、活性化ビタミンDの血清値を示す。

Table 1  
Biochemical parameters

	SO	BDL	P-value
Total bilirubin(mg/dl)	0.00 $\pm$ 0.00	8.14 $\pm$ 0.69	< 0.0001
Serum GGT (U/l)	0.33 $\pm$ 0.49	40.67 $\pm$ 9.18	< 0.0001
Serum AST (U/l)	140.40 $\pm$ 28.95	542.30 $\pm$ 145.82	< 0.0001
Serum ALT (U/l)	37.50 $\pm$ 8.41	134.80 $\pm$ 23.18	< 0.0001
Active metabolite Vit.D <sup>25</sup> (pg/ml)	265.70 $\pm$ 39.08	158.30 $\pm$ 30.00	< 0.0001
Initial body weight (g)	265.40 $\pm$ 5.42	282.00 $\pm$ 3.82	0.1722
Final body weight (g)	332.10 $\pm$ 5.57	308.20 $\pm$ 5.79	0.0002

SO, sham-operated group; BDL, bile duct ligated group; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; U, international unit; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine aminotransferase

BDL群ではGGTを含む肝疾患マーカーとされる酵素群や総ビリルビンが著明に上昇し、活性化ビタミンDは有意に減少していた。よって、BDL群では手術後2週間で明らかな肝障害が誘導され、高GGT血症が生じていた。

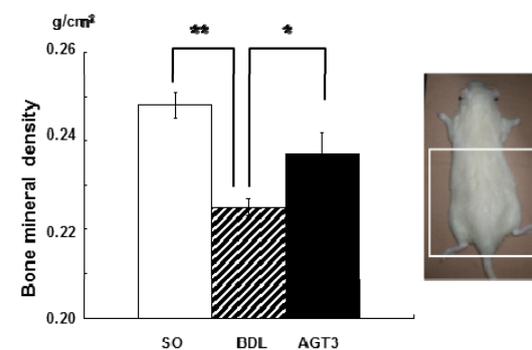


図1. 骨密度

図1の白枠に示す領域の骨密度は、BDL群で

有意に減少し ( $P < 0.01$ ), AGT 3 群では有意な改善を示した ( $P < 0.05$ ).

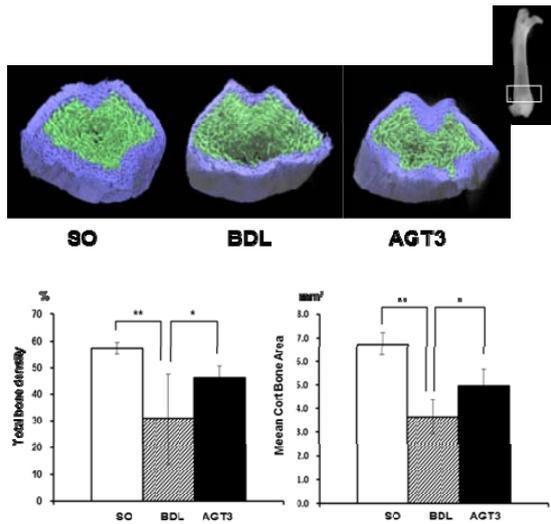


図 2.  $\mu$ CT と解析結果

図 2 は大腿骨遠位骨端部の  $\mu$ CT 像を示す. BDL 群では骨量が著しく減少している. 特に皮質骨における骨量の減少は著明で, 皮質骨の菲薄化が顕著である ( $P < 0.01$ ). AGT3 投与により骨梁の減少や皮質骨の面積減少は有意に改善している ( $P < 0.05$ ).

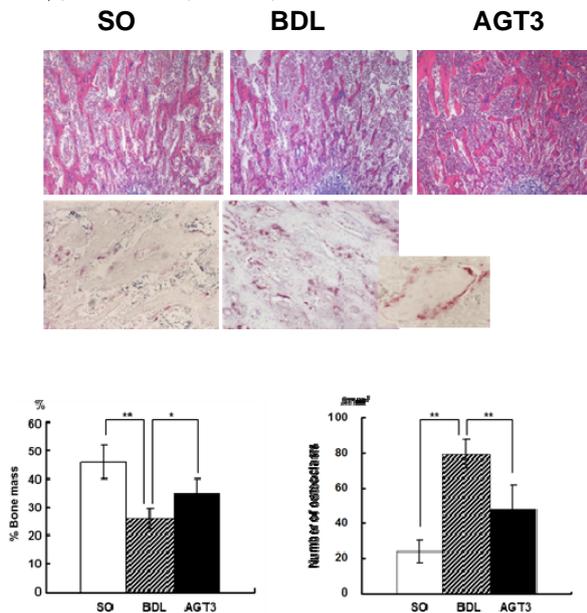


図 3. 組織学的変化と骨梁%, 破骨細胞数の解析

組織学的に BDL 群における海綿骨骨梁数は減少し, 骨梁幅も狭くなっていた. AGT3 群では骨梁数の減少が抑制された. BDL 群の骨梁周囲には TRAP 陽性の破骨細胞が増加し, 盛んに骨吸収を営んでいた. BDL 群で減少した骨量%は AGT3 投与で有意に改善した ( $P < 0.05$ ).

一方, BDL 群でみられた破骨細胞数の有意な増加は, AGT3 群で有意に減少していた ( $P < 0.01$ ).

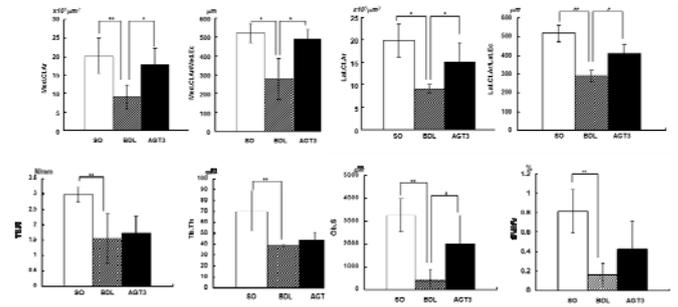


図 4. 組織計測学的パラメーターの解析

組織計測学的解析結果は皮質骨の厚さと面積が BDL 群で著明に減少し, AGT3 投与によって有意に回復していた. 一方, 海綿骨のパラメーターである Tb.N, Tb.Th の減少に AGT3 抗体投与は影響しなかった. Obs, OV/TV の減少は改善する傾向を示す程度に留まった.

## 2. 高 GGT 血症モデルにおける LPS 誘導歯槽骨破壊の検討

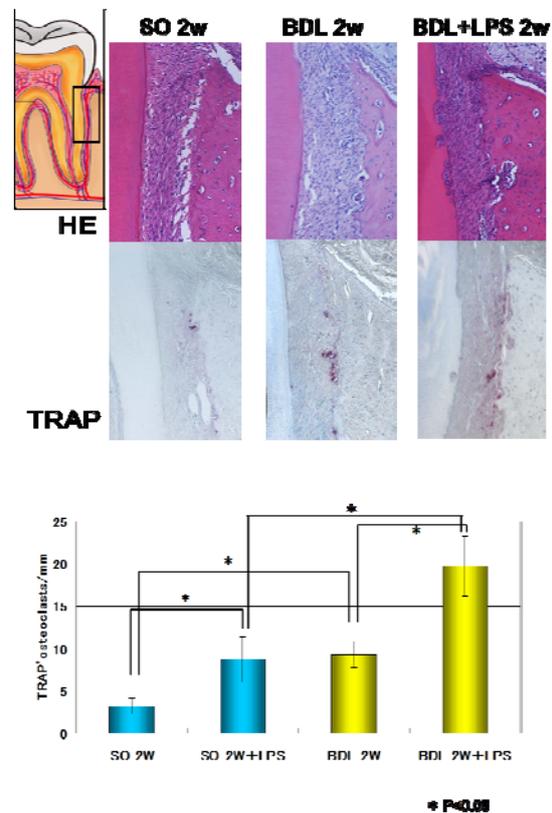


図 5 歯槽骨への影響

BDL に伴う高 GGT 血症は歯周組織における GGT 濃度を高め, 歯槽骨の破骨細胞性骨吸収

を活性化し、LPS 刺激による歯槽骨の破壊をさらに促進することが明らかとなった。よって肝障害に伴う高 GGT 血症は歯周炎に伴う歯槽骨破壊のリスクファクターとなると考えられる。

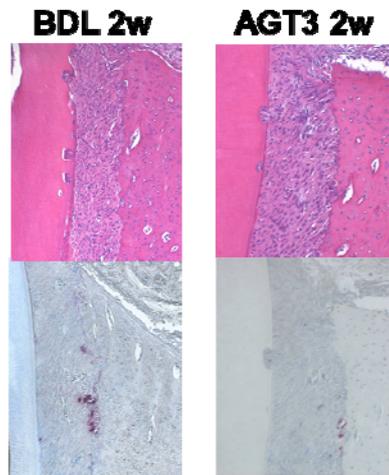


図 6. AGT3 抗体処理が歯槽骨破壊におよぼす影響

AGT3 抗体投与によって歯槽骨に沿って出現する破骨細胞数が著しく抑制された。

### 3. GGT が骨芽細胞に及ぼす影響の検討

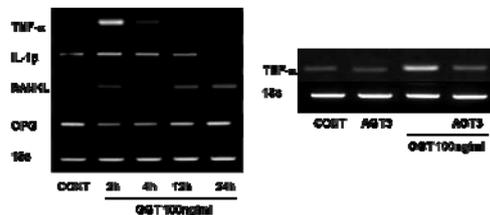


図 7. 破骨細胞誘導に関わる遺伝子への影響

GGT 刺激によって骨芽細胞系細胞 ST2 の TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , RANKL mRNA 発現は上昇する。一方、OPG-mRNA 発現は抑制される。よって GGT は骨芽細胞を介した破骨細胞形成を促進することが明らかとなった。また AGT3 抗体前処理は GGT による TNF- $\alpha$  mRNA 発現上昇を有意に抑制した。

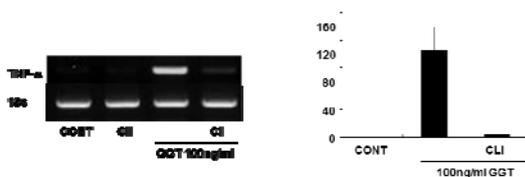


図 8. GGT 誘導 TNF- $\alpha$  mRNA 発現における TLR4 経路の関与

GGT は TLR4 受容体に結合し、サイトカイン発現を誘導することが示唆されている。そこで TLR4 シグナル伝達系をアダプター分子 MD88 以前の部位で抑制する TLR4 特異的な阻害剤 CLI-095 を 6 時間前投与し、GGT で刺激したところ、TNF- $\alpha$  mRNA 発現はほぼ完全に抑制された。

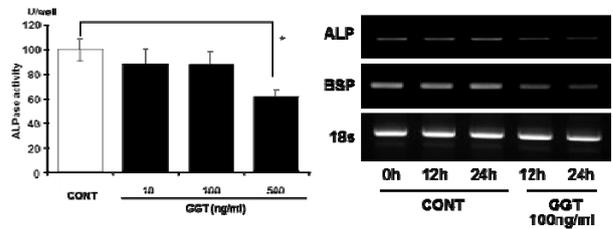


図 8. ALP 活性ならびに骨形成関連遺伝子発現におよぼす影響

MT3T3-E1 細胞を GGT で刺激した。骨芽細胞の ALP 活性は GGT で有意に抑制された ( $P < 0.05$ ) ALP および BSP 遺伝子発現は 12 時間、24 時間で抑制された。

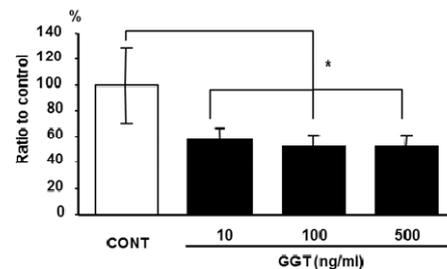
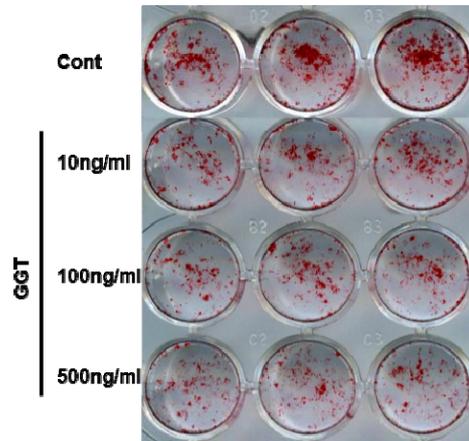


図 9. 骨芽細胞の石灰化能におよぼす影響

ラット primary 骨芽細胞の石灰化能におよぼす GGT の影響を検討した。GGT 処理によって

骨芽細胞が形成する石灰化物は著しく減少した。各 well あたりの ALZ 量は有意に減少していた。(P<0.05)

以上、慢性肝疾患に伴う高 GGT 血症は破骨細胞性骨吸収を促進し、骨芽細胞の骨形成能を抑制することによって、2 次的な骨粗鬆症を誘発することが明らかになった。また、高 GGT 血症による歯周組織での GGT 濃度の上昇は、歯周病原細菌由来 LPS の誘導する破骨細胞形成を相乗的に増加させるリスクファクターであることが明らかとなった。抗 GGT 抗体 AGT3 は GGT の誘導する破骨細胞誘導を抑え、骨量減少を改善することが示された。

よって、GGT 中和抗体 (AGT3) は肝疾患に伴う骨粗鬆症や歯周炎際の歯槽骨破壊の治療薬として有効であると考えられた。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

1. Miyauchi M, Kawazoe Y, Inubushi T, Takata T. hyper- $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT)emia is a potent risk factor for osteoporosis. The 15th International Congress of Oral Pathology and Medicine 16-20 Aug 2010, Souel, KOREA

2. Miyauchi M, Kawazoe Y, Takata T.  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) is a potent risk factor of periodontitis. 58th JADR Annual Meeting 20-21 Nov 2010, Kitakyusyu, JAPAN

3. Kawazoe Yusuke, Miyauchi Mutsumi, Takata Takashi. Influence of elevation of GGT by cholestatic liver disease on bone and LPS induced alveolar bone destruction. 3rd The International Workshop on Biodental education & Research, 7-8 Feb 2009, Hiroshima JAPAN

4. Takata T, Kawazoe Y, Miyauchi M, Niida S. Elevation of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase with cholestatic liver diseases is a potential risk factor of osteoporosis and periodontal disease. 32nd The Annual Scientific Meeting of the Association for Dental Sciences of the Republic of China, 27-29 Nov 2009, Takao TAIPEI

5. 川添祐亮, 宮内睦美, 古庄寿子, 新飯田俊平, 高田 隆. 歯肉溝滲出液中  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性を用いた歯周診断システムの構築の可能性について. 第 52 回日本歯周病学会春季学術大会, 2009 年 5 月 15-16 日, 岡山市

6. 宮内睦美, 川添祐亮, 古庄寿子, 新飯田俊平, 高田 隆. 高  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase 血症が骨破壊に及ぼす影響について. 第 20 回 日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2009 年 7 月 29-31 日, 札幌市

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮内 睦美 (MIYAUCHI MUTSUMI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 50169265

##### (2) 研究分担者

高田 隆 (TAKATA TAKASHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 10154783

北川 雅恵 (KITAGAWA MASAE)

広島大学・病院・助教

研究者番号 : 10403627

##### (3) 連携研究者

新飯田俊平 (NIIDA SYUNPEI)

国立長寿医療研究センター・室長

研究者番号 : 10137630