

## 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 6月15日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592667

研究課題名（和文）口臭原因物質による破骨細胞誘導と歯槽骨吸収：その分子機構解析

研究課題名（英文）Effect of oral malodorous compound on the osteoclast differentiation and alveolar bone loss.

研究代表者

今井 敏夫（IMAI TOSHIO）

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：90120617

研究成果の概要（和文）：本研究は口臭原因物質である揮発性硫黄化合物の破骨前駆細胞から破骨細胞への分化誘導機構を解明することを目的とした。マウス骨髄由来破骨前駆細胞に生理的濃度の硫化水素を曝露させたところ、RANKL 非存在下で酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性細胞の出現頻度が増加した。その時に ERK1/2 のリン酸化活性の誘導も認めた。RAW264 細胞に低濃度 NaHS 処理させたところ、PKC のリン酸化が強く発現した。PKC インヒビター GF109203X で前処理後、NaHS が誘導する PKC、c-Raf、ERK1/2 のリン酸化は顕著に抑制された。以上の結果は、生理的濃度の硫化水素による破骨細胞の分化誘導は PKC、c-Raf、ERK1/2 の経路を介して情報が伝達していることを強く示唆した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to elucidate the signal transduction mechanisms of hydrogen sulfide-induced osteoclast differentiation in primary cultured osteoclast precursor cells and RAW264 cells. Hydrogen sulfide at physiologic concentrations in mouth air induced the differentiation of mouse bone marrow-derived osteoclast precursor cells in the absence of RANKL. Moreover, hydrogen sulfide activated ERK1/2 phosphorylation in the osteoclast precursor cells. A low concentrations of NaHS induced PKC phosphorylation in RAW 264 cells. When pretreatment with PKC inhibitor (GF109203x), NaHS-induced the activation of PKC, c-Raf and ERK1/2 in RAW264 cells were diminished. These results suggested that hydrogen sulfide at physiologic concentrations stimulate the osteoclast differentiation through the PKC, cRaf, ERK1/2 pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：予防歯科学

## 1. 研究開始当初の背景

慢性歯周炎は歯槽骨の吸収が特徴的病態である。しかし、歯槽骨吸収に関する分子機構の研究は軟組織炎症に比べ遥かに少ない。歯周炎の発生には、口腔内細菌の代謝産物である LPS が深く関与するが、同じ代謝産物、口臭原因物質（揮発性硫黄化合物：硫化水素、メチルメルカプタン）は、LPS と同じ分子機構で歯周病原性を発揮する。本研究グループは、歯周ポケット内濃度より低い揮発性硫黄化合物が、歯肉線維芽細胞のコラーゲン合成の阻害や分解、アポトーシスなどを惹起すると報告した (Yegaki K, Jpn Dent Sci Rev, 44, 100-108, 2008)。また genomic レベルで、DNA に大きな損傷を与えることも報告し (Yaegaki K, et al. J Periodontal Res 43:391-399, 2008)、歯肉上皮細胞にもアポトーシスや genomic DNA damage を惹起すると報告している (J Periodontal Res)。さらに直近では、上皮幹細胞では上皮細胞の 2 倍以上の頻度でアポトーシスを誘導することを発見した (J Periodontal Res)。以上の結果は、硫化水素が歯肉内縁上皮バリアーに機能障害をもたらす歯周病の原因となることを示す。一方、硫化水素は歯肉粘膜組織への透過性が極めて高く、歯槽骨への直接的影響が考えられる。そこで研究代表者は硫化水素の歯槽骨吸収過程に及ぼす影響について検討し、硫化水素が骨芽細胞の細胞増殖を阻害し、そのシグナルは MAPKs を介して行なわれていることを明らかにした (J Periodontol, 2009)。以上より、生理的口臭の原因物質・硫化水素は歯槽骨吸収の原因と考えられた。次に、低濃度硫化水素による破骨細胞の分化への影響を検索したところ、生理的口臭程度の硫化水素が、破骨細胞 RAW264 の分化を顕著に促進することを発見した (J Periodontol, 2010)。硫化水素は破骨細胞分化因子として、直接、破骨細胞を分化誘導することを示唆した。一般に破骨細胞への分化には、あるいは M-CSF などの破骨細胞分化因子が必須である。ところが、硫化水素は、破骨細胞分化因子 RANKL を必要としない。今まで歯周病原菌代謝産物が直接、破骨細胞分化因子として作用する事実は報告が無い。LPS と異なり硫化水素が直接、破骨細胞分化因子となる事実は硫化水素が LPS より遥かに骨吸収することを示す。さらに生理的口臭程度の濃度で発生することから、歯周炎初期の骨吸収に関与すると考えられた。しかし、この分子機構特に細胞内シグナル伝達機構についてはいまだ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究は口臭原因物質である揮発性硫黄化合物の歯槽骨に対する作用メカニズムの解明することを主目的とし、具体的に 2 つの課題を取り上げた。(1) 硫化水素による破骨細胞への分化促進は普遍的かである。先に我々は生体内の生理的な硫化水素が RAW264 細胞分化を誘導することを明らかにした。そこでこの事象が生体内で生じているかを、生体内の破骨細胞機能を保持している骨髄由来破骨前駆細胞にて硫化水素の分化誘導を検証する。次に (2) 硫化水素による破骨細胞の分化誘導が細胞内のどのようなシグナル伝達機構が関与しているかを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 骨髄細胞の採取 6~9 週齢の Jc1-ICR マウス (Nihon SLC) をペントバルビタールナトリウムを腹腔内に投与し、頸椎脱臼した。大腿骨を摘出し、両端を切除した。片側から注射針を差し込んで培地を注入し、骨髄を採取した。ピペッティング後、1500rpm にて遠心分離して細胞を回収した。なお、動物実験は日本歯科大学動物実験審査委員会にて承認を得た。

(2) 破骨細胞の純化 骨髄細胞をディッシュに播種し、3 時間培養した。ディッシュ付着した上皮系細胞を除去するために、ディッシュを軽くピペッティングし、浮遊した細胞を回収し、1500rpm、10 分間遠心分離した。次に細胞を再びディッシュ播種した。一晚培養した後、5 ng/ml M-CSF1 含有培地でさらに 48 時間培養し、浮遊細胞を取り除き、付着している細胞を未分化破骨細胞として実験に供した。

(3) 破骨細胞の検出 (TRAP 染色) 細胞を PBS (-) で洗浄後、破骨細胞の酵素マーカーである酒石酸耐性ホスファターゼ染色 (TRACP&ALP double-stain kit, Takara bio) をおこない、顕微鏡下で TRAP 陽性で多核の細胞を破骨細胞と評価し、計測した。

(4) RAW264 細胞 マウスマクロファージ由来破骨細胞株 RAW264 は 10%FCS、2mM L-グルタミン含有  $\alpha$ -MEM 培地にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。培地は 2~3 日毎に交換し、継代は 7 日毎に行った。

(5) 硫化水素曝露 細胞の硫化水素曝露システムは Yaegaki らの方法に準じた。硫化水素 generator に標準硫化水素を挿入して、0.05、0.5 ng/ml 硫化水素になるように 5% CO<sub>2</sub> にて調整し、これに細胞を挿入して置いた専用のチャンバーに流量を一定にして送入了。細胞はこの環境にて 37°C で 5 日間培

養した。なお、RAW264 細胞に対する硫化水素の細胞内シグナル伝達の検討には、一硫化水素ナトリウムを供した。

(6) ウェスタンブロット解析 細胞を PBS(-) で洗浄後、即座に $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結し細胞の代謝を停止させた。凍結解除後、氷上にて細胞を 1mM PMSF 含有 lysis buffer (Cell signaling) にて溶解し、12,000xg、25 分、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離を行った。上清を実験に供した。タンパク質の定量は Pierce BCA protein assay kit (Thermo scientific) 用い、波長 562nm の吸光度を測定した。ウェスタンブロット用のタンパク質の分離は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でおこなった。アクリルアミド濃度は 8~10%とし、タンパク質の分子量に応じてその濃度を調整した。電気泳動後、ゲル中タンパク質を nitrocellulose membrane (Amersham Hybond-P, GE healthcare) に転写した。ブロットは 5%スキムミルク、10mM Tris buffer でブロッキングした。次にメンブレンを各種 1 次抗体と反応させた。1 次抗体は、ERK1/2、p-ERK1/2、P38、p-P38、PKC、p-PKC、c-Raf、Smad2/3、Samd1/5/8 (Cell signaling) を用いた。

2 次抗体はいずれも anti-rabbit HRP-linked IgG, antibody (Cell signaling) で反応させた。免疫反応後 membrane は Western lighting ECL pro (PerkinElmer) にて反応し、X線フィルムに露光して現像した。

(7) PKC インヒビター処理後の RAW 細胞のシグナル伝達 硫化水素処理後の RAW264 細胞のシグナル伝達に PKC リン酸化が直接介在するかを明らかにするため、特異的 PKC インヒビターである  $5\ \mu\text{M}$  GF109203X で 2 時間前処理した後、 $10^{-3}\text{mM}$  NaHS 処理して、ウェスタンブロットにて各種シグナル伝達物質のリン酸化を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 骨髄細胞由来破骨細胞 マウス骨髄から採取した細胞をディッシュに播種し、3 時間後の未付着細胞を回収し、再びディッシュに播種して 5ng/ml M-CSF 添加培地で 48 時間培養した。この細胞の破骨細胞の分化機能の保持を検証するため、この時点で対照群として 5ng/ml M-CSF 添加培地、実験群として 20ng/ml M-CSF、10ng/ml RANKL 含有培地でそれぞれ 4 日間培養後の TRAP 陽性細胞を計測した。20ng/ml M-CSF、10ng/ml RANKL 含有培地では RANKL 不含培地に比べ、顕著に TRAP 陽性細胞の高い出現が観察された。この結果は、上記の細胞分離手法で硫化水素による破骨細胞分化誘導実験に適していると強く示された。以降では本条件にて破骨前駆細胞として実験に供した。

(2) 硫化水素による破骨細胞分化誘導 骨

髄由来破骨前駆細胞の分化に対する硫化水素の影響を明らかにするため、硫化水素存在下で 4 日間培養し、TRAP 陽性細胞を計測した。硫化水素濃度は著者らが先に RAW264 細胞で処理した  $0.05\text{ng/ml}$  とした。この濃度はヒトの生理的濃度に近似した値である。実験群には  $0.05\text{ng/ml}$  硫化水素、 $20\text{ng/ml}$  M-CSF 含有培地、対照群には  $20\text{ng/ml}$  M-CSF 含有培地とした。実験群の TRAP 陽性細胞数は対照群の約 5 倍高い細胞が計測された。高い生体内機能を保持している骨髄由来破骨前駆細胞に対して低濃度の硫化水素がその細胞の分化を誘導した結果は、生理的な硫化水素が生体内で破骨細胞の分化誘導を惹起していることを強く示唆している。次に硫化水素による骨髄由来破骨前駆細胞の分化誘導が細胞内シグナル伝達、ERK1/2 のリン酸化が介在しているかを、ウェスタンブロット法にて検索した。硫化水素処理した細胞のリン酸化 ERK1/2 の染色バンドは、対照群に比べ強く現れた。この結果は、著者らが先に報告した硫化水素による RAW264 細胞の分化誘導結果と一致していた (Ii, et. al, J Periodont, 2010)。

(3) 硫化水素による RAW264 細胞のシグナル伝達 硫化水素による RAW264 細胞の分化誘導に介在するシグナル伝達機構を明らかにすることを目的に、ERK1/2 伝達経路の上流域を中心に検索した。NaHS 処理後の Smad2/3 のリン酸化をウェスタンブロットにて検出したところ、対照群に比べわずかに強く誘導された。しかし、Smad1/5/8 では対照群との差は認められなかった。次に  $0\sim 1\text{mM}$  NaHS 処理 24 時間後の PKC のリン酸化のウェスタンブロットの結果を図 1 に示した。 $10^{-4}\text{mM}$  NaHS から PKC リン酸化活性が増加し、 $10^{-3}\text{mM}$  NaHS でほぼピークに達した。それ以降徐々に活性は低下し、 $1\text{mM}$  NaHS で最も低かった。次に  $10^{-3}\text{mM}$  NaHS で 40 分、160 分、280 分処理後の PKC リン酸化活性をウェスタンブロットで測定した結果を図 2 に示した。PKC 活性は 40 分処理が最も高く、160 分以降減少していた。この結果は低濃度の硫化水素の曝露情報が RAW264 細胞内に早期段階で PKC に伝達されることを示唆している。

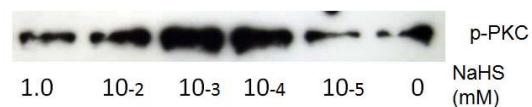


図1 RAW264のp-PKCIに対するNaHSの濃度依存的効果

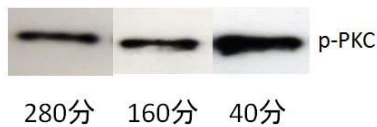


図2 RAW264細胞のp-PKCに対するNaHSの時間依存的効果

(4)PKC インヒビターによる NaHS のシグナル伝達 RAW264 細胞を特異的 PKC インヒビターである GF109203X で前処理後、 $10^{-3}$ mM NaHS で処理した時のリン酸化PKCをウエスタンブロットで測定した (図3)。NaHS 単独処理では、無処理群に比べ顕著に p-PKC のバンドが明瞭に認められた。これに対して GF109203X 前処理後、NaHS 処理したものは、NaHS 単独処理に比べ顕著に減少していた。この結果は硫化水素と RAW264 細胞の PKC 活性化の誘導が強い関連性があることを示している。次に硫化水素による RAW264 細胞の PKC 活性化の誘導とその下流域にある c-Raf および ERK1/2 との直接的関連性について検討した。RAW264 細胞を GF109203X で前処理し、 $10^{-3}$ mM NaHS で後処理した時のリン酸化 c-Raf の変動をウエスタンブロットで測定した (図4)。NaHS 単独処理では、無処理群に比べ顕著にリン酸化 c-Raf の誘導が認められた。これに対して GF109203X 前処理後、NaHS 処理したものは、NaHS 単独処理に比べ顕著にその誘導が抑制された。上記と同様に RAW264 細胞を GF109203X で前処理し、 $10^{-3}$ mM NaHS で後処理した時のリン酸化 ERK1/2 の変動をウエスタンブロットで測定した (図5)。GF109203X 前処理後、NaHS 処理したものは、NaHS 単独処理に比べ顕著に ERK1/2 のリン酸化のバンドが薄く、その誘導が抑制された。以上の結果は、硫化水素による RAW264 細胞のシグナル伝達は、PKC、c-Raf、ERK1/2 の経路を介して情報が伝達されていることを示している。

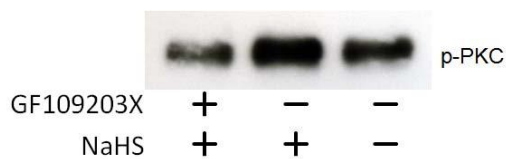


図3 GF109203X前処理後のNaHSが誘導するp-PKC

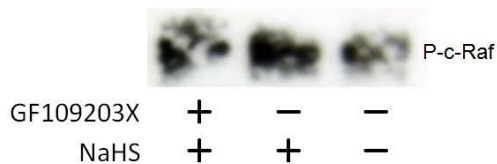


図4 GF109203X前処理後のNaHSが誘導するp-c-Raf



図5 GF109203X前処理後のNaHSが誘導するp-ERK1/2

## 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0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井敏夫 (IMAI TOSHIO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：90120617

### (2) 研究分担者

八重垣 健 (YAEGAKI KEN)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：40166468

村田貴俊 (MURATA TAKATOSHI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：10313529

(H21,22年度は分担者、H23年度：退職)

