

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593110

研究課題名(和文)低濃度フッ化物による骨吸収抑制機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of Micromolar NaF in anti-osteoclastogenesis

研究代表者

荒川 浩久(Arakawa, Hirohisa)

神奈川県立歯科大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00130906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：フッ化物(F)添加で、SDラット未熟頭蓋冠より分離した骨芽細胞における骨芽細胞分化マーカー1型コラーゲン、Alkaline Phosphatase、Osteopontin、Osteocalcin、Bone sialoproteinの発現を増加した。また、歯周病原細菌に対するFの抗菌活性も示唆された。破骨細胞活性化はウェスタンブロッティング法よりカテプシンK、NFATc1、MMP9の発現を増加した。実験的歯周炎モデルではFの摂取により3日後、TNF- α の発現を減少した。また、28日後、Fの摂取ではカテプシンK、MMP-9、NFATc1の発現を減少した。

研究成果の概要(英文)：We report here that Sprague-Dawley rat tissue samples of *P. gingivalis* ATCC 33277 group with bone resorption visible on micro computed tomography, exhibited a marked increase in cathepsin K, NFATc1, MMP9, and IL-1beta expression compared with those of *P. gingivalis* + NaF group. Specimens were also confirmed by staining with tartrate-resistant acid phosphatase and by measuring the distance between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest. Moreover, bone marrow cells formed osteoclasts in vitro with exogenous receptor activator of RANKL or M-CSF and micromolar NaF inhibited osteoclast formation. Additionally, cultured bone marrow cells of NaF group expressed higher levels of osteoprotegerin than did control group. These results suggest a model for understanding the pathogenesis of aggressive bone loss in periodontitis and anti-osteoclastogenesis function of micromolar NaF.

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：低濃度フッ化物 骨芽細胞 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

フッ化物 (F) は、齲蝕に対して抵抗性の高い歯と丈夫な骨を作り、それを維持していくうえで生体にとって必要不可欠な微量元素である。F の細胞への影響として、 μM レベルの低濃度では、骨芽細胞 (Burgener et al, *J Bone Miner Res*, 1995) やエナメル芽細胞 (Yan et al, *J Dent Res*, 2007) の増殖を促進する報告の他、申請者らは、上皮細胞に対して、低濃度 F では増殖・移動を促進するが、 mM レベルの高濃度では抑制することを明らかにした (Arakawa et al, *Biomedical Research*, 2009)。また、F の生体に対する影響として、その過剰摂取が歯のフッ素症や骨フッ素症などを引き起こす報告がある一方、適正量では骨折や成人の骨粗鬆症を予防するという知見が示されている (Vestergaard et al, *Osteoporos Int*, 2008)。このように F はその摂取量が適量であると細胞や生体に対して好影響を与える。

F と歯周疾患の関係は、近年、水道水 F 濃度調整地区において、住民の歯周組織の健全性が高いとの疫学的報告がある (Kumar et al, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2009)。さらに、申請者らの最近の研究により、歯周病感染モデルラットを用いた実験で、低濃度 F 摂取群では非摂取群に比べ、有意に歯槽骨吸収を抑制することを見出した

2. 研究の目的

- (1) F の歯周病原細菌に対する抗菌活性の検討
- (2) F の骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討
- (3) F の破骨細胞分化および活性化に及ぼす影響の検討
- (4) 実験的歯周病モデルラットを用いた F 摂取の骨芽細胞および破骨細胞に及ぼす影響の検討

3. 研究の方法

- (1) F の歯周病原細菌に対する抗菌活性の検討

P. gingivalis を含む歯周病原細菌に対する F の抗菌活性を検討するため、各濃度に調整した F を含む細菌培養用培地中に歯周病原細菌を培養し、発育阻害が認められる希釈倍率について検討する。さらに、ディスクを用いた阻止円からの検討も行う。

- (2) F の骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討

SD ラット未熟頭蓋冠より分離した骨芽細胞を、ビタミン D₃、デキサメタゾンを含む α -MEM 培地で培養し、F 添加の有無による影響を解析する。骨芽細胞分化マーカーとして 1 型コラーゲン、Alkaline Phosphatase (ALP)、Osteopontin (OPN)、Osteocalcin (OCN)、Bone sialoprotein (BSP)、また破骨細胞分化制御因子として RANKL、OPG、M-CSF の発現をリアルタイム PCR 法より評価する。

- (3) F の破骨細胞分化誘導および活性化に及ぼす影響の検討

5-10 週齢の SD ラットの大腿骨から採取した骨髄細胞を、10%FCS、50ng/mL M-CSF、15ng/mL RANKL を含む α -MEM 培地で 7 日間培養し、F 添加の有無による影響を解析する。破骨細胞の分化は、酒石酸抵抗性フォスファターゼ (TRAP) 染色および Pit Formation Assay 法 (SEM 法) より解析する。また、破骨細胞活性化はウェスタンブロットティング法よりカテプシン K、MMP2、MMP9 の発現を評価し、ゼラチンゼイモ電気泳動より MMP2、MMP9 の活性化を評価する。

- (4) 実験的歯周病モデルラットを用いた F 摂取の骨芽細胞および破骨細胞に及ぼす影響の検討

P. gingivalis ATCC33277 株の菌液を一日おきに 3 回ラット口腔内へ直接播種し実験的歯周炎を惹起する (Nakajima et al, *J Periodontal Res*, 2006)。F の摂取は、

NaF 粉末をイオン交換水に溶解して調整した μM レベルの低濃度 F を常時摂取させる。 *P. gingivalis* 播種最終日から 3 日、7 日および 28 日で屠殺後、試料を回収する。また、菌の定着を確認するため、屠殺時に採取した口腔内試料より DNA を抽出し *P. gingivalis* 特異的プライマーを用いた PCR 法を行う。歯槽骨吸収量の評価は、マイクロ CT による解析する。また、炎症状態の評価は、H-E 染色による病理組織学評価、抗ラットマクロファージ/樹状細胞モノクロナール抗体および TNF- α の免疫組織学的評価より行う。さらに骨芽細胞活性を評価するため 1 型コラーゲン、ALP、OPN、OCN、BSP の発現を免疫組織学的に評価する。破骨細胞活性を評価するため TRAP 染色およびカテプシン K、MMP-9、MMP-2 の発現を免疫組織学的に解析する。

4. 研究成果

F 添加で SD ラット未熟頭蓋冠より分離した骨芽細胞における骨芽細胞分化マーカー 1 型コラーゲン、ALP、OPN、OCN、BSP の発現を増加した。また、*P. gingivalis* を含む歯周病原細菌に対する F の抗菌活性も示唆された。破骨細胞活性化はウェスタンブロッティング法よりカテプシン K、MMP2、MMP9 の発現を評価した。*P. gingivalis* ATCC33277 株の菌液を一日おきに 3 回ラット口腔内へ直接播種し実験的歯周炎を惹起し、F の摂取は、3 日後、TNF- α の発現を減少した。また、28 日後、F の摂取ではカテプシン K、MMP-9、MMP-2 の発現を減少した。

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 18 件)

1. Receptor for advanced glycation end products is required for HMGB1/S100A4/NF- $\kappa\beta$ interaction in porphyromonas gingivalis induced

gingival inflammation. He D, Sun J, Bhawal UK, Fukuoka CY, Huang YC, Hamada N, Arakawa H. *Journal of Hard Tissue Biology* 2014; 23(1): 55-62. 査読有り

2. Low level fluoride stimulates epithelial-mesenchymal interaction in oral mucosa. He D, Bhawal UK, Hamada N, Kuboyama N, Abiko Y, Arakawa H. *Journal of Hard Tissue Biology* 2013; 22(1): 59-66. 査読有り
3. Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. Sasahira T, Ueda N, Kurihara M, Bhawal UK (他 5 名) *Human Pathology* 2013; 44(6): 1098-1106. 査読有り
4. Expression of caveolin-1 in the early phase of beta-TCP implanted in dog mandible. Chou CT, Bhawal UK (他 5 名) *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2013; 101(5): 804-812. 査読有り
5. Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma. Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Bhawal UK (他 3 名) *Clinical and Experimental Metastasis* 2013; 30(2): 165-176. 査読有り
6. Silk fibroin-based scaffolds for bone regeneration. Kuboyama N, Kiba H, Arai K, Uchida R, Bhawal UK (他 5 名) *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2013; 101(2):

- 295-302. 査読有り
7. The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. Wu Y, Sato F, Yamada T, Bhawal UK (他 9 名) *International Journal of Oncology* 2012; 41(4): 1337-1346. 査読有り
 8. The basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 inhibits TGF- β -induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells. Sato F, Kawamura H, Wu Y, Sato H, Jin D, Bhawal UK (他 7 名) *International Journal of Molecular Medicine* 2012; 30(3): 495-501. 査読有り
 9. IL-1 β -mediated up-regulation of DEC1 in human gingiva cells via the Akt pathway. Bhawal UK (他 11 名) *Journal of Cellular Biochemistry* 2012; 113(10): 3246-3253. 査読有り
 10. BHLH transcription factor DEC2 regulates pro-apoptotic factor Bim in human oral cancer HSC-3 cells. Wu Y, Sato F, Bhawal UK (他 7 名) *Biomedical Research* 2012; 33(2): 75-82. 査読有り
 11. Smad3 and Snail show circadian expression in human gingival fibroblasts, human mesenchymal stem cell, and in mouse liver. Sato F, Sato H, Jin D, Bhawal UK (他 8 名) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 419(2): 441-446. 査読有り
 12. Identification by DNA microarray of genes involved in *Candida albicans*-treated gingival epithelial cells. Ikuta T, Bhawal UK (他 4 名) *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2012; 41(10): 769-778. 査読有り
 13. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates CyclinD1. Bhawal UK (他 15 名) *Journal of Pathology* 2011; 224(3): 420-429. 査読有り
 14. Increased telomerase activity and hTERT expression in human salivary gland carcinomas. Shigeishi H, Sugiyama M, Tahara H, Ono S, Bhawal UK (他 8 名) *Oncology Letters* 2011; 2(5): 845-850. 査読有り
 15. PERIOD1 (PER1) has anti-apoptotic effects, and PER3 has pro-apoptotic effects during cisplatin (CDDP) treatment in human gingival cancer Ca9-22 cells. Sato F, Wu Y, Bhawal UK (他 5 名) *European Journal of Cancer* 2011; 47(11): 1747-1758. 査読有り
 16. Basic helix loop helix transcription factors DEC1 and DEC2 regulate the paclitaxel induced apoptotic pathway of MCF-7 human breast cancer cells. Wu Y, Sato F, Bhawal UK (他 6 名) *International Journal of Molecular Medicine* 2011; 27(4): 491-495. 査読有り
 17. Transcriptome analysis of beta-TCP implanted in dog mandible. Zhao J, Watanabe T, Bhawal UK (他 2 名) *Bone* 2011; 48(4): 864-877. 査読有り
 18. Down-regulation of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) associated with poor prognosis of adenoid cystic and

mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland. Sasahira T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK (他 2 名) *Cancer Science* 2011; 102(2): 492-497. 査読有り

〔学会発表〕(計 21 件)

1. Bhawal UK. Transcription factor DEC1 and Epithelial-Mesenchymal Transition. 第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 6 日、神戸国際会議場、神戸、兵庫。
2. Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. Prox1 and FOXC2 act as regulator of lymphangiogenesis and angiogenesis in oral cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜、横浜、神奈川。
3. Bhawal UK, Kuboyama N, Abiko Y. Effect of protamine-hydrolysate peptide (DMX) in oral hygiene. FDI Annual World Dental Congress. 2013 年 08 月 30 日、Istanbul, Turkey.
4. Bhawal UK, Fukuoka CY, Abiko Y. Epigenetic regulation of CXCL14 expression in oral cancer. IADR Asia-Pacific Region, 2013 年 8 月 21 日、Plaza Athenee, Bangkok, Thailand.
5. Bhawal UK, Abiko Y. Transcription factor DEC1 and Epithelial-Mesenchymal Transition. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. 2013 年 03 月 23 日、Washington State Convention Center, Seattle, Washington, USA.
6. Bhawal UK, Abiko Y. Molecular mechanism of transcription factors DEC1 and DEC2 in cancer. 日本分子生物学会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場、福岡。
7. Bhawal UK, Abiko Y. IL-1 β -mediated up-regulation of DEC1 in gingiva cells via Akt pathway. アメリカ歯周病学会共催 日本歯周病学会、2012 年 10 月 02 日、Los Angeles Convention Center, Los Angeles, CA, USA.
8. Sasahira T, Bhawal UK, Kurihara M, Ueda N, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H. Expression of TANGO in oral cancer. 日本癌学会学術総会、2012 年 09 月 21 日、ホテルロイトン札幌、北海道。
9. Bhawal UK, Ito Y, Sasahira T, Kuniyasu H, Abiko Y. Smad3 shows circadian expression in human gingival fibroblasts and human mesenchymal stem cells. 日本癌学会学術総会、2012 年 09 月 21 日、ホテルロイトン札幌、北海道。
10. Bhawal UK, He D, Hamada N, Kuboyama N, Abiko Y, Arakawa H. Micromolar level NaF promotes epithelial cell growth and reduces Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. FDI Annual World Dental Congress. 2012 年 09 月 01 日、Hong Kong Convention and Exhibition Centre, Hong Kong, China.
11. Bhawal UK, Abiko Y. Functional analysis of transcription factors DEC1 and DEC2 in tumor. 国際歯科研究学会議(IADR)、2012 年 06 月 23 日、イグアスフォールズ、ブラジル。
12. He D, Bhawal UK, Arakawa Y, Abiko Y, Arakawa H. Micromolar Fluoride Reduces Alveolar Bone Loss in Experimental Rat Periodontitis. 日本口腔衛生学会総会、2012 年 05 月 27 日、神奈川歯科大学、横須賀、神奈川。
13. Bhawal UK, He D, Arakawa Y, Arakawa H, Abiko Y. Identification by DNA microarray of genes involved in micromolar level NaF-treated epithelial cells. 日本口腔衛生学会総会、2012 年 05 月 27 日、神奈川歯科大学、横須賀、

- 神奈川。
14. パワー ウジャール、伊藤由美、安孫子宜光。口腔扁平上皮癌における CXCL14 のエピジェネティック機構を介した遺伝子発現制御。日本病理学会総会、2012 年 04 月 28 日、京王プラザホテル、東京。
 15. Sato F, Wu Y, Bhawal UK, Kato Y, Kijima H. Functional analysis of BHLH transcription factor DEC1 and DEC2 in tumor. 第 34 回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜、横浜、神奈川。
 16. Bhawal UK, Sato F, Sasahira T, Ito Y, Kuniyasu H, Kijima H, Abiko Y. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC1 regulates CyclinD1 expression through E- box element. 第 70 回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2011 年 10 月 5 日、名古屋国際会議場、名古屋、愛知。
 17. Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H. Functional analysis of miR-126 in oral cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場、名古屋、愛知。
 18. Fujii K, Luo Y, Bhawal UK, Yoshikawa M, Maruyama H, Chihara Y, Kuniyasu H. Anti-angiotensin and hypoglycemic treatments suppress liver metastasis of colon cancer cells. 第 70 回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場、名古屋、愛知。
 19. Bhawal UK、伊藤由美、安孫子宜光。ヒト口腔扁平上皮癌における PERIOD (PER1) と PER3 の発現。第 53 回歯科基礎医学会 (招待講演) 2011 年 10 月 2 日、長良川国際会議場、岐阜、愛知。
 20. Bhawal UK, Tsushima K, Ikuta T, Abiko Y.

IL-8 signaling pathway in gingival epithelial cells in response to *Candida albicans*. 第 59 回 国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術 (招待講演) 2011 年 10 月 9 日、広島国際会議場、広島。

21. Bhawal UK、伊藤由美、安孫子宜光。炎症における DEC1 と DEC2 の役割。第 53 回歯科基礎医学会 (招待講演) 2011 年 10 月 2 日、長良川国際会議場、岐阜、愛知。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 浩久 (Arakawa Hirohisa)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：00130906

(2) 研究分担者

パワー ウジャール (Bhawal Ujjal)
日本大学・松戸歯学部・助教
研究者番号：50433339

(3) 連携研究者

()

研究者番号：