

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792531

研究課題名（和文）酸化ストレスが歯周病に及ぼすメカニズムの解明-転写因子 FoxO1 の重要性

研究課題名（英文）Elucidate molecular biological mechanisms involved in oxidative stress-mediated periodontitis

研究代表者

吉川 美弘（YOSHIKAWA YOSHIHIRO）

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70434793

研究成果の概要（和文）：歯周病は様々な要因により引き起こされる歯周組織の疾患である。歯周病が進行すると歯を支える骨が吸収される。しかし、それらの詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで骨を吸収する細胞を用いて、実験を行った結果、骨を作る因子が骨を形成するだけでなく、骨吸収を起こしているということが明らかになった。これらの事実によって、新たな治療法の解明の一助となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Periodontitis is a set of inflammatory diseases affecting the periodontium. Bacteria cause progressive bone loss. But it is not clear the mechanism. I elucidated that bone formation factor plays the role of not only bone formation, but also bone resorption.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,161,000

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：骨代謝、骨芽細胞、破骨細胞、BMP-2

1. 研究開始当初の背景

(1) ライフスタイルの欧米化により糖尿病や肥満、それらに合併する慢性疾患などの生活習慣病患者は急増しており大きな社会問題になっている。生活習慣病、特に糖尿病や肥満は歯科分野の疾患においても大きく影響しており、それに伴う歯周病は増加の一途をたどっており、それらの予防や治療法の確立は急務である。肥満は酸化ストレスを上昇し、歯周病は酸化ストレスによって、悪化するといわれていることから、肥満が歯周病を悪化するメカニズムとして酸化ストレスを介した系が考えられる。本研究は肥満による酸化ストレスが歯周組織に与えるメカニズムを解明することにより歯周病の原因を探

索することを目的とする。

(2) 申請者らはこれまでに、酸化ストレスを制御する転写因子の1つである Foxo1 に着目し、酸化ストレスと骨形成の分子メカニズムの解明を行ってきた。申請者らのグループは、Foxo1 が骨組織にも発現していることを世界で初めて明らかにし、骨芽細胞特異的 Foxo1 ノックアウトマウスが酸化ストレスの上昇により、骨密度が減少することを報告した。これらの結果から、肥満が Foxo1 を介して酸化ストレスを上昇し、骨吸収を起こすことにより歯周病の悪化を導くのではないかと考えた。

(3) 近年の肥満症、メタボリックシンドローム患者の急増によって、インスリンを中心と

した内分泌・エネルギー代謝の研究は世界中で盛んに行われており、さらに最近では骨と代謝に関連した研究が注目を浴びている。このような背景の下、申請者らはエネルギー代謝の中心となる転写因子 Foxo1 が骨代謝に影響を及ぼすことを明らかにしたため、Foxo1 の骨代謝・エネルギー代謝において基礎研究をリードしていると考えられる。

(4) Foxo1 は、マウス生体内では肝、膵β細胞、白色及び褐色脂肪組織、骨格筋などのインスリン反応性臓器に発現が認められ、アポトーシス、細胞増殖、細胞分化、糖代謝などに深く関わることは広く知られている。申請者は Foxo1 がマウスより単離された歯根膜細胞株である PDL-A9b においても発現を確認し、歯根膜においても Foxo1 が機能し、細胞増殖、細胞分化、糖代謝に関与していることが考えられた。

2. 研究の目的

- (1) 歯周病は様々な要因により引き起こされる歯周組織の疾患である。歯周病が進行すると歯を支える骨が吸収される。しかし、それらのメカニズムは明らかになっていない。歯周病は、細菌群により産生される LPS やインターロイキンといった炎症性サイトカインが破骨細胞を活性化し、骨形成と骨吸収のバランスが崩れることにより、骨を吸収する。
- (2) Bone morphogenetic protein (BMP) -2 は TGF スーパーファミリーに属する強力な骨形成因子であるが、骨芽細胞分化を促進するだけでなく、破骨細胞の分化や機能を制御するという結果が報告されている。
- (3) そこで、本研究では、BMP-2 による骨芽細胞の Vitamin D receptor (VDR) 発現のメカニズムを Smad1 に着目し検討した。

3. 研究の方法

(1) ddY マウス(雄 6 週齢) 骨髄由来細胞 (BM) が、破骨細胞に分化する際に BMP-2 がどのように影響するか調べるために、マウス骨髄由来細胞と ddY マウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (1 日齢) (OB) を 1, 25 (OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) 存在下で BMP-2 (100 ng/mL) を添加した α-MEM で共培養した。培養 7 日後に TRAP (酒石酸耐性酸性フォスファターゼ) 染色を行い、3 核以上の tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 陽性の破骨細胞の数を数えて BMP-2 による破骨細胞の分化への影響を調べた。

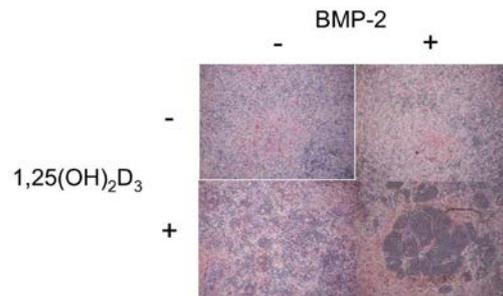
(2) 1, 25 (OH)₂D₃ と BMP-2 で刺激したマウスの初代骨芽細胞から mRNA を抽出し、real time RT-PCR 法で破骨細胞分化誘導因子である receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)、破骨細胞分化抑制因子である osteoprotegerin (OPG) および 1, 25 (OH)₂D₃ により発現が亢進する VDR の

mRNA 発現を定量的に解析した。さらに BMP-2 の主要シグナル因子の一つである Smad1 をノックダウンし、同様に両因子の共刺激による RANKL、OPG、VDR 発現を確認した。

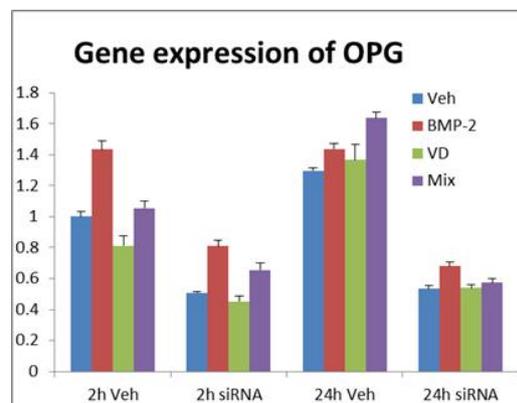
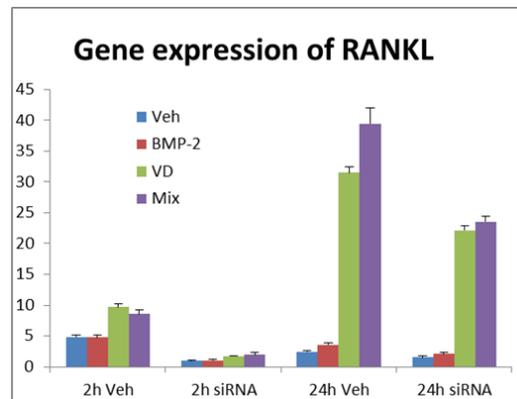
(3) シクロヘキシミドを用いて、BMP-2 の作用機序を調べた。

4. 研究成果

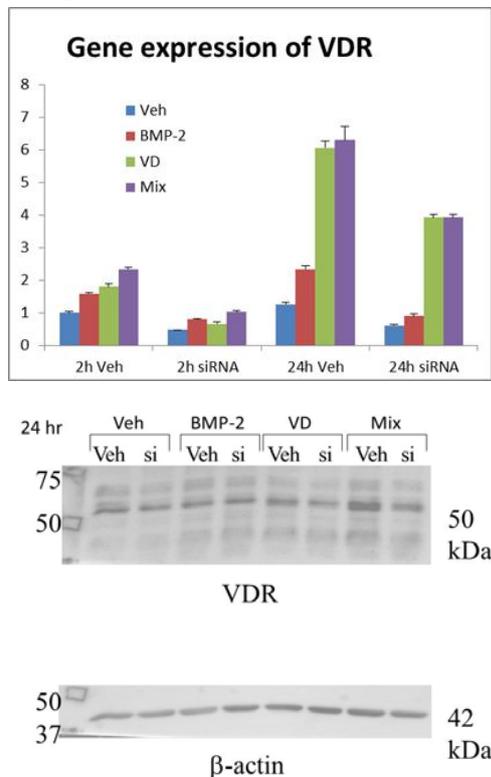
- (1) BM と OB を共培養すると、TRAP 陽性細胞が染色され、それらの TRAP 陽性細胞数は 1, 25 (OH)₂D₃ に加えて BMP-2 刺激群で上昇した。



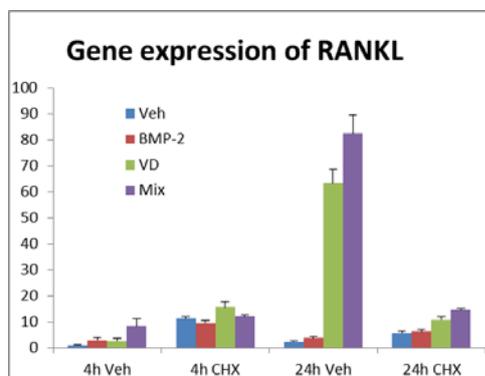
- (2) 詳細なメカニズムを明らかにするために、OB を用いて、1, 25 (OH)₂D₃ と BMP-2 を刺激した。共刺激により、RANKL mRNA 発現は 1, 25 (OH)₂D₃ 単独刺激に比べて有意に高値を示した。一方、Smad1 をノックダウンした細胞では、コントロール群に比べて、RANKL 発現は減少した。OPG 発現はノックダウンによる変化がなかった。



(3) RANKL 発現を介している因子として VDR があげられるが、VDR の発現に BMP-2 と Smad1 が関与しているかを確認した。VDR 発現は BMP-2 との共刺激により、発現が増強するが、Smad1 のノックダウンにより、発現が抑制された。



(4) さらに、シクロヘキシミドを用いて、BMP-2 が RANKL mRNA 発現に直接影響を与えているのか検討した。BMP-2 により上昇した RANKL 発現はシクロヘキシミドにより、抑制された。これらの結果より、BMP-2 による RANKL 発現は間接的に影響を及ぼすことが示唆された。



BMP-2 が Smad1 を介して、1, 25(OH)₂D₃ 存在下での VDR 発現を上昇させることにより、1, 25(OH)₂D₃ の作用が増強し、その結果、RANKL mRNA 発現が上昇する可能性が示唆された。

これらの結果より、歯周組織における骨組織などでおこっている骨代謝の機序の一端が明らかとなり、今後、歯周組織すべてにおいて、糖代謝が歯周組織に及ぼす影響の解明につながると思われる。

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 3 件)

- (1) Tamura I, Kamada A, Goda S, Yoshikawa Y, Domae E, Ikeo T Insulin-like growth factor-II promotes proliferation of human periodontal ligament fibroblasts via expression of early growth response transcription factors. Journal of Oral Tissue Engineering 査読有 10: 2012:13-20
- (2) Hontsu S, Hashimoto Y, Yoshikawa Y, Kusunoki M, Nishikawa H, Ametani A Fabrication of Hydroxyl Apatite Coating Titanium Web Scaffold Using Pulsed Laser Deposition. Journal of Hard Tissue Biology 査読有 21: 2012:181-188
- (3) Yoshikawa Y, Kode A, Xu L, Mosialou I, Silva BC, Ferron M, Clemens TL, Economides AN, Kousteni S Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism. Journal of Bone Minereral Research 査読有 26:2011:2012-25

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kamada A, Ikeo T, Tamura I, Goda S, Yoshikawa Y, Domae E, Yoshimoto H, Kakudo K Statin Regulates Runx2 Expression in Human Dental Pulp Stem Cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR 2013/03/23 Seattle, WA, USA
- ② 吉川 美弘, 川本 章代, 堂前 英資, 合田 征司, 田村 功, 鎌田 愛子, 小正 裕, 池尾 隆 マウス骨芽細胞における Smad1 を介した VDR の発現. 第 11 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会・総会 2013/03/02 東京
- ③ Yoshikawa Y, Kamada A, Tamura I, Goda S, Domae E, Ikeo T BMP-2 Promotes Osteoclast Differentiation by Enhancing the Activity of Smad1.

American Society for Bone and Mineral
Research 2012 Annual Meeting
2012/10/15 Minneapolis, Minnesota,
USA

- ④ 吉川 美弘, 竹山 旭, 川本 章代,
田村 功, 鎌田 愛子, 小正 裕, 森
田 章介, 池尾 隆 骨芽細胞による破
骨細胞分化には Smad1 が関与する. 第
30 回日本骨代謝学会学術集会
2012/07/21 東京
- ⑤ Ikeo T, Kamada A, Yoshikawa Y, Domae
E, Goda S, Tamura I, Takaishi Y, Fujita
T Statin suppresses excess Runx2
expression in human osteoblastic
osteosarcoma cells. American Society
for Bone and Mineral Research 2011
Annual Meeting 2011/09/19 San Diego,
CA, USA
- ⑥ Kamada A, Ikeo T, Yoshikawa Y, Domae
E, Goda S, Tamura I Collagen-mimetic
peptide of adiponectin accelerates
osteoblastic differentiation.
American Society for Bone and Mineral
Research 2011 Annual Meeting
2011/09/17 San Diego, CA, USA
- ⑦ 吉川 美弘, 川本 章代, 新原 拓也,
竹山 旭, 堂前 英資, 合田 征司,
田村 功, 鎌田 愛子, 森田 章介,
岡崎 定司, 小正 裕, 池尾 隆 歯根
膜細胞において VDR 発現が破骨細胞分化
因子を調節する. 第 9 回日本再生歯科
医学会 2011/09/10 大阪市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 美弘 (YOSHIKAWA YOSHIHIRO)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70434793