

only in protection from a state of emergency in cells exposed to ER stress, but also in physiological processes such as normal bone formation.

Our studies also provide an insight into the regulation of the *Col1a1* promoter. We showed that OASIS activates the 2.3-kb *Col1a1* promoter through the UPRE-like sequence. Previously, the 2.3-kb promoter of *Col1a1* was demonstrated to have two regulatory regions for its expression in osteoblasts²¹. One of these regions is important for its specific expression in osteoblasts, the other is important for its high expression. The molecules that act on these regulatory regions have not yet been identified. Interestingly, as the UPRE-like sequence that OASIS acts on is included in the latter region, it could be this putative cis-element that is responsible for the high expression of *Col1a1*. It is possible that OASIS activity is synchronized with that of putative transcription factor(s) that act on the *Col1a1* promoter region important for specific expression, and so regulates the osteoblast-specific expression of *Col1a1*.

OASIS^{-/-} osteoblasts contained a large number of abnormally enlarged rough ER. Bone matrix proteins, including procollagen and Ocn, were abundantly accumulated in the lumen. It remains unclear why osteoblasts in *OASIS*^{-/-} mice reveal abnormal expansion of rough ER. BBF2H7, an ER stress transducer, is structurally very similar to OASIS. BBF2H7 promotes the transcription of *Sec23a*, which encodes a component of coat protein complex II vesicle and has a role in the transport of secretory proteins from the ER to the Golgi¹⁸. Proliferating *BBF2H7*^{-/-} chondrocytes showed expansion of the ER similar to that of *OASIS*^{-/-} osteoblasts. They also contained cartilage matrix proteins such as Col2 and cartilage oligomeric matrix protein in the ER. However, OASIS does not activate transcription of *Sec23a* (Supplementary Information, Fig. 5b), and *Sec23a* could not rescue the *OASIS*^{-/-} phenotype *in vitro* (Fig. 3b, 5f). Therefore, it is possible that target genes of OASIS other than *Col1a1* could have roles in the ER-to-Golgi transport of bone matrix proteins. Unknown target genes of OASIS need to be identified to clarify the precise mechanisms responsible for the abnormal expansion of rough ER seen in *OASIS*^{-/-} osteoblasts.

CREBH, BBF2H7 and AibZIP/Tisp40 have similar structures to that of OASIS, and their expression levels show tissue- or cell type-specific patterns^{26–28}. These proteins may function as tissue-specific ER stress transducers that convert ER stress to the transcription of target genes for development, differentiation, maturation or other important cell type-specific events in various tissues. Further studies are needed to evaluate the detailed signalling pathways of the new ER-resident transcription factors to better understand the diversity of the ER stress response in animals. □

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturecellbiology/>.

Note: Supplementary Information is available on the Nature Cell Biology website.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank G. Karsenty (Columbia University) for providing plasmids (*Col1a1* and *Osteocalcin* as probes for *in situ* hybridization, and pCMV-ATF4), G. Xiao (University of Pittsburgh, PA, USA) for providing a plasmid (pCMV-Runx2) and L. W. Fisher (National Institutes of Health, USA) for providing an LF41 antibody, M. Tohyama and S. Shiosaka for helpful discussions and critical reading of the manuscript, E. Nishida for technical advice and H. Yamato, H. Murayama, W. Soma, M. Shimbara, I. Tsuchimochi, T. Kawanami, A. Ikeda, A. Kawai, and Y. Maruyama for technical support. This work was partly supported by grants from the Japan Society for the Promotion of Science KAKENHI (#20059028, #21790184, #20890175, #21790323, #21700410), the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation, Takeda Medical Research Foundation and NOVARTIS Foundation (Japan) for the Promotion of Science.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.M. performed most of the experiments. A.S., S.H., S.Ko., S.Ka., M.I. and M.O. generated *OASIS*^{-/-} mice. K.C., H.S., K.T., K.O. and K.Y. performed electron microscopy. M.S., R.N., T.Y., I.K., T.F. and S.I. guided bone experiments. R.N., T.Y., S.I., M.O. and A.W. helped write the manuscript. T.M. and K.I. wrote the manuscript. K.I. supervised the project.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturecellbiology/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

- Honma, Y. *et al.* Identification of a novel gene, *OASIS*, which encodes for a putative CREB/ATF family transcription factor in the long-term cultured astrocytes and gliotic tissue. *Brain research* **69**, 93–103 (1999).
- Kondo, S. *et al.* OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nature Cell Biol.* **7**, 186–194 (2005).
- Murakami, T. *et al.* Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *J. Neurochem.* **96**, 1090–1100 (2006).
- Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kondo, S. & Imaizumi, K. A novel ER stress transducer, OASIS, expressed in astrocytes. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 563–571 (2007).
- Antony, J. M. *et al.* The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *J. Immunol.* **179**, 1210–1224 (2007).
- Nikaido, T. *et al.* Expression of the novel transcription factor OASIS, which belongs to the CREB/ATF family, in mouse embryo with special reference to bone development. *Histochem. Cell Biol.* **116**, 141–148 (2001).
- Mori, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **10**, 451–454 (2000).
- Ron, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* **110**, 1383–1388 (2002).
- Schroder, M. & Kaufman, R. J. ER stress and the unfolded protein response. *Mut. Res.* **569**, 29–63 (2005).
- Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K. & Witten, P. E. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* **235**, 176–190 (2006).
- Komori, T. *et al.* Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764 (1997).
- Otto, F. *et al.* *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765–771 (1997).
- Nakashima, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17–29 (2002).
- Karsenty, G. & Wagner, E. F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell.* **2**, 389–406 (2002).
- Ishida, Y. *et al.* Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2346–2355 (2006).
- Morello, R. *et al.* CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* **127**, 291–304 (2006).
- Cabral, W. A. *et al.* Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nature Genet.* **39**, 359–365 (2007).
- Saito, A. *et al.* Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated *Sec23a* pathway is essential for chondrogenesis. *Nature Cell Biol.* **11**, 1197–1204 (2009).
- Yang, X. *et al.* ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* **117**, 387–398 (2004).
- Rosert, J., Eberspaecher, H., and de Crombrughe, B. Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro- α 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J. Cell Biol.* **129**, 1421–1432 (1995).
- Rosert, J. A., Chen, S. S., Eberspaecher, H., Smith, C. N., and de Crombrughe, B. Identification of a minimal sequence of the mouse pro- α 1(I) collagen promoter that confers high-level osteoblast expression in transgenic mice and that binds a protein selectively present in osteoblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **6**, 1027–1031 (1996).
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R. J. & Mori, K. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem.* **136**, 343–350 (2004).
- Yamaguchi, A., Komori, T. & Suda, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and *Cbfa1*. *Endocr. Rev.* **21**, 393–411 (2000).
- Shaffer, A. L. *et al.* XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**, 81–93 (2004).
- Liu, T. *et al.* BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines. *J. Cell. Physiol.* **211**, 728–735 (2007).
- Zhang, K. *et al.* Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* **124**, 587–599 (2006).
- Kondo, S. *et al.* BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1716–1729 (2007).
- Nagamori, I. *et al.* The testes-specific bZip type transcription factor Tisp40 plays a role in ER stress responses and chromatin packaging during spermiogenesis. *Genes Cells.* **11**, 1161–1171 (2006).

METHODS

Generation of *OASIS*^{-/-} mice. A targeting vector containing a neomycin resistant gene (shown in Supplementary Information, Fig. 1a) was used to generate *OASIS*^{-/-}. The *OASIS* targeting vector was electroporated into embryonic stem (ES) cells derived from 129/Sv (D3). Homologous recombination was identified by genomic PCR and Southern blot analysis. The primers used for genomic PCR were: 5'-CCCTCTCCAAGCCTCACTGAGG-3' (common forward), 5'-TACCCTGCTGAAGGGGCTTGTGG-3' (wild-type reverse) and 5'-TCCATCTGTTCATAGGCCGATCC-3' (targeting reverse). Germline transmission of the mutant allele was achieved using C57BL/6 mice. In all studies comparing wild-type and *OASIS*^{-/-} mice, sex-matched littermates derived from mating *OASIS*[±] animals were used. All experiments were performed with the consent of the Animal Care and Use Committees of Miyazaki University and Osaka University.

Cell culture materials, transfection and infection. MC3T3-E1 osteoblast-like cells and RD-C6 cells derived from the calvaria of *Runx2*-deficient mice were grown in alpha modified Eagle's medium (Gibco BRL) supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were transfected with each expression plasmid using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Primary cultures of osteoblasts were prepared from the calvaria of postnatal day (P) 3–4 wild-type and *OASIS*^{-/-} mice. The calvaria were digested with 0.1% collagenase (Wako Pure Chemical Industries) and 0.2% dispase (Gibco). Primary osteoblasts were grown in alpha modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum at a density of 1.5×10^5 cells per well in 12-well plates. The medium was changed every 3 days and on the day of assays, to create identical conditions in each dish. To quantify the total number of progenitors: total colony forming units-fibroblasts (CFU-F; methylene blue-positive colonies), colony forming units-alkaline phosphatase (CFU-ALP; ALP-positive colonies), and colony forming units-osteoblasts (CFU-O; von Kossa-positive colonies) of primary cultures of bone marrow stromal cells (MSCs) were collected from long bones of 1.5-month-old mice. MSCs were plated in alpha modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum at a density of 1×10^6 nucleated cells per well in 6-well plates. On the first media exchange, basal media was additionally supplemented with ascorbic acid ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) and β -glycerophosphate (10 mM) and cells were cultured for 18–21 days. For Van Gieson staining of hydroxyapatite, primary osteoblasts were grown on Cellyard hydroxyapatite scaffolds (Pentax) at a density of 1.5×10^5 cells per well in 24-well plates. We used thapsigargin ($1 \mu\text{M}$), brefeldin A ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$), and tunicamycin ($3 \mu\text{g ml}^{-1}$; Sigma-Aldrich) as ER stressors for the indicated times, and recombinant human BMP2 (100 ng ml^{-1} ; Sigma) for osteoblast maturation. For mineralization analysis, primary osteoblasts were stimulated by ascorbic acid ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), β -glycerophosphate (2 mM), and BMP2 (100 ng ml^{-1}) for a week. Von Kossa staining was performed using von Kossa kit (Cosmo Bio LSL) according to the manufacturer's protocol. Alkaline phosphatase (ALP), van Gieson and alizarin red S staining were performed according to standard protocols. To quantify matrix mineralization, alizarin red S-stained cultures were incubated with cetylpyridinium chloride (100 mM). The absorbance of released alizarin red S was measured at 570 nm. ALP activities were measured using Labassay ALP kit (Wako). The intensities of van Gieson staining were measured using Scion Image software (Scion). For osteoclast differentiation *in vitro*, spleen cells were isolated from C57BL/6 mice (Nihon SLC Co.) and incubated with M-CSF (30 ng ml^{-1}) and sRANKL (100 ng ml^{-1}) for 6 days. For generation of adenovirus, the recombinant adenoviruses carrying mouse *OASIS*, *Runx2*, dominant-negative *Runx2*, *BBF2H7* or *sec23a* were constructed by homologous recombination between the expression cosmid cassette and the parental virus genome in HEK293 cells, as described previously^{18,29}.

RT-PCR and *in situ* hybridization. Total RNA was isolated from cells or bone tissue using a RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA was synthesized in a 40 μl reaction volume using a random primer (Takara) and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). PCR was performed in a total volume of 30 μl containing 0.8 μM of each primer, 0.2 mM dNTPs, 3 U Taq DNA polymerase and 10 \times PCR buffer (Promega) using each specific primer set (supplement table). The PCR products were resolved by electrophoresis through a 4.8% acrylamide gel. The density of each band was quantified using Scion Image software (Scion). For *in situ* hybridization, skeletons of tibiae at P4 were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and then decalcified with Morse's solution overnight at 4 °C. *In situ* hybridization was carried

out on 10- μm frozen sections. Sections were digested with proteinase K, fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min followed by acetylation, and then hybridized in hybridization buffer with probes overnight at 60 °C. The *OASIS* probe has been described previously⁶. Digoxigenin-labelled antisense and sense probes were synthesized from linearized plasmids with DIG RNA labeling mix (Roche).

Western blotting, extraction and ELISA. For western blotting analysis, proteins were extracted from cells or calvaria using cell extraction buffer containing 0.05 M Tris-HCl at pH 8.0, 0.15 M NaCl, 5.0 mM EDTA, 1% NP-40 and a protease inhibitor cocktail (MBL) at 4 °C. After centrifugation, soluble protein in the extract was quantified. Samples were loaded onto 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Protein-equivalent samples were subjected to western blotting. A mouse monoclonal antibody secreting hybridoma line was established by fusing splenic cells immunized with mouse recombinant *OASIS* (17–253 amino acids) and the SP2/0-Ag14 mouse myeloma cell line. A mouse monoclonal antibody against *OASIS* (1:1,000) was then purified from hybridoma culture supernatant using a MAbTrap kit (GE Healthcare). Anti- β actin (Sigma; 1:5,000) and anti-OPN (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 1:200) antibodies were used. The extraction procedure for collagen was performed as described previously³⁰. The density of each band was quantified using Scion Image software. For measurement of OPG levels in supernatants of primary cultured osteoblasts, we used mouse OPG ELISA kit (R&D Systems).

Histomorphometric analysis, radiographs, μCT analysis and measurement of bone mineral density. Histomorphometric analysis, radiographs, μCT analysis and measurement of bone mineral density were performed using 12-week-old wild-type and *OASIS*^{-/-} male mice. Calcein double labelling of tibiae in wild-type and *OASIS*^{-/-} mice was performed with calcein injections (16 mg kg^{-1} body weight) at 6-day intervals. Left tibiae were fixed in 70% ethanol, and the undecalcified bones embedded in glycolmethacrylate. Sections 3- μm thick were cut longitudinally in the proximal region of the tibia and stained with toluidine blue. Histomorphometry was performed with a semiautomatic image analysing system (Measure6; Systemsupply) linked to a light microscope. Histomorphometric measurements were made at $\times 400$ using a minimum of 27–37 optical fields in the secondary spongiosa area from the growth plate-metaphyseal junction. Trabecular BV/TV (bone volume/tissue volume), Tb.Th (trabecular thickness), and Tb.N (trabecular number) were calculated. Nomenclature, symbols, and units used are those recommended by the Nomenclature Committee of the American Society for Bone and Mineral Research. Radiographs were obtained using a soft X-ray apparatus (TRS-1005, Sofron). μCT analyses were performed by using a micro-CT system (Scan Xmate-A090S). Bone mineral densities were measured using DCS-600EX (Aloka).

Histological staining, immunostaining and electron microscopy. For histological analysis, skeletons were fixed in 4% paraformaldehyde and then decalcified with 10% EDTA. Hematoxylin-eosin and van Gieson staining were performed using 6- μm paraffin sections, according to standard protocols. Immunostaining procedures were performed as described previously³. An anti-osteocalcin antibody (1:100) was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Rabbit antibodies against the C-propeptide of the type I collagen chain (LF41; 1:200; ref. 31) were provided by L. W. Fisher (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). An anti-*OASIS* antibody was used at a 1:100 dilution. For electron microscopy, bone tissue was fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (Agar Scientific Ltd) for 48 h at 4 °C, decalcified in a 10% ethylenediaminetetraacetic acid-Na₂ (EDTA-Na₂) at pH 7.4 for about 4 weeks at 4 °C, post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated, infiltrated and embedded in EPON812. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined using a Hitachi 7100 electron microscope operated at 80kV.

Reporter plasmids and luciferase assay. Mouse *Colla1* promoter 2.3 kb (-2323 to + 97 bp) were inserted into a pGL3-basic vector (Promega; pGL3-*Colla1* promoter, 2.3 bp). All plasmids for *Colla1* promoter mutants were generated by a PCR-based approach using the pGL3-*Colla1* promoter (2.3 kb) as a template. We used the Match program in the gene regulation database (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>) to find the UPRE (unfolded protein response element, TGACGTGG) like sequence (-1591 to -1584 bp in *Colla1* promoter region). MC3T3-E1 cells plated onto 24-well plates were transfected

with a reporter plasmid (0.2 µg) carrying the firefly luciferase gene and the reference plasmid pRL-SV40 (0.02 µg) carrying the *Renilla* luciferase gene under the control of the SV40 enhancer and promoter (Promega) with 0.2 µg of each plasmid expressing effector proteins^{2,32}. After 30 h, cells were lysed in Passive Lysis Buffer (200 µl; Promega). Firefly luciferase and *Renilla* luciferase activities were measured in cell lysates (10 µl) using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a luminometer (Berthold Technologies). Relative activity was defined as the ratio of firefly luciferase activity to that of *Renilla* luciferase. Values are the means from six independent experiments.

Electrophoretic mobility shift and Chromatin immunoprecipitation assays. Electrophoretic mobility shift assay was performed as described previously². The sequences of the oligonucleotides used in the binding were: 5'-AGCTGCCACGGCCAGCGACGTGGCTCCCTCCCCTTCTGT-3' (UPRE-wt) and 5'-AGCTGCCACGGCCAGCGAaGgGGCTCCCTCCCCTTCTGT-3' (UPRE-mt) (lower-case letters indicate mutations). For supershift experiments, samples were treated with an anti-Flag antibody at 4 °C for 1 h before incubation with a radiolabelled probe. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed as described previously². The primers used for the endogenous

mouse *Col1a1* promoter were: 5'-CATTGCTGTCTCCAGCTCTGCTTC-3' (forward) and 5'-TCCAAACCATCCAAGATTCATTG-3' (reverse), yielding a 245-bp product. PCR products were electrophoresed in a 4.8% polyacrylamide gel.

Microarray analysis. Experimental sample RNAs were isolated using RNeasy (Qiagen) and analysed using Mouse 385K Array (MM8 60mer expr) and Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) by NimbleGen Systems, Inc. and Miyazaki Prefectural Industrial Support Foundation, respectively.

Accession number of microarray data. The complete microarray data are available in Gene Expression Omnibus (GEO; accession number, GSE18062).

29. Ikeda, F. *et al.* Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J. Clin. Invest.* **114**, 475–484 (2004).
30. Domenicucci, C. *et al.* Characterization of porcine osteonectin extracted from foetal calvariae. *Biochem. J.* **253**, 139–151 (1988).
31. Fisher, L. W. *et al.* Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* **266**, 61–65 (1995).
32. Xiao, G. *et al.* Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific *osteocalcin* gene expression. *J. Biol. Chem.* **280**, 30689–30696 (2005).

DOI: 10.1038/ncb1963

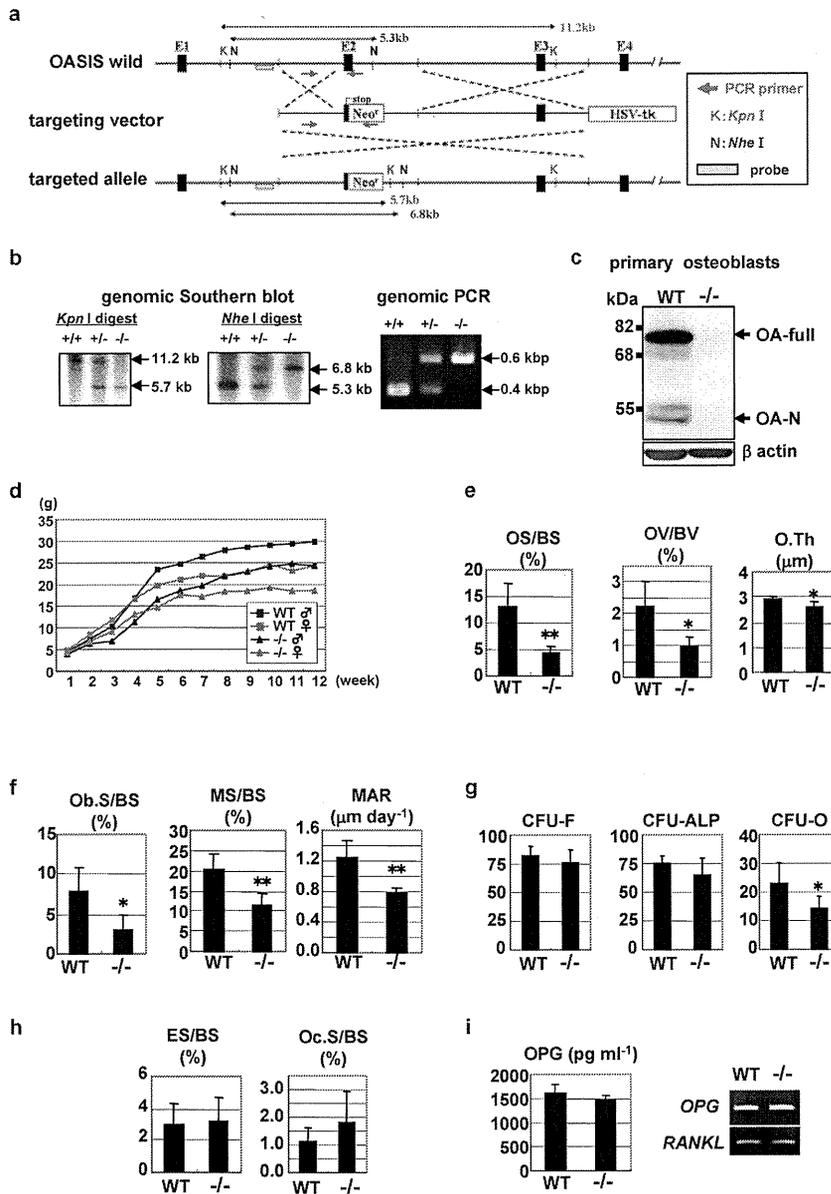


Figure S1 Generation and phenotype of *OASIS*^{-/-} mice. (a) Structure of the genomic *OASIS* locus, targeting vector, and targeted allele after homologous recombination (two sets of primers were used to distinguish mutant from WT loci; probes were used for genomic Southern blotting). (b) Southern blot analysis of tails digested with the indicated enzyme and PCR genotyping. Each band is detected in the expected manner. (c) Western blotting of *OASIS* using lysates from primary cultured osteoblasts. *OASIS* is expressed as full-length (OA-full) and cleaved fragments (OA-N) in primary osteoblasts, but is not detected in primary osteoblasts from *OASIS*^{-/-} mice. (d) Representative body weight plotted against age in *OASIS*^{+/+} (WT) and ^{-/-} littermates. *OASIS*^{-/-} mice were born at the expected Mendelian ratios, viable, and had no histological evidence of internal organ dysfunction including the brain; however, both male and female *OASIS*^{-/-} mice exhibit growth retardation. *OASIS*^{+/+} mice displayed no obvious anatomical or histological abnormalities compared with WT. (e) Osteoid measurements reveal osteoid surface (OS/BS), osteoid volume (OV/BV), and osteoid thickness

(O.Th) were significantly decreased in *OASIS*^{-/-} (mean ± SD, N = 5, **p < 0.01, *p < 0.05; t-test). (f) Reductions in the mineral apposition rate (MAR) and mineralizing surface (MS/BS) with the decrease of the osteoblast surface (Ob.S/BS) in *OASIS*^{-/-} versus WT (mean ± SD, N = 5, **p < 0.01, *p < 0.05; t-test). (g) Total colony forming units-fibroblasts (CFU-F), colony forming units-alkaline phosphatase (CFU-ALP), and colony forming units-osteoblasts (CFU-O) in bone marrow stromal cell cultures of WT and *OASIS*^{-/-} mice (mean ± SD, N = 4, *p < 0.05; t-test). (h) Histomorphometric analysis reveals that a similarly eroded surface (ES/BS) and osteoclast surface (Oc.S/BS) are not significantly changed in *OASIS*^{-/-} mice compared with WT (mean ± SD, N = 5). (i) OPG and RANKL levels in primary osteoblasts. Left; measurements of OPG in supernatants of WT and *OASIS*^{-/-} osteoblast cultures. OPG are not significantly changed in *OASIS*^{-/-} osteoblasts compared with WT (mean ± SD, N = 4). Right; RT-PCR analysis of *OPG* and *RANKL* mRNAs. There are no differences in the expressions of *OPG* and *RANKL* between WT and *OASIS*^{-/-} osteoblasts.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

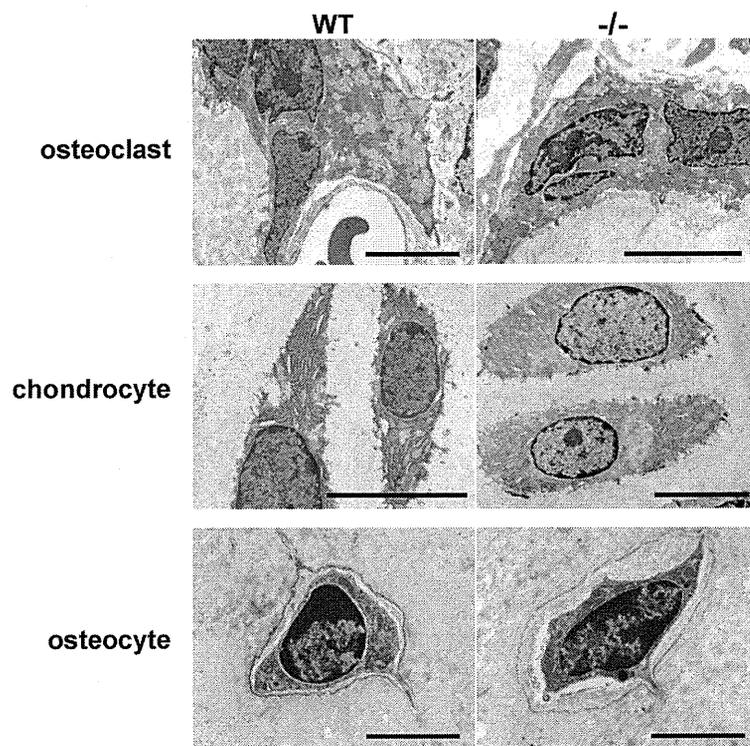


Figure S2 Electron microscopic analysis in tibiae of 4-month-old WT and *OASIS*^{-/-} mice. No structural changes are observed in osteocytes (scale Bar = 3 μ m), osteoclasts (scale Bar = 6 μ m), and chondrocytes (scale Bar = 6 μ m) in *OASIS*^{-/-} mice.

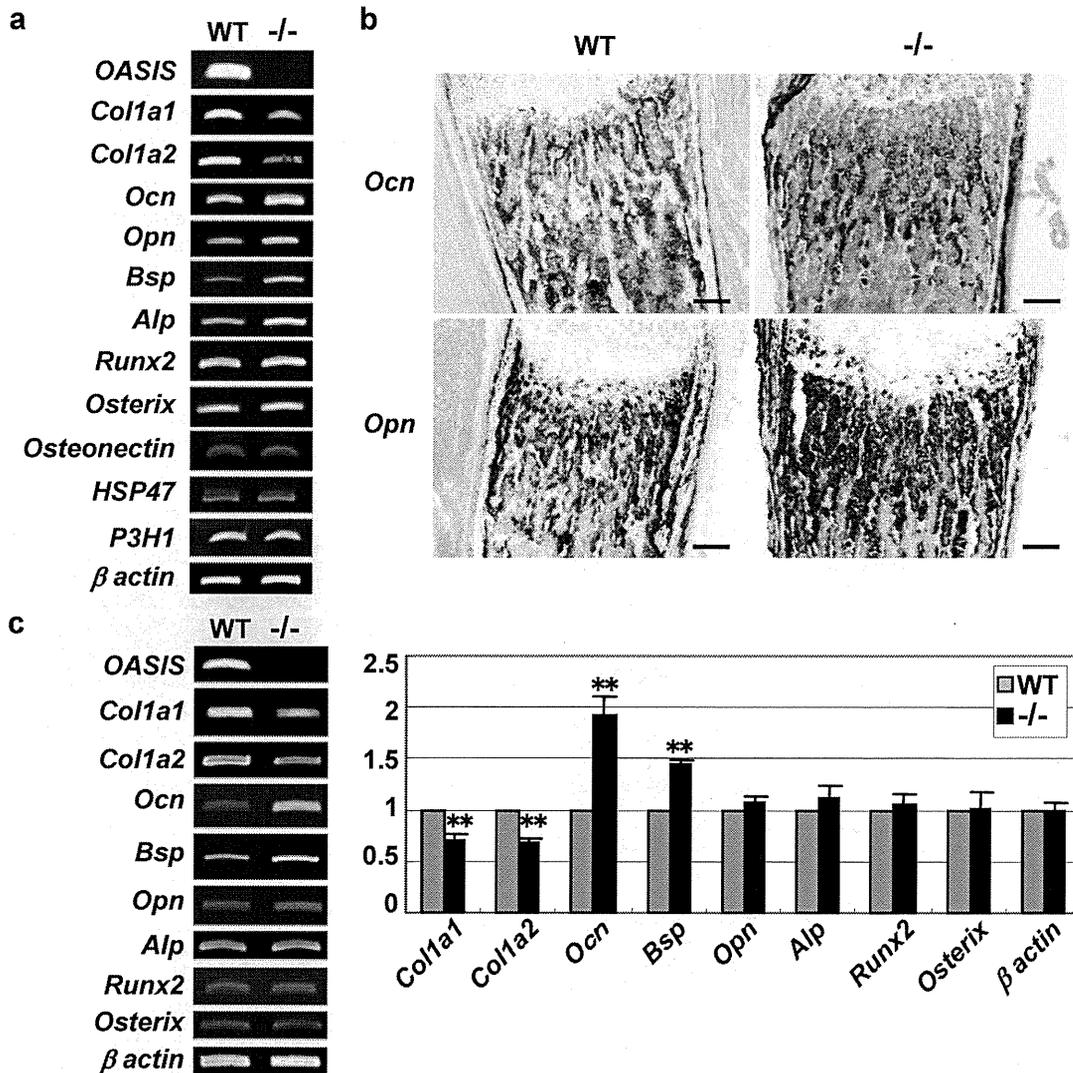


Figure S3 Comparison of gene expressions in bone tissues between WT and *OASIS*^{-/-} mice at postnatal 4 days (P4). (a) RT-PCR analysis of P4 calvaria from WT and *OASIS*^{-/-} mice. *Col1a1* and *Col1a2* mRNAs are down-regulated, and *Osteocalcin* (*Ocn*), *Osteopontin* (*Opn*), *Bone sialoprotein* (*Bsp*), and *Alkaline phosphatase* (*Alp*) mRNAs are

up-regulated in calvaria of *OASIS*^{-/-} mice. (b) *In situ* hybridization analysis of *Ocn* and *Opn* using P4 WT and *OASIS*^{-/-} tibiae (scale Bar = 200 μ m). (c) RT-PCR analysis of various genes in cultured osteoblasts from WT and *OASIS*^{-/-} mice. Right panel, quantitative analysis of RT-PCR (mean \pm SD, N = 3, **p < 0.01; t-test).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

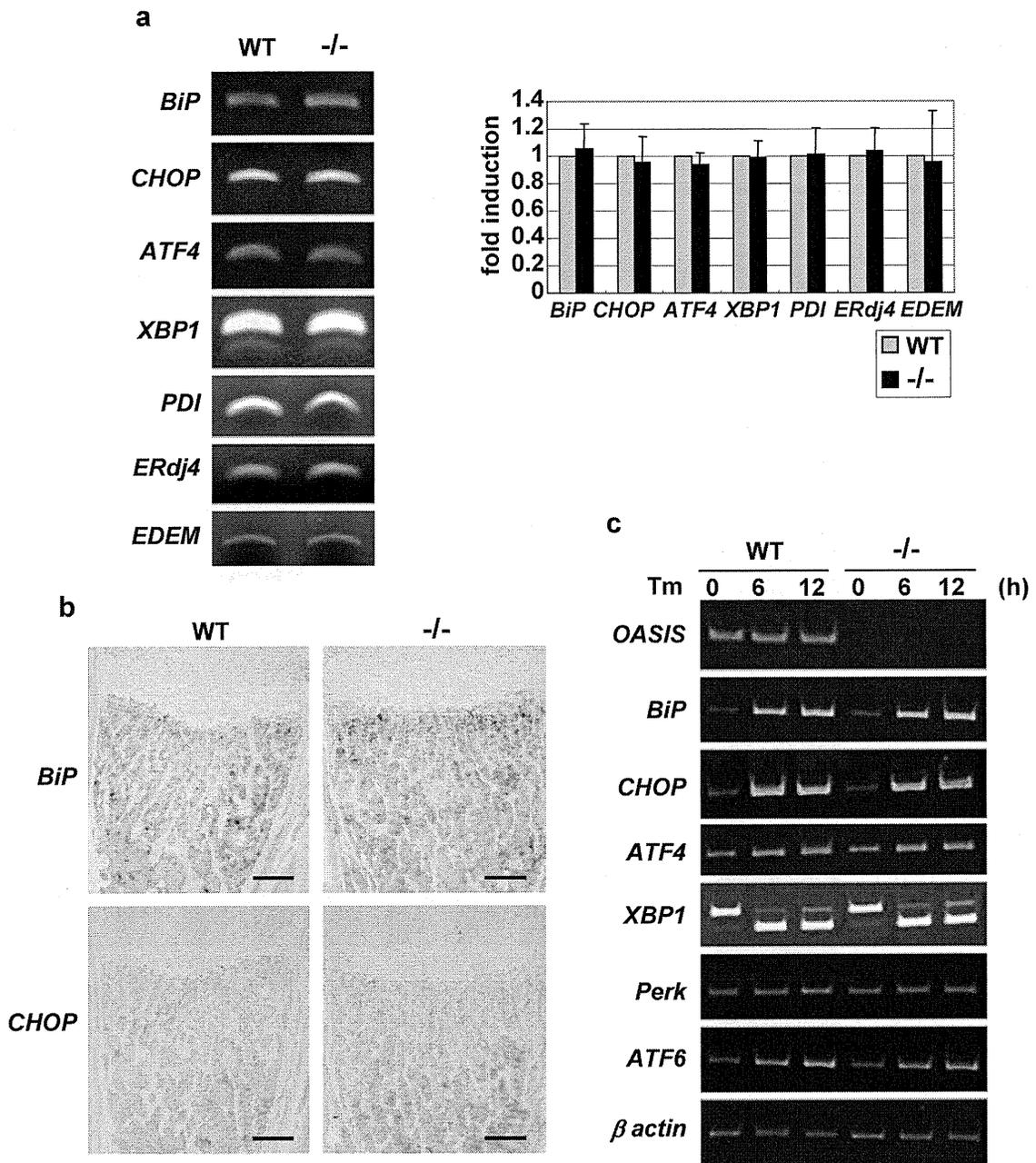


Figure S4 ER stress response in *OASIS*^{-/-} osteoblasts. **(a)** RT-PCR analysis of P4 calvaria in WT and *OASIS*^{-/-} mice. The indicated UPR-related genes in *OASIS*^{-/-} calvaria are not changed compared with those of WT. A right panel shows the quantitative analysis of RT-PCR (mean ± SD, N = 3). **(b)** *In situ* hybridization analysis of *BiP* and *CHOP* in WT and *OASIS*^{-/-} tibiae at P4. There are no differences in the expressions of *BiP* and *CHOP*

between WT and *OASIS*^{-/-} tibia (scale Bar = 200 μm). **(c)** RT-PCR analysis of UPR-related genes in primary cultured osteoblasts in WT and *OASIS*^{-/-} mice. Osteoblasts were exposed to 3 μg ml⁻¹ tunicamycin (Tm) for the indicated time, and mRNA was then extracted to examine the inductive level of each gene. The induction of each gene is almost the same in WT and *OASIS*^{-/-} osteoblasts.

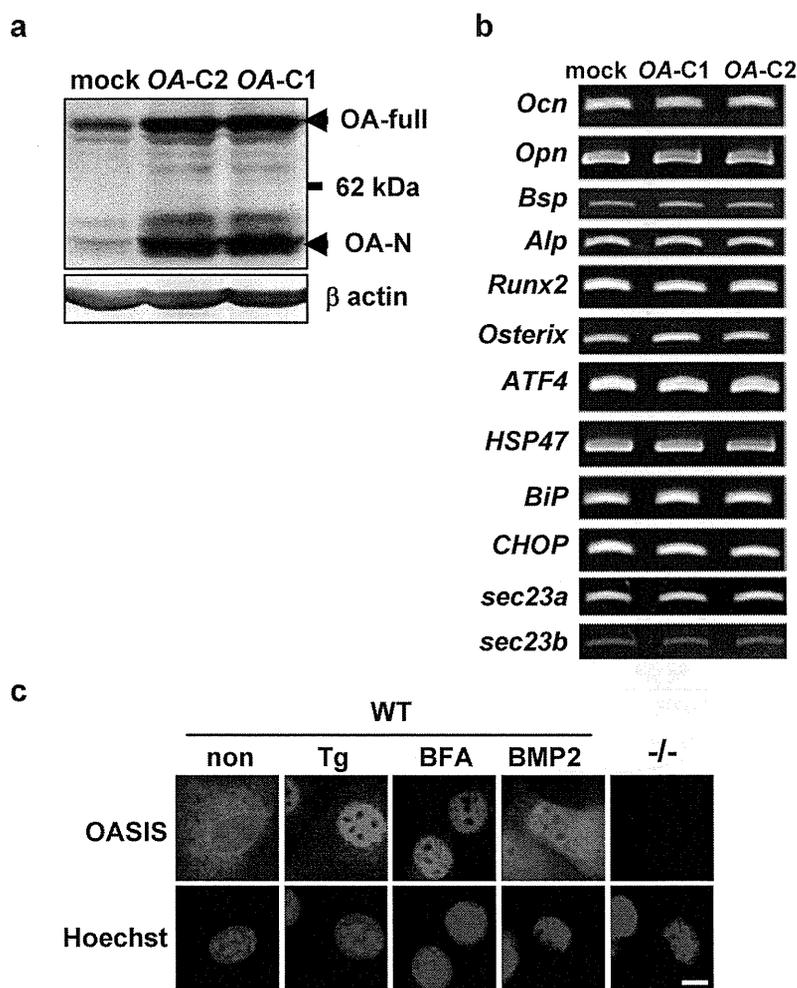


Figure S5 Alterations of genes in MC3T3-E1 cells infected with adenovirus expressing *OASIS* and immunostaining of OASIS in primary osteoblasts. (a) Western blotting of lysates from MC3T3-E1 cells infected with each adenovirus using anti-OASIS antibody. OA-C1 and C2 are the adenovirus indicated as expressing *OASIS* clone1 and clone2, respectively. The expression levels of OASIS in infected cells are shown. (b) RT-PCR analysis of bone formation-related genes and ER stress-related genes in MC3T3-E1 cells infected with adenovirus expressing *OASIS*. The expression levels of these

genes were not affected. (c) Indirect immunofluorescence with anti-OASIS antibodies showing the subcellular localization of OASIS. Hoechst staining showing the nucleus. Cells were treated with 1 μ M thapsigargin (TG) or 1 μ g ml⁻¹ brefeldin A (BFA) for 4 h. For BMP2 treatments, cells were cultured with 100 ng ml⁻¹ BMP2 for 5 days. Note that the immunoreactivities of OASIS are detected in the perinuclear area and also weak signals in nucleus under normal conditions. By contrast, OASIS signals accumulate in the nucleus after ER stress or treatments with BMP2 (scale Bar = 10 μ m). -/-; *OASIS*^{-/-} osteoblasts.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

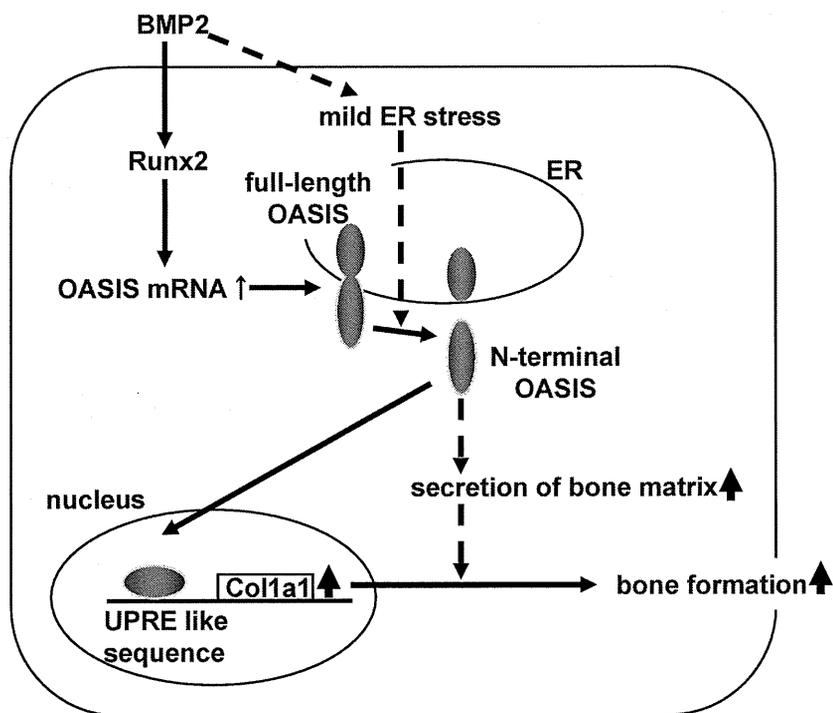


Figure S6 Putative mechanisms responsible for bone formation by OASIS in osteoblasts.

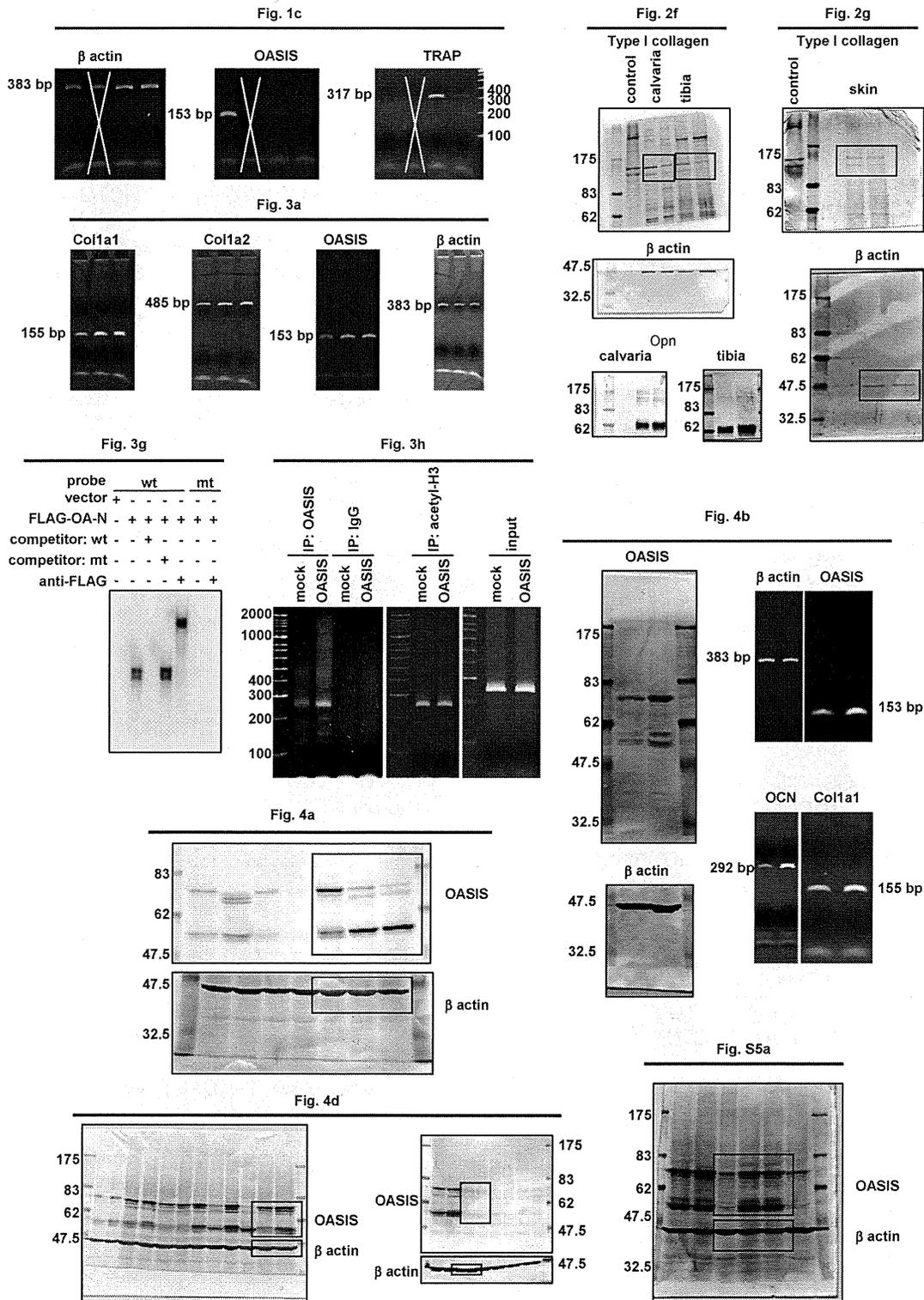


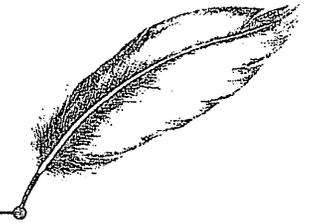
Figure S7 Full scans of key figures

Supplement table

OASIS-fwd CTTTGTGCCTGTCAAGATGGAG	BiP-fwd GTTTGCTGAGGAAGACAAAAAGCTC
OASIS-rev GCAGCAGCCATGGCAGAGGAG	BiP-rev CACTTCCATAGAGTTTGCTGATAAT
osteocalcin-fwd AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	CHOP-fwd GTCCAGCTGGGAGCTGGAAG
osteocalcin-rev AGCTGCTGTGACATCCATAC	CHOP-rev CTGACTGGAATCTGGAGAG
beta-actin-fwd TCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC	XBP1-fwd ACACGCTTGGGAATGGACAC
beta-actin-rev TCCTGCTTGCTGATCCACAT	XBP1-rev CCATGGGAAGATGTTCTGGG
TRAP-fwd AAATCACTCTTTAAGACCAG	ATF4-fwd GGACAGATTGGATGTTGGAGAAAATG
TRAP-rev TTATTGAATAGCAGTGACAG	ATF4-rev GGAGATGGCCAATTGGGTTTCC
procollagen 1a1-fwd CCCCAACCCTGGAAACAGAC	PDI-fwd CAAGATCAAGCCCCACCTGAT
procollagen 1a1-rev GGTACAGTTCAGTTGGTCAAAGG	PDI-rev AGTTCGCCCAACCAGTACTT
procollagen 1a2-fwd GCAATCGGGATCAGTACGAA	ERdj4-fwd CCCAGTGTCAAACCTGTACCAG
procollagen 1a2-rev CTTTCACGCCTTTGAAGCCA	ERdj4-rev AGCGTTTCCAATTTTCCATAAATT
OPN-fwd TCACCATTCCGGATGAGTCTG	EDEM-fwd TGGGTTGGAAAGCAGAGTGGC
OPN-rev ACTTGTGGCTCTGATGTTCC	EDEM-rev TCCATTCTACATGGAGGTAGAAGGG
ALP-fwd GCCCTCTCCAAGACATATA	PERK-fwd TCTTGTTGGGTCTGATGAAT
ALP-rev CCATGATCACGTCGATATCC	PERK-rev GATGTTCTTGCTGTAGTGGGG
Runx2-fwd CCGCACGACAACCGCACCAT	ATF6-fwd GGATTTGATGCCTTGGGAGTCAGAC
Runx2-rev CGCTCCGGCCCAAAATCTC	ATF6-rev ATTTTTTTCTTTGGAGTCAGTCCAT
Osterix-fwd CTGGGGAAAGGAGGCACAAAGAAG	BSP-fwd AACAATCCGTGCCACTCA
Osterix-rev GGGTTAAGGGGAGCAAAGTCAGAT	BSP-rev GGAGGGGGCTTCACTGAT
osteonectin-fwd ATTTGAGGACGGTGCAGAGG	OPG-fwd AACCCCAGAGCGAAACACAGT
osteonectin-rev TCTCGTCCAGCTCACACACT	OPG-rev GGCTCTCCATCAAGGCAAGAA
HSP47-fwd ACCACAGGATGGTGGACAACCGT	RANKL-fwd CCAGCATCAAAATCCCAAGTT
HSP47-rev ATCTCGCATCTTGTCTCCCTTGGG	RANKL-rev TCAAGGTTCTCAGTGGCACAT
P3H1-fwd GTGCAGGCAGATGACCTGGT	Sec23a-fwd GACCTACCACCCATCCAGTACGAG
P3H1-rev TCACGCTGCTGACGGCAGCT	Sec23a-rev CTGCATGGACTCCTTCAGAGCCTG
	Sec23b-fwd CAGGAGATGCTGGGCCTGACCAAGTC
	Sec23b-rev CCACAGATCTTCCACTGACTTGTG

1. 抗 Xa 薬作用

2) 抗炎症作用とそのメカニズム



国立長寿医療センター研究所口腔疾患研究部 松下 健二 (Matsushita, Kenji)

THROMBOSIS and Circulation

§ 論文のポイント

- [1] 血液凝固反応と炎症反応との間には密接な連関が存在し、その連関の中心的な役割を担うのが protease-activated receptors (PARs) である。
- [2] PAR-2 は、Xa 因子によって活性化され、各種細胞からのサブスタンス P や calcitonin gene related peptide (CGRP), IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-9 などの産生を促し、炎症、疼痛、浮腫、敗血症性ショックなどに関与する。
- [3] 歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* が産生するトリプシン様酵素 gingipain は、PAR-2 を活性化して炎症反応を強力に惹起する。
- [4] Xa 因子および TF/VIIa/Xa 複合体は PAR-1, PAR-2 を限定分解し、PAR を活性化する。次いで、供役 G 蛋白質 (Gq), PLC, PKC を次々に活性化して細胞内カルシウムを動員する。同時に、MAPK を活性化して炎症反応を惹起する。
- [5] Xa 阻害薬 DX-9065 a は、Xa 因子および gingipain による IL-6 および MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-9) の産生誘導を強力に阻害し、抗炎症作用を示す。

§ キーワード

プロテアーゼ活性化型受容体 (PARs) / 血管内皮細胞 / gingipain / DX-9065 a

はじめに

活性化血液凝固第 X 因子(Xa 因子)は、内因系(接触因子系)と外因系(組織因子系)の合流点で機能し、血液凝固反応の律速段階を規定する因子である。凝固亢進状態において Xa 因子を効率よく阻害することは血液凝固を制御する上で極めて重要である。また、Xa 因子は血液凝固反応における役割に加え、様々な細胞に作用し多彩な生理活性を示す。したがって、抗 Xa 薬はその応用範囲がさらに広がる可能性を秘めている。特に、凝固反応と炎症反応は密接に関連しており、抗 Xa 薬による炎症制御の可能性が示されている。本稿では、Xa 因子の細胞生理活性、特に炎症惹起作用について述べるとともに、Xa 阻害薬の抗炎症作用について解説する。

PARs を介した Xa の炎症惹起作用

Xa 因子は、その前駆体である X 因子が活性化されたセリンプロテアーゼであり、軽鎖と重鎖がジスルフィド結合により連結された構造をとる。Xa 因子は γ -カルボキシグルタミン酸(Gla)ドメイン(Ca^{2+} 、リン脂質との結合領域)、2つの上皮増殖因子(EGF)様ドメイン(Va 因子結合領域)とセリンプロテアーゼドメインを有する。Xa, Va, Ca^{2+} 、とリン脂質はプロトロンビナーゼ複合体を形成し、プロトロンビンをトロンビンに変換する。Xa 因子はそれ自体がトロンビン生成能を有しているが、プロトロンビナーゼ複合体を

形成することによりその生成能は 10^5 倍増強される。Xa 因子は血液凝固カスケードの中心的因子の1つであるとともに、プロテアーゼ活性化型受容体(protease-activated receptors : PARs)を介して種々の細胞応答を誘導する生理活性物質でもある。血液凝固反応と炎症反応との間には密接な連関が存在し、その連関の中心的な役割を担うのが PARs である¹⁾²⁾。現在4種類の PARs がクローニングされている。PARs は血管内皮細胞、血小板、単球、好中球、リンパ球をはじめとした全身の組織・臓器で発現しており多彩な生理作用を示す。トロンビンは、PAR-1, PAR-3, および PAR-4 のリガンドであり、これらの受容体を活性化し、細胞内にシグナルを伝えている。トロンビンは血小板膜上の PAR-1 と PAR-4 を活性化し、血小板の形態変化、脱顆粒、トロンボキサン A_2 の生成、GPIIb/IIIa の活性化を惹起して、血小板の凝集を引き起こす。

また PAR-1 は、生体内の様々な臓器、細胞に発現し多彩な生理活性を示す。トロンビンは、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に発現した PAR-1 を活性化し、プロテイン C キナーゼ、NF- κ B を次々と活性化して、IL-1, IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカイン、ICAM-1, P-セレクチンといった細胞接着因子の発現を強力に誘導する。また、PAR-1 シグナルは血管平滑筋細胞の増殖と遊走を惹起する。さらに、フォスフォリパーゼ C を活性化し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加して、血管内皮細胞からの Weibel Palade 小体のエキソサイトシスを誘導する³⁾⁻⁶⁾。したがって、トロンビンによる PAR-1 の活性化は、動脈硬化や血栓の形成に関わってくる。また、肥満細胞に発現する PAR-1 が活性化されると、ヒスタミン、血小板活性化因子(PAF)、炎症性サイトカインの放出が誘導される。さらに、乳癌細胞上の PAR-1 が matrix metallo-

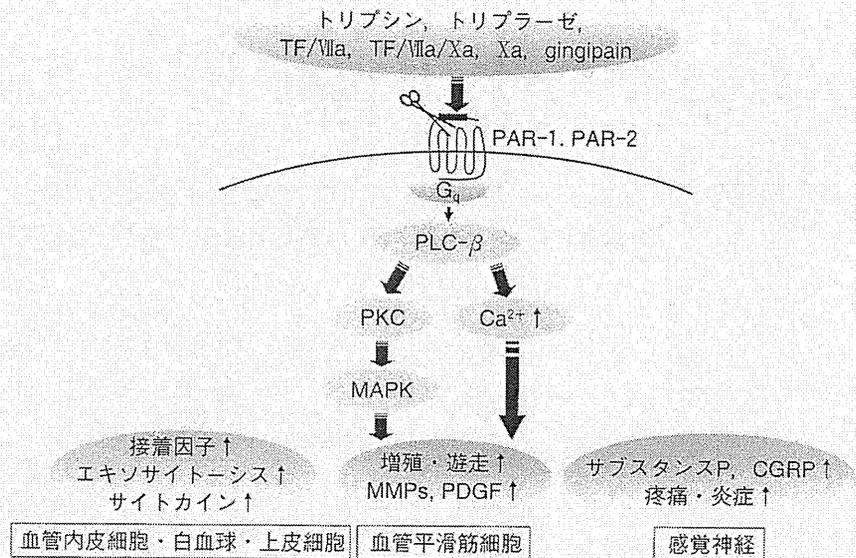


図1 PARを介した炎症惹起作用

proteinase-1 (MMP-1) によって活性化されて、同細胞の浸潤・転移が起こることも示唆されている⁷⁾。このように、PAR-1は止血・血栓形成に重要であるばかりでなく、炎症反応や癌の浸潤・転移にまで関与する分子である。一方、トロンビンは血管内皮細胞上のトロンボモジュリンとも結合し、複合体を形成してプロテインCを活性化する。この活性化プロテインCはEPCR (endothelial protein C receptor)と複合体を形成し、PAR-1を活性化して抗炎症作用を発揮することも報告されている⁸⁾。

PAR-2は、トリプシン、トリプターゼ、Xa-組織因子複合体、Xa-組織因子-VIIa 因子複合体によって活性化され、各種細胞からのサブスタンスPやCGRP (calcitonin gene related peptide)、IL-6、IL-8、MMP-3、MMP-9などの産生を促し、炎症、疼痛、浮腫、敗血症性ショックなどに関与している(図1)。われわれは、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* が産生するトリプシン様酵素 gingipain が、PAR-2を活性化して歯肉および歯髄に炎症反応を強力に惹起することを明らかにした。すなわち、gingipainは歯髄細胞上のPAR-2を介してMAPKを活性化し、サブスタンスPとCGRPの発現を誘導する。そして、歯髄組織に神経性炎症を惹起し、歯痛を誘発する⁹⁾。また、gingipainは歯肉繊維芽細胞上のPAR-2を活性化することによって、IL-6、IL-8、MMP-1などの発現を強力に誘導し、歯周病の発症に関わる¹⁰⁾。さらに、gingipainはPARの

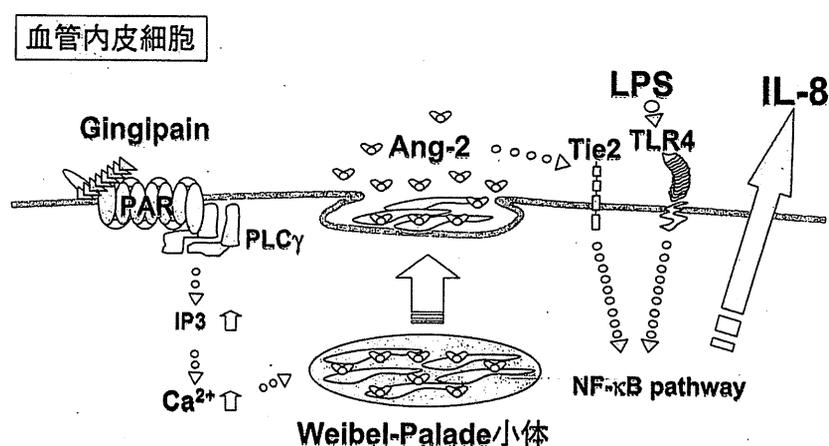


図2 PARシグナルを介した血管内皮細胞の活性化

活性化を介して血管内皮細胞におけるAngiopoietin 2 (Ang 2)の分泌を誘導し、同細胞のLPSに対する感受性を高める(図2)¹¹⁾。このように、PARシグナルは炎症反応に関与すると考えられる。

Xa因子は、そのレセプターを介して動脈硬化、血栓形成、および炎症反応に関わる多様な細胞生理活性を発揮する。現在Xa因子の受容体として、PAR-1およびPAR-2が認知されている¹²⁾。Xa因子単独でもPAR-1、PAR-2の活性化は起こるが、TF/VIIa/Xa 3分子の複合体の方が5倍以上活性化能が高いことが明らかになっている。また、その複合体による活性化はXa因子の酵素活性部位が重要であることが示されている。Xa因子およびTF/VIIa/Xa複合体はXaの酵素活性によってPAR-1のArg 41-Ser 42の間とPAR-2のArg 34-Ser 35の間を限定分解し、活性化する。次いで、同分子に供役しているG蛋白質(Gq)を活性化し、PLC-β、PKCを活性化して細胞内カルシウムを動員する。同時に、

MAPKを活性化して種々の遺伝子の発現を誘導し、血小板の活性化とともに炎症反応を惹起する(図1)。

Xa因子は血管内皮細胞における各種接着因子(E-selectin, ICAM-1, VCAM-1など)の発現を誘導する¹³⁾¹⁴⁾。また、Xa因子は血管内皮細胞におけるIL-6、IL-8、macrophage migration inhibitory factorなどの炎症性サイトカインの産生も誘導する¹⁵⁾。さらに、Xa因子はTFを強力に誘導する。これらの生理活性はPAR-1およびPAR-2の活性化を介して起こる。Xa因子は血管平滑筋の増殖と遊走を引き起こす。このメカニズムについては、また、Xa因子が同細胞からのPDGF, epiregulin (epidermal growth factor-related ligand)の産生を促す、あるいはfibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1)を活性化することによって誘導されることが示唆されている¹⁶⁾¹⁷⁾。また、Xa因子は血管平滑筋からのMMP-2の放出を誘導し、同細胞の浸潤を促す。このような、血管内皮および血管平滑筋に対する

生理活性は Xa 因子が動脈硬化および血栓形成に関わっている可能性を示唆している。また、Xa 因子は、単球・マクロファージにも作用し、TF や炎症性サイトカインの発現を誘導する。また、X 因子は、単球・マクロファージ上に発現している CD 11 b/CD 18 (Mac-1) に結合して Xa 因子となり、同細胞を活性化するとともに凝固系を活性化する。さらに Xa 因子は、脳神経細胞、メサンギウム細胞、および関節滑膜細胞などの遊走、増殖などを惹起して種々の病態形成に関与することが示唆されている(図 1)。

Xa 阻害による炎症性疾患治療の可能性

Xa 因子などの血液凝固因子は単に血液を固めるだけでなく様々な細胞応答も促し、炎症反応に深く関わっている。Xa 因子はその受容体である PAR-1, PAR-2 を介して炎症反応を惹起する。Xa 因子は炎症メディエーターとしても機能し、凝固と炎症の両方を修飾することが示されている。口腔内の代表的な疾患である歯周病は慢性的な歯肉出血が最も顕著な症状の 1 つである。したがって、歯周病患者の歯周組織においては血液凝固反応が常に亢進している状態であると考えられる。実際に、歯周病患者の患部から採取した歯肉溝滲出液中には同患者の健常部から採取したそれに比べて 5 倍から 10 倍の Xa 活性が認められる¹⁰⁾。炎症歯肉においては持続的な X 因子の活性化が起こり、炎症反応が助長されているものと考えられる。歯周病の原因菌である *P. gingivalis* の産

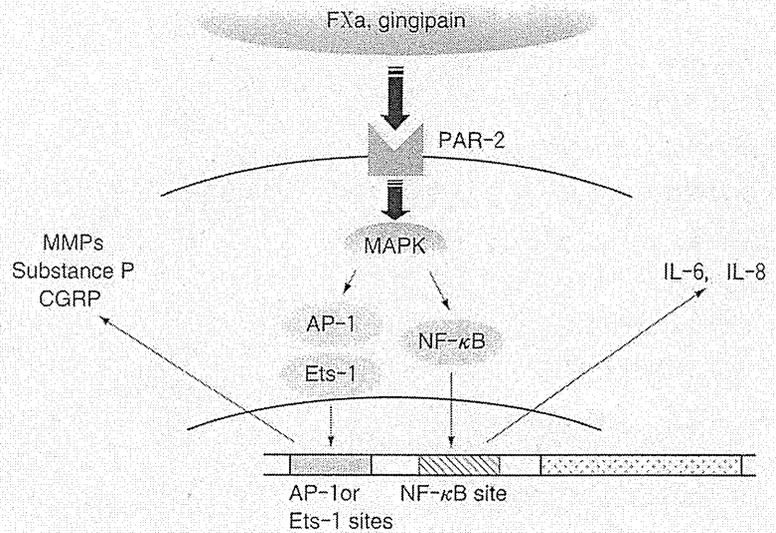


図 3 Xa 因子と gingipain による炎症惹起機序

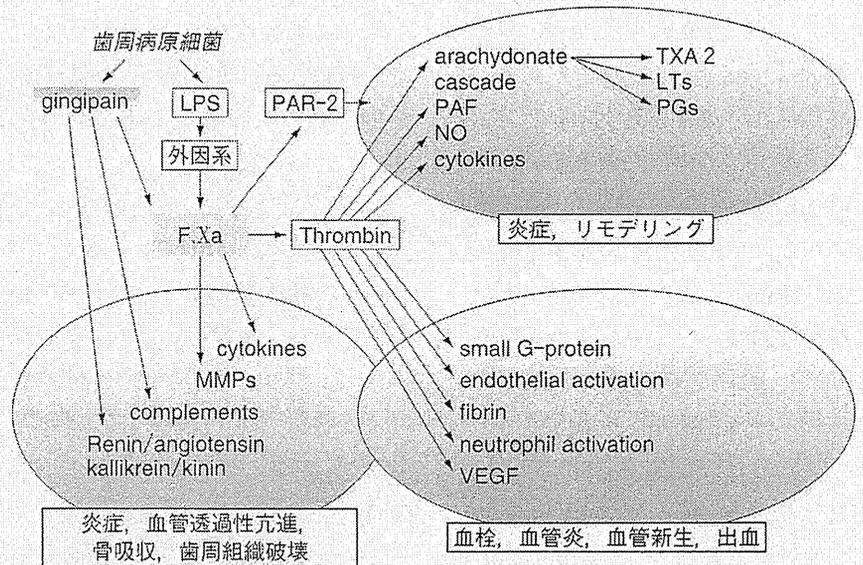


図 4 歯周病原細菌による Xa 因子の活性化と歯周病への関与

生するトリプシン様酵素 gingipain は、X 因子を活性化する¹⁸⁾。同酵素は内因性の凝固因子阻害蛋白であるアンチトロンビン III や tissue factor pathway inhibitor (TFPI) で抑制されにくいので、gingipain による Xa 因子の生成は大量にかつ無秩序に行われる。したがって、患部歯肉においては凝固因子の恒常的な活性化に

よって惹起される慢性炎症と凝固因子の消耗による出血が起こると考えられる。

最近われわれは、Xa 因子が培養歯肉線維芽細胞における IL-6 および IL-8 の発現、さらには matrix metalloproteinase (MMP)-1 の発現を強力に誘導することを明らかにした(図 3)¹⁰⁾。また、これらの発現誘

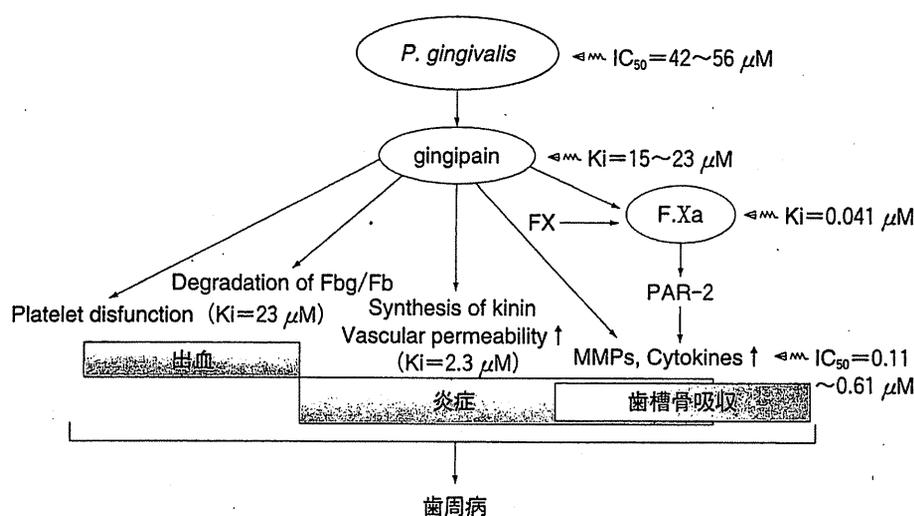


図5 抗 Xa 薬 DX-9065 a の歯周病治療薬としての可能性

導には PAR-2 が必須であること、加えて IL-6 および MMP-1 の誘導には Xa 因子の catalytic activity が必須であった。さらに、Xa 因子は MMP-1 だけでなく、内因性 gelatinase である MMP-2 および MMP-9 もヒト歯肉線維芽細胞系およびヒト好中球培養系においてそれぞれ誘導した。これらの事実は、Xa 因子が歯周病の病態形成に深く関わっていることを示唆している。図4に血液凝固因子特に Xa 因子の歯周病の病態への関与をまとめた。歯周病は、歯槽骨、支持組織を巻き込んだ慢性進行性疾患であり、その成立には Xa 因子が深く関わっている。すなわち、歯周病原菌 *P. gingivalis* の産生する gingipain は、歯肉局所において Xa 因子を多量に生成する。加えて、この菌の LPS によって外因系の凝固カスケードが活性化されてさらに Xa 因子の生成が助長される。局所において多量に生成された Xa 因子は、PAR-2 を介して炎症性サイトカインおよび matrix metalloproteinase

を誘導し、炎症反応を強力に惹起して歯周組織の破壊を促進する。さらに Xa 因子はトロンビンの生成を促す。そして、このトロンビンによる炎症反応も加わって歯周組織破壊がさらに促進されると考えられる。

このように Xa 因子は歯周病の病態形成に深く関わっている。そこでわれわれは、Xa 因子を制御することによる歯周病治療の可能性を検討するために、Xa 阻害薬 DX-9065 a の歯周病治療薬としての有用性を検討した。その結果、DX-9065 a は Xa 因子および gingipain (RgpA および RgpB) による IL-6 および MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-9) の産生誘導を強力に抑制した (IC₅₀ = 0.11 ~ 0.64 μM)¹⁰⁾。また、gingipain の酵素活性も強力に抑制すること (Ki = 15 ~ 23 μM) から、gingipain による炎症惹起作用 (コラーゲン分解、補体の活性化、キニン系の活性化等) を阻害することが想定された。さらに、歯周病原菌 *P. gingivalis* の増殖も強力に抑制すること (IC₅₀ =

42 ~ 56 μM) から、DX-9065 a が新規の歯周病治療薬として有望であることが示唆された (図5)。

おわりに

Xa 因子は、血液凝固反応の要の分子として作用するだけではなく、多様な細胞に多彩な生理作用を示す。特に、Xa 因子は PAR を介して炎症反応を惹起する。Xa 因子、トロンビンなどの凝固因子による炎症と凝固反応の連関は、動脈硬化、血栓症、感染症などの慢性炎症が基盤となる病態形成に重要である。抗 Xa 薬は、Xa 因子が関与する炎症性疾患の治療にも有用であろう。

References

- 1) Coughlin SR : Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature* **407** : 258-264, 2000
- 2) Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, et al : Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of re-

- ceptor activation. *Cell* **64** : 1057-1068, 1999
- 3) Matsushita K, Yamakuchi M, Morrell CN, et al : Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel-Palade-body exocytosis. *Blood* **105** : 207-214, 2005
 - 4) Matsushita K, Morrell CN, Lowenstein CJ : Sphingosine 1-phosphate activates Weibel-Palade body exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** : 11483-11487, 2004
 - 5) Matsushita K, Morrell CN, Mason RJ, et al : Hydrogen peroxide regulation of endothelial exocytosis by inhibition of N-ethylmaleimide sensitive factor. *J Cell Biol* **170** : 73-79, 2005
 - 6) Matsushita K, Morrell CN, Cambien B, et al : Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* **115** : 139-150, 2003
 - 7) Boire A, Covic L, Agarwal A, et al : PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* **120** : 303-313, 2005
 - 8) Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, et al : Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* **296** : 1880-1882, 2002
 - 9) Tancharoen S, Sarker KP, Imamura T, et al : Neuropeptide release from dental pulp cells by RgpB via proteinase-activated receptor-2 signaling. *J Immunol* **174** : 5796-5804, 2005
 - 10) Matsushita K, Imamura T, Tomikawa M, et al : DX-9065 a inhibits proinflammatory events induced by gingipains and factor Xa. *J Periodontol Res* **41** : 148-156, 2006
 - 11) Inomata M, Into T, Ishihara Y, et al : Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. *Microbes Infect* **9** : 1500-1506, 2007
 - 12) Camerer E, Huang W, Coughlin SR : Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 5255-5260, 2000
 - 13) Hezi-Yamit A, Wong PW, Bien-Ly N, et al : Synergistic induction of tissue factor by coagulation factor Xa and TNF : evidence for involvement of negative regulatory signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** : 12077-12082, 2005
 - 14) Senden NH, Jeunhomme TM, Heemskerk JW, et al : Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* **161** : 4318-4324, 1998
 - 15) Busch G, Seitz I, Steppich B, et al : Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes : implications in acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25** : 461-466, 2005
 - 16) Koo BH, Kim DS : Factor Xa induces mitogenesis of vascular smooth muscle cells via autocrine production of epiregulin. *J Biol Chem* **278** : 52578-52586, 2003
 - 17) Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, et al : Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **94** : 340-345, 2004
 - 18) Imamura T, Potempa J, Tanase S, et al : Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* **272** : 16062-16067, 1997

血管障害を基盤とした歯周病と糖尿病の関連性

* 国立長寿医療センター研究所 口腔疾患研究部

松下健二

歯科臨床の現場では、従来から歯周病は糖尿病合併症として認知されてきた。そして近年、大規模疫学調査の結果から両者の相関関係が明確にされた。一方、両者の因果関係についてはエビデンスが十分ではない。糖尿病患者においては、糖化タンパク質AGEがマクロファージなどの炎症性細胞を活性化するとともに、血管内皮を障害することにより歯周組織の炎症増悪と創傷治癒の遅延が起こっている可能性がある。一方、歯周病原細菌の産生するプロテアーゼやリポ多糖は、TNF- α をはじめとした炎症性サイトカインの産生を促し、歯周組織とともに全身に炎症を波及させることで、全身の血管を障害して糖尿病の病態を増悪する可能性が考えられる。

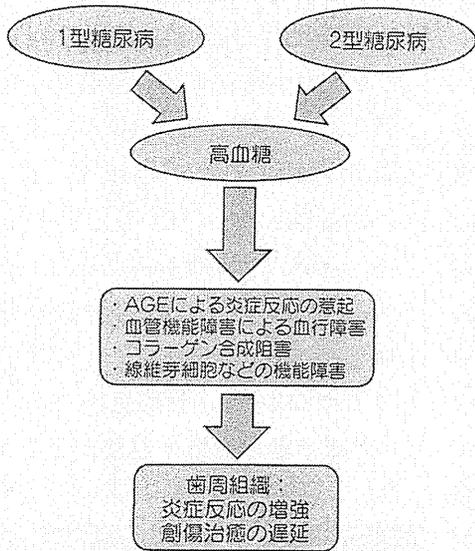


図1 糖尿病が歯周病に及ぼす影響の一例
糖尿病においてみられる高血糖は、炎症反応の増強、血管障害、代謝障害などを引き起こすことにより歯周組織の炎症増悪と創傷治癒の遅延をもたらす。

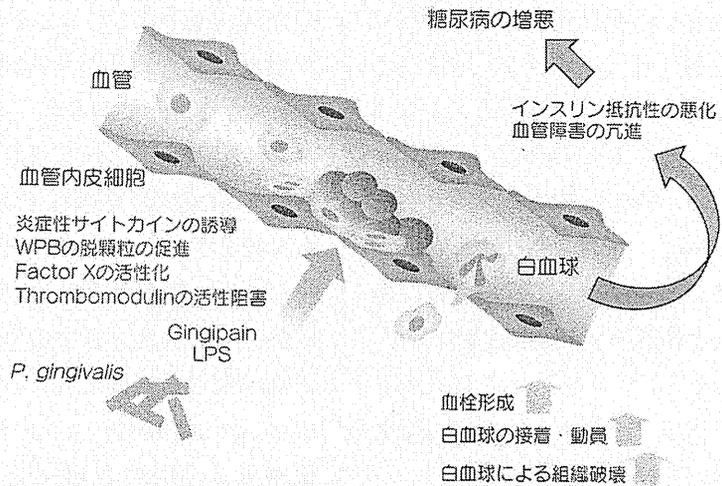


図2 血管を基盤とした歯周病による糖尿病の増悪機序

歯周病原細菌の産生するトリプシン様酵素gingipainやリポ多糖は、歯周組織および全身の血管に作用し、炎症反応の増強や血栓形成を促進することにより糖尿病の病態を増悪する可能性がある。

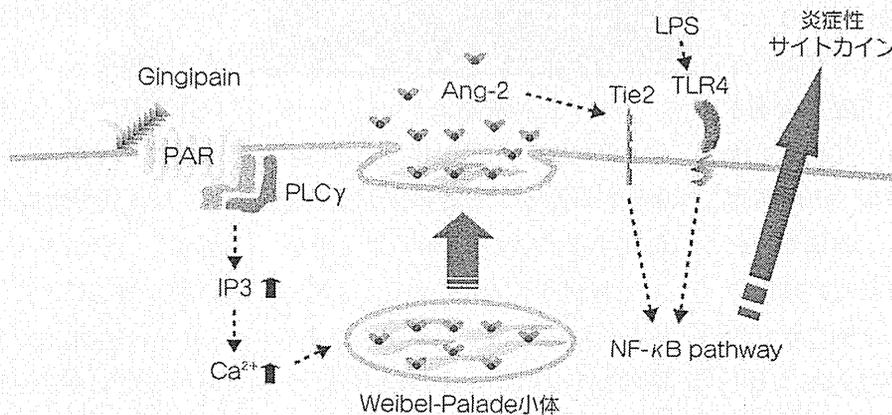


図3 歯周病原細菌由来プロテアーゼによる血管の免疫応答の増幅機序

歯周病原細菌 *P. gingivalis* の産生するgingipainは血管内皮のエキソサイトーシスを誘導し、LPSに対する血管内皮の免疫応答を増強する。

はじめに

歯周病は日本国民の約8割が罹患する国民病であり、歯の喪失の最大原因となる疾患である。歯周病は歯周ポケットに生息した一連の細菌群による感染症であるが、生活習慣がその発症と進行を左右する生活習慣病の側面も有する。また、近年歯周病と全身疾患の関連性が明らかになり、歯周医学 (Periodontal Medicine) といった学問領域も構築されつつある。これまでの研究結果から歯周病が、糖尿病、肥満、虚血性心脳疾患、早産、低体重児出産などのリスク因子になることが示唆されている。しかし、その一方で両者の因果関係はまだ十分明らかにされていないのが現状である。本稿では、歯周病と糖尿病の関連性について、これまでの知見を総括するとともに血管障害を基盤とした両者の関係についても考察したいと思う。

I. これまでの疫学研究

糖尿病患者が重度の歯周病に罹患していること、また糖尿病患者の歯周病が難治性であることなどから、歯周病は糖尿病の合併症と考えられている。1型と2型に大別される糖尿病であるが、これまで両タイプの糖尿病と歯周病との関連性が報告されている。欧米で行われたいくつかの横断研究の結果でも、1型糖尿病患者では重度の歯周病を有している患者が多いこと¹⁾、また血糖コントロールの悪い患者において高度の歯槽骨が認められること²⁾などが報告されている。ま

た本邦で行われた若年者の1型糖尿病の調査でも、同年代の健常者に比べ、歯周病の罹患率が有意に高いことが報告されている³⁾。以上のことから、1型糖尿病は歯周病のリスクファクターと考えることができる。

一方、2型糖尿病と歯周病についても有意な相関がみられる。米国ピマインディアンを対症にした調査では、2型糖尿病患者では非糖尿病患者に比べて歯周病発症率が2.6倍高いことが報告されている⁴⁾。加えて、血糖コントロールの悪い2型糖尿病患者では、コントロールが良好な患者に比べ歯周ポケットが深くなる傾向にあることも報告されている⁵⁾。以上の研究結果は、歯周病が糖尿病の合併症であることを示唆している。また、歯周病を合併している糖尿病患者に対して歯石除去と抗生剤の経口投与などの歯周治療を積極的に施すと、血中のtumor necrosis factor (TNF- α) 値やHbA_{1c} 値が減少したという報告もある⁶⁾。したがって、歯周病が糖尿病の増悪因子となっている可能性も示唆される。

II. 糖尿病が歯周病を増悪する機序

多くの疫学調査によって、歯周病と糖尿病の相関関係はある程度解明されたが、両者の因果関係を説明するにはまだ十分なエビデンスが蓄積されていないように思われる。糖尿病が歯周病を増悪する機序について、いくつかのことが想定される。その重要なファクターとして高血糖が挙げられる。高血糖は心血管疾患の主要なリスクファ

クターとして認知されている⁷⁾が、高血糖は非酵素的に生体のタンパク質を糖化する。これらの糖化最終産物 (AGE: Advanced glycation endproducts) は、マクロファージをはじめとする炎症性細胞を活性化する⁸⁾。AGEによって活性化された炎症性細胞は、動脈硬化巣へ集積し、TNF- α 、interleukin-6 (IL-6)、MCP-1などの炎症性サイトカインや活性酸素を産生し、血管の炎症を増悪して、動脈硬化を進展させる。AGEは、血管内皮細胞における一酸化窒素 (NO) の産生を障害し、血管内皮機能を低下させ、大小血管の循環障害を引き起こす⁹⁾。また、糖尿病患者の歯周組織には AGE が沈着していることが報告されている¹⁰⁾。したがって、AGE による動脈硬化の進展機序と同様に AGE による全身性の炎症惹起と細小動脈を含む血管機能の障害によって、歯周組織の炎症の増悪と創傷治癒の遅延が起こっている可能性が考えられる (図1)。

III. 歯周病が糖尿病を増悪する機序

歯周病は、歯周局所の感染症であり、歯周病病原細菌とそれに対する生体応答が全身に波及し糖尿病を増悪する可能性がある。歯周ポケットに形成される細菌性バイオフィルムは歯周局所に炎症反応を惹起し、歯周炎を引き起こす。その際、歯周局所には、炎症性サイトカインをはじめとする生理活性物質が多量に産生されるが、それは血行性に全身伝搬される。特に TNF- α はその受容体を介して骨格筋細胞や脂肪細胞によるなどの取

り込みを抑制し、インスリン抵抗性を付与する¹¹⁾。また、慢性の歯周炎患者においては、菌血症が頻繁に起こっていることが報告されている。血管内に侵入した歯周病原細菌も、末梢に伝搬され血管や末梢臓器に定着し、同部位において炎症反応を惹起する可能性が示唆されている。歯周病原細菌の多くはグラム陰性菌であり、その細胞壁成分であるリポ多糖(LPS)は強力な炎症惹起物質である。また、最も重要な歯周病原細菌の1つである*Porphyromonas gingivalis*は、強力なトリプシン様プロテアーゼ gingipainを産生し、血液凝固反応を亢進するとともに血管の炎症を惹起する(図2)。最近我々は、このgingipainが血管形成調節因子angiotoietin2を含む分泌顆粒のエキソサイトーシスを誘導し、LPSに対する血管内皮細胞の感受性を高め、血管の炎症応答を増強することを明らかにした(図3)¹²⁾。歯周病原細菌由来のこれらの因子は、協調的に作用して歯周局所の炎症を増悪するとともに、全身の血管に作用して血管の炎症を増強し動脈硬化を促進している可能性がある。加えて、それらの因子は糖尿病に合併する微小血管と大血管の障害を増悪する可能性が考えられる。

おわりに

歯周病と糖尿病の関連性について私見を踏まえて考察した。両者の相関関係についてはこれまでの研究からほぼ立証されたと考えてよい。しかし、因果関係に関しては十分な根拠が得られていないのが現状であり、本稿で述べたことも

推測の域をでないものが多い。今後、医学と歯学の研究者が協力して、両者の因果関係を明らかにするための質の高い研究が推進されることを切に望む。

参 考 文 献

- 1) Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, *et al.* Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc* 1982; 104(5): 653-60.
- 2) Rylander H, Ramberg P, Blohme G, *et al.* Prevalence of periodontal disease in young diabetics. *J Clin Periodontol* 1987; 14(1): 38-43.
- 3) Takahashi K, Nishimura F, Kurihara M, *et al.* Subgingival microflora and antibody responses against periodontal bacteria of young Japanese patients with type 1 diabetes mellitus. *J Int Acad Periodontol* 2001; 3(4): 104-11.
- 4) Taylor GW, Burt BA, Becker MP, *et al.* Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 1998; 3(1): 30-9.
- 5) Novaes AB Jr, Gutierrez FG, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I--Probing pocket depth and clinical attachment. *Braz Dent J* 1996; 7(2): 65-73.
- 6) Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, *et al.* The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycosylated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2001; 72(6): 774-8.
- 7) Ludwig DS. The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *JAMA* 2002; 287(18): 2414-23.
- 8) Schmidt AM, Yan SD, Brett J, *et al.* Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1993; 91(5): 2155-68.
- 9) Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, *et al.* Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006; 114(6): 597-605.
- 10) Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, *et al.* Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontol Res* 1996; 31(7): 508-15.
- 11) Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, *et al.* Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1994; 94(4): 1543-9.
- 12) Inomata M, Into T, Ishihara Y, *et al.* Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. *Microbes Infect* 2007; 9(12-13): 1500-6.