

平成21年 4月10日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791389
 研究課題名（和文） 根尖性歯周炎における骨破壊および骨再生への挑戦
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanism of periapical bone resorption induced by bacterial infection
 研究代表者
 栗原 直之（KURIBARA NAOYUKI）
 東北大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：00375099

研究成果の概要：

本研究では、IL-10 トランスジェニックマウスを用いて顎骨根尖部にIL-10産生を促し、根尖性歯周炎による骨破壊が抑制できるか否かについて検討した。その結果、顎骨根尖部にIL-10産生を強制的に促しても、根尖性歯周炎による骨破壊を制御することはできなかった。また、骨吸収サイトカインであるIL-1、TNF- α のノックアウトによっても根尖性歯周炎による骨破壊を制御できなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	300,000	2,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：IL-10、IL-1、根尖性歯周炎、炎症性骨吸収、トランジェニックマウス、ノックアウトマウス、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

感染根管治療は歯科臨床において最も頻繁に行われる治療のひとつであり、古くより確立された一定の治療法が踏襲されている。しかしながら、このような治療によっても臨床症状はもとより、根尖部骨破壊が改善されない症例がある。近年、根尖

性歯周炎の発症に関する免疫学的研究から、根尖部の骨破壊は根管由来の細菌および細菌代謝産物に対する免疫応答の結果生じること、骨破壊を惹起する主なサイトカインはIL-1であることなどが明らかとなった。さらに、我々と共同研究を行っている施設（Forsyth研究所、佐々木博士）では、代表

的なTh2（抗炎症性）サイトカインであるIL-4とIL-10のノックアウトマウスに根尖性歯周炎を惹起させたモデル実験において、炎症性骨破壊の抑制にはIL-4ではなく、endogenousなIL-10が強く関係することを報告している。すなわち、IL-10は、根尖性歯周炎による骨破壊のメカニズムを解明するためのキーポイントとなる可能性が高い。しかしながら、国内外において、IL-10の炎症性骨破壊に及ぼす影響についての報告はきわめて少なく、破骨細胞の分化・活性化に対するIL-10の作用機序についても明らかにされていない。

2. 研究の目的

今回申請する研究では、IL-10トランスジェニックマウス（TR）を用いて顎骨根尖部にIL-10産生を促し、IL-10投与によって根尖性歯周炎による骨破壊がどのような影響をうけるかについて明らかにする。また、骨吸収サイトカインとしてコンセンサスが得られているIL-1およびTNF- α をノックアウトすることにより骨破壊を抑制できるか否かを検討することによって、骨破壊のより詳細なメカニズムを明らかとする。

本研究では、これらの結果にもとづき、従来の感染根管治療法の概念に加えて根尖部骨破壊に対する新たな骨再生治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

実験的根尖性歯周炎マウスモデルにおける病変の動態

(1) 実験的根尖性歯周炎の惹起について

実験動物にはIL-10TR、IL-1 α 、 β ダブルKOマウス、IL-1 α 、 β およびTNF- α トリプルKOマウスおよびWTを用いる。マウス実験的根尖性歯周炎は、動物を腹腔麻酔後に外科用顕

微鏡下で上下左右の第一臼歯を1/4ラウンドバーで露髄し、ヒトの根尖性歯周炎に高頻度で検出される4種類の偏性嫌気性菌（*Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, and *Fusobacterium nucleatum*）を感染させることで惹起させる。

(2) 試料の収集

感染から21日目に動物を屠殺後、上下顎骨を摘出し、軟組織、とくに歯肉が残らないように除去する。骨吸収量の測定に片側の下顎骨を用いる。残り他の3/4顎は、病変組織からのタンパクならびにtotal RNAの抽出に使用する。この実験系を最低3回行なう。

(3) 骨吸収量のX線学的検討

MicroCTによる骨吸収量の測定は従来の組織切片からの計測に比べ非破壊的であり、短時間で結果を得られるという利点があり（Balto *et al.* 2000）、本研究においても同様の方法を採用する。MicroCTによるスキャンは10 \cdot m/sliceの条件で行い、スタックの中から第一臼歯根尖中央を的確に捉えているスライスを選び、コンピュータ画像処理の手法を用いて骨吸収量を面積（mm²）で計測する。データはTIFF形式で保存し、ソフトウェア（Adobe Photoshop、NIH Image）にて透過像の面積測定を行なう。

(4) 根尖歯周組織中の各種サイトカイン量の測定

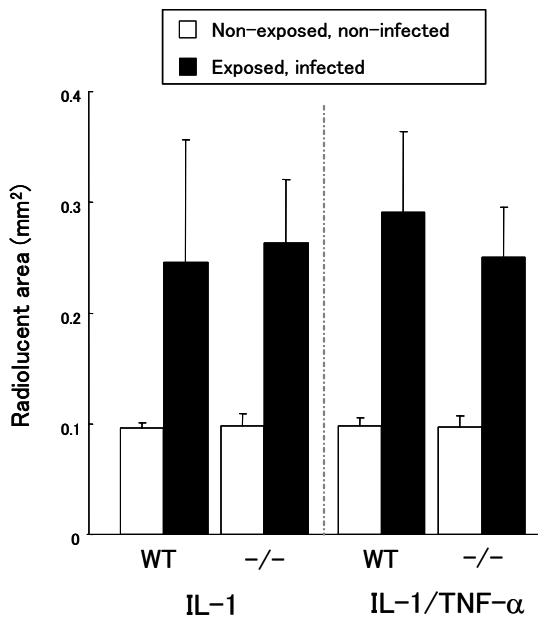
凍結試料からタンパク質を抽出後、各種サイトカイン量をELISA法（ELISA reader）により測定する。

4. 研究成果

(1)

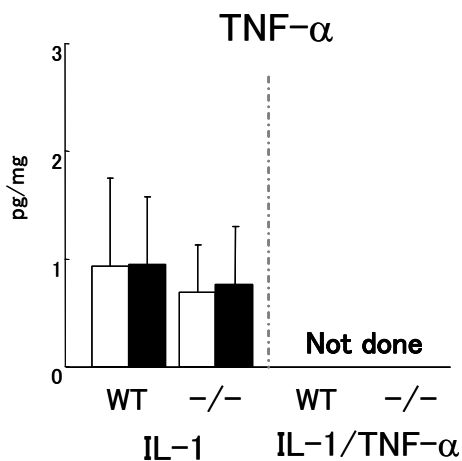
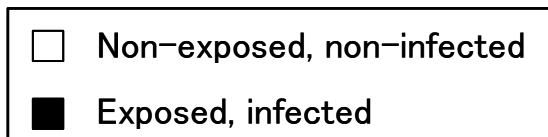
IL-10TRの実験群、コントロール群およびワイルドタイプの実験群、コントロール群の骨吸収量の面積はそれぞれ0.31、0.13、0.37、0.12（mm²）であった。また、実験群において、トランスジェニックマウスとワイルドタイプでは統計学的有意差はみられなかった。

(2)



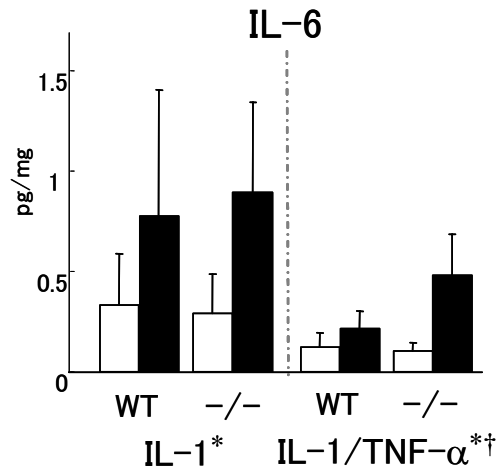
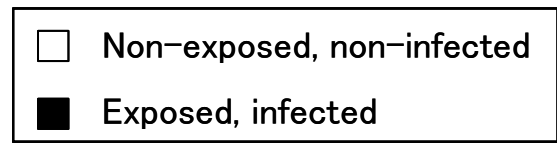
IL-1 α 、 β ダブル KO マウスおよび IL-1 α 、 β および TNF- α トリプル KO マウスの骨吸収量は WT に比べて有意差が認められなかった。

(3)



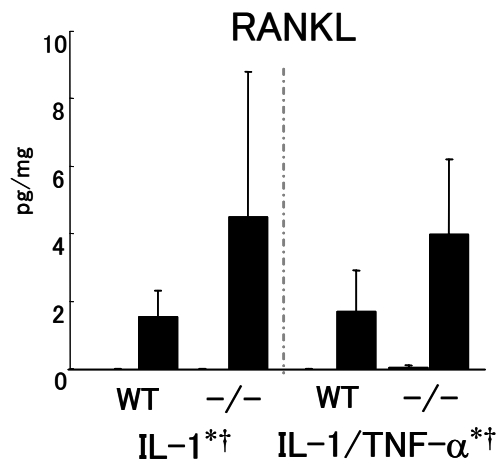
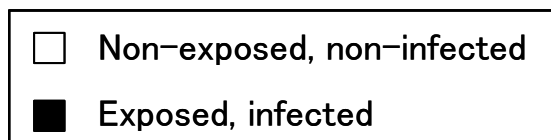
IL-1 α 、 β ダブル KO マウスにおいて、根尖病巣内の TNF- α 量に有意差が見られなかった。

(4)



IL-1 α 、 β ダブル KO マウスおよび IL-1 α 、 β および TNF- α トリプル KO マウスにおいて、骨吸収サイトカインである IL-6 は細菌感染によって有意に増加した。また、IL-1 α 、 β および TNF- α トリプル KO マウスにおいて、3 遺伝子のノックアウトにより IL-6 量に差がみられた。

(5)



IL-1 α 、 β ダブル KO マウスおよび IL-1 α 、 β および TNF- α トリプル KO マウスにおいて、骨吸収マーカーである RANKL は細菌感染によって有意に増加した。また、IL-1 α 、 β ダブル KO マウスおよび IL-1 α 、 β および TNF- α トリプル KO マウスにおいて、それぞれの遺伝子ノックアウトにより病変内 RANKL 量は増大した。

以上より、病変部の破骨細胞分解因子である RANKL が IL-1 α 、 β または IL-1 α 、 β および TNF- α のノックアウトにより増大するにもかかわらず、根尖部の骨吸収量が増大しないことから骨吸収抑制機構が働き、恒常性を維持していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 栗原直之、智歯の状態と症状に関する縦断的研究、東北歯誌、27、T27-T38、2008 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① T Furuuchi, S Kochi, N Kuribara, T Sasano, Evaluation of Secondary Bone Grafting for Alveolar Cleft Using CT, The 7th Asian Congress of Oral and Maxillo-Facial Radiology: Educational Lecture, 2008 Nov. 22th, Nara
- ② 飯久保正弘、古内 寿、栗原直之、阪本真弥、庄司憲明、笹野高詞、原因の同定にコーンビーム CT が有効であったニューロパシクペインの一例、第 49 回日本歯科放射線学会総会、2008 年 5 月 18 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 直之 (KURIBARA NAOYUKI)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：00375099