

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10862

研究課題名(和文) 卵巣摘出歯周炎ラットにおける損傷修復機構 - エストロゲンの直接作用とHSP発現推移

研究課題名(英文) Wound and repair mechanism in ovariectomized rats with periodontitis -Direct action of estrogen and transition of HSP expression

研究代表者

天野 カオリ (Amano, Kaori)

神奈川歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70316470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン欠乏環境で歯周炎を惹起した歯周炎罹患歯肉組織に軽度な機械刺激を与え、組織の状態を観察した。8週齢24匹のOVX群と6匹のSham群ラットを使用しOVXは 普通飼料 大豆由来イソフラボン含有飼料 E2ペレット群に分けた。歯周炎の惹起にはP.gingivalisを使用し60日後、電動歯ブラシにて下顎中切歯間部歯肉と舌片側にブラッシングを1分間行い、3時間後に4%PA/PBS溶液にて灌流固定した。損傷細胞の標識抗体にはC-Fosを用いた。C-Fosは、感染ブラッシング群歯肉と舌筋の上皮と上皮直下に豊富に観察されたがOVX群とSham群との損傷レベルに明瞭な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎の罹患率は40歳以降から急速に上昇するが、特に閉経前後に増加傾向となる病態機構について、エストロゲンの減少が直接影響しているか否かは未だに解明されていない。骨粗鬆症との関連性が報告されているが現段階では、あくまで憎悪因子の一つという位置づけとなる。一方、歯周炎の直接因子と考えられている加齢に伴う唾液分泌量の減少がエストロゲン補充により軽減すると多数の報告があり、エストロゲン欠乏は種々のリスク因子上昇に確実に関与しているといえる。本課題の意義は実験的に歯周炎を惹起させたOVXラットを使用しエストロゲン補充が歯周炎の進行に直接関与するのかが解明する事である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to observe the level of tissue cell disruption in OVX rats when inflammation such as periodontitis was induced in an estrogen-deficient environment. A total of 30 female rats were used in this experiment: 24 eight-week-old OVX rats in the experimental group and 6 sham rats in the control group. To induce periodontitis, P. gingivalis (P. g) was used. OVX rats were further divided into three: regular food, food containing soy isoflavones, and implanted with E2 pellets. After 60 days, the mandibular central incisor gingiva and the tongue were brushed with an electric toothbrush under anesthesia for 1 minute. 3 hours after brushing, all rats were perfused. C-fos and HSP70 antibody was used as the labeling marker for the injured cells. C-fos expression was abundantly observed in the injured cells of both gum and tongue muscle tissue just below the epithelium in the P.g infected group. HSP70 expression in OVX rats were clearly lower than that in sham rats.

研究分野：形態構造

キーワード：OVX エストロゲン欠乏 実験的歯周炎 軽度機械刺激と損傷 -エストラジオール C-Fos HSP70 唾液分泌減少

### 1. 研究開始当初の背景

閉経前後世代の女性における急速なエストロゲン減少により生じる種々の不調や疾患に加えて、歯周炎のリスクが高くなることが知られている。加齢による唾液分泌量減少や急速なエストロゲン欠乏による体内でのカルシウム吸収率低下により生じる骨粗鬆症が、歯周炎を悪化させる憎悪因子といわれている。しかしながらエストロゲンの歯周炎への作用について詳細は解明されておらず、エストロゲン補充により歯周炎に対する直接的な作用は期待できるのか、また早期補充により歯周炎症の軽減もしくは予防することができるのかは不明である。本研究の目的はエストロゲン欠乏環境で歯周炎を惹起した、いわゆる「更年期型歯周炎」の歯肉組織に対して、エストロゲン投与下で治療に連動する機械的刺激を与えた場合、歯周炎罹患組織にどのような影響を及ぼすのかを検証する。最終目標として、更年期型歯周炎の予防ならびに軽減法として臨床応用を可能にすることである。

### 2. 研究の目的

女性は閉経前後や更年期に入ると、女性ホルモンであるエストロゲンが急速に減少することによる様々な関連疾患に見舞われるリスクが高くなるといわれる。

その中心となるのが体内カルシウム吸収率の低下による骨粗鬆症・高血圧・肥満症とならび口腔成人病と称される歯周炎である。

歯周炎の罹患率は40歳以降から急速に上昇するが、特に閉経前後に増加傾向となる病態機構について、エストロゲンの減少が直接影響しているか否かは未だに解明されておらず、体内でのカルシウム吸収率の低下により生じる骨粗鬆症との関連性が報告されている中、一方で直接的な関連性は無いとの説もあり、あくまで憎悪因子の一つという位置づけとなる。歯周炎の直接因子と考えられている加齢に伴う唾液分泌量の減少がエストロゲン補充により軽減すると多数の報告があり、エストロゲン欠乏は種々のリスク因子上昇に確実に関与しているといえる。

生体組織が損傷を受けると、ストレス誘導性タンパクである HSP70 タンパクが産生され、損傷のレベルに応じてリフォールディングし、損傷組織の修復を促進することが知られている。

加えて HSP70 は炎症や組織損傷後の修復部位に、より多くの発現がみられることが報告されている。HSP70 の損傷部位への作用はこと女性において、エストロゲンが正常値であることに加えて、その刺激や損傷レベルなど個人環境により変化することが考えられ、エストロゲン値が変動していれば競合あるいは拮抗反応がおこるのではないかと考えた。

我々はこれまでブラッシング等の日常的かつ機械的にも軽度な刺激により、損傷を受けた歯肉細胞と舌筋(骨格筋)細胞の膜破壊と修復についての研究を継続している。

歯周組織細胞は生理的あるいは病的環境下において、日常的に様々な機械的刺激を受けており、この刺激によって生じる細胞膜損傷が原因で死滅(選択死)する細胞も見られるが、我々の研究から細胞膜の損傷後も傷を負った状態で死滅することなく生存し続けるタイプの細胞群の存在を確認した。特に骨格筋細胞は機械的に大きな損傷を受けると死滅するが、適度な刺激による損傷であれば細胞は死滅せず傷を負った状態で生き延びて修復することが分かっている。

この膜損傷機構と修復過程はエストロゲン欠乏環境下において、なんらかの影響を受けることが推測される。

本研究の目的はエストロゲン欠乏を伴う卵巣摘出ラット(OVX)に実験的歯周炎を併発させ、エストロジオール(E2)の補充または非投与下で歯肉組織の治療に反映する機械的刺激を与え、歯周炎症状にどのような経時変化がみられるのかを観察する。加えて組織への刺激・損傷により産生される修復タンパクである HSP70 はエストロゲン補充の有無により発現・作用に影響があるのかを検討することであった。

歯周炎に罹患した卵巣摘出ラットを使用し E2 補充が歯周炎の進行に直接関与するのか否か、また E2 補充により修復過程に変化を及ぼすのかを観察する。

エストロゲン欠乏環境で歯周炎を発症したケースでは、E2 を補充することにより歯周炎症状の緩和を誘導できるのかを観察すると共に、E2 を非投与の卵巣摘出ラット群には弱いエストロゲン様作用を持つと言われる大豆イソフラボン含有飼料を与え観察した。

### 3. 研究の方法

実験には8週齢24匹の OVX(卵巣摘出)群と6匹の Sham(偽手術)群ラット計30匹を使用した。動物実験の施行にあたり、神奈川歯科大学実験動物倫理委員会の承認を得た。

OVX ラットは(1) Regular 群：普通飼料 (2) ISO 群：大豆由来イソフラボン含有飼料

(3) E2 群： -Estradiol ペレットを埋め込み群の3グループに分けた。

なお Sham 群ラット6匹には普通飼料を与えた。

1週間後、実験的歯周炎を惹起させるため供試菌株に *Porphyromonas. gingivalis* (*P.gingivalis*・ATCC33277 継代)の混合菌液を使用し、5ml/を2週間2日おきに計5回塗布し、2週間後に再度同様に感染を行った。非感染群には5%CMCのみ塗布、感染群15匹(OVX:12/Sham:3)と非感染群15匹はそれぞれ隔離して飼育を行った。また32日後に OVX 普通食群の中からランダムに選んだ8匹に17- Estradiol(E2)ペレットを吸入麻酔下、外科処置にて頸部皮下に埋め込

んだ(0.1mg/21days)。

60 日後, 吸入麻醉下で電動歯ブラシ(Braun Oral B)にて下顎中切歯間歯肉部と舌片側に対して専用計測器を使用し適正範囲圧下でブラッシングを 1 分間行った。

ブラッシング後 3 時間後にそれぞれ深麻醉下で 4%パラホルムアルデヒド PA/PBS 溶液にて灌流固定し, 上顎・下顎骨を含む歯間部歯肉・舌筋と共に顎下腺・耳下腺を摘出した。

4 %PA/PBS 溶液にて 24 時間追加固定後 PBS で洗浄し, 試料は 15%-30%のシヨ糖溶液に 24-72 時間浸漬後, 通法に従い 7-20  $\mu$  の凍結切片を作成した。

損傷細胞の標識抗体には C-Fos を, 修復傾向にある細胞の標識として HSP70 を用い, 唾液腺の観察にはヘマトキシリン・エオシン(HE)と, HSP70 を使用した。染色後は蛍光顕微鏡(Kyence BZ-X810)にて観察を行った。

#### 4 . 研究成果

OVX・E2-ペレット群は挿入後数日間で体重の減少がみられたが, 他 OVX 群に関しては Sham 群と比較して平均 18g 体重が増加しており軽度肥満個体もみられた。

顎下腺を摘出後観察すると, OVX 群では Sham 群/E2 補充群と比較して明らかな脂肪組織の蓄積が認められた(Figure.1)。

Submandibular glands

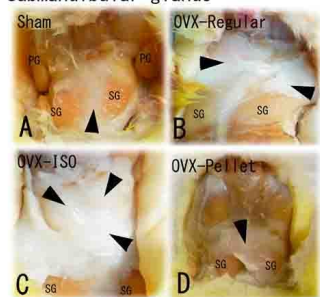


Figure.1 脂肪の蓄積(顎下腺)

A : Sham-顎下腺

B : OVX-Regular 顎下腺

C : OVX-ISO 顎下腺

D : OVX-E2 顎下腺

矢頭 : 脂肪組織

歯周病進行レベルの判定基準として重要となる歯槽骨吸収レベルを観察したところ, 最も吸収度が高いのは Sham 群 *P.gingivalis* 感染グループ : No8 と OVX 群普通食の非感染グループ : No4 であった(Table.1)。対して, 最も歯槽骨吸収度が低かったのは Sham の非感染群:No7 と ISO の非感染群 : No2 であった。この結果から, *P.gingivalis* 感染群とエストロゲンが減少傾向にある OVX 群における顎骨吸収が進行していることが推測される (Table.1)。

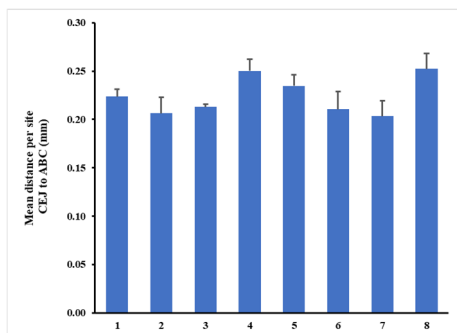


Table.1 歯槽骨吸収量

*P.gingivalis* 感染群(+)/非感染群(-)

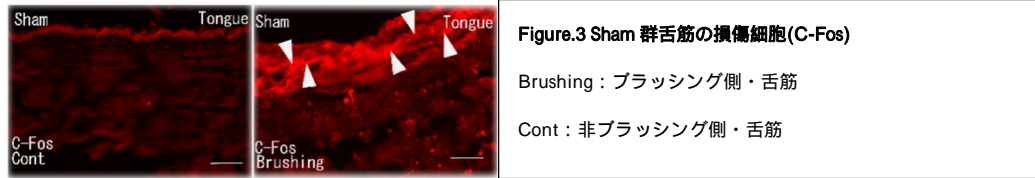
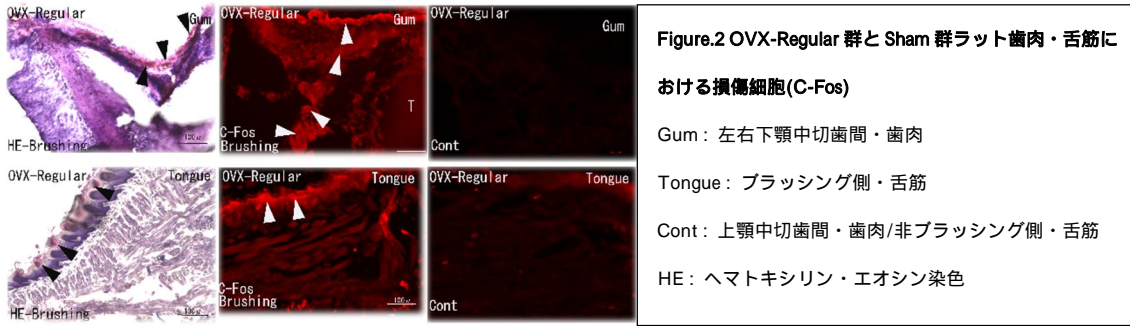
1 : OVX 普通食(-), 2 : OVX-ISO(-), 3 : OVX-E2 (-),

4 : OVX 普通食(+), 5 : OVX-ISO(+), 6 : OVX-E2 (+),

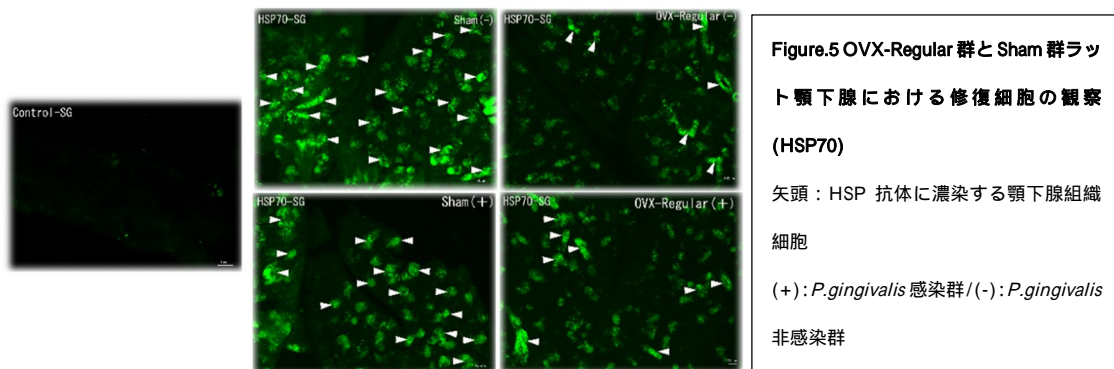
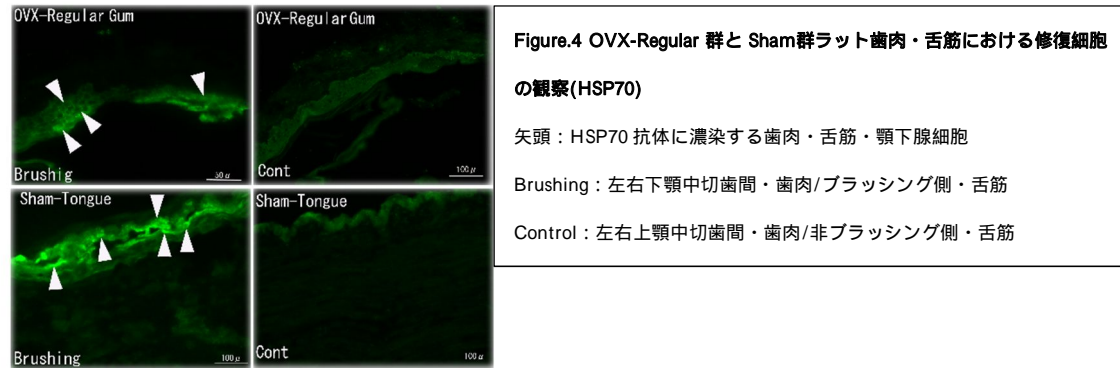
7 : Sham(+), 8 : Sham(-)

口腔内は日常的に機械的・生理的刺激を受ける活動的な環境下にあり, 組織細胞は頻繁に損傷と修復を繰り返している。ブラッシングは歯牙や歯周組織を清掃することで口腔内環境を整える目的があり, ブラッシングによる適度な刺激は歯周組織を強化することが知られている。本研究では視点を変えてブラッシングにより細胞は損傷するのか, それほどの程度の損傷なのかを観察した。

損傷細胞の標識抗体として使用した C-Fos は感染群ブラッシング後 3 時間後の歯肉と舌筋細胞の上皮ならびに上皮直下に豊富に観察された(Figure.2)。本実験において *P.gingivalis* に感染させた OVX 群と Sham 群との損傷レベルに肉眼的に明瞭な差は認められなかったが, わずかに Sham 群の損傷が広範囲であった(Figure.3)。このことから OVX 群よりもエストロゲン値が正常レベルの Sham 群の方が損傷を受けた後に生存する細胞の数が多いことが推測され, エストロゲンの減少は機械的損傷による修復過程に影響を与える事が考えられる。



HSP70 タンパクの発現は歯肉組織と舌筋と顎下腺において観察した。全ての OVX 群ラットでは, Sham 群と比較して HSP70 タンパクの減少が認められた(Figure.4)。HSP70 タンパクはエストロゲン量の低下に伴い減少することが報告されており, OVX 群の歯肉・舌筋・顎下腺における HSP70 抗体反応と比較して, Sham 群ラット歯肉・舌筋・顎下腺において高い反応が認められた(Figure.5)。すなわち HSP70 タンパクの値を観察することによりエストロゲン値の減少傾向を知ることが可能になることが考えられる。今後さらに予防的な視点からも臨床応用を目指し研究を続行する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto R, Amano K, Wada-Takahashi S, To, Takahashi S, Matsuo M	4. 巻 63
2. 論文標題 Changes in the microcirculation in periodontal tissue due to experimental peri-implantitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 153-160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2021.03.002. Epub 2021 Mar 18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Amano Kaori, Naito Michiko, Matsuo Masato	4. 巻 67
2. 論文標題 Morphological study of human facial fascia and subcutaneous tissue structure by region through SEM observation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101437 - 101437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2020.101437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Moriyama H, Amano K	4. 巻 124
2. 論文標題 Study of morphological structure in human fetus Wharton's duct opening area.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology	6. 最初と最後の頁 18 - 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijporl.2019.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Amano K, Inaba K, Matsuo M
2. 発表標題 Correlation between estrogen level and periodontal disease progression in OVX rats
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野カオリ, 稲葉啓太郎, 松尾まりあ, 松尾雅斗
2. 発表標題 実験的歯周炎を惹起させたOVXラットにおける唾液腺の形態学的観察
3. 学会等名 第65回日本唾液腺学会総会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Amano K, Inaba K, Hidaka K, Yamamoto R, Matsuo M
2. 発表標題 Morphological study of human facial and subcutaneous tissue structure by histological observation
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野カオリ, 山本麗子, 松尾雅斗
2. 発表標題 卵巣摘出ラットモデル口腔組織細胞への軽度機械的刺激における損傷について
3. 学会等名 神奈川歯科大学・歯学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------