

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19035

研究課題名(和文) 歯周病モデルマウスを用いた炎症性骨破壊に対する骨吸収抑制薬の作用機序

研究課題名(英文) Effect of Bone Resorption Inhibitor on Inflammatory Bone Destruction Using Periodontal Disease Model Mouse

研究代表者

栗谷 未来 (Miku, Kuritani)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：00826737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：障害者は四肢体幹障害などにより、自己での口腔管理が困難なため歯周病を発症しやすい。本研究では、骨吸収抑制薬である抗RANKL抗体およびビスホスホネート(BP)製剤投与が炎症性骨破壊に及ぼす影響について解析した。8週齢雄性マウスの上顎第2臼歯に絹糸を結紮し、炎症性歯周病モデルを作成した結果、抗マウスRANKL抗体(OYC1; 5mg/kg)を1週間隔で4週連続投与したマウスでは、microCT像から回復程度は軽度であった。またマウス大腿骨に歯科用バーにて骨髓に穿通させた骨欠損モデルでは、抗RANKL抗体投与群の骨修復程度は低かったが、ゾレドロネート投与群では骨修復が促進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

障害者は口腔清掃の重要性が理解できないことや四肢体幹障害などにより、自己での口腔管理が困難なため歯周病を発症しやすく、炎症性歯槽骨破壊のリスクが非常に高い。従って、物理的なプラークコントロールでなく、化学的に歯槽骨破壊を抑制する薬物療法の開発は重要課題の1つである。マウス臼歯に絹糸を結紮することで細菌感染に起因する炎症性骨破壊モデルに対する薬剤投与の効果を解析することは将来的な臨床応用への足がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：The handicapped are more likely to develop periodontal disease because it is difficult for them to manage their oral cavity by themselves due to trunk disorders of the limbs. In this study, we analyzed the effects of administration of anti-RANKL antibody and bisphosphonate (BP), which is a bone resorption inhibitor, preparation on inflammatory bone destruction. Results of ligating silk thread to the maxillary second molar of an 8-week-old male mouse to create an inflammatory periodontal disease model. In the mice to which the anti-mouse RANKL antibody (OYC1; 5 mg / kg) was continuously administered at 1-week intervals for 4 consecutive weeks, the degree of recovery from the microCT image was mild. In the bone defect model in which the mouse femur was pierced through the bone marrow with a dental bar, the degree of bone repair was low in the anti-RANKL antibody-administered group, but bone repair was promoted in the zoledronic acid-administered group.

研究分野：障害者歯科

キーワード：歯槽骨破壊 歯周病 骨代謝 骨吸収抑制薬

1. 研究開始当初の背景

障害者は口腔清掃の重要性が理解できないことや四肢体幹障害などにより、自己での口腔管理が困難なため歯周病を発症しやすく、炎症性歯槽骨破壊のリスクが非常に高い。従って、物理的なプラークコントロールでなく、化学的に歯槽骨破壊を抑制する薬物療法の開発は重要課題の1つである。本研究では、現在広く用いられている骨吸収抑制薬である抗 RANKL 抗体およびビスホスホネート(BP)製剤が、細菌感染に起因する炎症性骨破壊に及ぼす影響について解析し、効果的に局所での薬剤効果を高める方法を検討することとした。また、骨吸収抑制薬の効果的な投与のタイミングや、長期的な薬効の持続時間の検討などもさらなる課題として挙げられる。

口腔ケアとしての日常のブラッシングは、歯周領域を清潔に保ち、歯周炎を予防する最も効果的な手段であることが知られている。しかし知的能力障害、自閉症や脳性麻痺などを有する障害者は、自己もしくは介助者によるブラッシングが十分に行えず、歯周領域に食物残渣やプラークが長期にわたり停滞することとなる。

プラークの停滞は、歯周病の重症化へとつながる。歯周病の問題点の1つとして、プラーク内の細菌や菌体成分である Lipopolysaccharide (LPS) などにより引き起こされる炎症性骨破壊が挙げられる。グラム陰性細菌の細胞壁構成成分である LPS は、Toll-like receptors (TLRs) ファミリーの1つである TLR4 に認識され、マクロファージや線維芽細胞などから IL-1, IL-6, TNF, PGE₂ などの炎症性因子の産生を誘導する。これらの炎症性因子は骨芽細胞に作用し、破骨細胞の分化・活性化に必須の因子である RANKL の発現を上昇させる。また、LPS は直接、破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞形成を促進する。その結果、歯槽骨では炎症箇所において破骨細胞が増加し、過剰に骨吸収が起こり、歯槽骨破壊を呈する。しかし、現在、歯周病治療において骨組織に直接作用する薬剤の適用はない。

2. 研究の目的

現在、骨吸収抑制剤として最も使用されているビスホスホネート製剤は、ヒドロキシアパタイトに高い親和性を持つ低分子化合物であり骨基質に蓄積する。骨組織に沈着したビスホスホネートは骨吸収の過程で破骨細胞内に取り込まれ、細胞骨格の障害やアポトーシスを誘導して破骨細胞の機能を抑制する。

さらに近年、抗体医薬品として開発されたデノスマブも骨吸収抑制薬として用いられている。デノスマブは完全ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体で、破骨細胞の分化、機能及び生存を制御する最も重要なサイトカインである RANKL に特異的かつ高い親和性でヒト RANKL に結合することで RANKL/RANK のシグナル伝達を阻害し、破骨細胞による骨吸収を抑制する。ビスホスホネートのように成熟した破骨細胞の機能を抑制するだけでなく、RANK を発現する破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞の分化、機能を抑制できる。しかし、現在のところ歯周病に伴う歯槽骨破壊の治療には使用されておらず、その効果は未だ解明されていない。そのためこれらの骨吸収抑制薬が、歯周病モデルマウスにより再現された炎症性骨破壊を抑制することで、歯周病治療の選択肢として確立できる可能性を検討することを目的とした本研究は、独自性のある研究だといえる。また、臨床応用されているエムドゲインのように外科処置を必要とせず、コラーゲンゲルなどを用いた局所投与方法も検討する。

3. 研究の方法

デノスマブが歯周病に伴う骨破壊の抑制に有効か否かを明らかにするため、2種類の炎症性骨破壊モデルマウスとして、(1) LPS 誘導性頭蓋骨炎症モデル、(2) 歯周病モデルと骨欠損修復モデルとして(3) 大腿骨ドリル欠損モデルを用いて検討する。

デノスマブはマウス RANKL には結合しないため、実験では同等の作用をもつ抗マウスモノクローナル RANKL 抗体(オリエンタル酵母社製 OYC1®)を使用し、また比較のためにビスホスホネート(ゾレドロネート)も用いる。

(1) LPS 誘導性頭蓋骨炎症モデル

8 週齢の雄マウスの頭蓋骨縫合部に LPS(25 mg/kg) および抗マウス RANKL 抗体(3 mg/kg)またはゾレドロネート (0.2 mg/kg)を局所投与し、5 日目に頭蓋骨を摘出後、破骨細胞特異的酵素活性を利用した染色(TRAP 染色)と μ CT による骨形態解析を行う。なお、LPS および薬物の局所滞留性を高めるため、コラーゲンゲルを基材として用いる。

(2) 歯周病モデル

上顎第二大臼歯を絹糸で結紮し歯周炎を誘発させ、同時に抗 RANKL 抗体(5 mg/kg) またはゾレドロネート(0.2 mg/kg)を腹腔内投与し、1・2 週間後に歯槽骨と歯根の形態を μ CT で解析する。また、パラフィン切片を作製し、組織形態計測も行う。

(3) 大腿骨ドリル欠損モデル

麻酔下で右側下肢の大腿骨に歯科用ラウンドバー(直径 0.8mm)で穴開け、8 日後、安楽死させて下肢を摘出し μ CT 撮影を行った。

上記の方法を基盤に、炎症性骨破壊に対する抗 RANKL 抗体の効果的な投与のタイミングを検討し、その効果が一時的な抑制ではないかどうか確認した上で長期使用しても全身への影響がないか調べる。

4. 研究成果

(1) LPS 誘導性頭蓋骨炎症モデル

マウスの頭皮を剥離し、破骨細胞を TRAP 染色したところ、control のマウスでは縫合部に破骨細胞の存在を認めた。これに対して、LPS のみを投与したマウスでは破骨細胞が顕著に増加した。一方、抗 RANKL 抗体を投与したマウスでは破骨細胞が著しく減少した。ゾレドロネートを投与したマウスでは、破骨細胞の減少は認められなかった。

μ CT より、LPS により破骨細胞形成および骨破壊が促進されたが、抗 RANKL 抗体はこれらを抑制した。ゾレドロネートは骨破壊を抑制したものの、破骨細胞形成は抑制しなかった(図 1)。[Kuritani, M, et al., Biol Pharm Bull. 41(4):637-643, 2018]

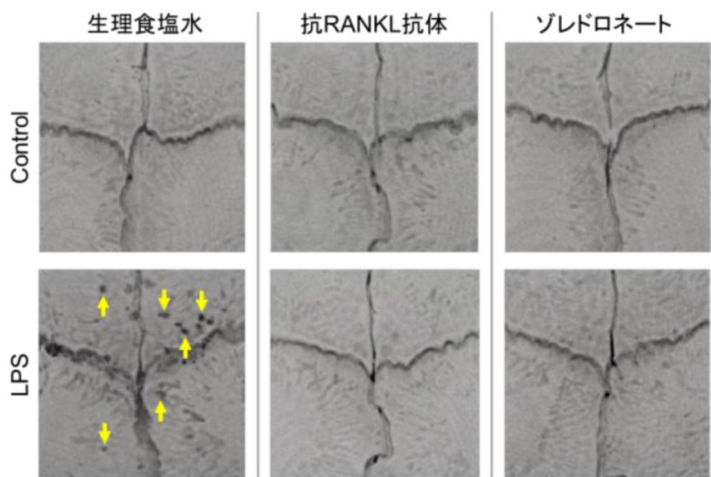


図 1

(2) 歯周病モデル

マウスの臼歯を糸で結紮したところ、1 週間後に歯槽骨破壊が認められ、2 週間後には歯根部分の露出が明瞭に観察された。抗 RANKL 抗体を投与したマウスでは、このような歯槽骨破壊と歯根露出は抑えられた。一方、ゾレドロネートを投与したマウスでは、抗 RANKL 抗体ほど強い歯槽骨破壊の抑制は認められなかった。口蓋の両側を比較することで、歯槽骨の破壊を観察したところ、糸で結紮した部分のみに骨破壊がおこり、それを抗 RANKL 抗体が抑制した。歯槽骨破壊とそれに伴う歯根露出が認められたが、抗 RANKL 抗体はそれを強力に抑制した。しかし、ゾレドロネートは抗 RANKL 抗体に比べて歯槽骨破壊に対する抑制作用が弱く、歯根露出を防げなかった(図 2)。[Kuritani, M, et al., Biol Pharm Bull. 41(4):637-643, 2018]

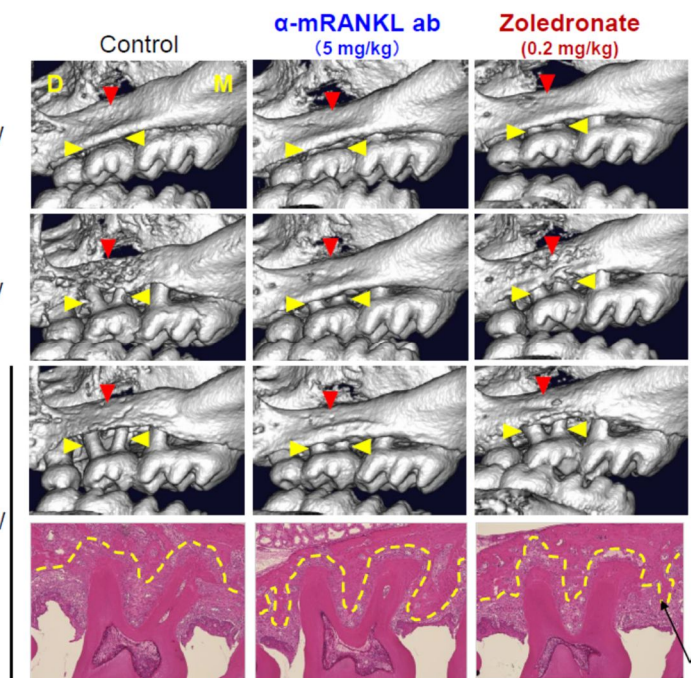


図 2

(3) 大腿骨ドリル欠損モデル

RANKL 抗体を投与したマウスの骨修復はゾレドロネート投与群と比較して、遅延傾向にあった(図3)。

結論: 頭蓋骨破壊モデルでは, 抗 RANKL 抗体とゾレドロネートは LPS による炎症性骨破壊を抑制した。抗 RANKL 抗体が LPS による骨破壊を抑制することを示したのは, これが初めての報告となる。一方, 歯周炎モデルでは, 抗 RANKL 抗体は歯槽骨破壊を強く抑制したのに対して, ゾレドロネートの作用は比較的弱いことがわかった。この理由は不明だが, 両薬剤の物性や作用機序の違いによるものと思われる。また, 今回の実験で, 頭蓋骨に投与した両薬剤は大腿骨の骨量には影響を及ぼしていなかったことから, 局所のみで作用したと考えられる。

以上より, 抗 RANKL 抗体すなわちデノスマブの局所投与方法を確立できれば, ビスホスホネートよりも優れた歯槽骨破壊予防が可能になると示唆された。

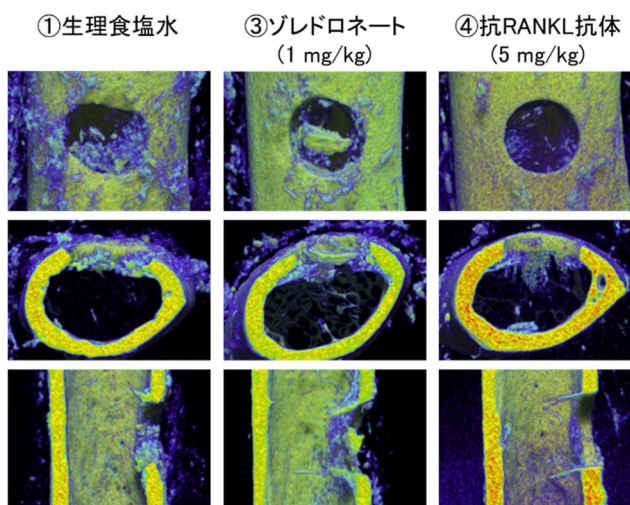


図3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Isawa Motoki, Karakawa Akiko, Sakai Nobuhiro, Nishina Saki, Kuritani Miku, Chatani Masahiro, Negishi-Koga Takako, Sato Masashi, Inoue Mitsuko, Shimada Yukie, Takami Masamichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Biological Effects of Anti-RANKL Antibody and Zoledronic Acid on Growth and Tooth Eruption in Growing Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 56151-1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56151-1	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 -

〔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 佐藤 ゆり絵、嘉手納 未季、馬目 瑠子、姜 世野、栗谷 未来、下村 直史、新田 雅一、船津 敬弘
2. 発表標題 口腔内の自傷行為の防止に苦慮したLesch-Nyhan 症候群の1 例
3. 学会等名 第37回日本障害者歯科学会総会および学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 姜 世野、嘉手納 未季、馬目 瑠子、佐藤 ゆり絵、栗谷 未来、伊原 良明、船津 敬弘
2. 発表標題 障害者歯科医療を地域で支えるための取り組みについて
3. 学会等名 第37回日本障害者歯科学会総会および学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗谷未来、嘉手納未季、馬目瑠子、姜世野、佐藤ゆり絵、船津敬弘
2. 発表標題 歯周病悪化の主因が糖尿病のコントロール不良と考えられる自閉スペクトラム症の1例
3. 学会等名 第36回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 ゆり絵、嘉手納 未季、馬目 瑤子、姜 世野、栗谷 未来、下村 直史、渡来真央、安藤茜、中村夏野、小野慎之介、船津 敬弘
2. 発表標題 脂質とコレステロール摂取バランスがマウスの骨代謝恒常性維持に与える影響
3. 学会等名 第38回 日本障害者歯科学会総会および学術大会
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