

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791615

研究課題名 (和文)

オステオプロテジェリンを用いた歯周病の薬物療法の開発

研究課題名 (英文)

The possibility of osteoprotegerin as a topical application drug in periodontal therapy.

研究代表者

美原 智恵 (MIHARA CHIE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70403748

研究成果の概要 (和文)：実験的歯周炎モデルラットに RANKL のデコイレセプターであるオステオプロテジェリン (OPG) を局所投与し、OPG の歯槽骨吸収抑制効果について検討した。その結果、OPG 投与群では対照群に比較して破骨細胞の数が減少し、有意な歯槽骨吸収の抑制が認められた。一方、歯周組織における IL-1 $\beta$  の発現に差は認められず、上皮下結合組織での多型核白血球および血管腔の数は両群間で有意差がなかった。以上より、歯周病における OPG の有用性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of this study was to investigate the effects of osteoprotegerin (OPG), decoy receptor of RANKL, on alveolar bone resorption in rat experimental periodontitis. Morphological analysis revealed that alveolar bone resorption was significantly inhibited by OPG treatment through a decrease of osteoclast number. The expression of IL-1 $\beta$  was similar between OPG-treated and non-treated groups. The numbers of polymorphonuclear leukocyte and blood vessel in the subepithelial connective tissue were not affected by OPG treatment. These results show that OPG may be useful as a topical application drug in periodontal therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：歯周治療学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯学、歯周病、オステオプロテジェリン

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病原細菌によって惹起される炎症性疾患であり、炎症の持続により歯槽骨吸収が生じ、ついには歯が脱落する。現在の歯周治療は歯周ポケット内の歯石や炎症

組織の機械的除去 (外科的治療) が主体であるが、近年薬物療法 (内科的治療) が注目を浴びている。しかし歯周治療における薬物療法は、ほとんどの場合が急性症状の緩和を目的とした対症療法にとどまるものである。現

在、歯周組織の細胞に直接作用し、その機能を制御することで歯周疾患の進行を阻止するような薬物療法は行われていない。そこで申請者は破骨細胞の分化および活性を制御している RANKL/RANK シグナリングにおける RANKL のデコイレセプターであるオステオプロテジェリン(OPG)に注目した。また、RANKL/RANK シグナリングは免疫系にも重要な役割を果たすことが知られている。そこで、ラットに実験的歯周炎を惹起させる過程で OPG を投与し、OPG が歯周組織に及ぼす影響について検討した。

## 2. 研究の目的

実験的歯周炎モデルの歯槽骨吸収抑制過程において、OPG が歯周組織に及ぼす影響について検討し、歯周治療における新たな治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験的歯周炎モデルの作製

実験動物は8週齢ウイスター系雄性ラット(日本チャールズリバー・大阪)を12匹用い、Setoら(J Periodontal Res, 42: 85-89, 2007)の方法に準じて実験的歯周炎モデルを作製した。すなわちラットに歯槽骨吸収を惹起させるためにネプタール(大日本製薬・東京)麻酔下で上顎右側第二臼歯歯頸部周囲にナイロン糸(No 5-0・夏目製作所・東京)による結紮を行い、最長14日間飼育した。ラットは以下の3群に分けた。すなわち OPG(和光純薬・大阪)を投与する OPG 投与群(2.5  $\mu$ g/side/day)、生理食塩水を投与する対照群、および結紮を行わない左側臼歯は非結紮対照群として実験に用いた。それぞれの溶剤を一日おきに上顎骨第二臼歯口蓋側歯肉に局所投与し、実験開始5および14日目に上顎骨を採取し、10%中性緩衝ホルマリン水溶液(pH7.4)にて固定した。

### (2) マイクロ CT 分析

マイクロ CT (Model MIF-100・日立メディコ・東京)を用い、5mA、50kVの管電圧で上顎第二臼歯部について8倍の倍率、厚さ14  $\mu$ mの幅で201スライスの断層撮影を行った。撮影画像をコンピュータ上で三次元構築し作製した画像上でNIH imageを用いて、セメント-エナメル境から歯槽骨頂までの距離(CEJ-ABC)を計測し、歯槽骨吸収の指標とした。

### (3) 病理組織分析

#### ① OPG が歯槽骨吸収に及ぼす影響

マイクロ CT 撮影後の上顎骨を10%中性 EDTA 水溶液中で28日間脱灰し、通法により

パラフィン包埋を行った。引き続き上顎第二臼歯近心根に平行する厚さ7  $\mu$ mの薄切切片を作製し、破骨細胞を染色するために酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ染色(TRAP染色)を行い、ヘマトキシリン液で対比染色を行った。さらに光学顕微鏡で染色された組織切片を観察し、組織像を撮影するとともに上顎第二臼歯口蓋根の歯槽骨骨頂部に認められた TRAP 陽性多核細胞(破骨細胞)の数を気計測した。

#### ② OPG が炎症に及ぼす影響

通法に従い炎症性サイトカインの1つである IL-1 $\beta$  の免疫染色を行った。すなわち、薄切切片の脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼを不活性化するために3%過酸化水素含有メタノール溶液で15分間処理した。次にクエン酸ナトリウム緩衝液を用い95°Cで15分抗原賦活化処理を行った後、10%ヤギ血清を用いてブロッキング処理を行った。洗浄後、切片にマウス抗ラット IL-1 $\beta$  抗体(R and D Systems、ミネソタ、アメリカ合衆国)を5  $\mu$ g/mlの濃度で添加し、4°Cで24時間反応させた。洗浄後、室温でヒストファインシンプルステイン-MAX-PO(MULTI)(ニチレイ・東京)と30分反応させ、3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩含有0.05M トリス-塩酸緩衝液(pH7.6)で発色させた。発色後はヘマトキシリン液で対比染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察し、写真撮影を行った。次に、Irieら(J Dent Res, 87: 456-460, 2008)の方法に準じて薄切切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施し、接合上皮直下結合組織における単位面積(0.05mm $\times$ 0.1mm)あたりの多型核白血球数と血管腔数を、400倍の視野で数えた。

#### (4) 統計分析

各群における計測値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。統計処理はScheffeの検定で行い、 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロ CT 分析

実験開始5日目において、対照群で歯槽骨吸収が惹起され、分岐部の露出が認められたが、OPG投与群では有意な歯槽骨吸収の抑制が認められた。14日目においても同様の結果が認められた(図1A、B)。

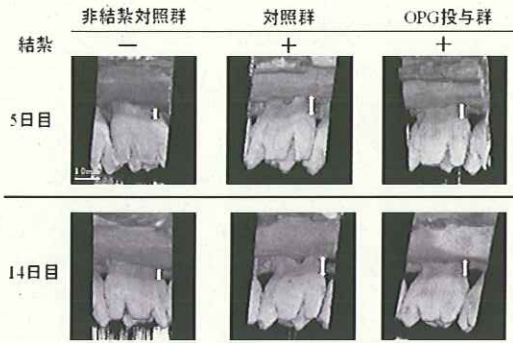


図 1: OPG 投与が歯槽骨吸収に及ぼす影響  
A: 上顎第二臼歯のマイクロ CT 像

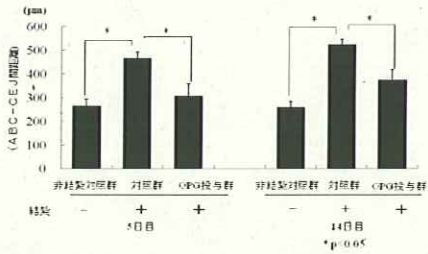


図 1 B: CEJ-ABC 間距離

(2) 病理組織分析

① OPG が歯槽骨に及ぼす影響

図 2 に上顎第二臼歯口蓋側歯槽骨の拡大像を示す (A: 弱拡大像 B: 強拡大像)。実験開始 5 日目において対照群および OPG 投与群において TRAP 陽性破骨細胞が観察された。14 日目では全ての群で破骨細胞は認められなかった。5 日目の破骨細胞数を計測した結果、結紮を行うと有意に破骨細胞が出現する (対照群) が、OPG 投与に (OPG 投与群) よりその数は有意に抑えられた (図 2 C)。

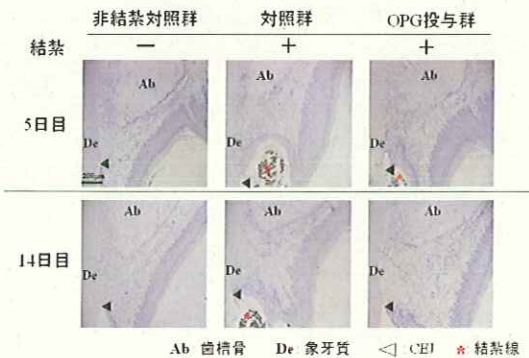


図 2 A: 上顎第二臼歯口蓋側歯槽骨 (弱拡大像) パー: 200 μ m)

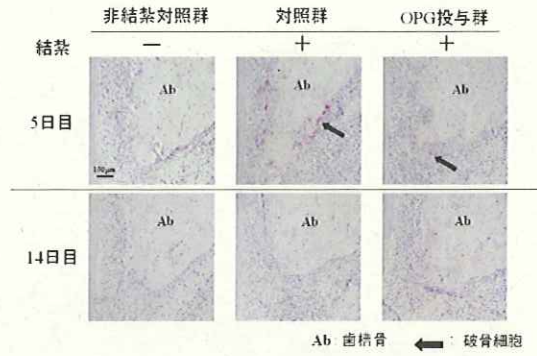


図 2 B: 上顎第二臼歯口蓋側歯槽骨 (強拡大像) パー: 100 μ m)

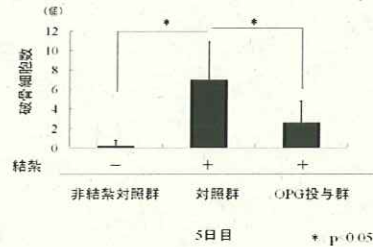


図 2 C: 口蓋側骨頂部に存在する破骨細胞数

② OPG が炎症に及ぼす影響

図 3 A に IL-1β の免疫染色像を示す。非結紮対照群に比較して対照群、OPG 投与群ともに強い IL-1β の発現が認められたが、対照群と OPG 投与群を比較すると差は認められなかった。接合上皮直下の結合組織内の単位面積あたりの多型核白血球数 (個/0.05mm × 0.1mm) は非結紮対照群が 3.8 個であるのに対し、対照群、OPG 投与群はそれぞれ 8.3、8.2 個であり、約 2 倍の増加が認められた。対照群と OPG 投与群の間では有意差は認められなかった (図 3 B)。同測定範囲における血管腔数は 3 群ともに有意差を認めなかった。

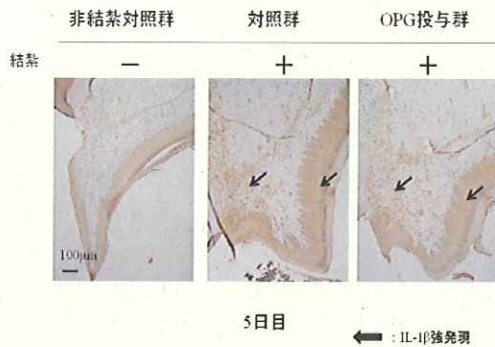
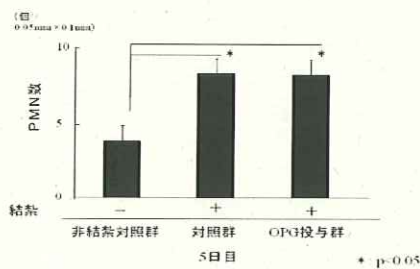
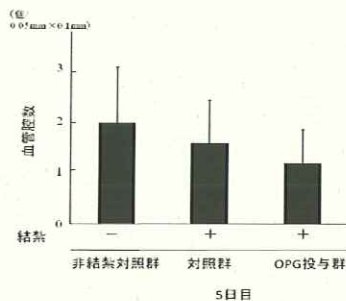


図3: OPGが炎症に及ぼす影響  
A: IL-1 $\beta$ の免疫染色像 (バー: 100 $\mu$ m)



B: 接合上皮直下の結合組織内における単位面積あたりの多型核白血球数



C: 接合上皮直下の結合組織内における単位面積あたりの血管腔数

以上より、OPGはラット実験的歯周炎の骨吸収過程において破骨細胞を減少させ、歯槽骨吸収を抑制させることが明らかとなった。また、接合上皮直下結合組織の単位面積あたりの多型核白血球の数に変化がなかったことから、炎症には影響を及ぼさない結果となった。本研究結果より、歯周病の薬物療法におけるOPGの有用性が示唆された。

## 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2件)

- ① 美原(和田)智恵、瀬戸浩行、堀部ますみ、木戸淳一、永田俊彦、サイクロスポリンA投与ラットにおける歯槽骨の組織学的解析、日歯保存誌、査読有、51巻、2008、246-255
- ② 美原(和田)智恵、板東美香、片岡正俊、久保田健彦、板垣真奈美、島田靖子、田井秀明、吉江弘正、西村英紀、曾我賢彦、高柴正悟、永田俊彦、木戸淳一、薬物誘発性歯肉増殖症の発症に関する遺伝子多型の検索・ $\alpha 2$ インテグリン多型+1648G/A遺伝子多型、日歯保存誌、査読有、51巻、2008、464-471

[学会発表] (計3件)

- ① 美原智恵、ラット実験的歯周炎におけるオステオプロテジェリンの骨吸収と炎症に及ぼす効果、第16回徳島骨代謝学会、2009年10月23日、徳島グランヴィリオホテル(徳島)
- ② 美原智恵、ラット実験的歯周炎におけるオステオプロテジェリンの骨吸収と炎症に及ぼす効果、第52回日本歯周病学会秋季学術大会、2009年10月11日、宮崎観光ホテル(宮崎)
- ③ 徳永格、ラット実験的歯周炎におけるオステオプロテジェリンの歯槽骨吸収抑制作用、第51回日本歯周病学会春季学術大会、2008年4月25日、大宮ソニックシティ(埼玉)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

美原 智恵 (MIHARA CHIE)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号: 70403748

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし