

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10269

研究課題名(和文)抗体医薬を用いた新規歯周病予防法の基礎的検討

研究課題名(英文)Basic study of new periodontal disease prevention method using antibody drug

研究代表者

合田 征司 (GODA, Seiji)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70351476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要はマウス動物実験においてはP. gingivalis菌感染24時間後に歯根膜細胞においてCX3CL1発現を認め、RANKLの発現は認めなかった。1か月後、歯根膜細胞および骨芽細胞においてCX3CL1発現は減弱し、RANKLの発現を強く認め、歯槽骨吸収が顕著に認められた。抗CX3CL1抗体を腹腔内に投与行った場合、P. gingivalis菌感染によるCX3CL1発現およびRANKL発現の減弱が認められ、歯槽骨吸収も有意に抑制された。以上の結果から抗CX3CL1抗体は、慢性歯周炎の発症および骨吸収を抑制することが明らかとなり、今後薬剤として更なる研究が重要である事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的意義は中和抗体を用いて慢性歯周炎の抗体医薬開発を目指して、慢性歯周炎へのCX3CL1中和抗体の有効性について検討した結果P. gingivalis菌感染による歯槽骨吸収は、CX3CL1中和抗体投与により歯槽骨吸収は抑制された。更にLPS感染によるMyD88の分解およびRANKL発現にはCX3CL1刺激が強く関与していることが示唆された点である。研究成果の社会的意義は今後慢性歯周炎の治療薬として中和抗体という生物製剤の可能性が示唆されたことである。

研究成果の概要(英文)：The academic significance of the research results is that they aimed to develop an antibody drug for chronic periodontitis using neutralizing antibodies, and examined the effectiveness of CX3CL1 neutralizing antibodies on chronic periodontitis. The results showed that alveolar bone resorption caused by P. gingivalis infection was suppressed by administering CX3CL1 neutralizing antibodies, and further suggested that CX3CL1 is strongly involved in the degradation of MyD88 and RANKL expression caused by LPS infection. The social significance of the research results is that they suggest the possibility of neutralizing antibodies as a biological drug as a treatment for chronic periodontitis in the future.

研究分野：免疫学・歯周病学・生理学

キーワード：ケモカイン RANKL 抗CX3CL1 中和抗体

1. 研究開始当初の背景

慢性歯周炎は 55~64 歳で歯周炎の有病者率が 82.5%となるなど、歯周疾患の有病状況は他の疾患に類を見ないほど高率を示している。歯の喪失は糖尿病だけでなく、認知症や脳血管疾患などさまざまな全身疾患のリスクを高める。歯を維持することは、全身の健康維持につながり、医療費の節約につながると報告されており歯周疾患は国民の保健上大きな課題となり慢性歯周炎による骨吸収機序を解明することが重要である。

慢性歯周炎の骨吸収には *Porphyromonas gingivalis* に代表される歯周病原細菌が産生する病原因子に対する宿主の免疫応答が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

CX3CL1 は、ケモカインドメインとムチンドメインを併せもつケモカインで、活性化血管内皮細胞上に直接発現する。CX3CL1 受容体(CX3CR1)はパトローリング単球やキラーリンパ球などの特徴的な機能を担う免疫細胞に選択的に発現している(Imai et al. Cell 91:521-530, 1997)。現在まで、脳炎、糸球体腎炎、心筋虚血、クローン病などの炎症性疾患において CX3CL1 の発現が報告されている。破骨細胞分化や骨吸収にも CX3CL1 が深く関与することが報告されている(Koizumi et al. J Immunol 15;158:1825-31)。関節リウマチにおいては、罹患関節滑膜の線維芽細胞様滑膜細胞、血管内皮細胞などに CX3CL1 が発現している。また、その受容体(CX3CR1)は単球/マクロファージや一部の CD8 陽性 T 細胞に発現しており、細胞遊走に関与すると推測されている。同時に CX3CL1 には血管新生作用、滑膜細胞や T 細胞などへの刺激作用もあり、さらに破骨細胞の前駆細胞の遊走にも関与する。そのため、CX3CL1 は関節リウマチの病態に深く関与していると考えられており、治療標的分子となることが期待されている。実際、関節炎モデルマウスにおいて、抗 CX3CL1 抗体の投与により関節炎が抑制されている。関節リウマチ患者に慢性歯周炎がみられる確率が高いことが知られており、このような背景から、慢性歯周炎局所での CX3CL1 の過剰な産生を抑制することが骨吸収を特徴とする歯周炎の進行抑制につながると考えている。慢性歯周炎の発症機序および増悪における新規ターゲットとして CX3CL1 に注目している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性歯周炎の発症機序および増悪における新規ターゲットとして CX3CL1 に注目し、抗 CX3CL1 中和抗体を用いた新規慢性歯周病予防法の基礎的検討である。

3. 研究の方法

歯肉線維芽細胞をCX3CL1刺激によるRANKLの発現を検討

歯肉線維芽細胞を種々の濃度 CX3CL1 を刺激し、24 時間後細胞を回収後抗 RANKL 抗体で処理後 FACS 解析および細胞を可溶化し、mRNA を抽出、PCR 装置を用いて RANKL のプライマーにより、RT-PCR 法により検出する。

マウスにおける実験的慢性歯周炎の発症

4 週齢オスの C57BL/6N マウスを用いて実験を行う。健康状態を観察後、イオン交換水中に最終濃度 1 mg/ml のサルファメトキサゾールと 200 µg/ml のトリメトプリムを混合したものを飲料水として 4 日間与えてその後、3 日間抗生物質を含まないイオン交換水を与える。2・6・8・10・15・17・22・29 日目に腹腔内に各々の抗体 (control IgG 抗体、抗 CX3CL1 抗

体)を0.5 mg/匹投与する。供試菌には、*P. gingivalis* ATCC 33277 株を用い、イーストエキス(5.0 mg/ml)、ヘミン(5.0 µg/ml) および1%ビタミン K1 (0.2 µg/ml) を添加したブレインハートインフュージョン液体培地を用いて嫌気条件下で(CO₂: 10%、H₂: 10%、N₂: 80%)、18 時間培養する。細菌感染は、供試菌液を遠心集菌し(4 °C、8,000 rpm、20 minutes) 1% カルボキシメチルセルロース溶液で調製したもの(1010 CFU/ml) を 1 日毎に計 6 回、マウス 1 匹あたり 0.1 ml を経口接種する。すべてのマウスは食事や飲料水を自由に摂取できるようにし、温度 23 °C、湿度 60%、明暗 12 時間サイクルの環境下で飼育する。

口腔内定着の確認

PBS で作製した 5% CMC 溶液で 0.5 mg/ml 濃度に調整した菌液投与群とコントロールとして PBS で作製した 5% CMC 溶液を投与する群を用いる。投与回数は、細菌の投与開始 2 日前から最終投与 2 日後まで毎日、計 9 回投与する。

すべてのラットは、食事、飲料水を自由に摂取できるようにし、温度 23 °C、湿度 60%および明暗 12 時間サイクルの環境下で飼育する。ラット口腔内の *P. gingivalis* の存在は、PCR 反応を行なって確認する。すなわち、綿棒でラット口腔内を 30 秒間拭って、プラーク細菌を採取し、ISOPLANT (ニッポンジーン)を用いて DNA を抽出する。抽出した DNA を 20 µl の T₁₀E₁ 溶液にて溶解し、4 °C で保存する。プライマーは、Ashimoto らが報告した 16S rRNA の塩基配列に基づいて作製し、PCR 反応は 95 °C 5 分間加熱変性後、95 °C 30 秒、60 °C 1 分、72 °C 1 分を 35 サイクルで行う。

骨吸収の測定

細菌の接種最終日から 42 日目にすべてのラットをエーテル麻酔下で断頭瀉血により屠殺する。歯槽骨吸収量の評価は、上顎臼歯部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を 7 箇所測定して行う。頭蓋骨を 2 気圧下で 10 分間加熱後、3%次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬して軟組織を除去し、1%メチレンブルー溶液で歯槽骨を染色乾燥させた試料をデジタル HD マイクロスコープ(実体顕微鏡)で 40 倍の倍率で測定する。7 箇所の測定値を平均して個体当たりの骨吸収量とし、6 匹分の平均値を実験群の骨吸収量としてミリメートルで表示する。測定は、同一試料について 3 回実施し平均値と標準誤差(SE)を求める。統計分析は、Fisher's PLSD (StatView)にて行う。

歯肉組織における Myd88 の分解能の検討

P. gingivalis 3 回目感染直後および 5 週目に採取した上顎右側顎側歯肉を採取し組織を 1%TritonX-100、Protease inhibitor、Phosphatase inhibitor 存在下で超音波破碎機を用いて可溶化し、タンパク質分離泳動装置とパワーサプライを用いて SDS/PAGE で分離後、ナイロン膜上に転写し各種抗体を用いた Western blotting 法により、Myd88 を検出する。

病理組織学的検討

P. gingivalis 3 回目感染直後および 5 週目に採取した上顎左側顎骨は、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で約 4 週間固定後、10% EDTA 溶液にて 4 週間脱灰操作を行った後、脱灰後パラフィン包埋し、厚さ約 3 µm の頬舌断連続切片を作製して、Hematoxylin-Eosin 染色、免疫染色 (RANKL, CD4, CX3CR1, Cathepyhin K, CX3CL1 抗体など) にて光学顕微鏡の病理組織学的検索を行う。

4 . 研究成果

研究成果の概要は、マウス動物実験においては計 3 回 *P.gingivalis* 菌感染 24 時間後に歯

根膜細胞において CX3CL1 発現を認めたが、RANKL の発現は認めなかった。3 回 *P.gingivalis* 菌感染 1 か月後、歯根膜細胞および骨芽細胞において CX3CL1 発現は減弱し、RANKL の発現を強く認め、CT 画像解析においても歯槽骨吸収が顕著に認められた。抗 CX3CL1 抗体を腹腔内に投与行った場合、*P.gingivalis* 菌感による CX3CL1 発現および RANKL 発現の減弱が認められ、CT 画像解析においても歯槽骨吸収も有意に抑制された。*P.gingivalis* 感染直後（24 時間後）および感染後 1 か月の歯肉組織における Myd88 の分解をウエスタンブロッティング法および RT-PCR 法を用いて検討した結果、歯肉線維芽細胞において *P.gingivalis* 感染 Myd88 の分解は、1 回のみ感染には認められず、3 回感染においては Myd88 の分解が認められた。抗 CX3CL1 抗体群においてもコントロール群と比較して Myd88 の分解が抑制された。以上の結果から抗 CX3CL1 抗体は、慢性歯周炎の発症および骨吸収を抑制することが明らかとなり、今後薬剤として更なる研究が重要である事が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lan L, Inoue H, Goda S.	4. 巻 14(2)
2. 論文標題 Surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler eluate suppresses MMP-1 secretion by TNF- α -stimulated human gingival fibroblasts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nano Biomedicine	6. 最初と最後の頁 41-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Inoue H, Lan L, Ke Z, Yang Y, Zheng F, Mao D, Goda S.	4. 巻 41(1)
2. 論文標題 Effects of S-PRG filler eluate on MMP-1 and MMP-3 secretion by human gingival fibroblasts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dent Mater J	6. 最初と最後の頁 159-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-062	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------