

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号 : 32710
 研究種目 : 若手研究 (B)
 研究期間 : 2011~2012
 課題番号 : 23792489
 研究課題名 (和文) 歯周病初期における好中球エラスターゼの歯根膜細胞への作用と阻害剤の臨床応用
 研究課題名 (英文) Effects of the Neutrophil Elastase on periodontal ligament cells and the clinical application of Neutrophil Elastase inhibitor to periodontal disease.
 研究代表者
 氏名 優子 (UJIIE YUKO)
 鶴見大学・歯学部・助教
 研究者番号 : 60588599

研究成果の概要 (和文) : 好中球エラスターゼは炎症時に異物を分解し、生体を防御する好中球から放出される酵素である。この酵素は歯周病に罹患すると歯を支える歯根膜組織中に増え、それが歯根膜のコラーゲン線維間基質を分解する事が分かっている。本研究では、歯を支える歯根膜と骨の破壊に、この酵素が関与する事を明らかにした。また、すでに臨床応用されている、この酵素の阻害剤を用いて骨を破壊する破骨細胞への分化を抑制し、歯根膜の破壊を抑えることができるという可能性を示した。

研究成果の概要 (英文) : It is known that Neutrophil Elastase is one of the neutral proteinase and it degrade foreign objects at the inflammatory situation. The proteinase increased in the periodontal ligament which supports teeth, and it degraded non-collagenous matrix of periodontal ligaments. At this experiment, we demonstrated that the neutrophil elastase related with the degradation of periodontal ligament and bone matrix. Additionally, we implied a possibility that the inhibitor of neutrophil elastase restrained the differentiation of osteoclasts, moreover, the inhibitor suppressed a degradation of periodontal ligaments.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 歯学・歯周治療系歯学

キーワード : 歯周予防学

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病における歯周組織の破壊に歯根膜中のプロテアーゼが関与するという報告は少ない。

(2) 好中球エラスターゼが歯周病罹患患者の歯根膜から検出された。これは歯根膜の線維間基質を分解する唯一のエラスターゼである。

(3) この好中球エラスターゼで処理した歯根膜では機械的強度の低下が認められた。

2. 研究の目的

(1) 歯周病原菌の感染によって浸潤した好中球から放出される好中球エラスターゼが歯根膜細胞に及ぼす影響を調べる。

(2) 好中球エラスターゼの阻害剤であるシベレスタットが歯根膜細胞に与える影響を調べる。

(3) 慢性歯周病モデルにおける好中球エラスターゼの作用と阻害剤の効果を調べ、好中球エラスターゼ阻害剤に着目した歯周病治療薬として臨床応用できる可能性を検討す

る。

3. 研究の方法

- (1) 慢性歯周病マウスの作製
 - ① 歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*)を Brain-Heart Infusion Broth (BHI)で嫌気培養をして実験に使用するにあたり、十分な量を確保する。
 - ② *P.g* 菌を口腔内に付与しやすいように、2% Carboxymethylcellulose (CMC)と生菌 *P.g* 10^9 colony-forming units/ $100 \mu\text{L}$ PBS を混ぜ合わせてゲル状にした。以下この *P.g* 菌を *P.g*-CMC と呼ぶ。
 - ③ シルク糸で C57 BL/6 マウスの上顎第二大臼歯を結紮。同日に *P.g*-CMC を口腔内に付与して歯周病を引き起こす。この *P.g*-CMC の付与は1日おきに行った。
 - ④ *P.g*-CMC の付与開始から10日目に屠殺した。
 - ⑤ 4%パラホルムアルデヒド固定液にて頭蓋を固定し、マイクロ CT 撮影をおこなった。
- (2) 作製したマウス慢性歯周病モデルの歯根膜から RNA を抽出し、テンプレートを作製し、PCRにて mRNA の発現を調べる
 - ① 結紮(-)と結紮(+)の両群から第一、第二、第三大白歯を抜歯する。
 - ② 抜去歯に付着している歯肉は顕微鏡下で取り除く。大白歯を RNA 抽出溶液を入れたチューブ内に入れて、10 秒間 Voltex にかけた。その後の RNA 抽出の手順は使用した RNAqueous kit (Ambion)の説明に従う。
- (3) In Vitro において好中球エラスターゼがヒト歯根膜細胞に与える影響について調べる。
 - ① 3群に分けて培養する。a) 歯周病原細菌の LPS 処理群、b) LPS 処理群にさらに好中球エラスターゼを添加した群、c) LPS も好中球エラスターゼも添加しない群。
 - ② これらの条件下で培養した歯根膜細胞の mRNA 発現を調べる。まずは添加する好中球エラスターゼの適した濃度を調べる。
- (4) ラット慢性歯周病モデルにおける、好中球エラスターゼ阻害剤 (シベレスタット) の影響を調べる。
 - ① In Vivo でシベレスタットを注入した浸透圧ポンプ (ALZET ポンプ) に充填され、カテーテルを通じて頸静脈から体内に取り込まれた。このポンプから流速 $0.25 \mu\text{L}/\text{hrs}$ の割合でシベレスタットが静脈内に供給された。
 - ② 2日おきに *P.g*-CMC を口腔内に付与し、

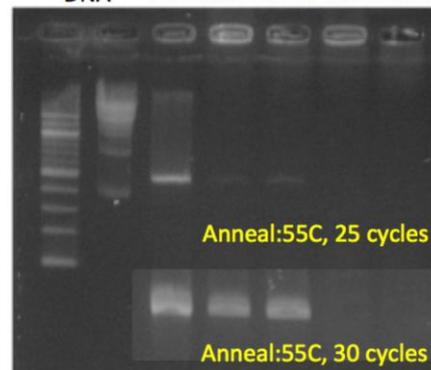
10日後に屠殺した。その後 H-E 染色において組織学的観察を行った。

- (5) シベレスタットが骨吸収に与える影響について調べる。
 - ① シベレスタットがマウスマクロファージの細胞活性を抑制していないか MTT アッセイにて調べた。
 - ② マウスマクロファージの細胞培養上清に、RANKL を添加して破骨細胞への分化を誘導する。シベレスタットがマクロファージから破骨細胞への分化に影響を及ぼすかどうか TRAP 染色と TRAP アッセイを用いて調べる。

4. 研究成果

- (1) マイクロ CT にて歯周病による歯槽骨の吸収が結紮した第二大臼歯の周辺に認められた。
 - ① 結紮(+)側では結紮(-)側に比べて明らかな骨吸収が結紮をした第二大臼歯の周囲に認められた。よって、この条件下にて歯周病を惹起できる事が分かった。
- (2) 慢性歯周病モデルから採取したマウス歯根膜に好中球エラスターゼの発現が認められた。
 - ① 抜去したマウス大白歯の歯根膜から RNA を抽出し、テンプレートを作製。GAPDH, mouse 好中球エラスターゼのプライマーにて mRNA の発現を確認した。
 - ② この時に結紮をして歯肉の腫脹が認められた右側と、結紮をしなかった歯肉の腫脹が認められなかった左側との間に好中球エラスターゼの発現量の大きな差はなかった。

100 1000
Radder G mNE1,2 mNE3,4
DNA AR-1 AR-1 AR-1L AR-1 AR-1L



AR-1: 結紮系+
AR-1L: 結紮系-

mNE1,2: RNA全長の前半でprimer設計
mNE3,4: RNA全長の後半でprimer設計

- ③ 結紮(+)では RANK と TRAP の発現が認め

られた。結紮(-)と比較すると、これらの発現は結紮(+)で強かった。

- ④ 一方で、RANKL と OPG の発現は結紮(+)と結紮(-)の両群で認められなかった。

(3) 高濃度の好中球エラスターゼはヒト歯根膜線維芽細胞(hPDLFs)の mRNA 発現を弱めた。シベレスタットは好中球エラスターゼの作用を減弱させた。

- ① 0.25 U/mL 好中球エラスターゼを hPDLFs に添加すると GAPDH の発現は 20cycles では認められなかった。

② 上記の条件にシベレスタットを 0.05mg/ml もしくは 1mg/ml 加えると、GAPDH の発現はシベレスタットの濃度依存的に回復した。

- ③ 好中球エラスターゼを添加しない hPDLFs では GAPDH の発現は 20cycles でも強く認められた。

(4) シベレスタットの静脈内投与によって、シベレスタット投与群と非投与群との間に変化が認められた。

- ① 肉眼的には、結紮糸周囲の辺縁歯肉(口蓋側)はシベレスタット投与群の方が、非投与群よりも肥厚していた。



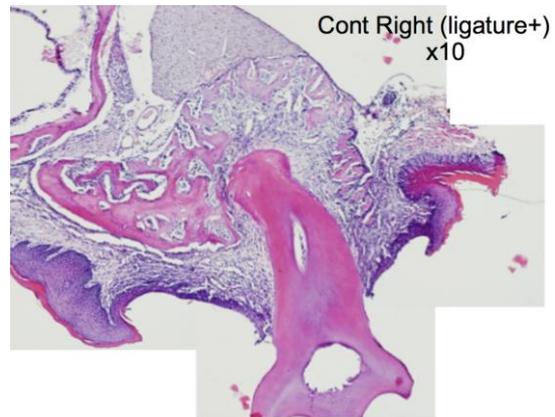
- ② H-E 染色では結紮糸周囲歯肉の内縁上皮

の上皮突起が、シベレスタット群ではコントロール群と比べて肥厚していた。

- ③ マイクロ CT においてシベレスタット投与群と非投与群では骨の吸収に差はないように見られた。

④ しかしながら H-E 染色で観察すると、シベレスタット投与群の方が、骨の吸収が進んでいなかった(下図コントロール群とシベレスタット群の H-E 染色: 根尖付近の歯槽骨)。

- ⑤ H-E 染色においては、第二大臼歯根尖付近の歯根膜の線維間基質の分解はシベレスタット非投与群の方がシベレスタット投与群に比べて進んでいた(下図 H-E 染色の根尖から歯槽骨の間の歯根膜組織中の非コラーゲン線維基質)。



コントロール群：上顎第二大臼歯(結紮糸+)、縦断面

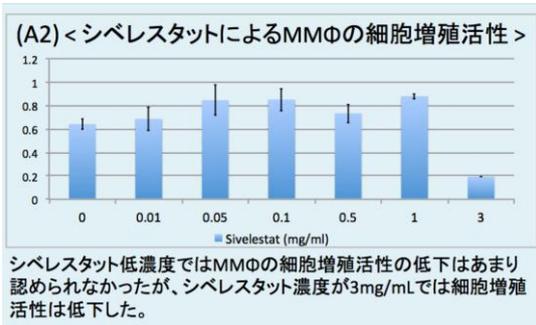


シベレスタット群：上顎第二大臼歯(結紮糸+)、縦断面

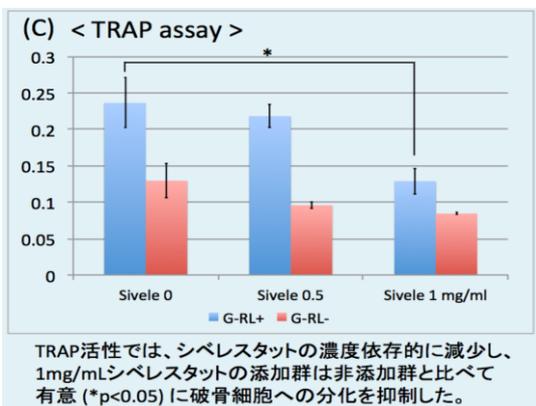
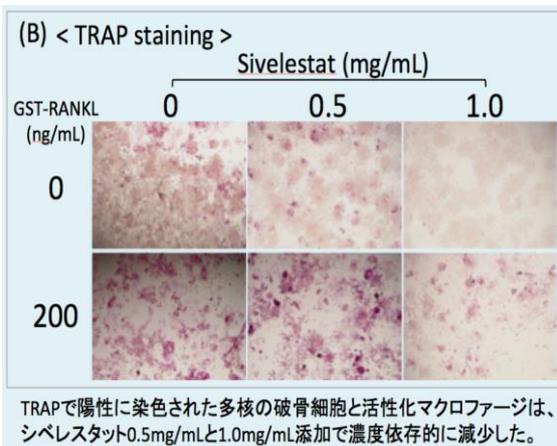
(5) シベレスタットは破骨細胞への分化に対して抑制的に働く。

- ① マウスマクロファージの細胞増殖活性はシベレスタットの濃度によって影響を受ける。シベレスタットの濃度が 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1mg/mL ではマクロファージの細胞増殖活性は変わらなかった。

- ② しかし、シベレスタット 3mg/mL では、マクロファージの細胞増殖活性は明らかに低下した。



- ③ 200 ng/mL GST-RANKL によって、マクロファージが破骨細胞へと分化する時に 0, 0.5, 1.0mg/mL シベレスタットを添加すると、シベレスタットの濃度依存的に TRAP で陽性に染色された細胞が減少した(下図 B)。
- ④ TRAP アッセイではシベレスタットの濃度が 0, 0.5, 1.0mg/mL と高くなることに伴って、TRAP 活性が低下した。つまり、シベレスタット添加群は非添加群と比べて有意に ($p < 0.05$) に破骨細胞への分化を抑制していた(下図 C)。



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)

[学会発表] (計 1 件)
氏家 優子、好中球エラスターゼ阻害剤が骨吸収に及ぼす影響、日本歯周病学会、2013 年 05 月 31 日～06 月 01 日、タワーホール船堀 (東京)

6. 研究組織
(1) 研究代表者
氏家 優子 (UJIIE YUKO)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：60588599