

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593132

研究課題名(和文) MAPKシグナル亢進による炎症性歯周病モデルの作製

研究課題名(英文) Production of the inflammatory periodontal disease model by the enhanced MAPK signaling

研究代表者

小出 雅則 (Koide, Masanori)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：10367617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は細菌感染による慢性炎症疾患である。歯周病の治療を進展させるために生体側の病態の解明が重要である。我々は、病態を反映した歯周病モデルの確立を目指して、炎症性の細胞内伝達因子であるMAPKが恒常的に活性化しているMAPK phosphatase-1 (MAPK不活性化因子, MKP-1) 遺伝子欠損マウスと骨吸収が亢進したOPG遺伝子欠損マウスを交配して新規の炎症性歯周病モデルの作製を試みた。(結果)MKP-1・OPG遺伝子ヘテロ二重遺伝子改変マウスを得た。マイクロCTの解析より、MKP-1・OPG遺伝子ヘテロ二重遺伝子改変マウスでは歯槽骨の進行を認めた。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is caused a chronic inflammatory disease by bacteria infection. But, the condition of a patient is complicated, and pathological condition of periodontitis is not understood well enough. Elucidation of the inflammation of host side is important to progress treatment of periodontitis. MAPK is an intracellular signal transduction of an inflammation. Deficiency of MAPK phosphatase-1 (MAPK inactivating gene, MKP-1) activates constantly inflammation. MKP-1-deficient mice exhibited high sensitivity of inflammation. OPG-deficient mice exhibited severer alveolar bone loss. Our aiming was establishment of the accelerated periodontitis model that reflected the pathological condition. (Result) I got the MKP-1 and OPG double deficient (dKO) mice. The alveolar bone loss is more severe in MKP-1 and OPG dKO mice than OPG-deficient mice using analysis of micro CT.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周病 歯周病モデル 歯槽骨吸収 MAPK OPG 歯周免疫機能学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は細菌感染による慢性炎症疾患である。しかし、病態は複雑であり解明は十分でない。その理由は、細菌や宿主に関わる多様な因子が関与するためである。宿主の慢性的な炎症反応により歯周組織破壊および歯槽骨吸収が起こる。しかし、炎症反応が歯槽骨吸収にどの程度関与するかは明確でない。この為、現在の治療方法は歯石除去や抗生剤の投与等の外的因子の除去療法が中心である。そこで、歯周病の治療を進歩させるために生体側の病態の解明が要である。

(2) 歯周病モデルとして細菌感染によるラットやマウスモデルが用いられている。しかし、細菌や宿主の多様な因子が関与しており炎症性因子がどの程度重要かは明確でない。また、歯槽骨吸収量は僅かであり薬剤評価等は困難である。近年、遺伝子改変動物を用いた生体レベルでの遺伝子の機能が急速に解明されつつある。我々のグループは、これまで骨代謝関連遺伝子の改変マウスを用いて骨代謝機構の報告をしてきた。我々も sRANKL 遺伝子の強発現マウスを用いて、薬の骨吸収抑制作用を検討した。更に、骨吸収が亢進した OPG 遺伝子欠損マウスが歯槽骨吸収のモデルであることを示した。しかし、このモデルは炎症反応を起こしておらず歯周病の病態の一部を示すに過ぎない。現在、炎症性骨吸収の評価は、LPS(細菌の内毒素)の頭頂骨皮下への投与モデルにより行われている。しかし、歯周組織はマクロファージやリンパ球などの浸潤が豊富であり、炎症反応が起こり易い組織である。歯周組織における炎症性因子による歯槽骨吸収機構の詳細は明確でない。炎症性歯周病モデルの作製は、歯周病における炎症と歯槽骨吸収の関連性および重要度を生体レベルで明らかにできると期待される。上記の炎症性因子として MAPK シグナルをとり上げる。MAPK は LPS などの刺激により誘導される細胞内シグナル伝達を担うリン酸化酵素である。MAPK は LPS 誘導性炎症反応や骨吸収に重要なシグナルである。MAPK 誘導性の歯槽骨吸収を評価することは、炎症と歯槽骨吸収の関連性の解明に重要である。

## 2. 研究の目的

(1) 病態を反映した歯周病モデルの確立を目指して、炎症性の細胞内伝達因子である MAPK が恒常的に活性化している MAPK phosphatase-1 (MAPK 不活性化因子, MKP-1) 遺伝子欠損マウスと骨吸収が亢進した OPG 遺伝子欠損マウスを交配して新規の炎症性歯周病モデルの作製を試みる。

(2) MKP-1/OPG 2 重遺伝子欠損マウスを用いて、歯周病に対する炎症性遺伝子の役割を生体レベルで解明する。

(3) 炎症性歯周病モデルに抗炎症薬または骨吸収抑制薬を投与して評価することである。これ等の研究の結果、新規炎症性歯周病モデルの作製: MKP-1 遺伝子欠損マウスの歯槽骨は

対照マウスと同様であった。OPG 遺伝子欠損マウスにおける歯槽骨吸収モデルに、MKP-1 遺伝子欠損マウスを交配して炎症性歯周病モデル作製する。更に、このマウスに歯周病細菌を接種して高感度の細菌感染による歯周病モデルを作製する。炎症性歯周病モデルの解析: KP-1・OPG 遺伝子二重欠損マウスの歯槽骨吸収量を定量する。また、歯周組織の炎症及び骨吸収関連タンパクの発現を組織学的に評価する。これらの解析により、歯周病に対する MKP-1 遺伝子の影響を解明することである。

## 3. 研究の方法

MAPK が恒常的に活性化する MKP-1 遺伝子欠損マウスを用いて、新規炎症性歯周病モデルを作製することが本研究の目標である。

(1) 交配により MKP-1・OPG 遺伝子ヘテロ二重欠損マウス等が作製される。更に、交配することにより MKP-1・OPG 遺伝子二重欠損マウスが得られる。これら、MKP-1・OPG 遺伝子二重欠損マウス及び MKP-1・OPG 遺伝子ヘテロ二重欠損マウスの歯槽骨をマイクロ CT で撮影する。評価項目は、ヒトと同様にセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を歯槽骨吸収量として測定する。歯槽骨および脛骨の骨量を測定する。これらより、歯槽骨のみならず全身に及ぼす MKP-1 遺伝子の影響を明らかにする

(2) 新規炎症性歯周病モデルの生化学および組織学的解析: 炎症反応の亢進を介して歯槽骨吸収を起こすと想定されるため、両因子の評価を行う。血清中の骨吸収マーカーである TRAP5b と骨形成マーカーである ALP、炎症の指標である TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  量を測定する。これらの結果を指標として、以下の組織学的及び遺伝子発現の検討を行う。歯周組織の炎症の程度を組織学的に評価するため、TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの染色を行う。免疫担当細胞の数や分布の変化を解析するため、F4/80 などのマクロファージの染色および CD11c や MHC などの樹状細胞の染色を行う。更に、抗 CD3 や抗 CD4 抗体などで T リンパ球の染色を行う。破骨細胞の数や分布の変化を解析するため、TRAP やカテプシン K などの染色を行う。上記の組織より mRNA を抽出して各遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で定量する。これらより、炎症反応と歯槽骨吸収の関係を明らかにする。

(3) MKP-1/OPG 二重遺伝子欠損マウスに歯周病細菌を接種して高感度の細菌感染による歯周病モデルを作製する。MKP-1・OPG 遺伝子二重欠損マウスの口腔に歯周病細菌である *P. gingivalis* を接種する。細菌感染後の MKP-1・OPG 遺伝子二重欠損マウスの歯槽骨量をマイクロ CT で評価する。これらの評価より、歯周炎の発症における細菌感染や炎症性因子の意義を考察する。

(4) 炎症性歯周病モデルを応用して骨吸収抑制薬及び抗炎症薬の評価: MKP-1・OPG 遺伝

子二重欠損マウスの歯周病モデルに骨吸収抑制薬であるビスホスホネート (BP) を投与して評価する。マイクロ CT で歯槽骨吸収量を測定し、評価を行う。マイクロ CT で歯槽骨および脛骨の骨量を測定して、全身の骨量との相関を評価する。血清中の骨吸収や骨形成および炎症マーカーの測定を行う。歯周組織の炎症を組織学的に評価するため、TNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ などの染色を行う。免疫担当細胞の数や分布の変化を解析するため、F4/80などのマクロファージの染色およびMHCなどの樹状細胞の染色を行う。更に、抗CD3や抗CD4抗体などでTリンパ球の染色を行う。破骨細胞の数や分布の変化を解析するため、TRAPやカテプシンKなどの染色を行う。上記の組織よりmRNAを抽出して各遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法で定量する。これらより炎症反応時に骨吸収を阻害した場合の評価を行う。

(5) 歯周組織に対するMKP-1遺伝子の影響を生化学および組織学的に解析するため、血清マーカーの測定や歯周組織の遺伝子発現の解析及び免疫染色を行う。MKP-1・OPG遺伝子二重欠損マウスの炎症性歯周病モデルに抗炎症薬または骨吸収抑制薬を投与して、歯槽骨吸収量などを測定して治療薬の評価を行う。

#### 4. 研究成果

MKP-1・OPG遺伝子ヘテロ二重遺伝子改変マウスを得た。マイクロCTの解析より、MKP-1・OPG遺伝子ヘテロ二重遺伝子改変マウスでは歯槽骨の進行を認めた。MKP-1欠損による影響は著明ではなかった。MKP-1・OPGヘテロ欠損二重遺伝子改変マウスに歯周病細菌の接種を行ったところ、その歯槽骨吸収量は増加傾向を示した。歯槽骨吸収モデルにおいて、MKP-1欠損による炎症の亢進により骨吸収の亢進が観察された。しかし、細菌感染による他の因子も歯槽骨吸収の進行に重要であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Mochizuki N, Sugino N, Ninomiya T, Yoshinari N, Udagawa N and Taguchi A, Association of cortical shape of te mandible on panoramic radiographs with mandibular trabecular bone structure in Japanese adults : a cone-beam CT-image analysis, Oral Radiol, 査読有, 140, 2014, 160-167.

doi: 10.1007/s11282-013-0155-z

Horibe K, Nakamichi Y, Uehara S, Nakamura M, Koide M, Kobayashi Y, Takahashi N and Udagawa N, Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis,

Immunology, 査読有, 140, 2013, 344-351  
doi: 10.1111/imm.12146

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N and Udagawa N. Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: Comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice, Endocrinology, 査読有, 154, 2013, 773-782  
doi: 10.1210/en.2012-1928

Udagawa N, Koide M, Nakamura M and Takahashi N, Minocycline to be used a potential anti-bone resorption agents due to the suppression of osteoclastic bone resorption, Journal of Oral Biosciences, 査読有, 55, 2013, 16-22  
doi:10.1016/j.job.2013.01.001

[学会発表](計4件)

小出雅則, カレントコンセプト5: 骨細胞による骨吸収制御, 第32回日本骨代謝学会学術集会, 2014/7/26, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N and Udagawa N, Osteocyte-derived OPG contributes to prevention of alveolar bone loss, Osteocyte-derived OPG contributes to prevention of alveolar bone loss, IBMS BoneKEy, 2013/5/29, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

小出雅則, 歯槽骨の維持機構と破骨細胞制御, 第31回日本骨代謝学会学術集会, 2013/5/30, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N and Udagawa N, Tetracyclines inhibit osteoclast differentiation by converting the differentiation pathway from osteoclasts to dendritic cells, American Society for Bone and Mineral Research, 2012/10/14, Minneapolis, USA

[図書](計4件)

小出雅則, 高橋直之, 医歯薬出版株式会社, 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ, 第4章 歯槽骨への炎症の波及, 2013, 3 (28-30)

小出雅則, 高橋直之, 株式会社 先端医学社, 骨粗鬆症治療, 力学負荷と骨: 骨細胞, 2014, 7 (1-7)

宇田川信之, 小出雅則, 堀部寛治, 中村美どり, 株式会社 医薬ジャーナル, Clinical Calcium, バイオミネラルの脱結

晶化, 2014, 9(215-223)

小出雅則, 高橋直之, 診断と治療社, 副甲状腺・骨代謝疾患診療マニュアル, 第 7 章 カルシトニンと骨・ミネラル, 2013, 2(16-17)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mdu.ac.jp/graduate/index.htm>

l

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 雅則 (KOIDE, Masanori)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号 : 10367617

(2) 研究分担者

二宮 禎 (NINOMIYA, Tadashi)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号 : 00360222

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号 : 70245801

(3) 連携研究者

なし