

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462869

研究課題名(和文) 糖尿病性歯周炎発症の分子機構の解明と治療薬開発のための基礎研究

研究課題名(英文) The basic study on the molecular mechanism and development of therapeutic agent for type II diabetic periodontitis

研究代表者

張 皿 (Zhang, Min)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00326472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン非依存性の 2 型糖尿病は高血圧、動脈硬化などの重篤な合併症の他に糖尿病性歯周炎を誘発する。本研究では、2 型糖尿病モデルマウスであるレプチン受容体欠損マウス (db/db マウス) を用いた歯周炎モデルを作製し、糖尿病性歯周炎の病態メカニズムを明らかにした。db/db および野生型マウス右第一大臼歯頰側歯肉に LPS を週 3 回、4 週間注射すると、db/db マウスでは多数の破骨細胞による歯槽骨の吸収の亢進が認められた。レプチンは破骨細胞前駆細胞の RANK および c-fms の発現を抑制することおよび骨芽細胞の RANKL の発現の上昇を抑制することで、破骨細胞形成を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Non-insulin-dependent type II diabetes mellitus causes serious complications, such as hypertension and arteriosclerosis, as well as diabetic periodontitis. In the present study, a model of type II diabetes periodontitis was developed using leptin receptor-deficient mice (db/db mice), and the mechanism of diabetic periodontitis in the model was clarified. As a model of experimental periodontitis, LPS was injected into the first right mandibular molar and mesial buccal gingiva of both db/db mice and wild type mice three times per week, for four weeks. We found that the alveolar bone resorption due to the large number of osteoclasts was significantly higher in the db/db group than in the WT group. We also clarified that leptin inhibited osteoclast formation by inhibiting the expression of RANK of the osteoclast out-riding cell and c-fms, as well as by inhibiting the rise in the expression of RANKL of osteoblasts.

研究分野：口腔病態病理学分野

キーワード：糖尿病性歯周炎 レプチン 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

【糖尿病性歯周炎】

International Diabetes Federation: IDF) 発行の「Diabetes Atlas」によると、わが国の糖尿病患者人口は1千万人を超え、この数は今後も増加していくと予測されている。文明の発達による食生活や生活様式の変化により、世界中でも糖尿病罹患患者数が急増しており、先進国だけではなく途上国においても深刻な問題となりつつある。歯周炎は糖尿病の合併症の中で6番目に多く、健常者と比較して糖尿病患者の歯周炎発症リスクは2.9倍 (Mealay BL, et al., *Periodontol.* 2000 2007 44:127-153)で、また歯周病患者における糖尿病の罹患率は約2倍 (Soskolne WA, et al., *Ann Periodontol.* 2001 6:91-98)といわれている。また重度の歯周炎をもつII型糖尿病患者は血糖値のコントロールが難しいことも報告されており (Lalla E et al., *J Periodontol Res.* 1998 33(7):387-389)、糖尿病と歯周炎とは互いに密接に関係していると考えられている。歯周炎による歯周組織の破壊、特に重度の歯槽骨吸収は歯の喪失につながり、QOLに多大な影響をおよぼす。糖尿病性歯周炎では、健常者の歯周炎に比べ重症化・慢性化がみられ、通常の歯周病治療では十分な効果が得られないことも多く、進行した歯周炎により咀嚼機能が低下し間接的に血糖値のコントロールに更なる悪影響をおよぼすことも考えられる。

【糖尿病患者の歯周炎の重症化が起こるのはなぜか】

糖尿病と歯周炎の関連には、糖尿病による①唾液減少によるプラーク付着の増加、②歯石や細菌の産生するリポ多糖(LPS)などによる炎症反応の遷延化、③免疫機能の低下にともなう重症化、④血中の過剰な糖分がタンパク質と結び付くことで形成される糖化最終産物(AGE)が歯周組織を形成するコラーゲンの脆弱化を引き起こすなど様々な原因が考えられ

る。しかし、糖尿病性歯周炎による歯槽骨吸収の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

【レプチン受容体欠損マウス: *db/db* マウス】

近年、食欲を司るホルモンであるレプチンの受容体の遺伝子多型がヒトのII型糖尿病の発症に関係していることが報告された (Tuomilehto J et al., *Int J Obes.* 2005 29:894-902; Chiu KC et al., *Eur J Endocrinol.* 2004 150:725-729)。また、レプチン受容体単一遺伝子の欠損により、過食による肥満とそれに続く高血糖を呈する *db/db* マウスは、ヒトのII型糖尿病モデルマウスとして広く用いられており、このマウスの骨形態計測結果では、ヒトII型糖尿病患者と同様に骨質の低下が認められたことが報告されている (Williams GA et al., *J Bone Miner Res.* 2011 26(8): 1698-1709)。そこで今回我々は、*db/db* マウスを用いた歯周病モデルマウスを作製することで、糖尿病患者の歯周炎における骨吸収のメカニズムの一端を証明できると考えた。

2. 研究の目的

II型糖尿病患者は重篤な歯周炎を発症することが多いが、未だ糖尿病性歯周炎の発症機構が解明されておらず有効な打開策がないため、通常の歯周病治療では十分な効果が得られないことが多い。そこで本研究では、糖尿病性歯周炎の病態メカニズムを明らかにするために、II型糖尿病モデルマウスであるレプチン受容体欠損マウス (*db/db* マウス) を用いた歯周炎モデルを作製し、糖尿病性歯周炎の病態メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) II型糖尿病モデルマウスの実験的歯周炎における骨吸収の検討:

II型糖尿病モデルマウス (*db/db*) と同腹の野生型マウス右下顎第一臼歯部の頰側歯肉にリポ多糖(LPS: 0.8mg/kg)を週3回で連続4週間注入し、歯周炎を誘導した。対象群には左下

顎同部位にPBSを注入した。最初のLPS注入時より1週間毎に経時的に下顎骨を摘出した。

- ① 画像解析： μ CT撮影による歯槽骨の3次元構築、pQCTによる歯槽骨の骨密度の測定および骨形態計測を行った。
- ② 組織学的解析：第一臼歯周囲を含む頬舌方向の切片を作製し、破骨細胞数を酒石酸抵抗性ホスファターゼ (TRAP) 染色し、骨形態計測を行った。さらに抗RANKLおよび抗OPG抗体を用いた免疫染色を行い、歯周炎発症過程を経時的に観察した。
- ③ 生化学的解析：*db/db*および野生型マウスの下顎骨を採取し、メンブレンフィルター上でLPS存在下または非存在下で器官培養し、6日後に培地中に溶出したカルシウム濃度を測定した。

(2) *db/db*マウスの骨吸収促進機構の解明：

- ① レプチン受容体の発現確認：*db/db*および野生型マウスの骨髄細胞をM-CSFで3日間培養し、破骨細胞前駆細胞を誘導した後にRANKLとM-CSFでさらに3日間培養し、破骨細胞を誘導した。骨髄細胞、破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の全RNAを調製し、RT-PCR法を用いてレプチン受容体とレプチン受容体の不活性型 isoformである *Lepr^{ort}* mRNAの発現を検討した。
- ② 共存培養による破骨細胞分化に対するレプチンの効果の検討：野生型および*db/db*マウスの骨髄細胞と生後1日齢の野生型および*db/db*マウスの頭蓋冠より初代骨芽細胞をLPS存在下で共存培養し、レプチンを添加し、形成された破骨細胞数を計測した。マウス骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) および破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) 存在下でレプチンを添加し、形成された破骨細胞数を計測した。さらに野生型および*db/db*マウスの骨芽細胞をLPSで添加し、レプチン存在下、非存在下で経時的に全RNAを調製し、RANKLおよびOPGの発現を検討した。
- ③ 破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) による破骨

細胞分化に対するレプチンの効果の検討：野生型および*db/db*マウスの骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) とレプチン存在下または非存在下で3日間刺激して破骨細胞前駆細胞を誘導した後に、さらにM-CSFとRANKL存在下でレプチンを添加し、形成された破骨細胞数を計測した。さらに野生型および*db/db*マウスの骨髄細胞をM-CSF単独、またはM-CSFとRANKL存在下で培養し、レプチン存在下、非存在下で経時的に全RNAを調製し、RANKおよび*c-fms*の発現を検討した。

4. 研究成果

1) II型糖尿病性歯周炎における骨吸収の解明：

野生型および*db/db*マウス右側下顎第一大臼歯頰側よりLPSを週3回4週間投与し、第一大臼歯根分岐部で μ CT撮影し歯槽骨の吸収状態を評価したところ、*db/db*マウスでは野生型マウスと比較して著明な歯槽骨吸収が認められた。また、野生型および*db/db*マウス右側下顎第一大臼歯頰側よりLPS投与4週間後に下顎骨を摘出し、10%のホルマリンで固定した後に5%EDTAで2週間脱灰した後パラフィン標本包埋をした。6 μ m切片を作製してTRAP染色を行ったところ、*db/db*マウスでは野生型マウスと比較してLPS投与群で歯槽骨に多数の破骨細胞と深い吸収窩が認められた。次に野生型および*db/db*マウスから下顎骨を摘出し、培養1日後からLPS存在下、または非存在下でさらに6日間培養した。6日後に培地中の溶出したカルシウム量を測定した結果、培地中にLPSを添加することにより両マウスともカルシウムの溶出量が増加したが、*db/db*マウス由来の下顎骨では野生型と比較して有意にカルシウムの溶出量が亢進した。

以上の結果より、歯周炎モデルでは、*db/db*マウスでは野生型マウスと比較して、LPS刺激による歯槽骨の吸収が亢進することがわかった。

(2) *db/db*マウスの骨吸収促進機構の解明：

①レプチン受容体の発現確認：*db/db*および野生型マウスの骨髄細胞、破骨細胞前駆細胞および破骨細胞すべてにレプチン受容体とレプチン受容体の不活性型 isoform である Leporin mRNA の発現が認められ、さらに破骨細胞分化に伴いこれらの発現は上昇した。

②共存培養による破骨細胞分化に対するレプチンの効果の検討：野生型マウス骨髄細胞と初代骨芽細胞の共存培養にレプチンを添加すると破骨細胞形成が抑制された。さらに *db/db* マウスの初代骨芽細胞と骨髄細胞による組み合わせでは、最も破骨細胞形成が認められた。初代骨芽細胞と骨髄細胞の一方を野生型、もう一方を *db/db* で組み合わせた場合では、破骨細胞形成が優位に認められ、レプチンを添加すると破骨細胞形成が抑制された。これらのことから、初代骨芽細胞と破骨細胞において両者ともにレプチンは破骨細胞分化を抑制することが示唆された。また、*db/db* マウスの初代骨芽細胞において RANKL が強く発現しており、野生型マウスではレプチン添加により RANKL の発現が抑制された。

③破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) による破骨細胞分化に対するレプチンの効果の検討：*db/db* マウス由来の骨髄細胞は M-CSF と RANKL 存在したで培養すると野生型マウス由来の骨髄細胞と比較して破骨細胞形成が有為に増加した。また、野生型マウス骨髄細胞を M-CSF で培養する際にレプチンを添加すると、破骨細胞形成が抑制されたが、*db/db* マウス骨髄細胞で見られた破骨細胞分化の亢進はレプチンを添加しても抑制されなかった。また、*db/db* マウス骨髄細胞は野生型マウス骨髄細胞と比べて *c-fms* および RANK の発現が上昇していた。野生型マウス骨髄細胞にレプチンを添加すると *c-fms* および RANK の発現が減少することから、レプチンは破骨細胞分化過程のうち、M-CSF による骨髄細胞から破骨細胞前駆

細胞への分化を制御していることが示唆された。

db/db マウスは、レプチン受容体欠損によるレプチンが作用しないことにより、破骨細胞形成が亢進し、歯槽骨吸収が促進される。このことからレプチンはレプチンシグナルが関与する糖尿病性歯周炎における骨破壊に重要な役割を果たしていると考えられる。また、*in vitro* においてレプチンが破骨細胞形成を抑制することから、レプチンは骨吸収抑制薬としても期待できると考えられる。今後は、LPS による歯槽骨破壊に対するレプチンの治療効果について検討して行きたいと考えている。

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 5 件)

- ① Min Zhang, Kou Matsuo, Yasuhiro Morimoto and Kenshi Maki. Odontogenic tumors in children: A review of 121 cases. *J West J Soc Clin Pediatr Oral Maxillo Surg* 7(1):6-11, 2015.
- ② Min Zhang, Shoichiro Kokabu, Chihro Nakatomi, Goro Sugiyama, Kou Matsuo and Eijior Jimi. The distinct distributions of immunocompetent cells in rat dentin pulp after pulpotomy. *Anat Rec* 298:741-749 2015. doi: 10.1002/ar.23087.
- ③ Jimi E. The Role of BMP Signaling and NF- κ B Signaling on Osteoblastic Differentiation, Cancer Development, and Vascular Diseases-Is the Activation of NF- κ B a Friend or Foe of BMP Function? *Vitam Horm.* 99:145-170, 2015. doi: 10.1016/bs.vh.2015.05.002.
- ④ Y Akasaki, K Matsuo, K Adachi, A Ishikawa, M Zhang, R Hosokawa. Effects of thymosin β 10 and β 15 on wound healing in rat tooth extraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol* 26: 280-286, 2014. doi: 10.1016/j.ajoms.2013.02.007.
- ⑤ K Matsuo, N Yamamoto, Y morimoto, Y

Yamashita, M Zhang, A Ishikawa, T Tanaka, S Kito, T Takahashi. Multiple complex odontomas and subsequent occurrence of an ossifying fibroma at the same site as the removed odontoma. *Journal of Dental Sciences* 8(2): 189-195, 2013. doi: 10.1016/jds.2012.09.018.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Min Zhang. The basic study of the bone resorption in type 2 diabetic. 第7回アジア国際外傷歯学会 平成 27 年 7 月 12 日 北九州
- ② Min Zhang. The basic study of the bone resorption in type 2 diabetic. 第15回日本外傷歯総会 平成 27 年 7 月 12 日 北九州
- ③ Zhang M and Matsuo K. The basic study of the bone resorption in type 2 diabetic periodontitis. The 6th conference of Asian International Association of Dental Traumatology. 平成 25 年 9 月 6-8. University of Indonesia, Jakarta, Indonesia.
- ④ Zhang M, Matsuo K and Jimi E. A basic study of the bone resorption in type 2 diabetic periodontitis. 第2回アジア太平洋国際カンファレンス 平成 26 年 1 月 25 日 九州歯科大

[図書] (計 0 件)

[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：

取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

張皿 (Min Zhang)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00326472

(2) 研究分担者

自見英治郎 (Eijiro Jimi)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：40276598

松尾拓 (Kou Matsuo)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70238971

福島 秀文 (Hidefumi Fukushima)
東北大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：70412624

(3) 連携研究者