

令和元年6月13日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11106

研究課題名(和文) カテプシンK阻害による根尖病変の炎症および骨吸収抑制機構の解明と臨床応用への期待

研究課題名(英文) Cathepsin K inhibitor regulates inflammation and bone destruction in experimentally-induced rat periapical lesions.

研究代表者

鈴木 規元 (SUZUKI, NORIYUKI)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：20372451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット実験的根尖性歯周炎の進展におけるカテプシンK阻害剤(NC-2300)の抑制効果を検討したところ、根尖病変の大きさ、病変内のTRAP陽性破骨細胞およびMHC class II陽性マクロファージの密度、炎症性サイトカインの発現が、カテプシンK阻害剤投与群において非投与群と比較して有意に減少した。以上の結果より、カテプシンK阻害剤の投与によって、破骨細胞におけるカテプシンK阻害作用による骨吸収抑制に加えて、活性化マクロファージおよび炎症性サイトカインの発現が減少することにより破骨細胞形成が抑制され、その結果として根尖周囲の骨吸収が抑制された可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根尖性歯周炎は、根尖歯周組織に生じる炎症性骨吸収性疾患であるが、その病態の判定は困難であり、慢性化すると難治性となることも少なくない。本研究はカテプシンK阻害剤の抗炎症作用に着目し、根尖性歯周炎の抑制に応用しようとするものである。本研究により、薬剤によって根尖性歯周炎を抑制できる可能性が示唆されたことにより、将来的に難治性根尖性歯周炎を速やかに治癒に導く可能性が開ければ、国民の口腔の健康増進に与える影響は大きいものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of cathepsin K inhibitor on inflammation and bone destruction in experimentally-induced rat periapical lesions. The size of the periapical lesion, number of tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclasts and major histocompatibility complex class II molecule-expressing macrophages in the experimental group decreased significantly when compared with the control group. The expression of pro-inflammatory cytokines in the experimental group was significantly suppressed when compared with the control group. These results suggest that the cathepsin K inhibitor may inhibit not only cathepsin K activity in osteoclasts but also inflammatory mediator synthesis relating to osteoclastogenesis, and these synergistic effects may be involved in the suppression of periapical lesion expansion.

研究分野：歯内治療学

キーワード：根尖性歯周炎 カテプシンK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎は、根尖歯周組織に生じる炎症性骨吸収性疾患であるが、その病態の判定は困難であり、慢性化すると難治性となることも少なくない。ラットあるいはマウスの第一臼歯を露髄し、そのまま口腔内に開放または歯内疾患原因細菌を根管内に播種すると、歯髄は次第に壊死に陥り、根尖周囲に骨吸収を伴った肉芽腫性病変が形成される。ラットまたはマウスを用いたこの実験モデルは、根尖性歯周炎の病態を経時的に観察するモデルとして大変有用であると思われ、我々はこれまで、根尖性歯周炎の病態について、本動物実験モデルを用いて免疫組織化学的・分子生物学的に解析を行ってきた。

一方、近年、関節リウマチ治療薬として、カテプシンK阻害作用をもつ経口投与可能な薬剤であるNC-2300が日本ケミファ社によって開発された。カテプシンKは破骨細胞に強く発現するシステインプロテアーゼであり、骨吸収において重要な役割を果たしていることが知られている。関節リウマチモデルにおいて、NC-2300投与により関節の骨破壊が抑制されるばかりでなく、樹状細胞におけるToll-like receptor 9を介するシグナル伝達を阻害することにより、炎症反応も抑制されることがこれまでに報告されている。

2. 研究の目的

(1) 根尖性歯周炎は根尖周囲における炎症性の骨破壊を特徴とすることから、カテプシンK阻害剤(NC-2300)が根尖性歯周炎の進展を抑制する可能性が高いと考えられる。ラット実験的根尖性歯周炎の進展におけるカテプシンK阻害剤(NC-2300)の抑制効果のメカニズムを解明し、さらに本薬剤を根尖性歯周炎治療剤として応用することを最終目標とした。

(2) NC-2300の臨床治験が中断されており、今後臨床応用が困難となる可能性が考えられることから、研究最終年度において、その代替として骨吸収抑制薬である抗RANKL抗体の根尖性歯周炎進展の抑制効果についても検索を行った。

3. 研究の方法

(1) 6週齢のWistar系雄性ラットを用い、下顎第一臼歯をラウンドバーにて露髄後、抜髄し、口腔内に開放することにより根尖性歯周炎を誘発した。実験群では、露髄開放時よりNC-2300(150 mg/kg)を1日2回経口投与し、非投与群をコントロールとした。21日後に屠殺して下顎臼歯を周囲の顎骨ごと摘出し、左側は4%パラホルムアルデヒド/リン酸塩緩衝液(PBS)にて固定後、マイクロCT撮影により根尖病変の大きさを測定した。その後、脱灰、包埋後、凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色、抗MHC class II抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、組織学的に検討した。右側は、根尖周囲の病変部を根尖とともに一塊として摘出し、RNA抽出後、通法に従いcDNAを作製し、リアルタイムPCRにて起炎症性サイトカイン(IL-1 α , IL-6)の発現量を測定した。

(2) 抗RANKL抗体であるデノスマブおよびBP製剤であるゾメタを使用し、それぞれの薬剤がC57BL/6マウスに全身的に効果があることを確認するため、デノスマブとゾメタを6週齢のC57BL/6マウスの腹腔内にそれぞれ投与し、21日目に屠殺、大腿骨をマイクロCTで解析した。また、同マウスの下顎第一臼歯に根尖性歯周炎を誘発し、根尖病変の大きさをマイクロCTで解析した。

4 . 研究成果

(1)カテプシン K 阻害剤(NC-2300)の効果

根尖病変の大きさをマイクロ CT により評価した結果、コントロール群では大きな根尖病変が形成されていた。一方、NC-2300 投与群においても根尖病変は形成されていたが、その大きさはコントロール群と比較して有意に小さかった (図 1)。

根尖病変の組織学的検討の結果、TRAP 陽性破骨細胞が根尖周囲の歯槽骨上に観察されたが、その数と密度は、NC-2300 投与群においてコントロール群と比較して有意に小さ

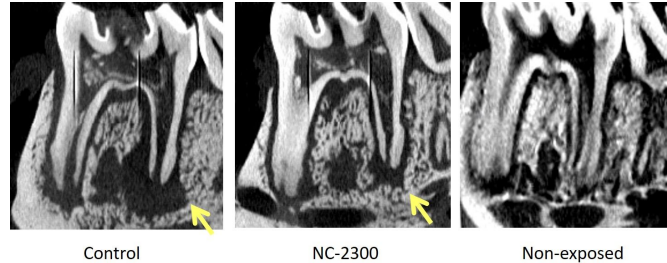


図1 マイクロCT画像

かった。また、MHC class II 分子を発現している活性化マクロファージの密度は、NC-2300 投与群においてコントロール群と比較して有意に小さかった。

根尖病変中の炎症性サイトカイン発現を比較したところ、NC-2300 投与群においては IL-1 α および IL-6 の発現が有意に抑制されていた (図 2)。

以上の結果より、NC-2300 の投与によって、破骨細胞におけるカテプシン K 阻害作用による骨吸収抑制に加

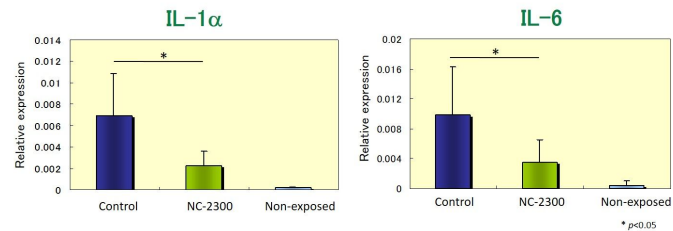


図2 炎症性サイトカインの発現

えて、活性化マクロファージおよび炎症性サイトカインの発現が減少することにより破骨細胞形成が抑制され、その結果として根尖周囲の骨吸収が抑制された可能性が示唆された。

(2)デスノマブおよびゾメタの効果

マイクロCTでの解析により、薬剤の濃度に依存して大腿骨の増加傾向が認められた。また、根尖病変の大きさは薬剤の濃度に依存し小さくなることが確認された。今後、さらなる検討を行っていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Ota C, Morisaki H, Nakata M, Arimoto T, Fukamachi H, Kataoka H, Masuda Y, Suzuki N, Miyazaki T, Okahashi N, Kuwata H: *Streptococcus sanguinis* noncoding *cia*-dependent small RNAs negatively regulate expression of type IV pilus retraction ATPase PilT and biofilm formation. *Infection and Immunity*, Vol 86(3), e00894-17, 2018.
2. Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N: Cathepsin K inhibitor regulates inflammation and bone destruction in experimentally induced rat periapical lesions; *J Endod*, Vol.41(9), p1474-1479, 2015.

〔学会発表〕(計3件)

1. Yamamoto M, Hashimoto K, Bakhit A, Suzuki N, Kawashima N, Okiji T: Effects of short-period three-dimensional spheroid culture for odonto-/osteoblastic differentiation of dental pulp cells. European Society of Endodontology, 2015.
2. 川島伸之、橋本健太郎、山本弥生子、辺見浩一、鈴木規元、興地隆史：Osr2 はマウス歯乳頭細胞の硬組織形成細胞への分化を促進する．第36回日本歯内療法学会、2015.
3. 川島伸之、山本弥生子、橋本健太郎、Bakhhit A、小泉悠、辺見浩一、大井智恵、鈴木規元、興地隆史：歯髄組織および歯肉組織より得られた間葉系幹細胞の硬組織形成細胞への分化能の比較．第142回日本歯科保存学会春季大会、2015.

〔図書〕(計2件)

1. 鈴木規元他．エンドの基本．医歯薬出版、76-84、2019.
2. 鈴木規元他．最新エンドのグローバルスタンダード．クインテッセンス出版、56-63、2017.

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：川島 伸之

ローマ字氏名：KAWASHIMA Nobuyuki

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：60272605

(2)研究協力者

研究協力者氏名：池田 めぐみ

ローマ字氏名：IKEDA Megumi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。