

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11837

研究課題名(和文)咬合性外傷における骨細胞の役割の検討

研究課題名(英文) Study of the role of osteocytes in the occlusal trauma

研究代表者

鵜飼 孝 (UKAI, Takashi)

長崎大学・病院(歯学系)・准教授

研究者番号：20295091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：噛み合わせが悪いなど歯に強い外傷力が加わると歯の周囲の骨の吸収が起きやすくなる。これは歯周病悪化の一つの要因でもある。マウスを用いた今回の研究では、歯に外傷力を加えた場合、歯の周囲組織である歯根膜や骨の中にある骨細胞において、ダメージを受けたときに細胞から放出されるhigh mobility group box-1 (HMGB1)の発現が多くなることが確認できた。これを抑制するとわずかではあるが骨吸収を抑制することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で歯に外傷力が加わった場合の骨吸収メカニズムの一端を明らかにすることができた。また、HMGB1を抑制することで骨吸収を抑制できたことより、これまでとは違うアプローチでの歯周病治療の治療薬の開発に応用可能ではないかと考えられる。また、同じく骨吸収を引き起こす関節リウマチや骨粗鬆症などの疾患の治療にも応用できる可能性があり、今後の研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)： When the tooth is subjected to a strong traumatic force such as bad occlusal condition, the bone around the tooth is likely to be resorbed. This is also one of the factors that exacerbate periodontal disease. In this study using mice, when traumatic force was applied to teeth, cells in the periodontal ligament which is the tissue surrounding the teeth, and osteocytes in the bone, were released the high mobility group box-1 (HMGB1) when they were damaged. It was confirmed that the expression of increased. When this HMGB1 was suppressed, bone resorption could be inhibited, albeit slightly.

研究分野：歯周治療学

キーワード：咬合性外傷 破骨細胞 骨細胞 HMGB1

## 1. 研究開始当初の背景

外傷性咬合は歯周炎による歯槽骨破壊を促進する。外傷性咬合により進行する骨吸収をコントロールすることは歯周炎の治療において重要であると考えられるが、外傷性咬合によりどのようなメカニズムで骨吸収が進んでいくのかは未だ明らかになっていない。*in vivo*においてラットやマウスの歯牙に強い外傷力をかけた場合には、多くの研究で初期反応として歯根膜組織の硝子様変性が起こり、その後に骨破壊が進んでいくことが示されている。これより外傷性咬合による骨吸収では歯根膜細胞の牽引や圧迫ではなく、歯根膜組織の変性などの影響が大きいのではないかと考えられるが、そのメカニズムは明らかになっていない。

研究代表者らはこれまでの研究でラットに外傷性咬合を付与した時の根分岐部組織では、破骨細胞出現時に破骨細胞誘導因子 (RANKL) 陽性細胞が増加することを報告している (J Periodontal Res, Yoshinaga Y, Ukai T *et. al.* 2007)。この咬合性外傷モデルにおいて、外傷予後に根間中隔の骨細胞の消失が見られ、その周囲に多くの破骨細胞が観察された。骨細胞はギャップジャンクションを介して骨細胞同士や骨表面の骨芽細胞とシグナル伝達を行っており、骨内の状態を骨表面に伝達できると考えられる。また最近の研究で骨細胞は RANKL を産生する重要な細胞の一つで、骨芽細胞や破骨細胞とともに骨のリモデリングをコントロールする重要な細胞の一つであることが示されている (Nakajima T, 2011)。そこで骨細胞の消失や消失に至る過程で分泌される因子が破骨細胞形成の促進や、骨吸収進行方向に影響しているのではないかと考えた。

さらに、細胞がダメージを受けた際に細胞から放出される High Mobility Group Box 1 (HMGB1) に注目した。これは細胞上の Toll-like receptor (TLR) 4 などのレセプターで認識されて細胞を活性化することが報告されており、破骨細胞の活性化にも関与することが報告されている。外傷性咬合によりダメージを受けた根分岐部歯根膜ならびに根間中隔の骨細胞から放出される HMGB1 が重要な働きをしているのではないかと考えられる。

## 2. 研究の目的

研究代表者は特に骨細胞がダメージを受けることが咬合性外傷時の骨吸収に大きな影響を与えているのではないかと考え、本研究では外傷力を加えた時の骨細胞の状態の変化ならびに HMGB1 が、骨吸収や破骨細胞形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。これを明らかにすることで、骨吸収が進行する方向がどのように制御されているのかを解明するための手掛かりになるのではないかと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 外傷性咬合付与

マウス下顎第一大臼歯に外傷性咬合を付与するために上顎第一大臼歯咬合面にワイヤーを装着して 1, 2, 3, 5 日後に屠殺して下顎骨を摘出した。一部のマウスは抗 HMGB1 抗体を投与し、同様に外傷性咬合を付与して 1, 5 日後に屠殺して下顎骨を摘出した。

### (2) 骨吸収の評価

摘出した下顎第一大臼歯の病理組織切片を作製し、HE 染色並びに酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、歯槽骨の破壊状態、破骨細胞の出現状態を調べた。

### (3) アポトーシス細胞の評価

作製した連続切片を用いて TUNEL 法によりアポトーシスの検出を行った。

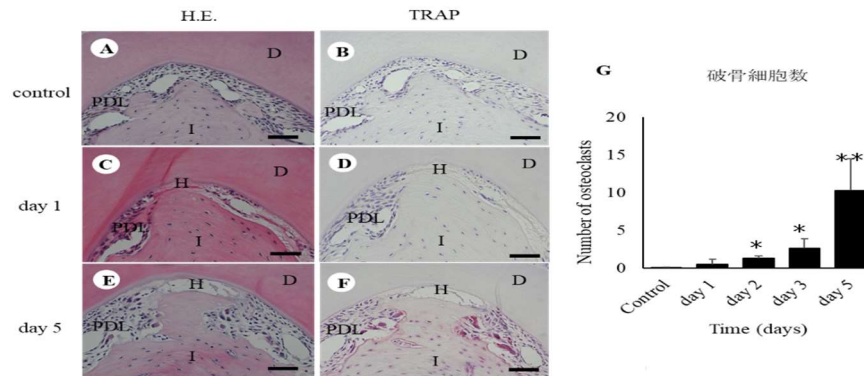
### (4) 免疫組織学的評価

作製した連続切片を用いて免疫染色により、RANKL、HMGB1、TLR4 の検出を行い、歯根膜細胞、骨細胞における陽性細胞の割合を調べた。

## 4. 研究成果

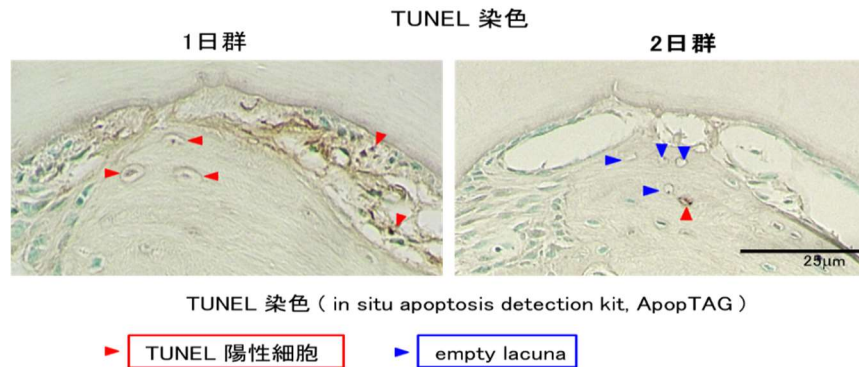
### (1) 骨破壊、破骨細胞の出現状態

1 日後の歯根膜組織に硝子様変性がみられ、2 日後より有意に破骨細胞数が増加した。5 日後には強い骨破壊が確認された。



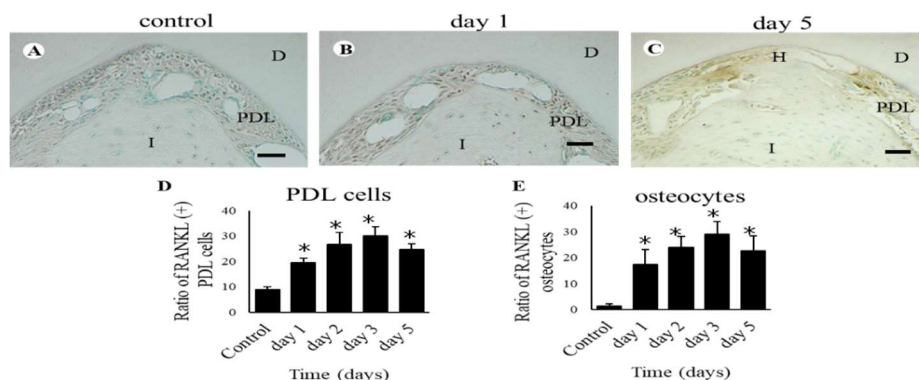
### (2) アポトーシスの検出

1 日後、2 日後根分岐部歯根膜に硝子様変性が認められた。根間中隔頂部の骨細胞の萎縮、消失が認められた。TUNEL 染色陽性で、アポトーシスしていると考えられた。



### (3) RANKL 陽性細胞

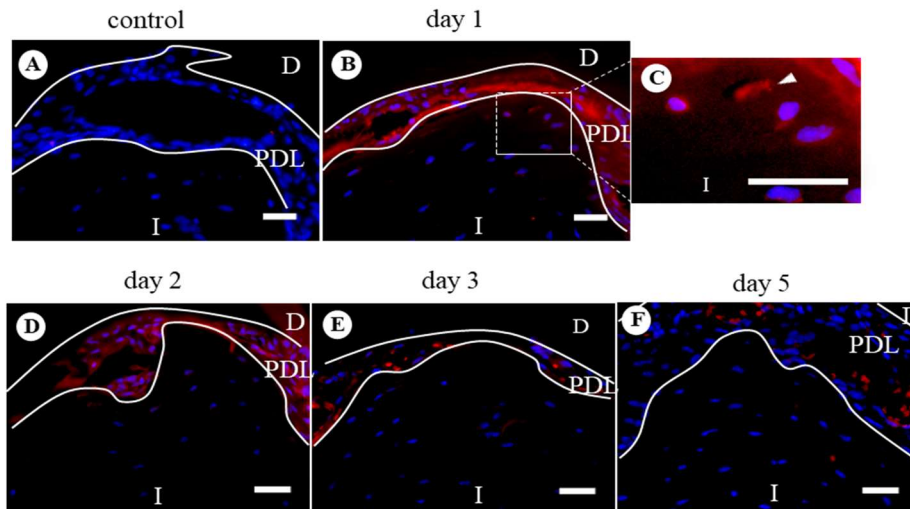
0, 1, 2, 3, 5 日後の RANKL 陽性細胞を免疫染色で検出した。歯根膜細胞、骨細胞ともに 1 日後より有意の陽性細胞が増加した。



#### (4) HMGB1 発現状態

蛍光免疫染色により根分歧部の HMGB1 陽性細胞を検出した。1, 2 日後の歯根膜細胞に強い陽性像が確認された。一部骨細胞にも陽性像が認められた。

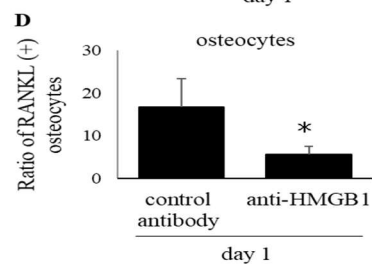
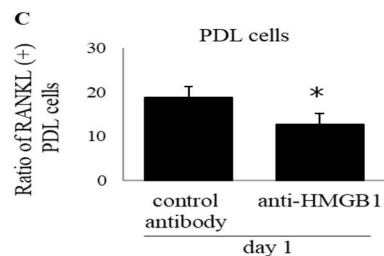
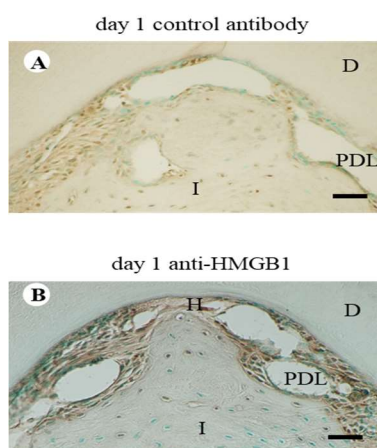
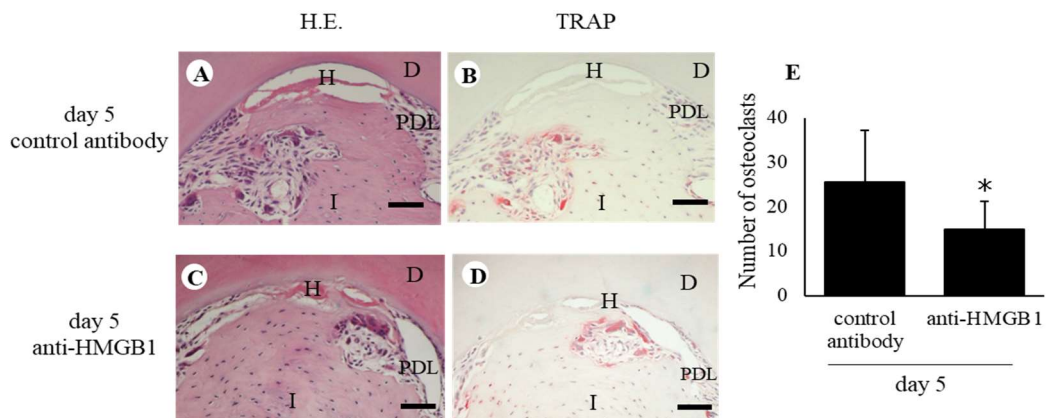
赤色 : HMGB1 陽性像、青色 : DAPI(核を染色)



#### (5) 抗 HMGB1 抗体の影響

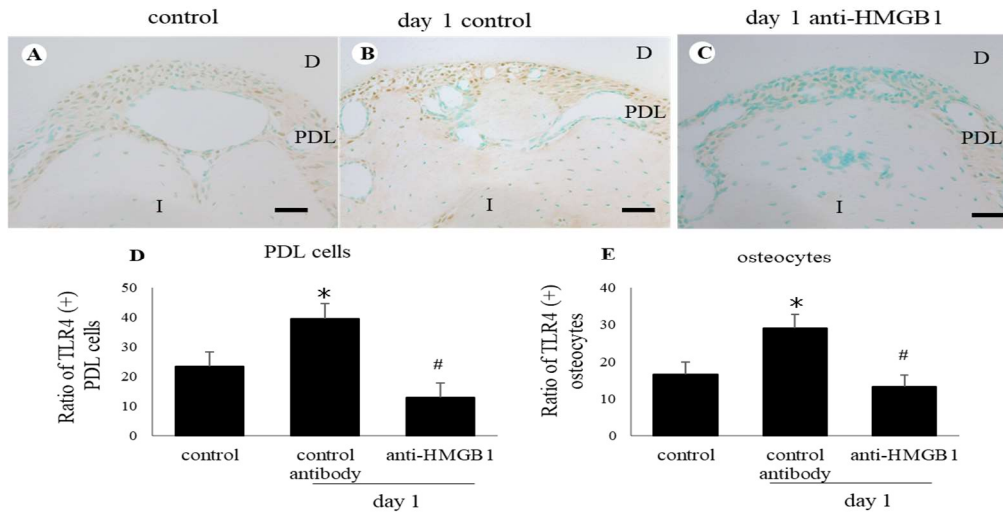
抗 HMGB1 抗体投与時の破骨細胞数と RANKL 陽性細胞の割合を調べた。

抗体投与により有意に破骨細胞、RANKL 陽性細胞の割合が減少した。



## (6) TLR4 陽性細胞の割合

TLR4 陽性細胞の割合は外傷 1 日後に有意に増加したが、抗 HMGB1 抗体投与により増加は見られなくなった。



## まとめ

今回の研究で、外傷性咬合付与により 1, 2 日後に根分岐部歯根膜組織に硝子様変性が認められた。またこの時、根間中隔頂部骨細胞のアポトーシスが認められた。その後、根間中隔に破骨細胞が増加し、骨破壊が進行した。RANKL, HMGB1, TLR4 (HMGB1 のレセプターの一つ) は外傷性咬合付与 1 日後より増加が確認された。抗 HMGB1 抗体により HMGB1 の働きを抑制すると RANKL, TLR4, 破骨細胞の出現が減少した。これらの結果から外傷性咬合によって細胞から放出された HMGB1 が RANKL の産生を促進して、破骨細胞形成を促進し、骨破壊を起こしている可能性が示された。また、この HMGB1 が TLR4 発現を増加させることで、細胞が HMGB1 の刺激を受けやすくなっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴飼 孝、小山美香、山下恭徳、吉村篤利
2. 発表標題 マウス臼歯への外傷性咬合による骨吸収におけるHMGB1の関与
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山 美香、鶴飼 孝、中村 弘隆、山下 恭徳、小林 弘樹、樋口 賀奈子、白石 千秋、吉村 篤利、原 宜興
2. 発表標題 アポトーシスが咬合性外傷における骨吸収におよぼす影響に関する病理組織学的研究.
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会2017年度春季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山 美香、鶴飼 孝、山下 恭徳、小林 弘樹、吉村 篤利、原 宜興
2. 発表標題 外傷性咬合による骨吸収へのRANKLとHMGB-1の関与-病理組織学的研究-
3. 学会等名 平成29年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴飼 孝
2. 発表標題 歯周炎における骨吸収の制御にむけて
3. 学会等名 第60回日本歯周病学会春季学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

現在、Journal of Periodontal Research に投稿し、3回目のリバイス中である。

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
研究分担者	原 宜興  (HARA Yoshitaka)  (60159100)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授    (17301)	