

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17072

研究課題名（和文）外傷性咬合による骨吸収への静止期破骨細胞前駆細胞の関与と血管内皮増殖因子の影響

研究課題名（英文）Involvement of vascular endothelial cell growth factor in mouse alveolar bone resorption by traumatic occlusion

研究代表者

山下 恭徳 (Yamashita, Yasunori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教

研究者番号：10782568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：生体内には静止期にとどまる破骨細胞前駆細胞（QOP）が循環しており、歯槽骨吸収においては速やかに局所に集積し、破骨細胞へ分化することが報告されている。外傷性咬合による歯槽骨吸収では比較的短期間で破骨細胞が出現してくることから、歯周組織以外の組織で既にRANKL前刺激を受けたQOPが関与しているのではないかと考えられる。本研究の目的は、外傷性咬合による歯槽骨吸収におけるQOPの関与を検討することである。マウス咬合性外傷における歯槽骨吸収には、QOPが関与していることが明らかとなった。QOPは、外傷性咬合付与時に局所に集積し、急速な骨吸収に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は殆どの成人が罹患する可能性がある慢性炎症性疾患である。本研究では、この歯周病の増悪因子の一つである咬合性外傷のメカニズムの一端として、破骨細胞分化因子であるRANKL刺激を受けている破骨細胞前駆細胞が既に生体内で循環していることで、未分化の単球マクロファージ系の前駆細胞よりも破骨細胞への分化が迅速に進むことを示した。外傷付与後、根分岐部歯根膜組織は硝子様変性し、分岐部中隔は穿下性の骨吸収が起こる。出される血管内皮増殖因子により、破骨細胞の形成が促進されることが示された。歯周病の増悪因子による組織破壊のメカニズムの一端が示されることで、歯周病治療のみならず学術的社会的意義を示せた。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that osteoclast progenitor cells (QOP), which remain in the quiescent phase, circulate in the body, rapidly accumulate locally during alveolar bone resorption, and differentiate into osteoclasts. Since osteoclasts appear in a relatively short period of time during alveolar bone resorption due to traumatic occlusion, QOP that has already undergone RANKL prestimulation in tissues other than periodontal tissues may be involved. The purpose of this study was to investigate the involvement of QOP in alveolar bone resorption due to traumatic occlusion. QOP was found to be involved in alveolar bone resorption in mice with occlusal trauma. It was suggested that QOP accumulated locally during traumatic occlusion and was involved in rapid bone resorption.

研究分野：歯周病

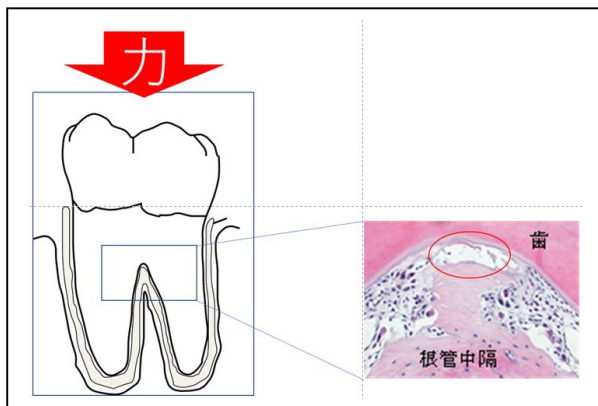
キーワード：歯周病 咬合性外傷 破骨細胞 破骨細胞前駆細胞

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、プラークに由来する細菌による骨吸収を引き起こし、歯を失う原因の一つである。歯周病の増悪因子の一つに咬合性外傷がある。咬合性外傷の原因である、外傷性咬合は、短期間で重度の歯槽骨破壊を引き起こす。2017年のワールドワークショップで様々な文献を元にしたナラティブレビューにおいて、咬合性外傷の影響を受けた歯は、隣接する歯周組織内の圧迫側に血管新生と歯根膜の壊死出血、骨吸収が起こるとされている。(Fan J, et al. J Clin Periodontol. 2018.)

実験的には、正常なラットやマウス臼歯に過大な咬合圧をかけると、特に臼歯の根間中隔において急速な骨吸収の進行が認められる。根分岐部歯根膜組織が硝子変性し、その後、根管中隔に穿下性の骨吸収が起こることを以前報告している。(Y Yamashita et al. 日本歯科保存学会 2017.) 根間中隔で骨吸収が起こりやすい理由が解明できれば、外傷性咬合による歯槽骨破壊の効果的な治療法開発に役立つのではないだろうかと考えられた。

骨表面や血液中には短期間で破骨細胞への分化が進みやすい破骨細胞前駆細胞 (Cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors: QOP) が存在することが報告されている。(N Takahashi et al. Adv Exp Med Biol. 2010.) 報告者は以前報告した外傷性咬合付与時の組織切片において、破壊された骨周囲に形成された破骨細胞が新生した血管腔周囲に多数存在することを報告した。(Y Yamashita et al. 11<sup>th</sup> APSP. 2015.) この血管増生に関与するとされる、血管内皮増殖因子(以下、VEGF) は、無酸素領域で血管内皮細胞、単球、マクロファージ、骨芽細胞により産生されることが知られている。この VEGF は、破骨細胞形成に必要とされる M-CSF 欠損による大理石病を呈する op/op マウスに投与すると破骨細胞が出現し、大理石病は治癒することが示され、破骨細胞分化誘導に関与することが示されている。一方、この VEGF は骨芽細胞に作用し、骨形成を促進するという報告もある。つまり、骨形成、吸収、いわゆる骨のリモデリングに関与するとされているが、破骨細胞形成を促進に関しては、促進するという報告もあれば、関与はするが促進はしないという報告もあり、詳細は不明である。



そこで本研究では、外傷性咬合付与時の骨吸収における QOP と VEGF の役割について解析した。

### 2. 研究の目的

マウス臼歯へ外傷性咬合が付与された場合に根間中隔で形成される破骨細胞への QOP の関与と、QOP の骨吸収局所への遊走および破骨細胞への分化において VEGF が果たす役割を、検討し、これらを明らかにすることを目的とした。

報告者はこれまでの研究でラット歯牙に外傷性咬合を付与すると主に根分岐部において早期に骨吸収が起こったことに着目した。短期間で破骨細胞が出現することから QOP が関与しているのではないかと考えた。これまでに外傷性咬合による RANKL やサイトカインなどの骨吸収刺激因子の発現についての研究は見られるが、破骨細胞前駆細胞に焦点をあてて骨破壊のメカニズムを解明した研究は見られない。VEGF はこれまでに破骨細胞前駆細胞の遊走や破骨細胞の分化に関連することが示唆されているが、どの分化段階の破骨細胞前駆細胞に影響するのかは明らかにされていない。我々は、破骨細胞前駆細胞の分化段階の違いにより、VEGF による破骨細胞形成への影響が異なることを確認しており、QOP に対しても VEGF が走化性や分化に促進的に作用するのではないかと考えた。

### 3. 研究の方法

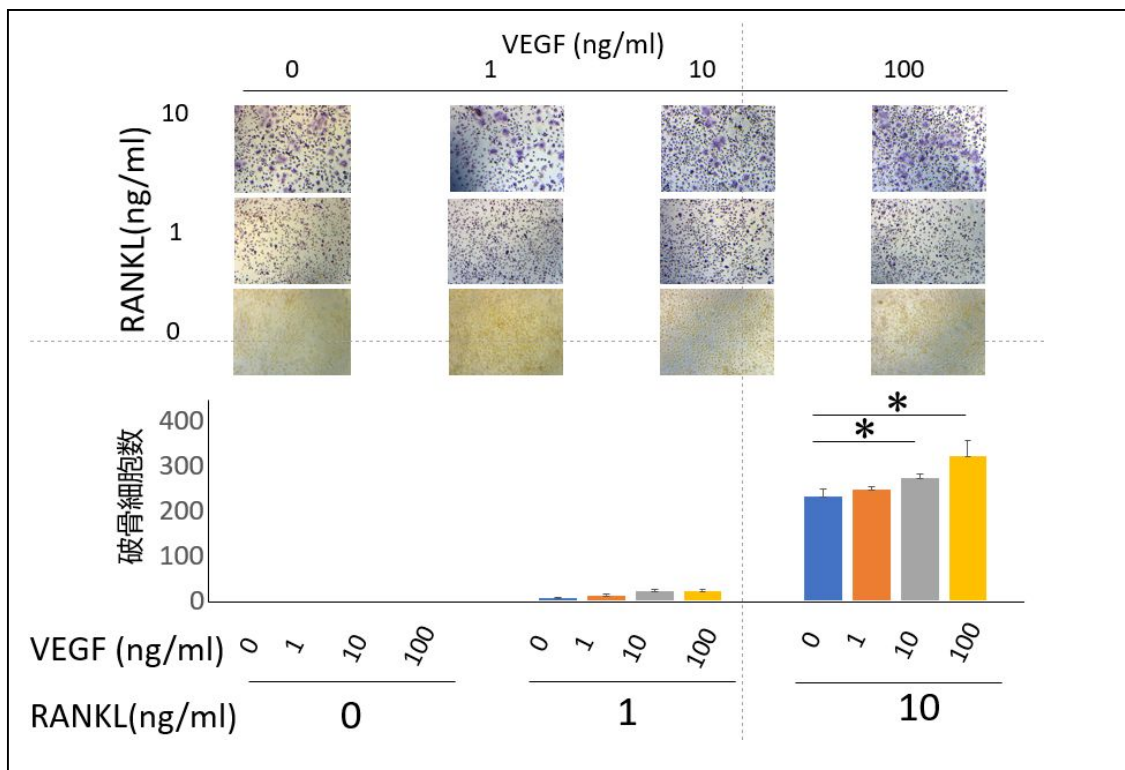
QOP は増殖能を持たないため、融合して破骨細胞に分化した破骨細胞前駆細胞の中で増殖していない細胞を QOP として検出する。QOP を検出するために用いる、プロモデオキシウリジン (BrdU) は DNA 前駆体の一つであるチミジンの類似物で、DNA 合成期の S 期に取り込まれる。静止期の細胞である QOP は BrdU を取り込まないことを利用して QOP の関与を検討する。

まず、破骨細胞系において、VEGF が破骨細胞形成を促進するかを確認した。次に、外傷性咬合による破骨細胞での QOP の関与を検討するために、8 週齢の CB-17 マウスに BrdU を投与し、上顎右側臼歯にステンレスワイヤー(厚さ 0.4mm, 長さ 1mm)を接着性レジンで装着し、過大な状態での外傷性咬合を付与した。そして 0, 1, 2, 3, 4, 5 日後に屠殺し、下顎左側第一大臼歯を摘出して根分岐部を観察するために 4 μm の厚さの組織切片を作製して、H.E. 染色ならびに破骨細胞のマーカーの一つである酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、破骨細胞

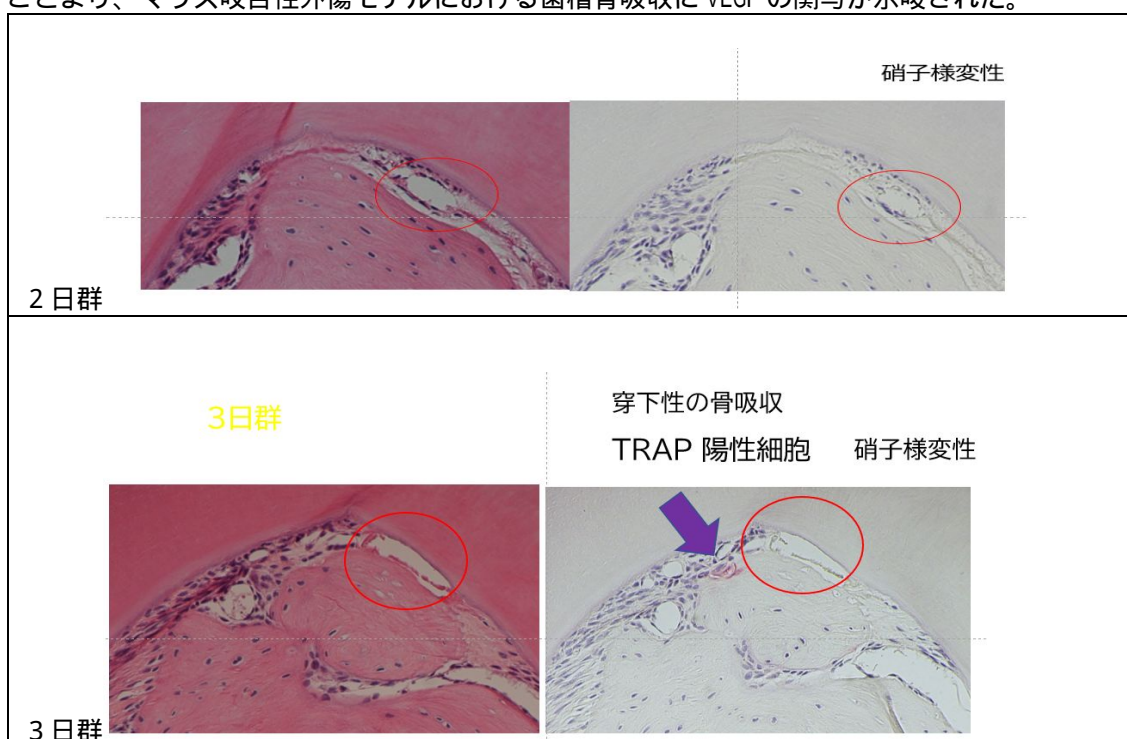
出現状態を病理組織学的に確認した。測定方法は、根分岐部から下方 250  $\mu\text{m}$  の範囲で、QOP のマーカーである RANK と BrdU、TRAP の三重蛍光免疫染色を行い、RANK で BrdU 陰性の QOP の分布を解析する。この時、破骨細胞において BrdU 陰性の核数の割合を算出して、破骨細胞分化時の QOP 融合の割合を検討した。

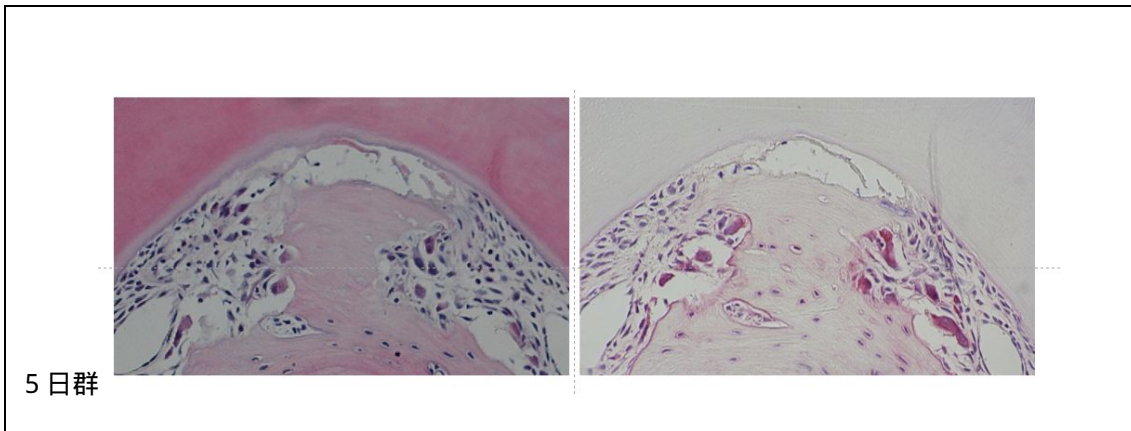
#### 4. 研究成果

破骨細胞系において、RANKL 10 ng/ml との VEGF の共刺激により、VEGF の濃度依存的に有意に破骨細胞形成は促進した。

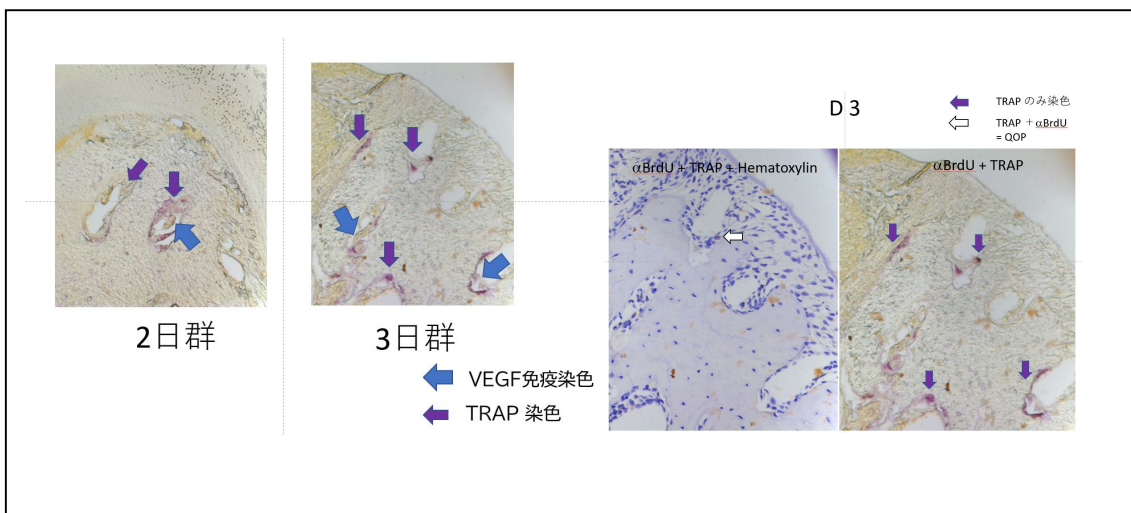
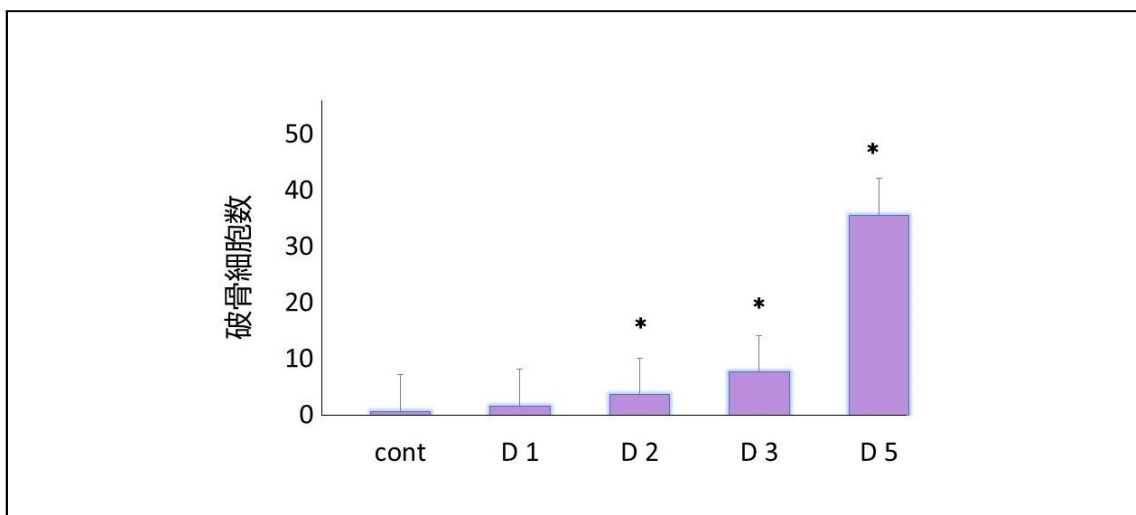


次にマウス第一臼歯に過大な外傷性咬合を加えると、2日目には根分岐部歯根膜組織が硝子様変性し、3日目には根管中隔に穿下性の骨吸収が起きた。外傷性咬合付与後、1日目、2日目に少数の TRAP 陽性細胞を認め、3日目、5日目には TRAP 陽性、VEGF 陽性の細胞を認めた。このことより、マウス咬合性外傷モデルにおける歯槽骨吸収に VEGF の関与が示唆された。





BrdU 投与群と非投与群に外傷性咬合を付与したマウスにおける組織切片を作製して、骨吸収状態を病理組織学的に、また、破骨細胞の核内の BrdU 陽性あるいは陰性を確認し、QOP の存在が早期の歯槽骨吸収に関与することを示した。



#### まとめ

今回の研究では、過大な外傷性咬合を付与したマウスでは、in vivo における M-CSF 存在下 RANKL 刺激による破骨細胞系より早期に吸収能を有する破骨細胞が QOP の存在と VEGF により形成されることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mae Megumi, Alam Mohammad Ibtehad, Yamashita Yasunori, Ozaki Yukio, Higuchi Kanako, Ziauddin S. M., Montenegro Raudales Jorge Luis, Sakai Eiko, Tsukuba Takayuki, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 The Role of Cytokines Produced via the NLRP3 Inflammasome in Mouse Macrophages Stimulated with Dental Calculus in Osteoclastogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12434 ~ 12434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oyama Mika, Ukai Takashi, Yamashita Yasunori, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 56
2. 論文標題 High mobility group box 1 released by traumatic occlusion accelerates bone resorption in the root furcation area in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 186 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ozaki Yukio, Kishimoto Takaaki, Yamashita Yasunori, Kaneko Takashi, Higuchi Kanako, Mae Megumi, Oohira Masayuki, Mohammad Alam Ibtehad, Yanagiguchi Kajiro, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 122
2. 論文標題 Expression of osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic cytokines differs in mouse gingiva injected with lipopolysaccharide, peptidoglycan, or both	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104990 ~ 104990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2020.104990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsuura Takashi, Mae Megumi, Ohira Masayuki, Yamashita Yasunori, Nakazono Ayako, Sugimoto Kouji, Yanagiguchi Kajiro, Yamada Shizuka	4. 巻 21
2. 論文標題 The efficacy of the novel zinc-containing desensitizer CAREDYNE Shield on dentin hypersensitivity: a study protocol for a pilot randomized controlled trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 464 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13063-020-04426-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi Kanako, SM Ziauddin, Yamashita Yasunori, Ozaki Yukio, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Initial periodontal treatment affects nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing protein 3 inflammasome priming in peripheral blood mononuclear cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104625 ~ 104625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.104625	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山下 恭徳
2. 発表標題 Role of quiescent osteoclast precursors in occlusal trauma in mice
3. 学会等名 アメリカ歯周病学会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 恭徳
2. 発表標題 咬合性外傷を伴う重度慢性歯周炎患者に対して包括的治療を行った一症例
3. 学会等名 令和元年度 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 2019年

1. 発表者名 山下 恭徳
2. 発表標題 ペプチドグリカン投与マウス歯槽骨面上の破骨細胞形成におけるIL-17の役割
3. 学会等名 2019年度日本歯科保存学会秋季学術大会 (第151回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 恭徳
2. 発表標題 歯石粒子と凍結乾燥歯周病原細菌のHSC-2口腔上皮細胞に対する細胞障害性の比較
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 恭徳
2. 発表標題 Effect of Initial Periodontal Therapy on Inflammasome Priming in PBMCs
3. 学会等名 国際歯科研究学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 恭徳
2. 発表標題 歯周基本治療が末梢血単核球におけるインフラマソームプライミング状態に及ぼす影響
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎 幸生, 山下 恭徳, 岸本 隆明, Ziauddin SM, 樋口 賀奈子, 金子 高士, 吉村 篤利
2. 発表標題 リボ多糖およびペプチドグリカン局所投与マウスにおける歯槽骨吸収に異なるサイトカインが関与する
3. 学会等名 平成30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 2018年

1. 発表者名 鶴飼 孝, 小山美香, 山下恭徳
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 HMGB-1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 樋口賀奈子, 山下恭徳, 尾崎幸生, 吉村篤利
2. 発表標題 コレステロール結晶はRAW-D細胞においてNLRP3インフラマソーム活性化とIL-1 産生を介して破骨細胞形成を促進する
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 尾崎幸生, 岸本隆明, 山下恭徳, ZIAUDDIN Sm, 樋口賀奈子, 金子高士, 吉村篤利
2. 発表標題 リポ多糖およびペプチドグリカン局所投与マウス歯槽骨面上の破骨細胞形成への炎症性および抗炎症性サイトカインの関与
3. 学会等名 第61回日本歯周病学会秋季学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------