

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592425

研究課題名(和文) 歯槽骨破壊の防止と動脈硬化抑制のための Wnt シグナル制御による新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic approach for the prevention of alveolar bone destruction and atherosclerosis through the regulation of Wnt signaling

研究代表者

長澤敏行 (NAGASAWA TOSHIYUKI)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：90262203

研究成果の概要(和文)：

破骨細胞分化因子(Receptor Activator of NF kappa B Ligand; RANKL)は破骨細胞形成を促し破骨細胞形成抑制因子(Osteoprotegerin:OPG)はそれを抑制するが、骨への影響だけでなくOPGの欠損は動脈硬化を引き起こすことが報告された。Wntシグナルは、細胞の分化・増殖を制御する分子であるが、Wntシグナルの活性化はOPG発現を上昇させRANKLを抑制することが知られている。本研究では研究期間内に歯周炎および動脈硬化巣におけるRANKL発現の上昇を確認し、RANKL発現が歯槽骨吸収や動脈硬化促進に関与する可能性、さらに歯周病原細菌が血管局所のRANKL発現に関与している可能性を検討すること、さらにWntシグナルを増強しOPGがRANKLよりも優位な状態を作るという新規治療を開発することを目的として研究を行った。本研究の結果、歯周炎組織ではOPGよりもRANKLが優位で歯槽骨吸収を亢進させており、腹部大動脈瘤の組織では、動脈硬化が見られる病変部組織から歯周病原細菌が検出され、また細菌が検出された組織ではRANKL発現の亢進が認められたのに対し、健康な血管からはRANKL発現の亢進は見られないことが明らかとなった。また歯周病原細菌のLPSは血管平滑筋細胞のRANKL発現を亢進させ、またRANKLは血管平滑筋細胞におけるMMPの発現を上昇させた。これらの結果から骨吸収にRANKL発現の上昇が関与するだけでなく、さらにRANKL発現の上昇は血管における腹部大動脈瘤と関わる可能性も示唆された。次に培養細胞を用いてWntシグナルの変動、OPG発現の変化などに対する薬物の効果を検討した。WntシグナルをsiRNAで抑制するとOPG発現の低下が見られるのに対し、食用として用いられる安全性の高いクルクミンによって歯肉線維芽細胞や歯根膜細胞等の様々な細胞でOPG発現は上昇し、RANKLを抑制できることが明らかとなった。これらのことからWntシグナルのコントロールによって歯周炎や腹部大動脈瘤を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Receptor activator of NF kappa B Ligand (RANKL) stimulates osteoclast differentiation, and osteoprotegerin (OPG) suppress the osteoclastogenesis. The OPG deficient mice showed severe osteopetrosis and atherosclerosis. The WNT signaling regulates cell differentiation and/or proliferation, and the activation of WNT signaling stimulates OPG expression. The purpose of this study was to examine the RANKL and OPG expression in periodontitis and atherosclerosis lesions, and evaluate the roles of periodontal infection on atherosclerosis. In addition, effects of Wnt signaling on OPG expression were also examined for the possible therapeutic approach against periodontitis and atherosclerosis. Present study showed that RANKL expression was augmented in periodontitis tissue and abdominal aortic aneurisms (AAA) tissue. In AAA tissues, periodontopathic bacteria were frequently detected, but they were completely absent in the healthy tissues. LPS from periodontopathic bacteria stimulated RANKL expression and RANKL augment MMP expression in vascular smooth muscle cells in vitro. These results suggest that RANKL expression augmented not only osteoclastogenesis, but also AAA lesion. Suppression of Wnt signaling by siRNA suppressed OPG expression in various cells. Curcumin augmented OPG

expression in various cell types, suggesting that they might suppress RANKL expression in periodontitis and AAA. These results suggested that regulation of Wnt signaling might suppress periodontitis and AAA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：RANKL, OPG, Wnt, beta-catenin, 抗リン脂質抗体症候群,

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞分化因子(Receptor Activator of NF kappa B Ligand; RANKL)は破骨細胞形成を促し破骨細胞形成抑制因子(Osteoprotegerin:OPG)はそれを抑制する。ノックアウトマウスの結果から、OPGの欠損は骨への影響だけでなく動脈硬化を引き起こすことが報告されていた。Wntシグナルは、細胞の分化・増殖を制御する分子であるが、Wntシグナルの活性化はOPG発現を上昇させRANKLを抑制することが基礎研究領域で報告された。本研究を開始する際に、我々は歯周炎にRANKL発現が関わること、また歯周炎が様々な全身疾患と関連していることについて報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では研究期間内に歯周炎および動脈硬化巣におけるRANKL発現の上昇を確認し、RANKL発現が歯槽骨吸収や動脈硬化促進に関与する可能性、さらに歯周病原細菌が血管局所のRANKL発現に関与している可能性を検討すること、さらにWntシグナルを増強しOPGがRANKLよりも優位な状態を作るという新規治療を開発することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 歯周炎と全身疾患との関わりを明らかにするために歯周炎患者における全身の状態を調べると共に、糖尿病やパージャージャー病などの疾患における歯周病の病態についても検討した。

(2) 動脈硬化巣におけるRANKL発現の上昇を確認し、RANKL発現が歯槽骨吸収や動脈硬化促進に関与する可能性、さらに歯周病原細菌が血管局所のRANKL発現に関与して

いる可能性を検討するため、腹部大動脈瘤の手術時に得られた組織を用いて歯周病原細菌の有無、OPGおよびRANKL発現を検討した。

(3) Wntシグナルを増強しOPGがRANKLよりも優位な状態を作るという新規治療を開発することを目的として歯周病原細菌が歯肉線維芽細胞や歯根膜細胞、血管平滑筋細胞のRANKLおよびOPG発現に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 歯周炎は動脈硬化、糖尿病やパージャージャー病と関わりが認められた。動脈硬化症は歯周病患者で優位に重度であった。歯周治療によって糖尿病の血糖コントロールの改善が認められた。パージャージャー病患者では歯周病の病態が重度であり、抗リン脂質抗体の上昇が認められた。歯周病原細菌の感染によってbIIIGPIに対する自己抗体が産生されることが明らかとなり、このことがパージャージャー病における血栓形成と関わりがあることが示唆された。

(2) 歯周炎組織ではOPGよりもRANKLが優位で歯槽骨吸収を亢進させており、腹部大動脈瘤の組織では、動脈硬化が見られる病変部組織から歯周病原細菌が検出され、また細菌が検出された組織ではRANKL発現の亢進が認められたのに対し、健康な血管からはRANKL発現の亢進は見られないことが明らかとなった。

(3) 歯周病原細菌のLPSは血管平滑筋細胞のRANKL発現を亢進させ、またRANKLは血管平滑筋細胞におけるMMPの発現を上昇させた。これらの結果から骨吸収にRANKL発現の上昇が関与するだけでなく、さらにRANKL発現の上昇は血管における腹部大動

脈瘤と関わる可能性も示唆された。次に培養細胞を用いて Wnt シグナルの変動、OPG 発現の変化などに対する薬物の効果を検討した。Wnt シグナルを siRNA で抑制すると OPG 発現の低下が見られるのに対し、食用として用いられる安全性の高いクルクミンによって歯肉線維芽細胞や歯根膜細胞等の様々な細胞で OPG 発現は上昇し、RANKL を抑制できることが明らかとなった。これらのことから Wnt シグナルのコントロールによって歯周炎や腹部大動脈瘤を抑制できる可能性が示唆された。

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 20 件)

1. Chen YW, Umeda M, Nagasawa T, Takeuchi Y, Huang Y, Inoue Y, Iwai T, Izumi Y, Ishikawa I. Periodontitis May Increase the Risk of Peripheral Arterial Disease. Eur J Vasc Endovasc Surg. 査読有, 2008 35(2): 153-8
2. Wang DQ, Nagasawa T, Chen YI, Ushida Y, Kobayashi I, Takeuchi Y, Umeda M, Izumi Y. Molecular mimicry of Aggregatibacter actinomycetemcomitans with beta-2 glycoprotein I. Oral Microbiol. Immunol. 査読有, 2008,23(5): 401-5
3. Ushida Y, Koshy G, Kawashima Y, Kiji M, Umeda M, Nitta H, Nagasawa T, Ishikawa I, Izumi Y. Changes in serum interleukin-6, C-reactive protein and thrombomodulin levels under ultrasonic debridement. J Clin Periodontology 査読有, 2008,35(11): 969-975
4. Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Uchimura I, Izumiyama H, Inagaki K, Kikuchi T, Noguchi T, Kanazawa M, Matsuo A, Chiba H, Nagakamura N, Kanamura N, Inoue S, Ishikawa I, Izumi Y Multi-center intervention study on glycohemoglobin (HbA1c) and serum, high-sensitivity CRP (hs-CRP) after local anti-infectious periodontal treatment in type 2 diabetic patients with periodontal disease. Diabetes Res Clin Prac 査読有, 2009 83(3): 308-15
5. Suda T, Nagasawa T, Wara-Aswapati N, Kobayashi H, Iwasaki K, Yashiro R, Hormdee D, Nitta H, Ishikawa I, Izumi Y. Regulatory roles of b-catenin and AP-1 on OPG production in IL-1a-stimulated periodontal ligament cells Oral Microbiol. Immunol. 査読有, 2009,24(5): 384-9
6. Chen Y-W, Nagasawa T, Wara-Aswapati N, Ushida Y, Wang D, Takeuchi Y, Kobayashi H, Umeda M, Inoue Y, Iwai T, Ishikawa I, Izumi Y Association between periodontitis and anti-cardiolipin antibodies in Buerger disease. J Clin Periodontol 査読有, 2009, 36(10): 830-5
7. Ishikawa I, Iwata T, Washio K, Okano T, Nagasawa T, Iwasaki K, Ando T. Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration. Periodontology2000, 査読有, 51, 220-238 (2009)
8. Izumi Y, Nagasawa T, Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y, Yashiro R, Hormdee D, Suda T, Ushida Y, Wara-aswapati N. Periodontitis and cardiovascular diseases: The link and relevant mechanisms Japanese Dental Science Review, 査読有, 2009, 45, 98-108
9. 長澤敏行、古市保志 歯周病原細菌と beta-2 glycoprotein I の分子相同性による血栓形成促進の可能性 北海道医療

- 大学歯学雑誌 28 (2), 13 (2009)
10. Nagasawa T, Noda M, Katagiri S, Takaichi M, Takahashi Y, Wara-Aswapati N, Kobayashi H, Ohara S, Kawaguchi Y, Tagami T, Furuichi Y & Izumi Y (2010) Relationship between Periodontitis and Diabetes — Importance of a Clinical Study to Prove the Vicious Cycle. *Internal Medicine*. 査読有, 49(10):881-5
 11. Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Izumi Y, Kanazawa M, Matsuo A, Chiba H, Miyazaki S, Miyauchi T, Nakamura N, Kanamura N, Ando Y, Hanada N, Inoue S High Prevalence of periodontitis in non-elderly obese Japanese adults *Obesity Research & Clinical Practice* 査読有, (2010) 4(4): e301-306
 12. 長澤敏行、古市保志 糖尿病と歯周病の関係 微研ジャーナル友 33 (2) 3-8, (2010)
 13. 長澤敏行、和泉雄一、古市保志 マクロファージによる歯周炎制御 炎症と免疫 18 (4) 325-331 (2010)
 14. 長澤敏行、辻 昌宏、古市保志 歯周病と糖尿病のオーダーメイド治療を目指して 北海道医療大学歯学雑誌 29 (1) 67-72 (2010)
 15. 安彦義裕、齋藤正人、長澤敏行、永易裕樹、古市保志、辻 昌宏 糖尿病における口腔粘膜の創傷治癒遅延のメカニズムについて 北海道医療大学歯学雑誌 29 (1) 25-32 (2010)
 16. 長澤敏行、辻 昌宏、古市保志 遺伝学的な見地からみた歯周病と糖尿病 月刊糖尿病 2(13) 43-52 (2010)
 17. 金澤真雄、長澤敏行、片桐さやか、新田浩、井上修二 糖尿病治療による歯周病への効果 月刊糖尿病 2 (13) 96-100 (2010)
 18. 井上修二, 金澤真雄, 片桐さやか, 新田浩, 長澤敏行. 生活習慣病. *Progress in Medicine* 特集 医科と歯科のクロストーク 第30巻第11号: 27-31, 2010.
 19. 片桐さやか、長澤敏行 歯科と医科のクロストーク *Periodontal Medicine Prog Med* 第30巻第11号: 23-26, 2010.
 20. Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Izumi Y, Kanazawa M, Matsuo A, Chiba H, Miyazaki S, Miyauchi T, Nakamura N, Oseko F, Kanamura N, Ando Y, Hanada N, Inoue S. Reduced masticatory function in non-elderly obese Japanese adults. *Obesity Research and Clinical Practice* 査読有, (in press) 2011.
- [学会発表] (計 21 件)
1. 長澤敏行, 王 冬青, 陳イモン, 牛田由佳, 竹内康雄, 小林宏明, 須田智也, 梅田 誠, 和泉雄一: b-2 glycoprotein I と相同性を有する歯周病原細菌由来ペプチドに対する歯周炎患者の抗体反応 2008. 第51回春季日本歯周病学会 (2008.4.25-26, 大宮ソニックシティ)
 2. 大西英知, 荒川真一, 長澤敏行, 小林宏明, 竹内康雄, 水谷幸嗣, 矢代麗子, 牛田由佳, 甘 美和, 横田 悟, 渡辺 香, 北川原 聡, 中島啓子, 関西一史, 片桐さやか, 梅田 誠, 中島琢磨, 和泉雄一: 歯周炎患者と健常者における歯肉溝滲出液中の抗 FDF 抗体価の比較 2008. 第51回秋季日本歯周病学会 (2008.10.18-19, 四日市文化会館)
 3. 牛田由佳, Geena Koshy, 川嶋庸子, 喜地 誠, 梅田 誠, 新田 浩, 長澤敏行, 石川烈, 和泉雄一: 超音波スクレーラーによる full-mouth debridement 後の血清 IL-6, CRP および可溶性トロンボモジュリンの変動 2008.

- 第51回秋季日本歯周病学会
(2008.10.18-19,四日市文化会館)
4. 北川原 聡, 長澤敏行, 小林宏明, 竹内康雄, 水谷幸嗣, 矢代麗子, 牛田由佳, 渡辺 香, 横田 悟, 中島啓子, 大西英知, 関西一史, 小柳達郎, 和泉雄一. 唾液中の抗菌ペプチド LL-37 と歯周炎の病態との関連性. 第 52 回春期日本歯周病学会、 2009 年 5 月 (岡山)
 5. 竹内康雄, 坂東由記子, 長澤敏行, 南原弘美, 小林宏明, 和泉雄一. 次亜塩素酸電解水の抗菌作用と細胞毒性の検討 第 130 回春期日本歯科保存学会、 2009 年 6 月 11-12 日 (札幌コンベンションセンターSORA)
 6. 片桐さやか, 新田 浩, 長沢敏行, 稲垣幸司, 黒須康成, 川瀬仁史, 野口俊英, 石川 烈, 和泉雄一. 歯周炎に罹患した 2 型糖尿病患者における歯周治療および糖尿病治療による多施設介入研究 第 130 回春期日本歯科保存学会、 2009 年 6 月 11-12 日 (札幌札幌コンベンションセンター SORA)
 7. 和田 真由子, 片桐 さやか, 新田 浩, 長澤敏行, 小林 宏明, 竹内 康雄, Bharti Pariksha, 谷口 陽一, 南原 弘美, 高松秀行, 和泉 雄一 2 型糖尿病患者に対する歯周治療の影響 第 131 回秋期日本歯科保存学会、 2009 年 10 月 29-30 仙台国際センター (仙台)
 8. 上興那原朝秀, 日高竜宏, 白井 要, 門 貴司, 賀来 亨, 長澤敏行, 古市保志 FGF-2 および BMP-2 がヒト歯根膜細胞群による組織再生に与える影響 第 52 回秋期日本歯周病学会、 2009 年 10 月 10-11 日 宮崎観光ホテル (宮崎)
 9. 高松 秀行, 片桐 さやか, 新田 浩, 長澤敏行, 牛田由香, 小林 宏明, 小柳達郎, 鈴木允文, 高橋 充, 谷口 陽一, 寺地真由, 南原 弘美, 早雲彩絵, 姫野彰子, 和田真由子, 和泉 雄一: 2 型糖尿病患者の歯周基本治療における HbA1c および歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価への影響 第 52 回秋期日本歯周病学会、 2009 年 10 月 10-11 日 宮崎観光ホテル (宮崎)
 10. Yashiro R, Wara-aswapati N, Nagasawa T, Nanbara H, Bando Y, Kobayashi H, Izumi Y Modulation of Wnt5a expression by periodontopathic bacteria American Academy of Periodontology 95th Annual meeting, Sep13-15, 2009 Boston MA
 11. 上興那原朝秀, 日高竜宏, 白井 要, 門 貴司, 賀来 亨, 村田 勝, 長澤敏行, 古市保志 FGF-2 および BMP-2 がヒト歯根膜細胞群による組織再生に与える影響 北海道医療大学歯学会第 28 回学術大会、 2010 年 3 月 6 日
 12. 衣笠裕紀, 白井 要, 加藤幸紀, 森 真理, 長澤敏行, 古市保志 歯周治療が糖尿病患者の血糖コントロールに与える影響 北海道医療大学歯学会第 28 回学術大会、 2010 年 3 月 6 日
 13. 小林宏明, 長澤敏行, 竹内康雄, 渡辺香, 北川原 聡, 藤川佳奈, 若松美江, 大西英和, 小柳達郎, 鈴木允文, 谷口陽一, 南原宏美, 早雲彩絵, 姫野彰子, 高橋 充, 高松秀行, 和田真由子, 柳 憲一郎, 山井雅文, 和泉雄一 ヒアルロン酸配合チューインガムによる歯肉炎改善効果に関する研究 第 53 回春季日本歯周病学会 2010 年 5 月 14-15 日、 盛岡市民文化ホール、いわて県民情報交流センター (アイーナ)
 14. 上興那原朝秀, 日高竜宏, 白井 要, 門 貴司, 賀来 亨, 長澤敏行, 古市保志 FGF-2 および BMP-2 がヒト歯根膜細胞群による組織再生に与える影響の個体差

- 第 53 回春季日本歯周病学会 2010 年 5 月 14-15 日、盛岡市民文化ホール、いわて県民情報交流センター (アイーナ)
15. 日高竜宏, 石崎 明, 長澤敏行, 門 貴司, 白井 要, 古市保志 FGF-2 が歯根膜細胞群中の STRO-1+/CD146+細胞に与える影響 第 53 回春季日本歯周病学会 2010 年 5 月 14-15 日、盛岡市民文化ホール、いわて県民情報交流センター (アイーナ)
16. 中塚侑子, 湯本泰弘, 植原 治, 加藤幸紀, 長澤敏行, 中澤 太, 古市保志 ナタマメエキスの抗菌効果と口腔上皮細胞への傷害性 第 53 回秋季日本歯周病学会 サポートホール高松 かがわ国際会議場 2010 年 9 月 18-19 日
17. 森 真理, 加藤幸紀, 栗倉あずさ, 日高竜宏, 門 貴司, 長澤敏行, 古市保志 切迫早産妊婦に対する歯科予防処置の効果 第 53 回秋季日本歯周病学会 サポートホール高松 かがわ国際会議場 2010 年 9 月 18-19 日
18. Ueyonahara T, Hidaka T, Shirai K, Kado T, Kaku T, Nagasawa T, Furuichi Y Effects of FGF-2 and BMP-2 on PDL derived cells American Academy of Periodontology 96th Annual meeting, Oct30-Nov2, 2010 Hawaii
19. Barti P, Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Kobayashi H, Izumi Y. Periodontal treatment increases serum adiponectin level in type2 diabetes patients American Academy of Periodontology 96th Annual meeting, Oct30-Nov2, 2010 Hawaii
20. Nagasawa S, Nagasawa T Regenerative therapy in severe periodontitis associated with orthodontic treatment American Academy of Periodontology 96th Annual

meeting, Oct30-Nov2, 2010 Hawaii

21. 長澤敏行, 清水伸太郎, 門 貴司, 加藤幸紀, 森真理, 古市保志 北海道医療大学 歯科内科クリニックで分離された *A.actinomycetemcomitans* 菌における leukotoxin 遺伝子の特徴 北海道医療大学歯学会第 29 回学術大会 2011 年 3 月 5 日 北海道医療大学札幌サテライトキャンパス

[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
 長澤敏行 (NAGASAWA TOSHIYUKI)
 研究者番号 : 90262203
- (2) 研究分担者
 小林宏明 (KOBAYASHI HIROAKI)
 研究者番号 : 50396967
- 竹内康雄 (TAKEUCHI YASUO)
 研究者番号 : 60396968
- (3) 連携研究者
 ()
 研究者番号 :