

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791623
 研究課題名（和文）骨吸収関連遺伝子改変マウスを用いた歯周炎モデルの解析
 及び治療薬の開発
 研究課題名（英文）Using bone resorption-related gene-modified mice, analysis of
 periodontitis model and development of drugs
 研究代表者
 小出 雅則（KOIDE MASANORI）
 松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
 研究者番号：10367617

研究成果の概要（和文）：骨吸収遺伝子であるRANKLの強発現マウス（RANKL-TG）とOPGの遺伝子欠損マウス（OPG-KO）における歯槽骨吸収量を評価した。RANKL-TGとOPG-KOは、長管骨と同様に歯槽骨量を低下させた。その低下量は、OPG-KOの方が多かった。更に、ヒトと同様にCEJ-ABCの距離を測定して、歯槽骨の喪失を評価した。その結果、OPG-KOでは、wild-typeマウスに対して約2倍の歯槽骨の喪失が観察された。一方、RANKL-TGは歯槽骨の喪失は認められなかった。この結果より、OPG量の低下が歯槽骨の喪失に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed of alveolar bones of RANKL-transgenic mice (RANKL-Tg), OPG-deficient mice (OPG-KO) and wild type littermates (WT). The alveolar bones were analyzed in wild-type (WT), RANKL-Tg and OPG-KO mice from 8-week-old to 12-week-old. To estimate alveolar bone loss, the distance from the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest was measured by micro-CT. ABL was admitted by neither WT mice nor RANKL-Tg mice. As expected, alveolar bone loss in 12-weeks-old OPG-KO mice was about 2-fold higher than the others. These results suggest that deficiency of OPG is more effective than enhancement of RANKL production in bone resorption and alveolar bone loss.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病、歯周炎モデル、歯槽骨吸収、RANKL、OPG

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は細菌感染による慢性炎症疾患である。しかし、細菌や宿主などに関わる多

様な因子が関与しているため、病態の解明は部分的でその関連性は明確でない。この為、現在の治療方法は歯石除去や抗生剤の投与

等の外的因子の除去療法が中心である。そこで、歯周病の治療を進歩させるために生体側の病態の解明が必須である。従って、実験的歯周炎モデルの確立は、歯周炎の発症機構の解明に有効である。近年、細菌感染によるラット歯周炎モデルが報告されている¹⁾。このモデルでは、ヒトと同様に歯槽骨頂が吸収している。しかし、マウスに応用している報告は少ない。

(2) 遺伝子改変動物を用いた生体レベルで分子の機能が急速に解明されつつある。しかし、ヒト歯周炎（歯槽骨頂の減少）を再現するマウス歯周炎モデルが確立していないため、歯周炎に関しては十分な解析が進んでいない。我々のグループは、これまで骨代謝関連遺伝子の改変マウスを用いて骨代謝機構の報告をしてきた¹⁾。申請者も sRANKL 遺伝子の強発現マウスを用いて、薬の骨吸収抑制作用を検討している²⁾。骨吸収関連遺伝子改変マウスを用いて歯周炎モデルを作製すると、歯周炎に対する骨吸収関連遺伝子の影響を生体レベルで明らかにできると期待される。上記の骨吸収関連遺伝子として RANKL（破骨細胞分化因子）と OPG（骨吸収抑制因子）をとり上げる。RANKL と OPG のバランスが負に傾くため骨粗鬆症などの骨吸収性疾患は引き起こされる。ヒト歯周炎の歯周ポケットから採取された歯肉溝浸出液中に RANKL と OPG が検出されるが、重症度と必ずしも相関していない³⁾。これら遺伝子の制御により引き起こされる骨吸収性疾患が歯周炎に及ぼす影響を評価することは、歯周炎と骨吸収性疾患の関連性の解明に重要である。

(3) 炎症性骨吸収の評価は、LPS の頭蓋骨への投与モデルにより行われている。申請者は、歯周炎による骨吸収抑制薬として、2-aminoethanesulphonic acid や破骨細胞抑制因子 (OIP-1) およびフェニトイン (DPH) の骨吸収抑制作用を解析してきた。しかし、歯周炎における細菌感染による炎症性骨吸収に対する DPH の効果は未解明である。そこで、歯周炎モデルの確立は、骨吸収のみならず歯周炎に対する治療薬の総合評価を可能にする。

(参考文献) 1) Yamamoto Y. et al. *Endocrinology* 147:3366-3374, 2006 2) 小出 雅則 他. *In vivo* で局所骨吸収をフェニトイン (DPH) は抑制する. 第 25 回日本骨代謝学会学術集会 (平成 19 年 7 月 19 日) 3) Mogi M. et al. *J. Dent. Res.* 83:166-169, 2004

2. 研究の目的

(1) 歯周炎モデルマウスを確立する。

(2) 骨吸収関連の遺伝子改変マウスを用いて歯周炎モデルを作製し、歯周炎に対する骨吸収関連遺伝子の役割を生体レベルで解析する。

(3) 歯周炎モデルに歯周治療薬を投与して、薬の効果を評価することである。以上の解析は、病態の解明及び治療法を飛躍的に進歩させると考えられる。

3. 研究の方法

(1) マウス歯周炎モデルを確立する。

ラット歯周炎モデルで使用されている歯周病関連細菌である *P. g.* 菌の口腔への接種により、マウスでの歯周炎の惹起を評価する。評価項目は、ヒトと同様にセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を歯槽骨吸収量として測定する。さらに、歯槽骨および脛骨の骨量を測定する。現在、C57BL/6 マウスは歯槽骨吸収が起こりにくいことが報告されており、系統の異なるマウスで比較を行う。

(2) 歯周炎モデルを応用して歯槽骨吸収及び歯周組織に対する骨吸収抑制薬の効果を検討する。

歯周炎に対する効果を検討するため、歯周炎モデルに骨吸収の抑制薬として研究してきたフェニトインや 2-aminoethanesulphonic acid を口蓋歯肉部もしくは腹腔へ投与する。歯槽骨吸収量を測定し検討する。歯槽骨の組織切片に TRAP と F4/80 染色を行う。破骨細胞と炎症性細胞を計測し検討する。歯肉結合組織における炎症及び骨吸収関連の遺伝子発現を検討する。歯槽骨と脛骨の海面骨量の規格部位を測定し検討する。以上より、歯槽骨を含む歯周炎に対する総合的な評価を行う。これらの評価により、骨吸収抑制薬を臨床応用に近づけることが出来る。

(3) RANKL 遺伝子強発現および OPG 遺伝子欠損マウスに歯周炎モデルを応用して歯槽骨吸収に及ぼす作用を検討する。OPG 遺伝子欠損マウスに歯周炎モデルを応用して歯槽骨吸収への作用を検討する。

骨吸収遺伝子である RANKL と OPG の遺伝子改変マウスにおける歯周炎の進行程度を評価する。破骨細胞分化因子の RANKL 遺伝子を強発現させたマウスは、著しい骨吸収亢進を示す。

A) RANKL 遺伝子強発現マウスに歯周炎モデルを応用して歯槽骨吸収に及ぼす作用を検討する。歯肉結合組織の mRNA を抽出して、炎症及び骨吸収関連の遺伝子発現の変化を検討する。歯槽骨の組織切片に TRAP 染色を行う。破骨細胞を計測し検討する。

次に、RANKL のデコイレセプターである OPG 遺

伝子を欠損させると血清中のRANKL量が著しく上昇する。このマウスの歯槽骨は骨量の低下を示している。

B) OPG遺伝子欠損マウスに歯周炎モデルを応用して歯槽骨吸収への作用を検討する。歯肉結合組織からmRNAを抽出して、炎症及び骨吸収関連の遺伝子発現の変化を検討する。

4. 研究成果

(1) *P. g.* 菌の接種によるマウスの歯槽骨吸収モデルを確立した。

(2) 骨吸収遺伝子であるRANKLの強発現マウス(RANKL-TG)とOPGの遺伝子欠損マウス(OPG-KO)における歯槽骨吸収量を評価した。RANKL-TGとOPG-KOは、長管骨と同様に歯槽骨量を低下させた。その低下量は、OPG-KOの方が多かった。更に、ヒトと同様にCEJ-ABCの距離を測定して、歯槽骨の喪失を評価した。その結果、OPG-KOでは、wild-typeマウスに対して約2倍の歯槽骨の喪失が観察された。一方、RANKL-TGは歯槽骨の喪失は認められなかった。この結果より、OPG量の低下が歯槽骨の喪失に重要であることが明らかとなった。

(3) 骨吸収抑制薬であるビスホスホネートをOPG-KOに投与した。その結果、ビスホスホネート投与により、OPG-KOの歯槽骨喪失を防ぐことが出来た。以上の結果より、OPG-KOは歯周病の病態解明及び治療開発の重要なモデルである。

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6件)

① Koide M, Kinugawa S, Ninomiya T, Mizoguchi T, Yamashita T, Maeda K, Yasuda H, Kobayashi Y, Nakamura H, Takahashi N, Udagawa N (2009) Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling. *J Bone Miner Res* **24**: 1469-80. (査読有)

② Tomimori Y, Mori K, Koide M, Nakamichi Y, Ninomiya T, Udagawa N, Yasuda H (2009) Evaluation of pharmaceuticals with a novel fifty-hour animal model of bone loss. *J Bone Miner Res* **24**: 1194-205. (査読有)

③ Kawahara I, Koide M, Tadokoro O, Udagawa N, Nakamura H, Takahashi N, Ozawa H (2009) The relationship between calcium accumulation in osteoclast mitochondrial

granules and bone resorption. *Bone* **45**: 980-6. (査読有)

④ Shanmugarajan S, Kawanabe N, Koide M, Tsuruga E, Arroyo JE, Key LL Jr, Reddy SV (2009) IL-12 stimulates the osteoclast inhibitory peptide-1 (OIP-1/hSca) gene expression in CD4⁺ T cells. *J Cell Biochem* **10**: 104-11. (査読有)

⑤ Fujita S, Kikuchi T, Sobue T, Suzuki M, Koide M and Noguchi T (2008) Lipopolysaccharide mediated enhancement of bone metabolism in estrogen deficient mice. *J Periodontol* **79**: 2173-81. (査読有)

⑥ Suzuki M, Ishihara Y, Kamiya Y, Koide M, Fuma D, Fujita S, Matsumura Y, Suga T, Kamei H and Noguchi T (2008) Soluble Interleukin-1 receptor type II levels in gingival crevicular fluid in aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontol* **79**: 495-500. (査読有)

[学会発表] (計7件)

① 松本歯科大学学会例会 (第69回) 2009年11月14日 (長野) OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨吸収に対する骨吸収抑制剤の効果: 小出雅則, 二宮 禎, 中村美どり, 新井嘉則, 小林泰浩, 高橋直之, 宇田川信之

② 日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会 (第4回) 2009年10月25日 (長野) 骨吸収遺伝子がマウスの歯槽骨吸収に及ぼす影響: 小出雅則, 二宮 禎, 中村美どり, 新井 嘉則, 小林泰浩, 吉成伸夫, 高橋直之, 宇田川信之 (第4回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会プログラム抄録集: p15, 2009)

③ 歯科基礎医学会学術大会 (第51回) 2009年9月10日 (新潟) OPG 遺伝子欠損マウスにおいては著しい歯槽骨吸収を呈する: 小出雅則, 二宮 禎, 中村美どり, 新井嘉則, 小林泰浩, 高橋直之, 宇田川信之 (*J Oral Biosci* **51 Suppl**: p65, 2009)

④ 日本骨代謝学会学術集会 (第27回) 2009年7月23日 (大阪) 骨吸収関連遺伝子改変マウスにおける歯槽骨吸収及びビスホスフォネートの効果: 小出雅則, 二宮 禎, 中村美どり, 保田尚孝, 小林泰浩, 高橋直之, 宇田川信之 (第27回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p237, 2009)

⑤ 日本骨代謝学会学術集会 (第27回) 2009年7月23日 (大阪) RANKL 投与骨量減少症モデルマウスによる denosumab 様抗ヒト RANKL 中和抗体の迅速評価: 富盛賀也, 森かおる, 小出雅則, 中道裕子, 二宮 禎, 宇田川信之, 保田尚孝 (第27回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p207, 2009)

⑥ 日本骨代謝学会学術集会 (第26回) 2008

年 10 月 30 日 (大阪) Minocycline が樹状細胞と破骨細胞の分化に及ぼす影響：衣川さや，小出雅則，二宮 禎，溝口利英，川原一郎，小林泰浩，中村浩彰，保田尚孝，高橋直之，宇田川信之 (第 26 回日本骨代謝学会プログラム抄録集：p161, 2008)

⑦歯科基礎医学会学術大会 (第 50 回) 2008 年 9 月 24 日 (東京) Minocycline は破骨細胞の分化を抑制し，樹状細胞分化を促進する：衣川さや，小出雅則，二宮 禎，川原一郎，小林泰浩，中村浩彰，宇田川信之，高橋直之 (J Oral Biosci 50 Suppl:p119, 2008)

[図書] (計 2 件)

①Takahashi N, Koide M, Noguchi T, Suda T (2009) Chapter 23: Current paradigms of osteoblast-osteoclast interactions and bacterial pathogen-induced bone resorption. Periodontal Medicine and Systems Biology, 3rd Edition, Blackwell Publishing, Chichester, 379-94.

②小出雅則，宇田川信之 (2009) 炎症性骨吸収における破骨細胞. 腎と骨代謝 22 : 33-41.

[その他]

ホームページ等

<http://www.mdu.ac.jp/graduate/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 雅則 (KOIDE MASANORI)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：10367617

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし