

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：21592619

研究課題名（和文） 2型糖尿病が歯周組織における骨代謝マーカー発現に及ぼす影響とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文） Effects of type 2 diabetes mellitus on expression of marker of bone metabolism in periodontal tissue

研究代表者

荘司 佳奈子（SHOJI KANAKO）

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：90302158

研究成果の概要（和文）：非肥満型2型糖尿病は、ラットの実験的歯周炎において、歯周組織の炎症反応を増加させることにより、歯槽骨吸収が促進される可能性が示唆された。また、歯槽骨中の骨芽細胞前駆細胞の石灰化機能は減少させることが明らかとなった。

実験的歯周炎の治癒過程においては、喪失した歯槽骨の治癒が遅延される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Non-fatty type 2 Diabetes mellitus may affect the metabolism of alveolar bone, both bone resorption and formation, and enhance the inflammatory process to result in the severe destruction and delay of regenerating process in experimental periodontitis in rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：歯周免疫機能学

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、歯周病との関連が強く指摘されている疾患であり、糖尿病患者の95%をインシュリン非依存型の2型が占める。2型糖尿病患者のうち、欧米では多くが肥満を併発するのに対して、日本では非肥満型の占める割合が多いと報告されている。高齢化社会の進行にともない、糖尿病を併発する歯周病患者は増加しており、糖尿病が歯周病による歯槽骨吸収を加速させるため、最終的に歯を喪失し機能的にも審美的にも患者の

QOLを著しく低下させる結果を招く。そのため、歯槽骨の骨代謝状態の把握および歯槽骨の吸収のメカニズムの解明を通して骨吸収を助長させるリスクファクターについて理解することは極めて重要である。

1型糖尿病では、インシュリン欠乏による高血糖状態が炎症反応の増強や免疫能低下などを起こすため歯周組織の破壊が促進されるという考え方が確立されているのに対し、2型糖尿病ではインシュリン抵抗性が惹起されるため、骨組

織においてインシュリン受容体を持つ骨芽細胞が減少し、破骨細胞の増殖や分化も抑制されるという報告があるものの、欧米人に多い肥満型2型糖尿病に関する報告である。我が国の主流である2型糖尿病患者は非肥満型が多いため、これまで報告されている歯槽骨の骨代謝に与える影響は適用できないと考えられる。したがって、この点について解明の必要がある。

研究代表者らは、以前より歯周病と全身状態の関連性のより深い理解のためには、全身状態と歯槽骨の骨代謝の関連の理解が不可欠であると考え、一連の研究を行ってきた。例えば、下顎骨の骨密度はカルシウム摂取量により影響を受けること、カルシウム摂取の不足により、授乳が実験的歯周炎による歯槽骨を加速させることを報告した。さらに、研究代表者は、トロント大学との共同研究で、骨粗鬆症に対する歯槽骨の骨芽細胞前駆細胞の反応が、大腿骨のそれとは異なることを明らかにした。

これらの一連の研究結果から、糖尿病が歯槽骨の骨代謝に与える影響についても同様に検討することが有効との着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、我が国に多い糖尿病を患う歯周病患者の治療方法の確立を最終目標にし、非肥満型2型糖尿病が歯槽骨の骨代謝に与える影響およびそのメカニズムについて、骨代謝マーカーを用いて組織学的・分子生物学的に解明することを研究目的とした。

動物モデルを用いて、非肥満型2型糖尿病が実験的歯周炎による歯槽骨吸収に与える影響および治癒過程に及ぼす影響に焦点をおいた。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

非肥満型2型糖尿病疾患モデルとして12週齢の雄性GKラット、健常モデルとして同週齢の雄性Wistarラットを用いた。

(2) 実験的歯周炎の惹起

Pentobarbital sodium で腹腔内麻酔を行った後、下顎右側第一臼歯の歯肉溝に規格化したゴム輪を挿入して機械的刺激を加えて、実験的歯周炎を惹起し歯槽骨吸収を促した。これを実験側とし、同じラットの左側は無処置の対照側とした。実験群として4群を設定し、GKラットの実験側を糖尿病+歯周病群

(D+P)、対照側を糖尿病+非歯周病群

(D+NP)とし、同様にWistarラットの実験側を非糖尿病+歯周病群(ND+P)、対照側を非糖尿病+非歯周病群(ND+NP)とした。いずれのラットもゴム輪挿入後14日間飼育を行い、diethyletherの過剰投与により屠殺した。

(3) 組織学的観察

下顎骨を摘出後、EDTAで約6週間脱灰し、脱水・パラフィン包埋を経て、下顎骨第一臼歯周囲の顎骨を含む頬舌方向5 μ mの連続切片を作製した。H-E染色後、画像を取り込み、根分岐部の歯槽骨の面積を測定し、歯周組織の観察を行なった。

(4) 骨芽細胞前駆細胞の石灰化機能の測定

摘出した下顎骨は、軟組織除去後に歯牙を除く部位から骨片を作製してplasma clots中に播種し、培地を変えてから14日間培養した。細胞を35mm dish中に播種し、24時間後に培地交換し15日間培養した。その後基質石灰化の誘導用培地で4日間培養した。なお全培養期間を通じて、培地交換は2~3日に一度行い、培養開始20日後に10%中性ホルマリンで1晩固定した。

基質石灰化能の評価にはvon kossa染色を用いた。各試料の石灰化ノジュール数および面積は、NIH imageを用いて256段階濃度で200以上の濃さのノジュールについてのみ画像解析して求めた。

(5) 半定量的遺伝子発現解析

摘出した左右下顎骨から軟組織と歯牙を除去し、液体窒素中で、1分間破碎した。破碎試料からのTotal RNA抽出後、cDNAへの逆転写反応を実施した。骨形成マーカーとしてosteocalcin, type I collagen, core binding factor alpha 1(cbfa1), alkaline phosphatase (ALP)および骨吸収マーカーとしてtartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), cathepsinKさらに破骨細胞分化因子としてreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), 破骨細胞形成抑制因子としてosteoprotegerin(OPG)についてmRNA発現解析を行った。

(6) 治癒過程に及ぼす影響の検討

-pQCT による根分岐部海面骨の骨密度測定-

前述 (2) に加えて、歯槽骨の治癒程度を評価する実験系では、ゴム輪挿入後 14 日目にゴム輪を除去し、7 日間の治癒観察期間をおいた。

と殺・軟組織除去後、下顎第一臼歯周囲頬舌方向根分岐部の海綿骨量を、動物研究用 pQCT 骨密度測定装置を用いて測定した (スライス幅: 0.1mm)。歯槽骨の吸収度および治癒状態の評価の指標として、対照側に対する実験側骨密度の比率 (P/NP) を用いた。

4. 研究成果

(1) 組織学的所見

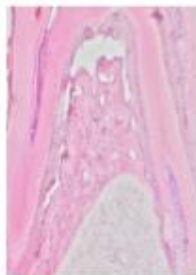
GK ラットの歯槽骨面積は、対照側で、Wistar ラットと比較して、有意に減少していた。実験側では、両ラットともに対照側と比較して有意に減少しているものの、ラット間での有意差はなかった。しかし、GK ラットの実験側では、炎症性細胞の浸潤が著明であった。



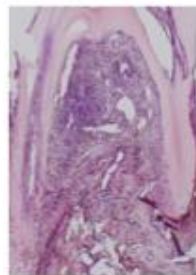
ND+NP



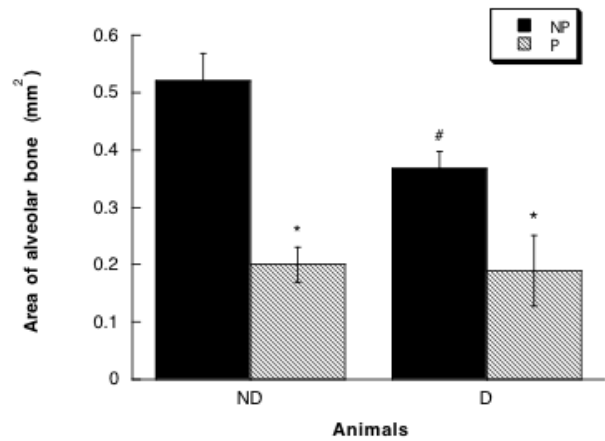
ND+P



D+NP



D+P



(2) 骨芽細胞前駆細胞の石灰化機能

実験側・対照側のいずれにおいても GK ラットにおける石灰化ノジュール数及び面積の減少は、肉眼的に顕著であった。実際の計測値においても、実験側・対照側ともに GK ラットでは Wistar ラットと比べて有意に減少した。しかし、両ラットで実験側と対照側間での有意差はなかった。



ND+NP



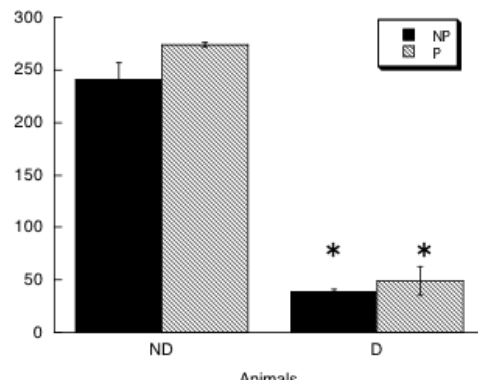
ND+P

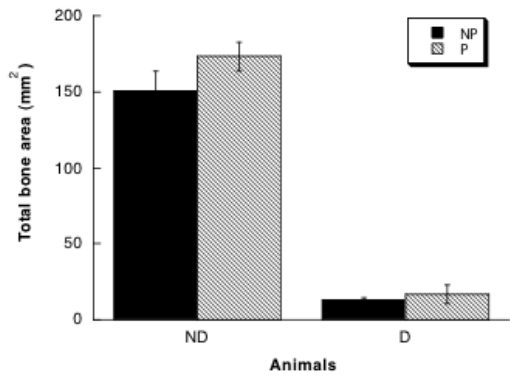


D+NP



D+P

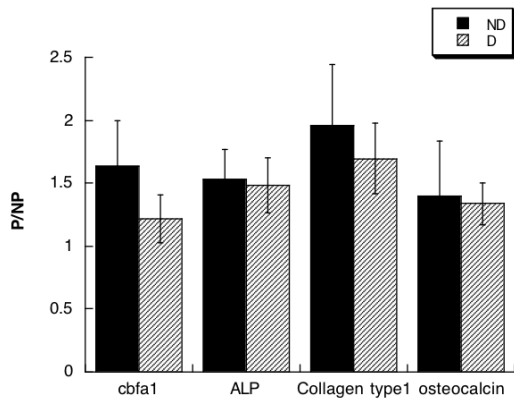




(3) 歯槽骨中の骨代謝マーカーの mRNA 発現

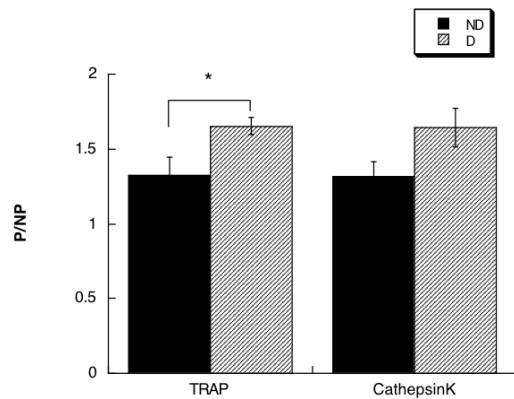
①骨形成系

cbfa1, ALP, collagen type 1, osteocalcin の発現は、両ラットの実験側で対照側と比較して有意に増加した。しかし、両ラット間での有意差はなかった。



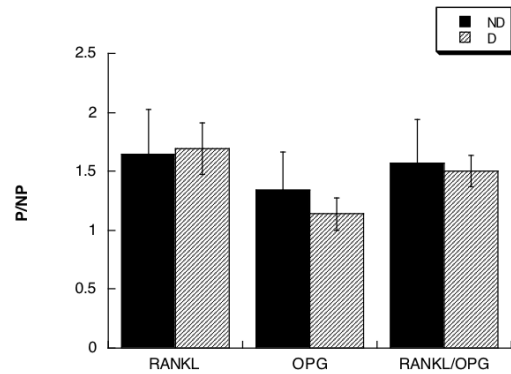
②骨吸収系

TRAP, cathepsin K の mRNA 発現は、両ラットの実験側で対照側と比較して有意に増加した。TRAP の発現は、Wistar ラットに比べ GK ラットで有意に増加した。



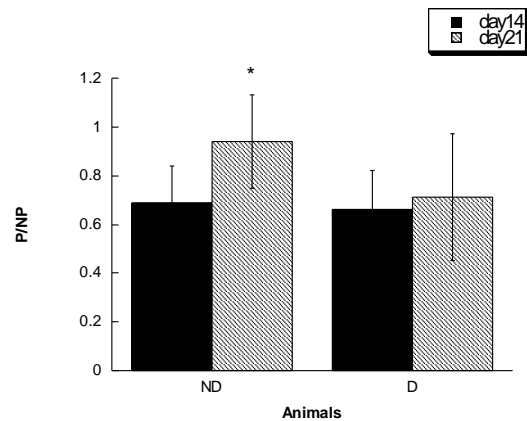
破骨細胞誘導制御因子である RANKL, OPG の mRNA 発現は、両ラットの実験側で対照側

と比較して有意に増加した。しかし、両ラット間での有意差はなかった。また、RANKL/OPG (比率) に関しても、同様の結果が得られた。



(4) 治癒過程に及ぼす影響 (pQCT 所見)

14 日目では、Wistar ラット、GK ラットともに実験側は対照側と比較して有意に減少していた (Wistar:65%, GK:69%)。治癒過程にある 21 日目では、Wistar ラットの骨密度が対照側とほぼ同程度までに回復したのに対して、GK ラットでは回復状態が低かった。(Wistar:94%, GK:71%)



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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

荘司 佳奈子 (SHOJI KANAKO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90302158

(2) 研究分担者

篠田 壽 (SHINODA HISASHI)
東北大学・大学院歯学研究科・非常勤
講師
研究者番号：80014025

村上 忍 (MURAKAMI SHINOBU)
東北大学・大学院歯学研究科・教育研
究支援者
研究者番号：40436093

島内 英俊 (SHIMAUCHI HIDETOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70187425

(3) 連携研究者

()

研究者番号：