

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09965

研究課題名(和文) 副甲状腺ホルモン関連タンパクの歯槽骨再生における役割の解明と再生歯科治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the role of PTHrP in alveolar bone regeneration and its application to regenerative dentistry

研究代表者

堀部 寛治 (Horibe, Kanji)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70733509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)は、骨形成を誘導するサイトカインである。我々は、抜歯および歯周病後の組織修復期の歯周組織でのPTHrPとその受容体PTH1Rの遺伝子発現、PTHrP投与による歯槽骨形成作用についてマウスを用いて研究を行った。健康な歯周組織ではPTHrPとPTH1Rの遺伝子発現レベルは非常に低いが、抜歯後の歯肉粘膜上皮ではPTHrPが、抜歯・歯周病後の骨芽細胞でPTH1Rのそれぞれの遺伝子発現レベルが大きく上昇した。また、マウスへのPTHrP製剤であるアバロパラチドの投与は抜歯後、歯周病後の両方で歯槽骨形成を促進させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス組織切片上での遺伝子発現解析により、抜歯後歯肉上皮細胞より酸性されたPTHrPが抜歯窩内部の骨芽細胞・前駆細胞に発現する受容体に結合し、骨形成を促進させることが示唆された。また、抜歯窩および歯周炎後の歯槽骨頂部でPTH1Rの発現レベルの増加から、抜歯・歯周炎後のPTHrP投与が骨形成を促進させる可能性が示された。

PTHrPアナログ製剤であるアバロパラチドのマウスへの投与は、抜歯窩内の骨形成、歯周炎後の歯槽骨再生をそれぞれ有意に促進させた。これらの結果は、PTHrP投与が歯槽骨再生にとって有効な治療手段であること示唆している。

研究成果の概要(英文)：Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is a cytokine that induces bone formation. We analyzed the gene expression of PTHrP and its receptor PTH1R in periodontal tissues of mice during tissue repair after tooth extraction and periodontal disease, in addition to the alveolar bone formation effect of PTHrP administration to mice.

Gene expression levels of PTHrP and PTH1R were very low in healthy periodontal tissue, while the expression levels of PTHrP in the gingival mucosal epithelium after tooth extraction and PTH1R in osteoblasts after tooth extraction and periodontal disease were both greatly increased.

Administration of abaloparatide, a PTHrP preparation, to mice enhanced alveolar bone regeneration both after tooth extraction and after periodontal disease.

研究分野：歯科

キーワード：歯科 歯槽骨 歯周炎 副甲状腺ホルモン関連タンパク

1. 研究開始当初の背景

歯槽骨は歯の保持やインプラント植立において必須の骨組織であり、摂食に必要な存在である。そのため、歯槽骨を含む歯周組織を維持することは、食習慣の維持に繋がり、超高齢社会である本邦において QOL 向上に特に重要な意義を持つ。しかし、歯槽骨は感染、炎症により容易に破壊されてしまう上に、自然治癒による再生も限局的である。歯周組織の感染疾患である歯周病の進行は不可逆であり、歯肉粘膜と歯の付着喪失、歯槽骨の吸収、そして最終的には歯の脱落による摂食機能の喪失へと繋がる。また、歯を喪失するほどに進行した重篤な歯周病ではインプラントを植立するだけの骨量が残存していない症例が多く、機能回復を行うのも難しい。したがって、歯周病の発生予防と共に、歯周病罹患後の歯周組織の再生による健康状態への復帰は、歯科臨床において最も重要で急務な課題の一つである。

副副甲状腺ホルモン関連タンパク(parathyroid hormone-related protein: PTHrP)は、骨芽細胞に発現している受容体 PTH1 Receptor (PTH1R)に結合することで骨代謝を亢進させるサイトカインである。PTHrP は、骨折治癒の促進や長管骨における骨増生作用が報告されているが、歯槽骨を含む歯周組織に関する作用は未だ不明である。そこで、我々は歯槽骨喪失を伴う歯周組織の治癒において PTHrP が組織再生を促進するか解明するために、本研究計画を策定した。

2. 研究の目的

副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH)は、骨芽細胞に発現している PTH 受容体と結合することで、骨形成を亢進させるとともに RANKL 発現上昇による破骨細胞誘導を行い、骨代謝を亢進させる。PTHrP は、PTH と共通の受容体である PTH1R と結合し、PTH 同様に骨代謝を亢進させるタンパク質である。ホルモンである PTH と異なり、PTHrP は局所の細胞で産生・作用するサイトカインである。

PTHrP は骨の成長板にある休止期軟骨細胞で発現しており、成長板軟骨細胞の増殖と分化、骨梁形成に寄与することが報告されている(Nature. 563:254, 2018)。また、骨折時には骨膜細胞から PTHrP が産生され、仮骨形成、骨修復を促進させる(Bone. 81:104, 2015)、マウスの骨折部位への PTHrP 投与は骨形成量を有意に増加させる(Int J Mol Sci. 18:337, 2017)ことが報告されている。歯科領域においては、PTHrP は歯小囊細胞で発現しており、歯周組織の形成に関与することが示唆されている(Proc Natl Acad Sci USA. 116:575, 2019)。

これらの報告から、PTHrP は骨組織の治癒・再生において重要であることは明らかであるが、歯槽骨喪失に対して PTHrP がどのように作用するかは不明である。そこで我々は、抜歯、歯周病による歯槽骨喪失後の治癒期での歯周組織における PTHrP および PTH1R の遺伝子発現の変化、そして PTHrP 投与による歯槽骨再生効果について検討するため、本研究計画を策定した。

3. 研究の方法

本研究では、歯槽骨再生における解析については二種類の実験モデルを用いて解析を行った。抜歯による物理的な歯周組織損傷を与える抜歯モデルと、細菌・炎症性の刺激によって惹起される歯周病モデルである。この二つの実験モデルを用いる理由は、抜歯モデルでは骨形成能の高い歯根膜細胞が抜歯窩内に残存し、短期間で骨形成が行われるの対し、歯周病モデルでは歯根膜細胞が破壊されており自然治癒では完全に回復しないことから、骨再生の機序が異なる可能性が

高いためである。それぞれの実験では7週齢、雄のマウスに全身麻酔をかけ処置を行う。抜歯モデルでは、上顎第一臼歯の抜歯を行う。歯周病モデルでは、上顎第二臼歯に絹糸を結紮することでプラーク付着による細菌感染を惹起させる。

(1) 歯周組織における PTHrP および受容体の遺伝子発現解析

歯周組織における PTHrP および PTH1R の遺伝子発現変化の解析は、未処置のマウス、抜歯処置から1週間後、絹糸結紮による歯周病誘導から1週間後、1週間の歯周病誘導後に結紮糸を除去し歯面清掃後さらに1週間経過、それぞれの条件で上顎を回収し、RNA Scope 法による in situ hybridization を行い、組織切片上で mRNA 発現細胞の数・発現強度を解析した。

(2) PTHrP 製剤投与による歯槽骨再生効果の解析

抜歯および、歯周病誘導後に絹糸を除去してからそれぞれ3日後のマウスに対して、ヒト PTHrP の N 末端から 34 個のアミノ酸配列の組み換えペプチドである hPTHrP (1-34) アナログ製剤アパロパラチド酢酸塩(商品名:オスタバロ, 帝人ファーマ)を 80 μg/kg の量で1日2回の間歇的な皮下投与を12日間行った。最終投与から3日後、マウス上顎を回収した。歯槽骨喪失部の回復状態はマイクロ CT 撮影による画像解析を行い、同量・同回数生理食塩水の皮下注を行ったマウス (Control 群) との比較により評価を行った。

4. 研究成果

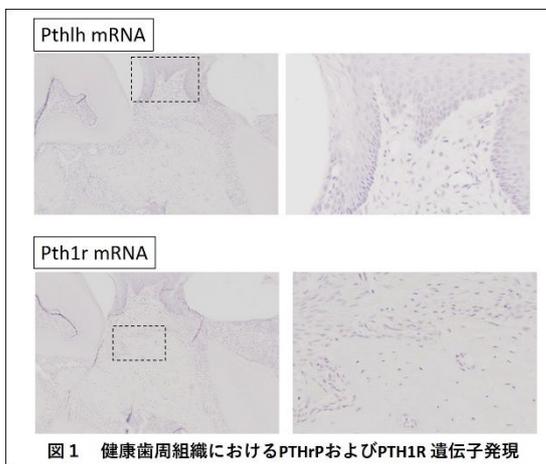


図1 健康歯周組織における PTHrP および PTH1R 遺伝子発現

(1) 歯周組織における PTHrP および PTH1R の遺伝子発現

マウスの組織切片に対して、RNA Scope 法による in situ hybridization を行い、歯周組織における PTHrP およびその受容体である PTH1R の遺伝子発現細胞の解析を行った。抜歯、歯周病誘導のどちらも行っていない健康なマウスの歯周組織では、PTHrP 遺伝子 (Pthlh) は歯肉上皮の基底層の細胞で、PTH1R 遺伝子 (Pth1r) は歯槽骨の骨芽細胞でそれぞれごく少数の細胞が低レベルで発現していた(図1)。

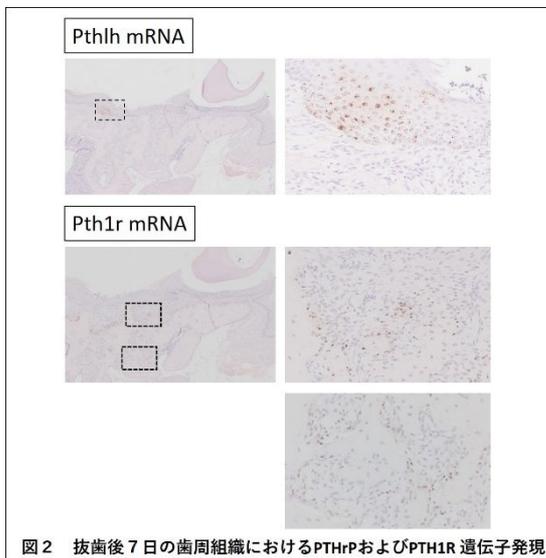


図2 抜歯後7日の歯周組織における PTHrP および PTH1R 遺伝子発現

抜歯から7日経過したマウスの歯周組織では、抜歯窩の粘膜は完全に閉鎖し、組織所見でも重層扁平上皮の形成が認められ、軟組織はほぼ完全に治癒する。また、抜歯窩内部では幼弱な線維性骨の形成がマイクロ CT 撮影像、組織像所見の両方で見られ、盛んな骨形成が進行していることが確認できる。この治癒期の抜歯窩を覆う歯肉粘膜の上皮細胞で PTHrP 遺伝子発現が非常に高いレベルで認められた(図2・上段)。また、PTH1R 遺伝子は抜歯窩の底部から上端にかけての新生骨表面の骨芽細胞およびその周囲の細胞で高いレベルで発現が認められた(図2・下段)。

マウス臼歯への絹糸結紮から7日後、感染性炎症により歯周組織は破壊され、絹糸結紮歯は多軸性の動揺が認められる。マイクロ CT 像では歯槽骨吸収像が認められ、組織像所見でも歯槽骨

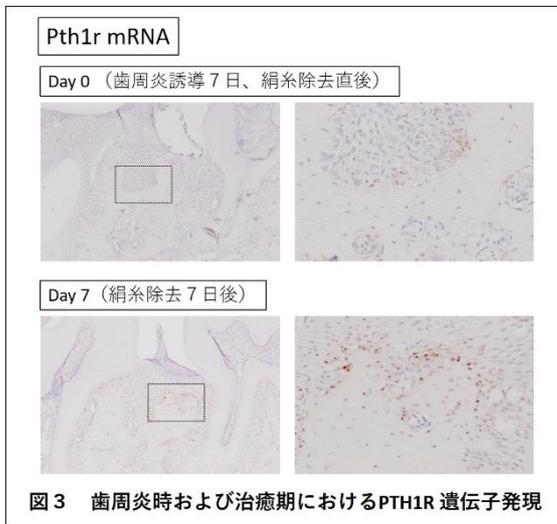


図3 歯周炎時および治癒期におけるPTH1R 遺伝子発現

破壊と炎症性細胞の多数の浸潤が見られる。この時期の結紮部位の歯槽骨頂部で PTH1R 遺伝子発現細胞の局在が認められた(図3・上段)。歯周病誘導後、絹糸の除去および歯面の清掃を行い7日経過すると歯周組織の炎症が収まっていることが組織像所見より観察できた。炎症の急性期から組織修復期に移行した歯周組織の歯槽骨頂では PTH1R 遺伝子発現が絹糸除去直後に比べて発現細胞数、発現レベル共に大きく上昇していた(図3・下段)。一方で、歯周病モデルにおける PTHrP の遺伝子発現は炎症期、組織修復期共に変化が認められなかった。

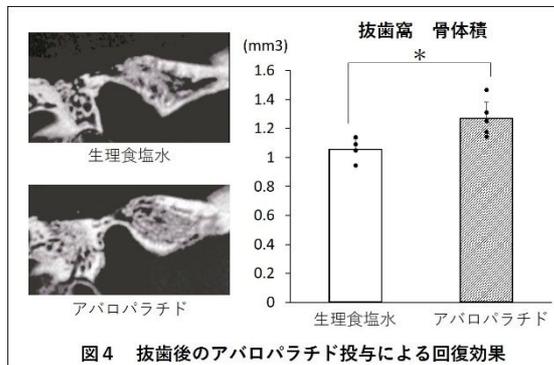


図4 抜歯後のアバロパラチド投与による回復効果

これらの結果から、物理的な歯周組織損傷である抜歯後には、歯肉上皮細胞より PTHrP が産生・放出されており、抜歯窩内部の骨芽細胞およびその前駆細胞に発現する受容体に結合することで骨の形成を促進させていることが示唆された。また、抜歯窩内部の線維性骨および、歯周炎後修復期の歯槽骨頂部で PTH1R の発現レベルが大きく高まっていることから、抜歯後および歯周炎後の PTHrP 投与が骨形成を促進させる可能性が示された。

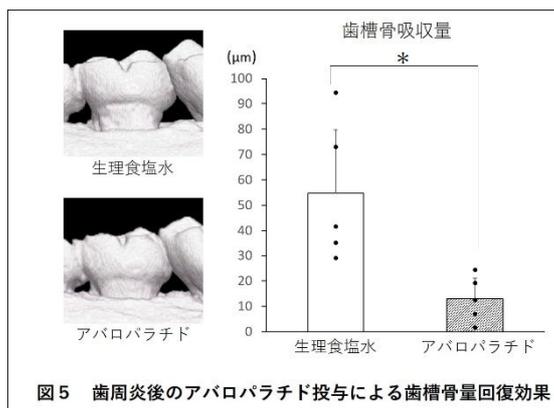


図5 歯周炎後のアバロパラチド投与による歯槽骨量回復効果

(2) hPTHrP(1-34)アナログ製剤アバロパラチドの歯槽骨再生効果の解析

抜歯処置3日後からアバロパラチドの間歇投与を行い、投与開始15日後の抜歯窩内部の骨形成状態をマイクロCT撮影像から評価を行った(図4)。画像所見上では、生理食塩水投

与群と比較してアバロパラチド投与群では抜歯窩断面の不透過像の専有面積が大きく、抜歯窩内の骨形成がコントロールの生理食塩水投与群よりも進行していることを示した。実際、抜歯窩内部の骨量を計測したところ、生理食塩水投与群の骨体積が平均値 $1.060 \pm 0.072 \text{ mm}^3$ (N=4) であるのに対して、アバロパラチド投与群での抜歯窩内部の骨体積は平均 $1.270 \pm 0.114 \text{ mm}^3$ (N=5) となり、有意に骨量が増加していた。

歯周病モデルによる歯槽骨吸収を起こしたマウスに生理食塩水、もしくはアバロパラチドを間歇投与し、投与開始から15日後の歯槽骨吸収状態をマイクロCT撮影により解析を行った(図5)。歯槽骨の吸収状態は、絹糸結紮を行った第二臼歯・口蓋側のセメント・エナメル境(Cemento-Enamel Junction: CEJ)から歯槽骨頂(Alveolar Bone Crest: ABC)の距離(CEJ-ABC distance)を計測し、絹糸結紮による歯周炎側(右側上顎骨)と非結紮の健康側(左側上顎骨)の差から算出を行った。生理食塩水を投与したコントロール群のCEJ-ABC distanceは、健康側で $119.946 \pm 16.006 \mu\text{m}$ 、炎症側で $174.611 \pm 30.370 \mu\text{m}$ となり、その差である $54.665 \pm 25.003 \mu\text{m}$ が歯槽骨吸収量となる(N=5)。アバロパラチド投与群の健康側CEJ-ABC distanceは $126.054 \pm$

16.336 μm 、炎症側では $139.009 \pm 8.851 \mu\text{m}$ となり、歯槽骨吸収量は $12.955 \pm 8.202 \mu\text{m}$ (N=5) となり、コントロール群よりも有意に低い値となった。また、コントロール群では健康側と炎症側の CEJ-ABC distance の計測値に有意差があったが、アバロパラチド投与群では有意差は生じなかった。この事は、歯周炎により喪失した歯槽骨がアバロパラチド投与により健康側と同程度にまで回復したことを示している。

以上の結果より、抜歯や歯周炎などの侵襲性刺激を受けた歯周組織は、組織修復の際に PTH1R signal を活性化することで歯槽骨形成を促進しており、PTHrP を投与することによってさらに骨形成を促進できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀部 寛治、西田 大輔、中村 浩彰
2. 発表標題 歯周組織治癒過程における PTHrP および PTH1 受容体の遺伝子発現
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	中村 浩彰 (Nakamura Hiroaki) (50227930)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	
研究分担者	平賀 徹 (Hiraga Toru) (70322170)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	
研究分担者	田所 治 (Tadokoro Osamu) (20319106)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	
研究分担者	奥村 雅代 (Okumura Masayo) (10362849)	松本歯科大学・歯学部・講師 (33602)	

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
---------	---------