

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24年 3月 31日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～1011

課題番号：22659383

研究課題名（和文）ビスフォスフォネート関連顎骨壊死発症・進行における歯周病菌の口腔免疫学的影響

研究課題名（英文）The oral immunological effect on bisphosphonate-treated mice model by periodontal disease associated-pathogen.

研究代表者

片岡 宏介 (KATAOKA KOSUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：50283792

研究成果の概要（和文）：ビスフォスフォネート（BP）長期投与された歯周病菌感染マウスの口腔内抜歯窩において、歯周病菌の長期定着が認められた。また同時に、同部における炎症性細胞の集積が強く認められ、さらに、同部からの CD4T 細胞、マクロファージ(Mφ)による破骨細胞分化に関わるサイトカイン発現に有意な差が認められた。以上より、本疾患の発症・進行機序には、歯周病菌が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：By using periodontal disease-associated pathogen-infected mice long-termed administered with bisphosphonate substrates, we showed long-term colonization of periodontal disease-associated bacterium and the accumulation of inflammatory cells in teeth extraction wound of the oral cavity. In addition, we displayed induction of osteoclasts differentiation-associated cytokines from CD4 T cells and Mφ of teeth extraction wound. Taken together, it was suggested that the existence of periodontal disease-associated bacterium had effect on the progress and outbreak of bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	270,000	3,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：ビスフォスフォネート、歯周病菌、粘膜免疫、顎骨壊死、骨免疫、破骨細胞、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

中・高齢者が急増している現在、その8割以上が歯周病に罹患しているといわれている。一方、中・高齢者の骨粗鬆症患者も近年増加し、治療のためのビスフォスフォネート(BP)投与患者が増加し、それにつれて、BP

投与患者における口腔外科処置後の顎骨壊死の多くの報告がなされている。しかしながら、その発症や進行機序、予防法の開発に直結する、科学的根拠を示す報告はほとんど見られない。

この点について、我々は、軟組織（粘膜）

や硬組織（歯・骨）が共存する口腔内における BP 投与下の本症発症が歯周病菌の感染によるものであり、すなわち、歯周病菌感染が歯肉粘膜および歯槽骨の免疫異常の誘導を促している可能性を仮定した。疾患マウスモデル作製後、本動物モデルにおける、歯周病菌による細菌学的・免疫学的影響の検討を行い、発症予防法および治療法の開発につなげていくことを考えた。

2. 研究の目的

長期 BP 投与マウスの臼歯を抜歯し、歯周病菌感染させることにより、以下の検討を行った。

- (1) 抜歯窩部における歯周病菌の定着特異性と同部における炎症性細胞の集積状況の検討。
- (2) 抜歯窩部の CD11b⁺マクロファージ(Mφ)および CD4⁺T 細胞による破骨細胞分化関連サイトカイン解析。
- (3) 脾臓および頸部リンパ節における CD4 T細胞の RANKL 発現解析。
- (4) 破骨細胞とパミドロン酸二ナトリウム共培養後、歯周病菌感染時の産生サイトカイン解析。

3. 研究の方法

C57BL/6J マウス（5週齢、♀）にチッ素含有 BP（パミドロン酸二ナトリウム）を3ヶ月間（15 μg/匹/週）静脈注射投与し BP 長期投与マウスを作製する。その後、下顎臼歯を抜歯し、歯周病菌（1 × 10⁷個）感染させ、BP 投与感染マウスを作製した。コントロールとして非感染 BP 投与マウス群および感染 BP 非投与マウス群を用いた。

- (1) 感染後 10 日目において、抜歯窩（下顎骨）に定着している歯周病菌数を測定するために、抜歯窩をスワップした綿棒に付着した歯周病菌から DNA を抽出し、細菌特異的プライマーを用い Real-time PCR 法により菌数を測定した。また、創傷粘膜部位の潰瘍および腐骨形成部位を PAS 染色し検鏡することにより、炎症性細胞の集積状況を確認した。
- (2) 抜歯窩部歯肉をコラゲナーゼ処理後、単核球細胞を調整し、抗体マイクロビーズ法により、CD11b⁺マクロファージ (Mφ) および CD4⁺T 細胞を分取した。各分取細胞から RNA を抽出し cDNA を調整後、炎症性サイトカイン特異的プライマー (TNF-α、IL-1β、IL-6)、破骨細胞分化抑制サイトカイン (IFN-γ、IL-4) 発現を測定した。

(3) 脾臓および頸部リンパ節 CD4 T細胞において、破骨細胞の分化促進因子である RANKL 分子の発現を特異的プライマーにより RT-PCR 法により検討した。

(4) *in vitro* 培養破骨細胞をパミドロン酸二ナトリウム (100 μg/ml; 100 μl) とともに 18 時間共培養した後、歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277) 生菌体 (1.0 × 10⁶ 個) により感染させ、24 時間後の培養上清中のサイトカイン、特に RANKL 分化に関連するサイトカイン測定 (IFN-γ、IL-4、IL-12、IL-18) を行い、破骨細胞分化への影響を検討した。

4. 研究成果

- (1) 感染後 10 日目において、両コントロールマウス群では、抜歯窩における菌の存在は認められなかった。一方、感染 BP 投与マウスでは、歯周病菌の存在が平均 2.4 × 10⁵ 個/マウスで認められた。また、創傷粘膜部位の潰瘍および腐骨形成部位を PAS 染色し検鏡したところ、感染 BP 投与マウスにおいて、強い炎症性細胞の集積、そして、歯周病菌の存在が認められた。
- (2) 両コントロール群と比較した時、感染 BP 投与マウスの Mφ からの炎症性サイトカイン IL-1β、T 細胞からは、破骨細胞の分化抑制サイトカインである IFN-γ、IL-4 の有意な発現誘導が認められた。
- (3) 脾臓および頸部リンパ節からの CD4 T細胞における RANKL 分子発現は、感染 BP 投与マウスでは減少する傾向にはあったものの、歯周病菌非感染マウスとの間に有意な差は認められなかった。
- (4) 生菌体により感染させた場合、IFN-γ、IL-4、IL-12、IL-18 は、非感染コントロール群と比べ、産生増加の傾向を認めたものの、有意な差は認められなかった。

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 12 件)

- ① Fukuyama Y, Tokuhara D., Kataoka K., Gilbert R. S., McGhee J. R., Yuki Y., Kiyono H., Fujihashi K. Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert Rev. Vaccines*, 査読有、11 (3)、2012 367-379

- ② Fukuyama Y., Tokuhara D., Sekine S., Kataoka K., Markham J. D., Irwin A. R., Moon G. H., Tokuhara Y., Fujihashi K., Davydova J., Yamamoto M., Gilbert R. S., and Fujihashi K. Notch-ligand expression by NALT dendritic cells regulates mucosal Th-1 and Th-2 type responses. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 査読有、3;418(1)、2012、6-11
- ③ Kataoka K., Fujihashi K., Terao Y., Gilbert R. S., Sekine S., Kobayashi R., Fukuyama Y., Kawabata S. and Fujihashi K. Oral-nasopharyngeal dendritic cells mediate T-independent IgA class switching on B-1 B cells. *PLoS ONE*, 査読有、6(9)、2011、e25396
- ④ Baatarjav T., Kataoka K., Gilbert R. S., Terao Y., Fukui M., Goto M., Kawabata S., Yamamoto M., Fujihashi K. and Ito H. -O. Mucosal immune features to phosphorylcholine by nasal Flt3 ligand cDNA-based vaccination. *Vaccine*, 査読有、29(34)、2011、5747-5757
- ⑤ Kido H., Takahashi E., Kataoka K., Fujii M., Suzuki S., Iwase K., Ito C. 2011、Attenuation of respiratory immune responses by antiviral neuraminidase inhibitor treatment and boost of mucosal immunoglobulin A response by co-administration of immunomodulator clarithromycin in paediatric influenza. *Influenza Other. Respi. Viruses*, 査読有、5、2011、240-242
- ⑥ Kataoka K., Fujihashi K. Oma K., Fukuyama Y., Hollingshead S. K., Sekine S., Kawabata S., Ito H. -O., Briles D. E., Oishi K. Nasal dendritic cell targeting flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumoniae. *Infect. Immun.*, 査読有、79(7)、2011、2819-2828
- ⑦ Kobayashi R., Kono T., Bolerjeck B. A., Fukuyama Y., Gilbert R. S., Fujihashi K., Ruby J., Kataoka K., Wada M., Yamamoto M., Fujihashi K. Induction of IL-10-producing CD4+ T cells in chronic periodontitis. *J. Dent. Res.*, 査読有、90(5)、2011、653-658
- ⑧ Fukuyama Y., King J. D., Kataoka K., Kobayashi R., Gilbert R. S., Hollingshead S. K., Briles D. E., Fujihashi K. A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG oligodeoxynucleotide as nasal adjuvant elicits protective secretory-IgA immunity to *Streptococcus pneumoniae* in aged mice. *J. Immunol.*, 査読有、184(4)、2011、2454-2461
- ⑨ Fukui M., Hinode D., Yokoyama M., Yoshioka M., Kataoka K., Ito H. -O. Levels of salivary stress markers in patients with anxiety about halitosis. *Arch. Oral Biol.*, 査読有、55(11)、2010、842-847
- ⑩ Fukuyama Y., King J. D., Kataoka K., Kobayashi R., Gilbert R. S., Oishi K., Hollingshead S. K., Briles D. E., Fujihashi K. Secretory-IgA antibodies play an important role in the immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.*, 査読有、185(3)、2010、1755-1762
- ⑪ Takahashi E., Kataoka K., Fujii K., Chida J., Mizuno D., Fukui M., Ito H. -O., Fujihashi K., Kido H. Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus. *Microbes. Infect.*, 査読有、12(10)、2010、778-783
- ⑫ Nakagaki H., Sekine S., Terao Y., Toe M., Tanaka M., Ito H., Kawabata S., Shizukuishi S., Fujihashi K., Kataoka K. *Fusobacterium nucleatum* envelope protein FomA is immunogenic and binds to salivary statherin-derived peptide. *Infect. Immun.*, 査読有、78(3)、2010、1185-1192

[学会発表] (計 21 件)

- ① 福井誠、ヒト唾液中および血中の抗ホスホリルコリン抗体と動脈硬化リスクとの関連性：五島研究、第 60 回口腔衛生学会総会、平成 23 年 10 月 10 日、日本大学松戸歯学部 (松戸市)
- ② サプタ・ムルヤトノ、経鼻粘膜アジュバント CpG ODN はマクロファージの TLR9 発現と歯周病原細菌抗原特異的 Th1 免疫応答を誘導する、第 60 回口腔衛生学会総会、平成 23 年 10 月 9 日、日本大学松戸歯学部 (松戸市)
- ③ 渋谷敦人、平成 22 年度に香川県内で実施された成人歯科健診モデル事業報告、第 22 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、平成 23 年 10 月 2 日、徳島大学 (徳島市)
- ④ 武川香織、妊婦歯科健康診査受診者の妊娠中の歯周状態と出産の状況について、第

- 22 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、平成 23 年 10 月 2 日、徳島大学（徳島市）
- ⑤ Kataoka, K., Nasal dendritic cell targeting Flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumonia. 15th International Congress of Mucosal Immunology, July 8th 2011, Paris, France
- ⑥ Mulyatno A. S., Cytokine profile in human saliva and its relationship with that in blood. International Joint QOL Symposium on Oral Science, December 18th, 2010, Bali, Indonesia
- ⑦ Fukui M., Cytokine profile in human saliva and its relationship with that in blood. 9th International Conference Asian Academy of Preventive Dentistry, November 10th, 2010, Kuala Lumpur, Malaysia
- ⑧ 片岡宏介、遺伝子改変植物による歯周病原菌定着阻害能を有するヒト唾液タンパク質スタセリンペプチドの発現、第 59 回口腔衛生学会総会、平成 22 年 10 月 8 日、朱鷺メッセ（新潟市）
- ⑨ 関根伸一、佐用町台風第 9 号災害における住民の口腔保健調査、第 59 回口腔衛生学会総会、平成 22 年 10 月 8 日、朱鷺メッセ（新潟市）
- ⑩ 福井誠、ヒト血中および唾液中の抗ホスホリルコリン抗体の存在実態、第 59 回口腔衛生学会総会、平成 22 年 10 月 8 日、朱鷺メッセ（新潟市）
- ⑪ Baatarjav T., Nasal Flt3L gene results in mucosal immune responses to PC through induction of B-1 B cells. 第 59 回口腔衛生学会総会、平成 22 年 10 月 8 日、朱鷺メッセ、（新潟市）
- ⑫ 片岡宏介、受動免疫型および能動免疫型ワクチン開発への挑戦、粘膜免疫学と分子生物学を基盤とした予防歯科学的展開～第 59 回口腔衛生学会総会シンポジウム「口腔の健康を科学する」、平成 22 年 10 月 7 日、朱鷺メッセ（新潟市）
- ⑬ 関根伸一、Flt3 ligand cDNA 及び CpG ODN は粘膜アジュバントとして *P. gingivalis* 抗原特異的抗体反応を誘導する、第 53 回日本歯周病学会秋季学術大会、平成 22 年 9 月 19 日、サンポート高松（高松市）
- ⑭ 片岡宏介、粘膜アジュバント CpG オリゴヌクレオチドによる *Porphyromonas gingivalis* 線毛抗原特異的抗体応答の誘導、第 53 回日本歯周病学会秋季学術大会、平成 22 年 9 月 19 日、サンポート高松（高松市）
- ⑮ Kataoka K., Nasal Cholera Toxin Activated Mucosal Dendritic Cells, but not CD4⁺ Cells Elicits TI-IgA Class Switching Recombination by B-1 B Cells. 14th International Congress of Immunology, August 27th 2010, 神戸国際会議場（神戸市）
- ⑯ Baatarjav T., Nasal Vaccination with Phosphorylcholine plus Flt3 Ligand Gene as a Mucosal Adjuvant Inhibits *Streptococcus pneumoniae* Colonization. 14th International Congress of Immunology, August 23rd 2010, 神戸国際会議場（神戸市）
- ⑰ Sekine S., Characterization of Mucosal Immunosenescence in Nasopharyngeal-Associated Lymphoreticular Tissue. 14th International Congress of Immunology, August 23rd 2010, 神戸国際会議場（神戸市）
- ⑱ 片岡宏介、ヒト唾液タンパク質由来ペプチドの歯周病原菌定着阻害効果、第 21 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、平成 22 年 6 月 20 日、サンラポーむらくも（松江市）
- ⑲ 福井誠、ヒトの唾液中および血中に存在する抗ホスホリルコリン抗体の検出、第 21 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、平成 22 年 6 月 20 日、サンラポーむらくも（松江市）
- ⑳ 三崎昌和、平成 21 年度に香川県内で実施された成人歯科健診モデル事業実施報告、第 21 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、平成 22 年 6 月 20 日、サンラポーむらくも（松江市）
- ㉑ 片岡宏介、*Fusobacterium nucleatum* 表層タンパク質 FomA と唾液高チロシンタンパク質スタセリンペプチドとの相互作用、平成 22 年 5 月 15 日、第 53 回日本歯周病学会春季学術大会、（盛岡市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 宏介 (KATAOKA KOSUKE)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
 研究部・准教授
 研究者番号：50283792