

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 5 月 25 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792102

研究課題名（和文） 新規炎症性歯周病モデルの作製および治療薬の評価

研究課題名（英文） The produced newly inflammatory periodontal disease model and evaluation of the therapeutic drug

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）：歯周病は細菌感染による慢性炎症疾患である。炎症反応が歯槽骨吸収にどの程度関与するかを検討することが必要である。本研究では、新規炎症性歯周病モデルの確立を試みた。炎症性因子であるTNFを強発現（hTNF-Tg）させたマウスの歯槽骨吸収は増加しなかった。次に、hTNF-TgマウスとOsteoprotegerin（OPG）遺伝子欠損マウスの交配より、hTNF-Tg・OPGヘテロ欠損二重遺伝子改変マウスを交配より得た。hTNF-TG・OPGヘテロ欠損二重遺伝子改変マウスの歯槽骨は軽度増加した。歯槽骨吸収において、TNF強発現の影響は少ないことが示唆された。hTNF-Tg・OPGヘテロ欠損二重遺伝子改変マウスに歯周病細菌の接種を行い、その歯槽骨吸収量を検討中である。本研究により、TNFの増加のみでは歯槽骨吸収を引き起こすのに不十分であることが示唆された。歯槽骨吸収における炎症反応に対する理解が深まった。

研究成果の概要（英文）：In this study, I tried the establishment of the newly inflammatory periodontal disease model. We analyzed of alveolar bones of human TNF-transgenic (hTNF-Tg) 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. The alveolar bone loss was not admitted by hTNF-Tg mice. Next, we made hTNF-Tg and Osteoprotegerin (OPG) hetero-gene modification mice. The alveolar bone of hTNF-Tg and OPG hetero-gene modification mice induced slightly alveolar bone loss. These results suggested that the overexpression of TNF in alveolar bone induced inflammatory alveolar bone loss but not strong. We inoculate periodontal disease bacteria into hTNF-Tg and OPG hetero-gene modification mice. They are examining quantity of the alveolar bone loss. This study suggested that the increase in TNF is insufficient for causing alveolar bone loss. The understanding for the inflammatory reaction in the alveolar bone loss deepened.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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, TNF, 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、病態は複雑であり解明は十分でない。その理由は、細菌や宿主などに関わる多様な因子が関与するためである。宿主の慢性的な炎症反応により歯周組織破壊および歯槽骨吸収が起こる。しかし、炎症反応が歯槽骨吸収にどの程度関与するかは明確でない。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、炎症性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、多様な因子が関与しているため、歯周病において炎症性因子がどの程度重要であるかは明確でない。

(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。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⁾。しかし、歯槽骨吸収と炎症性因子との関連は不明な点が多い。本研究では、炎症性歯周病モデルを作製することを目的とした。これにより、歯周病における炎症性遺伝子と歯槽骨吸収の関連性および重要性を生体レベルで明らかにできると期待された。上記の炎症性遺伝子として TNF をとり上げた。TNF は LPS (細菌の内毒素) の刺激により、生体側が産生する炎症性サイトカインである³⁾。しかし、持続的な TNF の刺激は自己組織を破壊する。リウマチ疾患では、TNF は炎症のみならず骨吸収を誘導する。歯周病の歯周ポケットから採取された歯肉溝浸出液中にも TNF が検出される。TNF 誘導性の歯槽骨吸収を評価することは、炎症と歯槽骨吸収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。本研究の炎症性歯周病モデルは、TNF 遺伝子の導入により宿主が TNF を産生する。つまり、生体が産生する TNF により引き起こされる炎症反応が歯槽骨吸収に及ぼす作用を明らかに

できる。そこで、炎症性歯周病モデルの確立は、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) Koide M, et al. Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling. *J Bone Miner Res* 24: 1469-80. 2009. 3) Zwerina J. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:11742-11747. 2007.

2. 研究の目的

(1) 炎症性歯周病モデルマウスを確立する。病態を反映した歯周病モデルの確立を目指して、炎症性因子として TNF α (腫瘍壊死因子) 遺伝子強発現 [hTNF-Tg] マウスを用いて、新規の炎症性歯周病モデルの作製を試みる。TNF 遺伝子強発現マウスの歯槽骨吸収を経時的に観察する。歯槽骨吸収が弱い場合は、OPG 遺伝子欠損マウスにおける歯槽骨吸収モデルに、TNF 遺伝子強発現マウスを交配して、炎症性歯周病モデルを作製する。

(2) 炎症性歯周病モデルの解析: 上記マウスの歯槽骨量の定量を行う。また、歯周組織の炎症及び骨吸収関連タンパクの発現を組織学的に評価する。これらの解析により、歯周病に対する炎症性遺伝子の影響を解明する。

(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) 新規炎症性歯周病モデルの作製
炎症性因子である TNF の強発現マウスの歯槽骨吸収を in vivo マイクロ CT により、評価する。

A) 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。

B) 上記で歯槽骨吸収量が少ない場合、TNF 強発現マウスと OPG 遺伝子欠損マウスを交配する。この TNF 強発現・OPG 欠損二重遺伝子改変マウスの歯槽骨をマイクロ CT で測定する。

C) 歯槽骨および脛骨の骨量を測定する。これらより、歯槽骨にみならず全身に及ぼす TNF の影響を明らかにする。

(2) 新規炎症性歯周病モデルの生化学および組織学的解析

炎症反応の亢進を介して歯槽骨吸収を起こすと想定されるため、両因子の評価を行う。

- A) 血清中の骨吸収マーカーである TRAP5b と骨形成マーカーである ALP, 炎症の指標である TNF や IL-1 量を測定する。この結果を指標として, 以下の組織学的検討を行う。
- B) 歯周組織の炎症の程度を組織学的に評価するため, TNF や IL-1 などの染色を行う。
- C) 免疫担当細胞の数や分布の変化を解析するため, F4/80 などのマクロファージの染色および MHC II などの樹状細胞の染色を行う。更に, 抗 CD3 や抗 CD4 抗体などで T リンパ球の染色を行う。
- D) 破骨細胞の数や分布の変化を解析するため, TRAP やカテプシン K などの染色を行う。

(3) 炎症性歯周病モデルおよび歯槽骨吸収モデルを用いた骨吸収抑制薬の評価
炎症性歯周病モデルを応用して歯槽骨吸収に及ぼす作用を検討する。歯槽骨吸収モデルを応用して歯槽骨吸収への作用を検討する。歯槽骨吸収の進行程度を評価する。

- A) 評価項目は, 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。
- B) 上記のマウスの歯槽骨をマイクロ CT で測定する。
- C) 歯槽骨および脛骨の骨量を測定する。これらより, 歯槽骨にみならず全身に及ぼす薬剤の効果を明らかにする。
- D) 血清中の骨吸収マーカーである TRAP5b と骨形成マーカーである ALP, 炎症の指標である TNF や IL-1 量を測定する。この結果を指標として, 以下の組織学的検討を行う。
- E) 歯周組織の炎症の程度を組織学的に評価するため, TNF や IL-1 などの染色を行う。
- F) 破骨細胞の数や分布の変化を解析するため, TRAP やカテプシン K などの染色を行う。上記の項目の変化を検討する。

4. 研究成果

(1) 新規炎症性歯周病モデルを確立した。炎症性因子である TNF を強発現 (hTNF-Tg) させたマウスの歯槽骨吸収は増加しなかった。次に, hTNF-Tg マウスと OPG 遺伝子欠損マウスの交配より, hTNF-Tg・OPG ヘテロ欠損二重遺伝子改変マウスを交配より得た。hTNF-TG・OPG ヘテロ欠損二重遺伝子改変マウスの歯槽骨は軽度増加した。歯槽骨吸収において, TNF 強発現の影響は少ないことが示唆された。

(2) hTNF-Tg・OPG ヘテロ欠損二重遺伝子改変マウスに歯周病細菌の接種を行い, その歯槽骨吸収量を検討中である。

(3) TNF の増加のみでは歯槽骨吸収を引き起こすのに不十分であることが示唆された。歯槽骨吸収における炎症反応に対する理解が深まった。

以上の結果より炎症性歯周病モデル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 3 件)

① Koide M, Ninomiya T, Udagawa N, Yasuda H (2012) Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. *J Immunology* **188**: 1772-1781. (査読有)

DOI:10.4049/jimmunol.1101174

② Ninomiya T, Koide M, Tadokoro O, Udagawa N, Nakamura H, Takahashi N, Ozawa H (2011) Prostaglandin E2 receptor EP4-selective agonist (ONO-4819) increases bone formation by modulating mesenchymal cell differentiation. *Eur J Pharmacol* **650**: 396-402. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.021>

③ Koide M, Kinugawa S, Takahashi N, Udagawa N (2010) Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. *Periodontol 2000* **54**: 235-246. (査読有)

DOI:10.1111/j.1600-0757.2010.00355.x

[学会発表] (計 2 件)

① in vivo Micro CT Forum (第 2 回) 2010 年 8 月 27 日 (東京) 骨吸収亢進マウスにおける歯槽骨吸収のマイクロ CT 解析: 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 American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting (第 32 回) 2010 年 10 月 18 日 (トロント) OPG rather than RANKL regulates alveolar bone loss: 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

[図書] (計 1 件)

① 小出雅則, 宇田川信之 (2010) THE BONE カルシウムシグナルを介する骨吸収の制御. *メディカルレビュー社* 22: 97-101.

② 小出雅則 (2011) Bone Journal Club: 骨芽細胞分化を促進する転写因子 Maf は, 加齢により減少して間葉系細胞の分化を脂肪細胞に振り分ける. *骨粗鬆症治療* **10**: 84.

[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

<http://www.mdu.ac.jp/graduate/index.htm>
1

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