

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21019

研究課題名（和文）NLRP3インフラマソームを介した歯石による歯周組織破壊に関する分子病理学的解析

研究課題名（英文）Molecular pathological analysis of periodontal tissue destruction caused by dental calculus via NLRP3 inflammasome

研究代表者

前 めぐみ（Mae, Megumi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・客員研究員

研究者番号：40967585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：マクロファージを歯石で刺激すると、NLRP3インフラマソームの活性化を介して炎症性サイトカインIL-1、IL-18が産生される。IL-1は破骨細胞形成に促進的に、IL-18は促進的または抑制的に作用することが知られている。しかしながら、歯石で誘導されるサイトカインが歯周炎における歯槽骨吸収にどのような影響を及ぼすか不明であった。本研究では、ラット歯周炎モデルに人工歯石としてハイドロキシアパタイト微粒子を投与すると、IL-1の産生が誘導され、歯槽骨吸収に促進的に作用することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯石はプラークの付着を助長するプラークリテンションファクターとして知られているが、近年、歯石結晶はダメージ関連分子としてNLRP3インフラマソームに認識され、マクロファージのIL-1産生を促進することが報告された。本研究では、歯周炎動物モデルにおいてラット歯肉溝に人工歯石としてハイドロキシアパタイト微粒子を投与するとIL-1産生を介して歯槽骨吸収が促進されることが明らかとなり、歯石の石灰化成分も歯周組織の破壊と歯槽骨に促進的に作用していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Macrophages stimulated with dental calculus produce the proinflammatory cytokines IL-1 and IL-18 via the NLRP3 inflammasome. IL-1 is known to act in a pro-osteoclastogenic manner and IL-18 acts in a pro- or inhibitory manner on osteoclastogenesis. However, it remains unclear how these cytokines affect alveolar bone resorption. In this study, hydroxyapatite microparticles administered as artificial dental calculus in a rat periodontitis model induced IL-1 production and promoted alveolar bone resorption.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯石 NLRP3インフラマソーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、炎症性疾患であり歯槽骨吸収を伴う。デンタルプラークの刺激に反応して歯周組織に浸潤した白血球が産生する TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインは骨吸収を促進し、IL-10 などの抗炎症性サイトカインは骨吸収を抑制する。歯石はプラークの付着を助長するプラークリテンションファクターとして知られているが、近年、歯石結晶はダメージ関連分子として NLRP3 インフラマソームに認識され、マクロファージの IL-1 $\beta$  産生を促進することが報告された。IL-1 $\beta$  はプラーク中の菌体成分などの刺激によりその前駆体が産生されるが、前駆体は活性を示さない。しかしマクロファージに結晶粒子などの刺激が加わると、カスパーゼ 1 を含む NLRP3 インフラマソーム複合体が形成され、活性化したカスパーゼ 1 が IL-1 $\beta$  前駆体を成熟型へ変換する。歯石でマクロファージを刺激すると歯石中の菌体成分により IL-1 $\beta$  前駆体だけでなく IL-18 前駆体も産生される。また NLRP3 インフラマソームが活性化すると、IL-1 $\beta$  及び IL-18 前駆体が成熟型へ変換される。さらに、IL-1 $\beta$  は破骨細胞形成を促進し、IL-18 は促進的または抑制的に作用する。IL-1 $\beta$  および IL-18 を含む歯石刺激後のマウスマクロファージ培養上清はマウス骨髄由来マクロファージ様細胞 (BMM 細胞) の破骨細胞形成を促進したが、RAW264.7 細胞由来で破骨細胞に分化しやすい RAW-D 細胞の破骨細胞形成を抑制し、破骨細胞形成へ異なる影響を及ぼした。

このように IL-1 $\beta$  および IL-18 は相反する破骨細胞形成への作用を示すため、歯石により誘導されるサイトカインが歯周炎における歯槽骨吸収にどのような影響を及ぼすか不明であった。

本研究の核心をなす学問的問いは、「歯石により NLRP3 インフラマソームを介して産生された IL-1 $\beta$  および IL-18 は生体内で歯槽骨吸収にどのような影響を及ぼすか」である。

### 2. 研究の目的

これまでにプラークにより誘導されたサイトカインが歯槽骨吸収に与える影響は数多く報告されている。歯石は菌体成分と結晶成分から構成され、IL-1 $\beta$ 、IL-18 前駆体の産生を誘導するだけでなく、成熟型へ変換する作用をもつ。本研究では、歯石自体の結晶成分により NLRP3 インフラマソームが活性化されることに着目し、歯石刺激によって産生されるサイトカインの歯槽骨吸収への影響を解析することとした。

小動物であるラットを動物実験モデルとして用いて、人工歯石としてハイドロキシアパタイト微粒子を歯肉溝に投与し、歯槽骨吸収および歯周組織破壊へ及ぼす影響を明らかにすることにした。人工歯石が歯槽骨を含む歯周組織に与える影響を解明できれば、歯石の歯周病治療における位置づけを再考し、歯周病の診断や治療への新しい戦略を開発することが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯石刺激後のマウスマクロファージ培養上清中のサイトカイン濃度測定

長崎大学病院歯科保存治療室に来院した歯周炎患者から、説明して同意を取得した後に歯石を採取し、採取した歯石を粉碎後に 48  $\mu$ m のナイロンメッシュで微粒子のみを選別をした。この歯石微粒子で野生型 (WT) マウスマクロファージおよび NLRP3 欠損型マウス由来マクロファージを刺激し、産生される炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ 、IL-18 および抗炎症性サイトカイン IL-10 を ELISA 法で測定した。

#### (2) 人工歯石投与ラット歯周炎モデルの作製とマイクロ CT 解析

Lewis 系雄性ラットの上顎第二臼歯に 4-0 絹糸を結紮し、上顎右側の実験側には人工歯石として直径 2  $\mu$ m 以下のハイドロキシアパタイト結晶を 500  $\mu$ g/ml の濃度でヒドロキシメチルセルロースに懸濁し、7 回または 14 回投与した。上顎左側のコントロール側には、同様な方法で溶媒のみを滴下した。各群 5 匹のラットを使用し、8 日目と 15 日目に屠殺した。屠殺後に、第二臼歯の近心根、分岐部、遠心根の 3 部位の歯槽骨レベルをマイクロ CT で計測した。頬側と口蓋側のセメントエナメル境を結ぶ仮想平面を設定し、口蓋側の仮想平面から歯槽骨頂までの距離を CEJ-ABC とし、骨欠損底部までの距離を CEJ-ABR とし、骨吸収量を実験群とコントロール群で比較した。

#### (3) 人工歯石投与ラット歯周炎モデルの病理組織学的解析

人工歯石投与後の実験群およびコントロール群の上顎を採取し、固定・脱灰後、上顎第二臼歯の連続切片を作製し、作製した各群の標本にヘマトキシリン・エオジン染色および酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い、口蓋側における破骨細胞の出現率を計測した。TRAP 陽性細胞率の計測は、マイクロ CT で観察したのと同じ 3 部位についてグリッドレンズを用い、歯槽骨頂から根尖までに観察された 3 核以上の TRAP 陽性細胞数をその距離で割ることにより計算した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯石刺激後のマウスマクロファージによる IL-1、IL-18、IL-10 産生

歯石刺激後の WT マウスマクロファージは、歯石の濃度依存的に IL-1 を産生したが、NLRP3 欠損型マウスマクロファージは IL-1 を産生しなかった(図1)。また、WT マウスマクロファージは歯石の濃度依存的に IL-18 を産生し、NLRP3 欠損型マウスマクロファージも IL-18 を産生したが、NLRP3 欠損型マウスマクロファージでは歯石の濃度依存的な産生量の増加はみられなかった。WT および NLRP3 欠損型マウスマクロファージは、いずれも歯石の濃度依存的に IL-10 を産生した。即ち、IL-1、IL-18 の産生は NLRP3 依存的であったが、IL-10 の産生は NLRP3 非依存的であった。

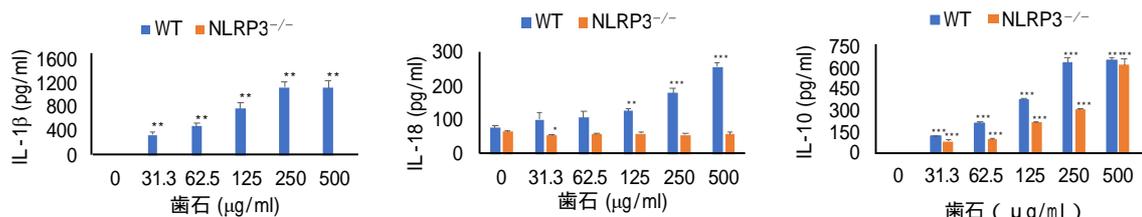


図1. 歯石刺激後のマウスマクロファージ培養上清中の IL-1、IL-18、IL-10 濃度

##### (2) 人工歯石投与ラット歯周炎モデルのマイクロCT解析

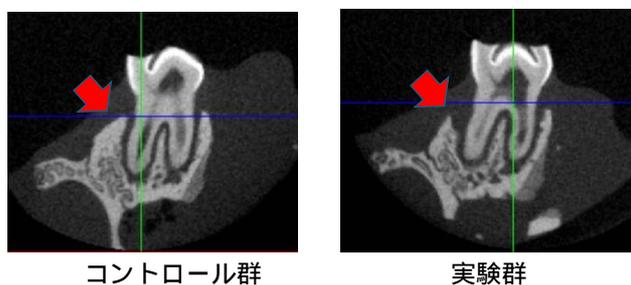


図2. ラット歯周炎モデルにおける人工歯石投与群とコントロール群のマイクロCT像の比較

ラット上顎第二臼歯に絹糸を結紮して14日目のコントロール群では、マイクロCT像において骨の吸収が軽微であったのに対し、実験群では垂直性の骨吸収像を認めた(図2)。CEJ-ABC間の距離計測では、MR・FA・DR部の全てでコントロール群と実験群の有意差は認められなかった。CEJ-ABR間の距離計測では、MR部でのみ実験群がコントロール群に比べて有意に大きな値を示した。

##### (3) 人工歯石投与ラット歯周炎モデルの病理組織学的解析

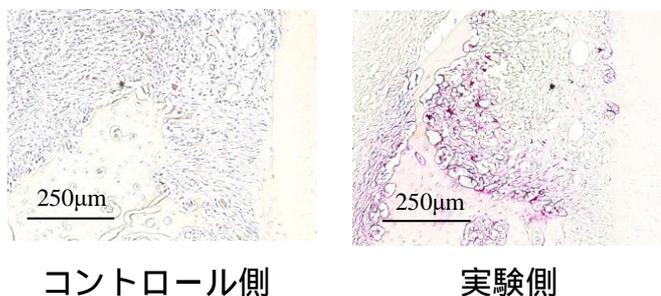


図3. ラット歯周炎モデルにおける人工歯石投与群とコントロール群のTRAP染色像の比較

ラット上顎第二臼歯に絹糸を結紮して14日目のコントロール群では、HE染色像において結合組織の炎症性細胞浸潤は軽度で、ほとんど骨吸収は認められなかった。一方、人工歯石を投与した実験群では顕著な歯槽骨の吸収がみられ、その付近に炎症性細胞浸潤と空胞変性がみられた。TRAP染色像において3核以上のTRAP陽性細胞率を7回投与群、14回投与群共にコントロール群に対して実験群でTRAP陽性細胞率が多い傾向にあり、分岐部FAでは有意差が認められた(図3)。

上記(1)~(3)の結果から、歯石で刺激されたマクロファージは NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 および IL-18 を産生し、これらのサイトカインは人工歯石投与ラット歯周炎モデルにおいて歯槽骨吸収を促進していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita Yasunori, Mae Megumi, Oohira Masayuki, Ozaki Yukio, Ohba Seigo, Asahina Izumi, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Clinical Efficacy and Safety of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Residual Periodontal Pockets during the Maintenance Phase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 924 ~ 924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph15080924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ziauddin S.M., Alam Mohammad Ibtehad, Mae Megumi, Oohira Masayuki, Higuchi Kanako, Yamashita Yasunori, Ozaki Yukio, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 93
2. 論文標題 Cytotoxic effects of dental calculus particles and freeze dried Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Fusobacterium nucleatum on HSC 2 oral epithelial cells and THP 1 macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 e92-e103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.21-0196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Alam Mohammad Ibtehad, Mae Megumi, Farhana Fatima, Oohira Masayuki, Yamashita Yasunori, Ozaki Yukio, Sakai Eiko, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 NLRP3 Inflammasome Negatively Regulates RANKL-Induced Osteoclastogenesis of Mouse Bone Marrow Macrophages but Positively Regulates It in the Presence of Lipopolysaccharides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6096 ~ 6096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23116096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasunori Yamashita, Megumi Mae, Masayuki Oohira, Yukio Ozaki, Atsutoshi Yoshimura
2. 発表標題 Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy in the periodontal maintenance phase
3. 学会等名 第108回アメリカ歯周病学会共催日本臨床歯周病学会・日本歯周病学会2022年大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Megumi Mae, Mohammad Ibtehaz Alam, Yasunori Yamashita, Yukio Ozaki, Masayuki Oohira, Atsutoshi Yoshimura
2. 発表標題 Osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic cytokines induced by dental calculus
3. 学会等名 第108回アメリカ歯周病学会共催日本臨床歯周病学会・日本歯周病学会2022年大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前 めぐみ, Alam Mohammad Ibtehaz, 吉村 篤利
2. 発表標題 歯石刺激後のマウスマクロファージによりNLRP3インフラマソームを介して産生されるIL-1 およびIL-18が破骨細胞形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学歯学部ホームページ <a href="http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_perio.html">http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_perio.html</a>
--

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

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