

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792513

研究課題名（和文） 歯周病予防としてのトレハロース摂取の有効性の検討

研究課題名（英文） Investigation of trehalose consumption to prevent periodontitis

研究代表者

遠藤 康正（ENDO YASUMASA）

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：50580213

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラット歯周炎モデルにおいて、トレハロースが破骨細胞分化に与える影響を調査した。その結果、トレハロースは、破骨細胞産生経路の一つである Toll 様受容体を介した PKC/ERK 経路を抑制することにより、歯槽骨における破骨細胞分化を抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the preventive effects of trehalose on osteoclast differentiation in ligature-induced periodontitis in rats. As a result, trehalose could suppress osteoclast differentiation in alveolar bone via inactivation of TLR4 and PKC/ERK pathway in the rat periodontitis model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：予防歯科学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：動物実験、破骨細胞、歯周炎、トレハロース

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯槽骨の吸収を伴う炎症性疾患である。研究開始当時、天然糖質であるトレハロースに骨吸収抑制作用、抗炎症作用、および抗酸化作用があることが明らかになっていた。したがって、トレハロースの摂取は、歯周病の進行を抑制する可能性があった。しかし、歯周組織の炎症に対するトレハロースの効果を検討した研究はなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット歯周病モデルを用いてトレハロース摂取による歯周組織への影響

を組織学的・分子生物学的に検証することであった。

## 3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラット 24 匹を 6 匹ずつ、対照群 (No treatment: NT 群)、Vehicle 群 (V 群)、30mg/ml トレハロース群 (T30 群)、60mg/ml トレハロース群 (T60 群) の 4 群に分けた。実験期間は 2 週間とした。NT 群に対しては、通常飼育のみを行った。他の 3 群では、上顎両側第二臼歯歯頸部に絹糸を結紮し、実験的歯周炎を惹起させた。結紮の翌日から、これ

ら3群のラットの歯肉溝に、蒸留水 (V 群)、30mg/ml トレハロース水溶液 (T30 群)、60mg/ml トレハロース水溶液 (T60 群) を1日1回、週5回の頻度でそれぞれ塗布した。1回の処置につき、5 $\mu$ l を5分間隔で計3回塗布した。塗布後は乾燥綿球にて余剰の溶液を除去した。実験期間終了後、上顎右側歯周組織の組織標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、歯肉結合組織中の多核好中球数を計測した。また、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)免疫染色及び tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行い、歯槽骨表面の RANKL 陽性細胞数、TRAP 陽性破骨細胞数を計測した。さらに、グラム陰性菌の内毒素である lipopolysaccharide (LPS) の構造の一部である lipidA の歯肉における発現を、免疫染色にて確認した。上顎左側歯肉からは遺伝子及びタンパクをそれぞれ抽出した。遺伝子発現の分析には逆転写リアルタイム PCR 法を用い、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、RANKL、toll 様受容体 (TLR)4 の発現量を求めた。タンパク発現の分析にはウェスタンブロット法を用い、RANKL 産生経路に関連するタンパクである TLR4、myeloid differentiation factor (MyD)88、protein kinase C (PKC)、リン酸化 PKC、extracellular signal regulated kinase (ERK)、リン酸化 ERK の発現量を求めた。

#### 4. 研究成果

V 群の歯周組織では、多核好中球数、RANKL 陽性細胞数、及び TRAP 陽性破骨細胞数が NT 群よりも有意に多かった。一方、T30 群と T60 群の多核好中球数、RANKL 陽性細胞数、及び TRAP 陽性破骨細胞数は、いずれも V 群と比べて有意に少ない値を示した。T30 群と T60 群との間に有意差は認められなかった (表 1、

図 1、2)。

	NT群	V群	T30群	T60群
多核好中球数 (個/0.05mm $\times$ 0.1mm)	1.5 $\pm$ 0.5	5.1 $\pm$ 0.6*	2.9 $\pm$ 1.3 <sup>†</sup>	2.2 $\pm$ 0.7 <sup>†</sup>
RANKL陽性細胞数 (個/mm)	7.1 $\pm$ 2.2	17.7 $\pm$ 2.0*	11.1 $\pm$ 2.3 <sup>†</sup>	11.3 $\pm$ 1.1 <sup>†</sup>
TRAP陽性破骨細胞数 (個/mm)	0.6 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 1.1*	1.6 $\pm$ 0.9 <sup>†</sup>	1.1 $\pm$ 0.8 <sup>†</sup>

\* NT群との比較、p<0.05 (Tukey法)  
<sup>†</sup> V群との比較、p<0.05 (Tukey法)

表 1 組織学分析

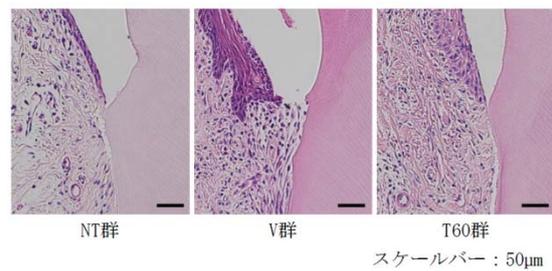


図 1 多核好中球組織像

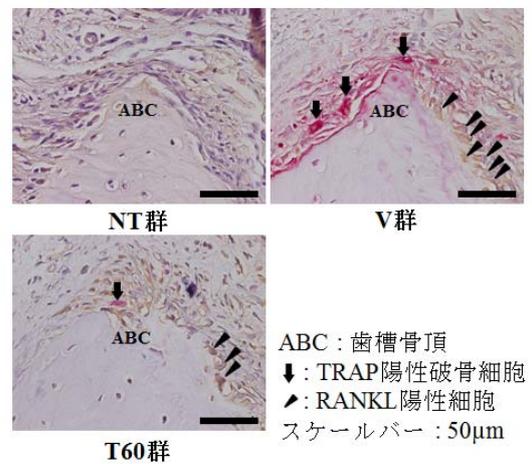


図 2 RANKL-TRAP 染色像

また、歯肉の lipidA の発現は、NT 群ではほとんど認められず、V 群、T60 群では同程度認められた (図 3)。

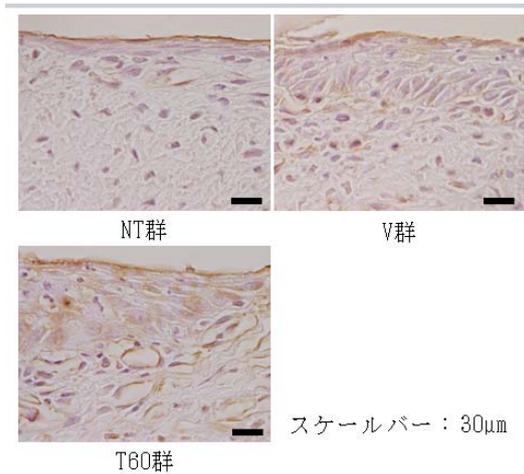


図3 lipidA 免疫染色像

TNF- $\alpha$ 、TLR4、RANKL の遺伝子発現の大きさは、V 群では NT 群と比較して有意に高かったが、T60 群では V 群よりも有意に低かった (図 4)。

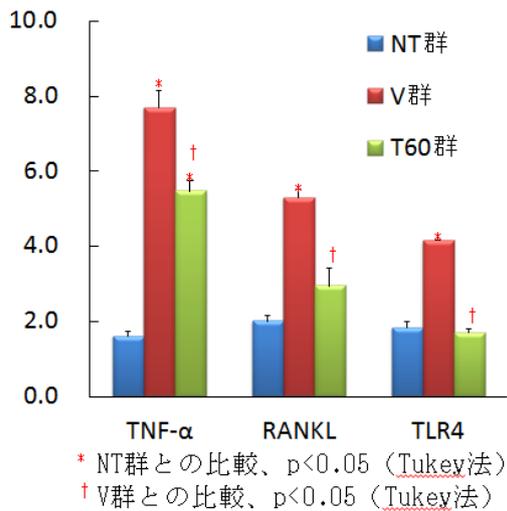


図4 歯肉の遺伝子発現

T60 群における TLR4、MyD88、リン酸化 PKC、リン酸化 ERK のタンパク質は V 群と比べて少なかった。PKC、ERK の発現は 2 群間で有意差は認められなかった (図 5)。

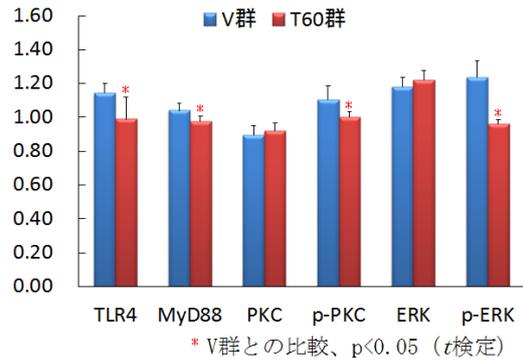


図5 歯肉のタンパク発現

絹糸結紮による歯周炎誘発状態において、トレハロースを塗布することにより、歯肉の多核好中球数や歯槽骨表面の TRAP 陽性破骨細胞数が減少した。さらに、歯肉における RANKL 発現もトレハロースにより抑制された。これらの結果から、トレハロース塗布により歯肉の炎症及び破骨細胞分化が抑制されたことが示唆された。ラット臼歯に絹糸を結紮することで、歯肉溝への細菌の凝集を引き起こす。今回のモデルにおいても、LPS は絹糸結紮モデル (V 群) の歯肉で増加した。しかし、トレハロースの塗布により歯肉における lipidA の発現は抑制されなかった。LipidA が LPS の構造の一部であることを考えると、トレハロースは LPS 産生に影響を与えなかったと思われる。一方、トレハロースの塗布により、TLR4 のタンパク及び遺伝子発現は減少した。過去の報告では、トレハロースは細胞膜の構造を安定化させることが示されている。ゆえに、トレハロースは TLR4 の発現を抑制し、口腔内細菌から産生された LPS と TLR4 との結合の頻度を減少させたことが示唆される。

以上のことから、ラット歯周炎モデルの歯周組織にトレハロースを塗布することにより、PKC/ERK 経路を介した破骨細胞分化が抑制されることが示唆された。

本研究の結果は、歯周炎による骨吸収の予防

にトレハロース塗布が有効であることを示唆するものであり、今後の予防歯科学の発展に寄与することが期待される。

#### 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 1 件)

- ① Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Irie K, Kasuyama K, Morita M, Preventive effects of trehalose on osteoclast differentiation in rat periodontitis model, Journal of Clinical Periodontology, 査読有、40巻、2013、33-40

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yasumasa Endo、Trehalose suppress osteoclast differentiation on alveolar bone through inactivation of PKC/ERK pathway in rat periodontitis model、American Academy of Periodontology 98<sup>th</sup> Annual Meeting、2012年9月29日～10月2日、アメリカ、ロサンゼルス
- ② Yasumasa Endo、Trehalose suppresses osteoclast differentiation in rat periodontitis、91th General Session & Exhibition of the IADR、2012年6月20日～23日、ブラジル、イグアス

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 康正 (ENDO YASUMASA)  
岡山大学・岡山大学病院・医員  
研究者番号：50580213

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者