

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870843

研究課題名(和文)好中球エラスターゼ阻害剤を歯周病治療薬として用いる基礎的研究

研究課題名(英文)Elementary research for making use of the inhibitor of neutrophil elastase as periodontal disease treatment.

研究代表者

氏家 優子(UJIE, Yuko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：60588599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は歯を支えている歯周組織(歯肉、歯根膜、歯槽骨、セメント質)に炎症が及ぶ疾患である。本研究では歯周病の特徴である歯槽骨の吸収を抑える因子として、好中球エラスターゼ阻害剤に着目した。これまでに好中球エラスターゼがまず始めに歯根膜のコラーゲン線維間基質である糖タンパク質を破壊し、これにより歯根膜の破壊が進行することを示してきた。

本研究では、好中球エラスターゼが歯根膜のみではなく、組織学的に歯根膜に隣接している歯槽骨の破壊にも同時に影響していることを調べ、それが好中球エラスターゼの阻害剤によって抑制されていることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is extending inflammation to the periodontal tissue: gingival tissue, periodontal ligaments, alveolar bone, cementum. In this project, the inhibitor of neutrophil elastase (NE) is focused on its function that is one of the factor of suppressive alveolar bone loss. Previously, it has demonstrated the NE resolved the glycoprotein, existing a substrate among collagen fibers firstly. Then, degradation of periodontal ligament is progressing.

In this experiment, it is histologically examined that NE affects not only the degradation of periodontal ligament but also, alveolar bone which is adjacent to periodontal ligaments. For that reason, the effects of the NE investigated using the inhibitor of neutrophil elastase (Sivelestat). As result, the Sivelestat group recovered the number of osteoclasts which is surrounding of periodontal pocket compare with the group of without Sivelestat. Therefore, it is suggested that Sivelestat suppressive acts on alveolar bone loss.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周病 好中球エラスターゼ 破骨細胞 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病における歯周組織中の歯根膜の破壊に關与するプロテアーゼには MMP-1, MMP-3, MMP-9 があると報告されていた。しかし、これらのプロテアーゼは歯根膜中のコラーゲン線維の分解に關連するものであった。

(2) 歯周病罹患患者の歯根膜から検出された好中球エラスターゼが唯一の歯根膜の線維間基質(糖タンパク質)を分解するプロテアーゼである。

(3) この好中球エラスターゼで処理した歯根膜では機械的強度の低下が認められた。

(4) 好中球エラスターゼが破骨細胞の分化に關与するという報告は認められない。

2. 研究の目的

(1) 歯周病原菌の感染によって浸潤した好中球から放出される好中球エラスターゼが歯根膜細胞に及ぼす影響を調べる。

(2) 好中球エラスターゼの阻害剤であるシベレスタットが歯根膜細胞に与える影響を調べる。

(3) 慢性歯周病モデルにおける好中球エラスターゼの作用と阻害剤の効果を調べ、好中球エラスターゼ阻害剤に着目した歯周病治療薬として臨床応用できる可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) シベレスタットが骨吸収に与える影響について調べる。

シベレスタットがマウスマクロファージの細胞活性を抑制していないか MTT アッセイにて調べた。

マウスマクロファージの細胞培養上清に、RANKL を添加して破骨細胞への分化を誘導する。シベレスタットがマクロファージから破骨細胞への分化に影響を及ぼすかどうか TRAP 染色と TRAP アッセイを用いて調べる。マウスマクロファージの細胞培養上清

に RANKL のみ、もしくは RANKL とシベレスタットを両方添加し、細胞から RNA を抽出し、テンプレートを作製し、PCR にて mRNA の発現を調べる。

(2) 慢性歯周病マウスの作製

歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) を Brain-Heart Infusion Broth (BHI) で嫌気培養をして実験に使用するにあたり、十分な量を確保する。*Pg* 菌を口腔内に付与しやすいように、2% Carboxymethylcellulose (CMC) と生菌 *Pg* 10⁹ colony-forming units/ 100 μL

PBS を混ぜ合わせてゲル状にした。以下この *Pg* 菌を *Pg*-CMC と呼ぶ。シルク糸で C57 BL/6 マウスの上顎第二大臼歯を結紮。同日に *Pg*-CMC を口腔内に付与して歯周病を引き起こす。この *Pg*-CMC の付与は 1 日おきに行った。*Pg*-CMC の付与開始から 10 日目に屠殺した。

4%パラホルムアルデヒド固定液にて頭蓋を固定し、マイクロ CT 撮影をおこなった。

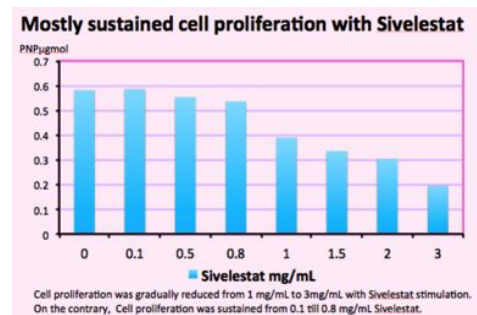
(3) ラット慢性歯周病モデルにおける、好中球エラスターゼ阻害剤(シベレスタット)の影響を調べる。

In Vivo でシベレスタットを注入した浸透圧ポンプ(ALZET ポンプ)に充填され、カテーテルを通じて頸静脈から体内に取り込まれた。このポンプから流速 0.25 μL/hrs の割合でシベレスタットが静脈内に供給された。

2 日おきに *Pg*-CMC を口腔内に付与し、10 日後に屠殺した。その後 H-E 染色において組織学的観察を行った。

4. 研究成果

(1) マウスマクロファージの細胞培養に対するシベレスタットの影響
細胞増殖活性の変動

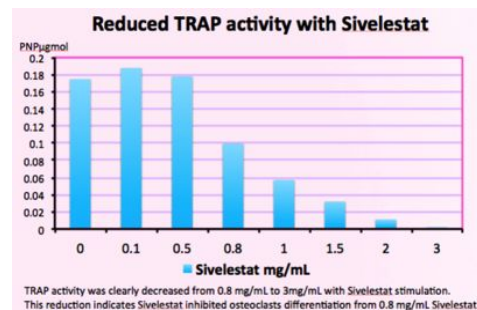


シベレスタット濃度 1 ~ 3 mg/mL では濃度依存的に細胞増殖活性の減少が認められる。

破骨細胞分化に対する TRAP 活性への影響

マウスマクロファージを RANKL で刺激し、破骨細胞に分化させる際にシベレスタットを培養上清に添加。

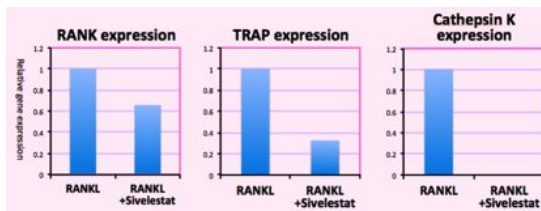
TRAP assay においてシベレスタット濃度依存的に破骨細胞への分化が抑制された。



破骨細胞分化に対する TRAP 染色における影響
シベレスタット濃度依存的に多核の破骨細胞数が減少した。つまり、マクロファージから破骨細胞への分化が抑制されたと考えられる。

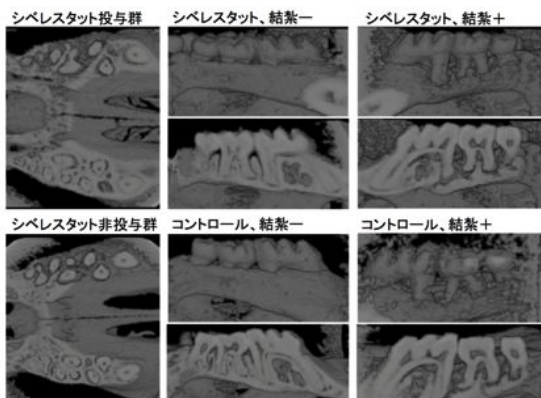


破骨細胞への分化を示す因子の遺伝子発現
破骨細胞への分化に必要な RANKL をマクロファージの細胞培養上清に添加した群とさらにそれにシベレスタットを加えた群とを比較した。破骨細胞の細胞膜上に存在する RANK、また破骨細胞に分化する時に認められる TRAP とカテプシン K、これら 3 つの mRNA 発現はいずれもシベレスタット添加により減少していた。

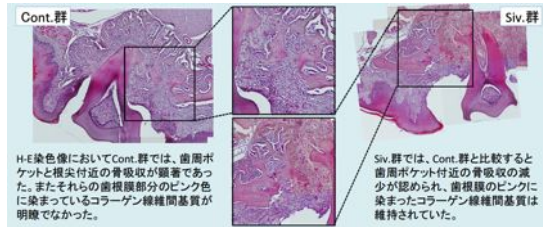


(2) マウス動物実験における歯周病モデルを用いたシベレスタットの影響を検討

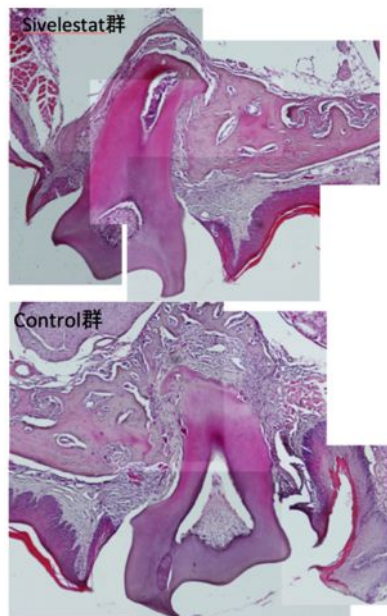
マウス歯周病モデルにおけるマイクロ CT による歯槽骨吸収
マイクロ CT においてシベレスタット投与群と非投与群では骨の吸収に差はないように見られた。



H-E 染色における歯根膜の形態的観察
H-E 染色においては、第二大臼歯根尖付近の歯根膜の線維間基質の分解はシベレスタット非投与群の方がシベレスタット投与群に比べて進んでいた。

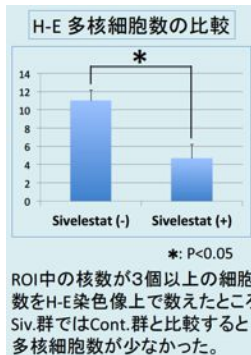


H-E 染色における歯槽骨の形態的観察
肉眼的観察によると、根尖付近の歯槽骨においては、シベレスタット投与群の歯槽骨の吸収が、コントロール群と比較すると進行していなかった。



歯槽骨内の破骨細胞数の観察

上記に記した図中に点線に囲まれた部位 (ROI) 中に存在する多核の H-E 染色に染まった破骨細胞数を数え、シベレスタット群とコントロール群と比較した。シベレスタット群では破骨細胞数がコントロール群よりも少なかった。



ROI中の核数が3個以上の細胞数をH-E染色像上で数えたところSiv.群ではCont.群と比較すると多核細胞数が少なかった。

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)

[学会発表](計 2 件)

氏家 優子、島田 明美、小松 浩一郎、
大島 朋子、二藤 彰、大井田 新一郎、
五味 一博、好中球エラスターゼ阻害剤
が実験的マウス歯周病の歯周組織に及
ぼす影響、日本歯周病学会、2015 年 09
月 12 日～09 月 13 日、アクトシティー浜
松（静岡件浜松市）

Yuko UJIIE, Takeo Karakida,
Shinichiro Oida, Kazuhiro Gomi, The
effects of Neutrophil elastase on
osteoclastogenesis. American Academy
of Periodontology, 2014 年 09 月 19 日
～09 月 22 日、Moscone center, San
Francisco, CA, USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

氏家 優子 (UJIIE Yuko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：60588599