

氏	草野弘揮
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3120 号
学位授与の日付	平成18年3月24日
学位授与の要件	医歯学総合研究科社会環境生命科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	高コレステロール食ラットの歯槽骨吸収におけるRANKLの発現

論文審査委員 教授 高柴 正悟 助教授 久保田聡 教授 渡邊 達夫

学位論文内容の要旨

【緒言】

高コレステロール食を与えたラットでは歯槽骨吸収が起こる。骨吸収の機序として、receptor-activator of nuclear factor κ B (RANK) ligand (RANKL)を介する経路や、interleukin (IL)-1 β および tumor necrosis factor (TNF)- α といった炎症性サイトカインを介する経路などが知られているが、高コレステロール食の摂取によってどのような機序で歯槽骨吸収が起こるのかは不明である。本研究では、高コレステロール食による歯槽骨吸収に、どのような経路が関与しているかを免疫組織化学的に検討することを目的とした。

【材料および方法】

1. 実験動物とグループ分け

実験動物として、8週齢のウィスター系雄性ラット60匹を使用した。高コレステロール食群には高コレステロール食、対照群には標準食を食餌として与えた。実験期間は4, 8, 12週とした。

2. 血清脂質の分析

実験期間終了後、全身麻酔下でラットを開胸し、心臓より採血した。得られた血液を遠心して血清を分離した。E-テストキット(和光, 大阪)を用いて、総コレステロール、high-density lipoprotein (HDL)-コレステロールおよび中性脂肪の濃度を測定した。

3. 標本作製

採血後、4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて還流固定を行った。顎骨を摘出し、同溶液で一晩浸漬固定した後、10%EDTA溶液で脱灰し、アルコール系列により脱水し、パラフィン包埋した。上顎第一臼歯の連続切片を頬舌的に4 μ m厚で作製し、抗IL-1 β および抗TNF- α モノクローナル抗体を用いた免疫染色を行った。また、抗RANKLポリクローナル抗体による免疫染色にtartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)染色を併せた二重染色も行った。

4. 組織定量分析

接眼レンズにマイクロメーターを装着した光学顕微鏡を用いて、組織標本の定量分析を行った。セメント-エナメル境(CEJ)から歯槽骨頂までの距離を歯軸と平行に計測した。歯槽骨表面のTRAP陽性破骨細胞と、RANKL, IL-1 β , TNF- α 陽性および総骨芽細胞は、単位長さ(1mm)当たりの個数を計数した。歯根膜におけるIL-1 β およびTNF- α 陽性線維芽細胞は単位面積(0.1mm \times 0.1mm)当たりの個数を計数した。

5. 統計分析

すべての測定値について、ラットごとに平均値を求めた。各実験期間において、群間の比較にはMann-Whitney U-testを行った。

【結果】

1. 血清脂質の分析

高コレステロール食群では、血清総コレステロール濃度が実験期間を通して対照群よりも約3

倍高い値となり、HDL-コレステロール濃度は8および12週で対照群よりも低くなった。また、高コレステロール食群における中性脂肪濃度は、8週と12週で対照群よりも高い値を示した。

2. 組織定量分析

高コレステロール食群では、CEJから歯槽骨頂までの距離が8週目と12週目で対照群よりも大きくなり、RANKL陽性骨芽細胞は実験期間を通して対照群よりも多くなった。また、高コレステロール食群では、TRAP陽性破骨細胞数が経時的に増加して12週目では有意差も見られたが、IL-1 β およびTNF- α 陽性細胞数は対照群と比べ、ほとんど差はなかった。

【考察】

高コレステロール食群では、総コレステロール濃度は対照群の約3倍となり、CEJから歯槽骨頂までの距離は8週目から差が見られ、過去の報告とも一致していた。これらのことから、高コレステロール食の摂取は、高コレステロール血症を誘発し、歯槽骨吸収を引き起こすことが考えられる。

高コレステロール食を与えたラットではRANKL陽性骨芽細胞およびTRAP陽性破骨細胞が増加したが、IL-1 β およびTNF- α 陽性細胞数は実験期間中、対照群との間に差が見られなかった。これらのことから、高コレステロール血症による歯槽骨吸収には、骨芽細胞におけるRANKL発現の促進と、それを介する破骨細胞の分化および活性化が影響していると考えられる。しかし、TRAP陽性の破骨細胞の増加に先行して歯槽骨吸収が見られていることから、RANKLは最初に破骨細胞の活性化を促進し、遅れて分化を促進したものと推測される。また、高コレステロール食による歯槽骨吸収の過程において、炎症性サイトカインの影響は小さいものと考えられる。

【結論】

高コレステロール食を与えたラットにおいて、歯槽骨の吸収経路について検討した結果、高コレステロール血症が誘発され、歯槽骨吸収が起こることを確認した。これには高コレステロール血症になったことにより、骨芽細胞におけるRANKLの発現を介する破骨細胞の活性化の影響が考えられ、IL-1 β やTNF- α などの炎症性サイトカインによる経路は関与していない可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

高コレステロール食を与えると歯槽骨吸収が起こることが明らかになっているが、その機序には不明な点が多い。骨吸収の起こる機序として、receptor-activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) を介する経路、および炎症性サイトカインである IL-1 β や TNF- α を介する経路などが知られている。そこで本研究では、高コレステロール食を摂取させたラットの歯槽骨吸収の機序を知るために、歯周組織における RANKL およびサイトカインの発現について検討することとした。

ラットを、標準食群と高コレステロール食群の2群に分けた。実験開始後の4, 8, 12週目に採血して血清を分離し、総コレステロール, HDL-コレステロール, および中性脂肪の濃度を分析した。また、上顎第一臼歯の歯周組織を採取して組織切片を作製し、抗IL-1 β 抗体あるいは抗TNF- α 抗体を用いた免疫染色, そして抗RANKL抗体を用いた免疫染色に tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を併せた二重染色を行った。光学顕微鏡を用いて、セメント-エナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定し、歯槽骨表面のTRAP陽性破骨細胞と、RANKL, IL-1 β , およびTNF- α 陽性骨芽細胞, さらに歯根膜におけるIL-1 β およびTNF- α 陽性線維芽細胞を計数した。

高コレステロール食群では、血清総コレステロール濃度が対照群の3倍程度高くなり、中性脂肪濃度も有意に高くなった。このことは、高コレステロール食によって高コレステロール血症が起こることを示している。なお、血清HDL-コレステロール濃度は高コレステロール食群において低下した。

高コレステロール食群では対照群と比較して、セメント-エナメル境から歯槽骨頂までの距離が8週目から増加し、歯槽骨吸収が見られた。また、歯槽骨表面のRANKL陽性骨芽細胞数が実験期間を通して増加し、TRAP陽性破骨細胞数の経時的な増加も見られた。しかし、IL-1 β およびTNF- α 陽性の骨芽細胞と線維芽細胞の数は、ほとんど変化しなかった。

本研究は、高コレステロール食を与えたラットの歯周組織において、歯槽骨吸収が起こる際に歯槽骨の吸収部位において、RANKL陽性の骨芽細胞数が増加することとTRAP陽性の破骨細胞数が増加することが共存していること、しかし同部位には炎症性サイトカインの発現に変化がないことを明らかにしている。これらの結果は、高コレステロール食の摂取による歯槽骨吸収には、RANKLの発現が影響しているのであって、炎症性サイトカインはほとんど関与しないことを示している。本研究結果は、高コレステロール血症を伴う歯周炎の発症と進行の機序を理解するための足掛かりとなる重要な知見である。したがって、本論文は博士(歯学)の学位を授与する価値があるものと認めた。