

氏名	遠藤 康正
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4717号
学位授与の日付	平成25年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	Preventive effects of trehalose on osteoclast differentiation in rat periodontitis model (ラット歯周炎モデルにおける、トレハロースの破骨細胞分化抑制作用)
学位論文審査委員	高柴 正悟 教授                      大原 直也 教授 森田 学 教授

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

歯周炎は、歯肉の炎症及び歯槽骨吸収を伴う慢性炎症性疾患である。骨吸収において主たる役割を担っているのは破骨細胞である。Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)は、破骨細胞形成の過程において重要なメディエーターである。RANKLは骨芽細胞を含む種々の細胞に発現しており、破骨細胞前駆細胞表面に存在する receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK)と結合し、破骨細胞の分化を引き起こす。RANKL産生を促進する因子の一つに、lipopolysaccharide (LPS)が挙げられる。LPSはグラム陰性菌の内毒素であり、骨芽細胞の細胞膜に存在する toll-like receptor (TLR) 4 と結合する。さらに、TLR4が活性化すると、その下位に存在する myeloid differentiation factor 88 (MyD88)、protein kinase C (PKC)、extracellular signal regulated kinase (ERK) を介する経路 (PKC/ERK経路) にシグナルが伝達され、RANKLが産生される。したがって、LPSとTLR4の結合を阻害できれば、PKC/ERK経路によるRANKL産生が抑制され、結果として破骨細胞の分化が抑えられると期待される。

トレハロースは、グルコース2分子が $\alpha$ -1,1結合した二糖類である。近年、トレハロースには、病的な骨吸収を抑制する効果があることが示唆されている。しかし、トレハロースが、歯肉の炎症組織において、LPSとTLR4との結合やそれに伴うRANKLの産生にどのような効果を示すのかは不明である。本研究では、ラット歯周炎モデルを用いて、トレハロースの破骨細胞分化に与える影響を、組織学的、生化学的に検討した。

#### 【方法】

Wistar系雄性ラット24匹を6匹ずつ、① 対照群 (No treatment : NT群)、② Vehicle群 (V群)、③ 30mg/mlトレハロース塗布群 (T30群)、および④ 60mg/mlトレハロース塗布群 (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)、もしくは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、RANKL免疫染色及び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。また、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、TLR4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、TLR4、MyD88、PKC、リン酸化PKC (p-PKC)、ERK、リン酸化ERK (p-ERK)の発現量を求めた。組織学分析、遺伝子分析の群間比較には一元配置分散分析とTukey法を、タンパク分析については検定をそれぞれ用い、群間比較を行った。

#### 【結果】

V群の歯周組織では、多核好中球数、RANKL陽性細胞数、および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、および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。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。

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。

T60群におけるTLR4、MyD88、p-PKC、p-ERKのタンパク発現量はV群と比べて少なかった。PKC、ERKの発現量は2群間で有意差は認められなかった。

#### 【考察】

過去の研究では、ラット臼歯歯頸部に絹糸を結紮することで実験的歯周炎が惹起されることが示されている。本研究においても、V群の多核好中球数とTRAP陽性破骨細胞数がNT群と比較して有意に多かったという結果が得られ、絹糸結紮により実験的歯周炎が惹起されたことが示された。このような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(T60群)。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。

MyD88は、PKC/ERK経路のみではなく、炎症性サイトカイン産生も促進することが報告されている。今回、トレハロースはTNF- $\alpha$ の遺伝子発現を抑制した。TNF- $\alpha$ は直接的及び間接的に破骨細胞の分化を促進する。したがって、トレハロースによる破骨細胞分化抑制作用においては、PKC/ERK経路の不活性化に加えて炎症性サイトカインの抑制も一役を担っている可能性がある。

本研究では破骨細胞の分化について分析したが、実際の骨吸収の程度については分析していない。また、今回の実験期間は2週間という短期間であった。今後は、より長期間にわたる実験を実施し、実際にトレハロースに骨吸収を抑制する効果があるか否かを検討する必要がある。

#### 【結論】

ラット歯周炎モデルにおいて、トレハロースには、TLR4およびPKC/ERK経路を不活性化し、破骨細胞の分化を抑制する作用があることが示唆された。

## 学位論文審査結果の要旨

近年、トレハロースには病的な骨吸収を抑制する効果があることが示唆されている。しかし、トレハロースが、歯肉の炎症組織において、lipopolysaccharide (LPS) と toll-like receptor (TLR) 4 との結合やそれに伴う receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) の産生にどのような効果を示すのかは不明である。本研究では、ラット歯周炎モデルを用いて、トレハロースの破骨細胞分化に与える影響を、組織学的、生化学的に検討した。

Wistar 系雄性ラット 24 匹を 6 匹ずつ、対照群 (No treatment : NT 群) , 溶媒の蒸留水を用いた Vehicle 群 (V 群) , 30mg/ml トレハロース水溶液塗布群 (T30 群) , および 60mg/ml トレハロース水溶液塗布群 (T60 群) の 4 群に分けた。NT 群は通常飼育のみを行った。他の 3 群では、上顎両側第二臼歯の歯肉溝に絹糸を結紮し、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、それぞれの水溶液を 1 日 1 回 (1 回の処置につき 5 $\mu$ l を 5 分ごとに 3 回塗布) , 週 5 日の頻度で塗布した。その結果、V 群の歯周組織では、多核白血球数、RANKL 陽性細胞数、および 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 群では、これらの細胞数は、いずれも V 群よりも有意に少なかった。T30 群と T60 群との間に有意差はなかった。*Tnf- $\alpha$* 、*Tlr4*、そして *Rankl* の発現程度は、V 群では NT 群と比較して有意に高く、T60 群では V 群よりも有意に低かった。T60 群における TLR4、myeloid differentiation factor 88 (MyD88) , phosphorylated protein kinase C (p-PKC) , そして phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) の発現量は、V 群と比べて少なかった。PKC と ERK の発現量は、T60 群と V 群との間で有意差はなかった。

以上のことから、ラット歯周炎モデルにおいて、トレハロースは破骨細胞の分化を抑制し、その機序として PKC/ERK 経路の活性化抑制が関与することを示唆した。

本論文は、ラット実験的歯周炎における破骨細胞分化及びその機序の一部に対するトレハロース塗布の有効性を解明する上で重要な知見である。よって、論文審査担当者は一致して、本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。