

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

木村 文香

論文題目

歯周病モデルマウスに対する eIF2 α 脱リン酸化阻害
剤 (salubrinal) の効果

I. 緒言

近年、矯正歯科治療の多様化が認められ、成長期の小児患者だけでなく、成人患者も矯正歯科治療を多く希望している。しかし、年齢に相応し骨粗鬆症などの全身疾患を有していることが散見され、さらには歯周組織が脆弱化し、矯正治療時には歯周病の進行防止に注意が必要である。歯周病は、主に細菌感染によって引き起こされる歯周組織の炎症性疾患であり、破骨細胞の増加、骨芽細胞の減少、およびアタッチメントロスにつながる。また歯周病によって産生されるサイトカインは、歯周病の重症度と相関することが知られている。歯周病は世界中の多くの成人に影響を及ぼし、成人の歯の喪失の最大の原因であるため、予防と治療は重要である。

歯周病の治療には、ブラッシング、スケーリング・ルートプレーニング (SRP)、歯周外科、薬物療法などがある。この中でも SRP は、通常基本的な治療として行われている。しかし、SRP の治療効果は主に術者の技量に依存し、歯周ポケットの深部に生息する細菌を完全に除去することは困難である。そのため、抗菌薬を治療と組み合わせて使用することが多く、その一つにミノサイクリン塩酸塩等の抗生物質の投与があげられる。これらの薬は局所における炎症を抑え、その結果破骨細胞の抑制を期待するものであり、破骨細胞に直接作用して骨吸収を防止又は抑制するものではないことから、破骨細胞に直接作用する薬が新たに開発されれば画期的な治療となる。

近年、小胞体ストレスにより誘発されたアポトーシスから細胞を保護する化合物について約 19000 の化学物質がスクリーニングされ、salubrinal という物質が発見された。salubrinal は小胞体ストレスを軽減し、eIF2 α の脱リン酸化を阻害することによって、破骨細胞の分化を抑制することが報告されている。この salubrinal を骨形成不全症マウスに皮下投与したところ、骨量の改善が認められたとの報告から、salubrinal は骨吸収を抑制もしくは骨形成を促進することが考えられ、骨代謝に関係のある歯周病にも応用が利くのではないかと仮説を立てた。

そこで、今回本研究ではマウスに対し実験的に歯周病を発症させ、salubrinal を投与することで、破骨細胞分化を抑制し、歯槽骨の吸収の抑制が可能かどうかを検討することを目的とした。

II. 実験材料および方法

本研究の実験動物には、生後 8 週齢の雄性 WT マウスを使用した。

投与を 4 週間行う群 (4w)、投与を 8 週間行う群 (8w)、投与を 12 週間行う群 (12w) と定義した。そして、4w 群、8w 群、12w 群をそれぞれ 2 つの群に分け、salubrinal を投与しない群 (sal-)、salubrinal を投与する群 (sal+) とした。さらにマウスの口腔内の左側を結紮側 (ligated+) とし、右側はコントロールとして非結紮側 (ligated-) とした。

1) 4wC : 4w, ligated-, sal- 2) 4w- : 4w, ligated+, sal-

(論文内容の要旨)

No. 3

愛知学院大学

- 3) 4w+ : 4w, ligated+, sal+ 4) 8wC : 8w, ligated-, sal-
5) 8w- : 8w, ligated+, sal- 6) 8w+ : 8w, ligated+, sal+
7) 12wC : 12w, ligated-, sal- 8) 12w- : 12w, ligated+, sal-
9) 12w+ : 12w, ligated+, sal+

本研究では、上記 1)～9) で示す略語を使用する。

三種混合麻酔薬（塩酸メデトミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルフェノール）を腹腔内投与し、上顎左側第一臼歯、第二臼歯間のコンタクトポイントを囲むように 0.1mm 径のステンレス製リガチャーワイヤーを結紮することでフードインパクションを引き起こし、実験的歯周病モデルマウスの作製を行った。8 週齢のマウス (4w+, 8w+, 12w+) に対し、salubrinal (2mg/kg of weight) はポリエチレングリコール (PEG) を溶媒として溶解して投与した。

リガチャーワイヤーの結紮 3 日前より 1 日 1 回皮下投与し、対照群 (4wC, 4w-, 8wC, 8w-, 12wC, 12w-) には同量の PEG を投与した。リガチャーワイヤーの装着後 4、8、12 週間後に上顎骨を採取し、 μ CT にて撮影を行い、Park らの方法を一部改変し、上顎第一臼歯と上顎第二臼歯間のコンタクトポイントから各々の根尖の中の歯槽骨残存量を計測し、同部位の全体積に占める割合を歯槽骨残存率とした。摘出した上顎骨は、通法に従って固定、脱灰、パラフィン包埋を行い、5 μ m の近遠心方向の連続組織切片を作製した。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、第一臼歯遠心面のアタッチ

メントレベルの割合、第一臼歯と第二臼歯間の歯槽中隔部の歯槽突起部表面の骨芽細胞数 (Ob. N/BS (mm)) の計測を行った。本実験では、歯周病の重症度を示す指標としてアタッチメントレベルを用いることとし、アタッチメントレベルの割合が大きいことは、骨吸収が進行していることを示す。また TRAP 染色を行い、第一臼歯と第二臼歯間の歯槽中隔部の歯槽突起部表面の破骨細胞数 (Oc. N/BS (mm)) を計測した。さらに、炎症反応を観察する為、TNF- α 、IL-1 β を用い、局所における小胞体ストレスの程度を観察する為、C/EBP homologous protein (CHOP) による免疫染色を行い、Rogers らの方法に準じて染色強度を判定した。屠殺時に血液を採取し、血中 TRAP 値の測定を行った。統計的処理として、得られた実験データは平均値と標準誤差で示し、Shapiro-Wilk test にてデータの正規性を確認し、統計的な有意差検定は一元配置分散分析 (Turkey' s multiple comparison test) を用いた。P<0.05 を統計学的有意差ありと判断した。

Ⅲ. 結果

以下に本実験結果を示す。

1. 実験的歯周病モデルマウス作製実験について

コントロールと比較して、4、8、12 週後において歯槽骨残存率の減少、またアタッチメントレベルの割合の増加が認められた。また、経時的に歯周病が進行している所見も認められた。さらに、骨芽細胞数の減少、破骨

細胞数の増加、免疫染色における炎症性サイトカインのスコアの増加、小胞体ストレスマーカーの増加が認められた。

2. Salubrinal 皮下投与における影響

1) 骨代謝への影響について

Salubrinal 投与群は salubrinal 非投与群と比較して、有意な差をもって歯槽骨残存率の増加、アタッチメントレベルの割合の減少、骨芽細胞数の増加および破骨細胞数の減少が認められた。

2) 炎症への影響について

Salubrinal を投与することにより免疫染色における炎症性サイトカインのスコアの増加の抑制が認められた。

3) 小胞体ストレスへの影響について

免疫染色における小胞体ストレスマーカーのスコアの増加の抑制が認められた。

4) 全身への影響について

血中 TRAP 値を測定した結果、salubrinal 投与群は salubrinal 非投与群と比較して有意な差をもって減少した。

IV. 考察

本研究より、実験的に歯周病を作製したマウスにおいて、結紮側は、歯槽骨残存率の減少、アタッチメントレベルの割合の増加や破骨細胞数の増加が認められた。このことは、結紮線を結紮した歯槽骨は、骨代謝の balan

スが崩れ、骨吸収が惹起されたことを示す。一方、salubrinal の皮下投与を行ったところ、salubrinal を投与していないマウスと比較して、歯槽骨吸収の抑制、アタッチメントレベルの割合の減少、破骨細胞数の減少、骨芽細胞数の増加、免疫染色による炎症部位の染色スコアの減少および小胞体ストレスの染色スコアの減少が認められた。つまり、破骨細胞活性が活発化し、骨芽細胞活性が抑制されている脆弱化した歯周組織において、salubrinal 投与は歯槽骨吸収や炎症を抑制することにより、歯周病の進行を抑制し、骨代謝の恒常性が保たれ、画期的な歯周病予防、また治療法となる可能性が示唆された。

V. まとめ

本研究は、実験的歯周病モデルマウスの作製を行い、salubrinal の皮下投与を行うことで骨芽細胞や破骨細胞に作用し歯槽骨吸収の抑制が可能かどうかを検討することを目的とした。その結果、歯周病モデルマウスにおける salubrinal 投与において、骨芽細胞数および破骨細胞数をそれぞれ増加および減少させることを実証し、さらに結紮線により引き起こされる炎症性サイトカイン、小胞体ストレスを抑制した。以上より、salubrinal は歯周病に有益な効果がある可能性が示唆された。