

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 799 号	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 $\alpha$ 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（付着の喪失）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。破骨細胞や骨芽細胞等の骨代謝を制御する薬は、多々開発されており、ビスフォスフォネート (BP) 製剤、女性ホルモン製剤、PTH、デノスマブ製剤等があげられる。その中でも骨吸収を制御する代表的な薬剤である BP は、ピロリン酸の類似体で、体内に吸収されると骨表面に吸着する。骨吸収時に BP が破骨細胞に特異的に取り込まれると、破骨細胞のアポトーシスを誘導するため、骨粗鬆症の治療に多く用いられている。しかし、近年 BP 薬剤を投与された患者が、抜歯などの歯科治療を受けた後に顎骨壊死あるいは顎骨骨髓炎を発症した報告が相次いでおり、使用に注意が必要と言われている。さらに BP は主に破骨細胞の機能の阻害に関連していると考えられており、骨芽細胞への影響について詳細は不明である。

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 の化学式は  $C_{21}H_{17}Cl_3N_4O_5$  で示される合成化合物である。Salubrinal は小胞体ストレスを軽減し、eIF2 $\alpha$  の脱リン酸化を阻害することによって、NFATc1 を抑制し、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や、変形性関節症モデルマウスに salubrinal を投与したところ、軟骨保護効果があったとの報告から、salubrinal は骨吸収を抑制もしくは骨形成を促進することが示された。そこで、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。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

### 1. 動物

本研究の実験動物には、生後 8 週齢の雄性 WT マウス (C57BL/6 J) (n=60) を使用した。これらのマウスは、日本クレア株式会社より購入し、愛知学院大学歯学部動物実験室にて飼育した。飼育環境は、室温  $22 \pm 2$  °C、湿度  $50 \pm 10$  %、照明時間を 12 時間サイクルで一定にした。飲料水は

(学位論文の内容を要約したもの)

No. 2

愛知学院大学

水道水とし、試料には CE-2 型固形 (日本クレア株式会社) を用い、自由摂取とした。なお、実験動物の管理ならびに研究方法については、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認の下 (承認番号 AGUD423 号)、動物実験指針に従った。

マウスは投与期間の異なる 3 つの群 (各  $n=20$ ) に無作為に分けられた。

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 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を投与しない群 (sal-)、salubrinal を投与する群 (sal+) とした (各群  $n=10$ )。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-
- 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。

## 2. 実験的歯周病モデルマウス

三種混合麻酔薬：塩酸メドミジン (明治製菓ファルマ株式会社)、ミダゾラム (アステラス株式会社)、酒石酸ブトルファノール (明治製菓ファルマ株式会社) の腹腔内投与による全身麻酔下にて、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 (株式会社ニラコ) 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。

## 3. Salubrinal 投与

8 週齢のマウス ( $n=30$ ) (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。Salubrinal の投与濃度は、Takigawa らの研究を参考にした。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 ( $n=30$ ) (4wC, 4w-, 8wC, 8w-, 12wC, 12w-) には同量の PEG を投与した。

## 4. $\mu$ CT 撮影

リガチャーワイヤーの装着後 4 週間後 ( $n=20$ )、8 週間後 ( $n=20$ )、12 週間後 ( $n=20$ ) に上顎骨を採取し、 $\mu$ CT (株式会社リガク) にて撮影を行った。撮影条件として、管電圧 90kV、感電流 150  $\mu$ A、撮影時間 2 分、画素サイズは、 $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$  で行った。その後、歯槽骨残存量の計測と解析は、ソフト TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング株式会社) にて行った。歯槽骨残存量を計測するにあたり、Park ら 27) 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。

## 5. 病理組織学的観察

上顎骨をリガチャーワイヤー装着日から 4 週間後 ( $n=20$ )、8 週間後 ( $n=20$ )、12 週間後 ( $n=20$ ) に摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。次に、10% EDTA (pH7.2) で約 4 週間、4  $^{\circ}\text{C}$  の条件下で脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋を行い、5  $\mu\text{m}$  の近遠心方向の連続組織切片を作製した。組織観察部位は臼歯部の根が全て観察可能な部位とした。その後、ヘマトキシリン-

エオジン染色 (HE 染色) を行い、第一臼歯遠心面のセメントエナメルジャンクション (CEJ) から根尖までの距離に対する、CEJ から歯肉溝底部までの距離の割合を、アタッチメントレベルの割合として計測した。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た。また、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。骨芽細胞数の計測に関しては、HE 染色を用いて行い、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骨芽細胞数 (Ob. N/BS(mm)) を計測した。また TRAP 染色 (酒石酸耐性酸ホスファターゼ染色) は ACID PHOSPHATASE、LEUKOCYTE KIT (SIGMA Diagnostic, St. Louis, MO, USA) を用いて行い、破骨細胞数の計測に関しては、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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  を用い、また小胞体ストレスを観察する為、C/EBP homologous protein (CHOP) による免疫染色を施行した。CHOP とは、小胞体ストレスによって顕著に誘導されるタンパク質で、ミスフォールドタンパク質に応答して活性化されるため、小胞体ストレスマーカーとして考えられている。免疫染色はヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO (R) (株式会社ニチレイバイオサイエンス) と、ヒストファインシンプルステイン DAB 溶液 (株式会社ニチレイバイオサイエンス) を用いて行い、TNF- $\alpha$  抗体は Anti-TNF alpha antibody (ab34674, TNF- $\alpha$  :1/100, Abcam Inc., Waltham, MA, USA)、IL-1 $\beta$  抗体は ANTI IL-1 $\beta$  (ab205924, IL-1 $\beta$  :1/100, Abcam Inc.)、CHOP 抗体は anti-CHOP antibodies (15204-1-AP, CHOP:1/200, Proteintech Inc., Rosemont, IL, USA) を用いた。スコア判定に使用された免疫染色の観察部位は、第一臼歯と第二臼歯間の歯槽中隔部の歯槽突起部表面とした。免疫染色における染色強度の判定は Rogers らや水野らの方法に準じ、染色された部位を 0~20%、21~40%、41~60%、61%~ の 4 グループに分類した。染色画像は、2 人の独立した評価者によってスコアを評価した。

#### 6. 血清骨代謝マーカーの測定

WT マウスに salubrinal の皮下投与を行い、12 週間投与後の血液を採取した。血中 TRAP 濃度は ELISA キット (Immunodiagnostic Systems Ltd, Ontario, Canada) を用いて行った。

#### 7. 統計的処理

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。全ての統計解析は、Graph Pad Prism v. 7 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。P<0.05 を統計学的有意差ありと判断した。

### III. 結果

#### 1. $\mu$ CT 画像における歯槽骨残存率の比較

##### 1) 各週齢間における比較

4wC、8wC、12wC と比較して、結紮することにより 4w-、8w-、12w- は歯槽骨残存率の減少が認められた。結紮をした状態に salubrinal を投与した 4w+ は、4w- と比較して歯槽骨残存率に有意な差は認められなかった。一方、8w+、12w+ は、それぞれ 8w-、12w- と比較して有意な差をもって歯槽骨残存率が大きい値を示した。

##### 2) 経時的における比較

4wC、8wC、12wC において、歯槽骨残存率はほぼ一定に保たれており、有意な差は認められなかった。4w-、8w-、12w- において、経時的に歯槽骨残存率の減少傾向が認められ、4w- と比較して、

12w-は歯槽骨残存率が有意に低い値を示した。一方 4w+、8w+、12w+において、歯槽骨残存率に有意な差は認められなかった。

## 2. 歯周組織の HE 染色画像におけるアタッチメントレベルの割合

### 1) 各週齢間における比較

4wC、8wC、12wC と比較して、結紮することにより 4w-、8w-、12w-はアタッチメントレベルの割合が有意に大きい値を示した。結紮をした状態に salubrinal を投与した 4w+、8w+は、それぞれ 4w-、8w-と比較して有意な差は認められなかったが、アタッチメントレベルの割合が小さくなる傾向が認められた。一方、12w+は、12w-と比較してアタッチメントレベルの割合が有意に小さな値を示した。

### 2) 経時的における比較

4wC、8wC、12wC において、アタッチメントレベルの割合に有意な差は認められなかった。4w-、8w-、12w-において、経時的にアタッチメントレベルの割合が大きな値を示し、4w-と比較して、12w-はアタッチメントレベルの割合が有意な差をもって大きな値を示した。一方 4w+、8w+、12w+において、アタッチメントレベルの割合に有意な差は認められなかった。

## 3. 骨芽細胞数の計測

### 1) 各週齢間における比較

4wC、8wC、12wC と比較して、結紮することにより 4w-、8w-、12w-は有意な差をもって骨芽細胞数の減少が認められた。結紮をした状態に salubrinal を投与した 4w+、8w+、12w+は、それぞれ 4w-、8w-、12w-と比較して骨芽細胞数の増加が認められた。4wC、8wC、12wC は、結紮をした状態に salubrinal を投与された 4w+、8w+、12w+と比較して骨芽細胞数に有意な差は認められなかった。

### 2) 経時的における比較

4wC、8wC、12wC において、骨芽細胞数に有意な差は認められなかった。4w-、8w-、12w-においても、骨芽細胞数に有意な差は認められなかった。また 4w+、8w+、12w+においても、骨芽細胞数に有意な差は認められなかった。

## 4. 破骨細胞数の計測

### 1) 各週齢間における比較

4wC、8wC、12wC と比較して、結紮することにより 4w-、8w-、12w-は有意な差をもって破骨細胞数の増加が認められた。結紮をした状態に salubrinal を投与した 4w+、8w+、12w+は、それぞれ 4w-、8w-、12w-と比較して破骨細胞数の減少が認められた。4wC、8wC、12wC は、結紮をした状態に salubrinal を投与された 4w+、8w+、12w+と比較して破骨細胞数に有意な差は認められなかった。

### 2) 経時的における比較

4wC、8wC、12wC において、破骨細胞数に有意な差は認められなかった。4w-、8w-、12w-においても、破骨細胞数に有意な差は認められなかった。また 4w+、8w+、12w+においても、破骨細胞数に有意な差は認められなかった。

## 5. 免疫染色におけるスコアの比較

### 1) TNF- $\alpha$ におけるスコアの比較

#### (1) 各週齢間における比較

4wC、8wC、12wC と比較して、結紮することにより 4w<sup>-</sup>、8w<sup>-</sup>、12w<sup>-</sup>は有意な差をもって染色スコアが大きな値を示した。結紮をした状態に salubrinal を投与した 4w<sup>+</sup>は、4w<sup>-</sup>と比較して染色スコアに有意な差は認められなかった。一方、8w<sup>+</sup>、12w<sup>+</sup>は、それぞれ 8w<sup>-</sup>、12w<sup>-</sup>と比較して有意な差をもって染色スコアが小さな値を示した。

#### (2) 経時的における比較

4wC、8wC、12wC において、染色スコアに有意な差は認められなかった。結紮をした 8w<sup>-</sup>、12w<sup>-</sup>は 4w<sup>-</sup>と比較して染色スコアが有意な差をもって大きな値を示した。一方 8w<sup>-</sup>は 12w<sup>-</sup>と比較して有意な差は認められなかった。4w<sup>+</sup>、8w<sup>+</sup>、12w<sup>+</sup>において、染色スコアに有意な差は認められなかった。

#### 2) IL-1 $\beta$ におけるスコアの比較

##### (1) 各週齢間における比較

4wC、8wC、12wC と比較して、結紮することにより 4w<sup>-</sup>、8w<sup>-</sup>、12w<sup>-</sup>は有意な差をもって染色スコアが大きな値を示した。結紮をした状態に salubrinal を投与した 4w<sup>+</sup>、8w<sup>+</sup>、12w<sup>+</sup>は、4w<sup>-</sup>、8w<sup>-</sup>、12w<sup>-</sup>と比較して染色スコアの減少傾向は示したが、有意な差は認められなかった。

##### (2) 経時的における比較

4wC、8wC、12wC において、染色スコアに有意な差は認められなかった。結紮をした 4w<sup>-</sup>、8w<sup>-</sup>、12w<sup>-</sup>においても、染色スコアに有意な差は認められなかった。また、4w<sup>+</sup>、8w<sup>+</sup>、12w<sup>+</sup>においても、染色スコアに有意な差は認められなかった。

#### 3) CHOP におけるスコアの比較

リガチャーワイヤーにより誘発された歯周病が小胞体ストレスを引き起こすかどうかを調べるために、組織切片を用いて小胞体ストレスによって増加する CHOP の発現レベルを測定した (31, 32)。12wC と比較して、結紮することにより 12w<sup>-</sup>は有意な差をもって染色スコアが大きな値を示した。結紮をした状態に salubrinal を投与した 12w<sup>+</sup>は、12w<sup>-</sup>と比較して染色スコアが小さな値を示した。

#### 6. 血清骨代謝マーカーの測定

結紮をした状態に salubrinal を投与した sal<sup>+</sup>は、salubrinal 非投与の sal<sup>-</sup>と比較して血中 TRAP 値は有意な差をもって低い値であった。

#### 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、コントロールと比べ歯槽骨残存率の減少、アタッチメントレベルの割合が大きいことや破骨細胞数の増加が認められた。このことは、リガチャーワイヤーを結紮した歯槽骨は、骨代謝のバランスが崩れ、骨吸収が惹起されたことを示す。

一方、歯周病を惹起したマウスに salubrinal を投与することにより歯槽骨残存率の増加、アタッチメントレベルの割合が小さい値を示したことから、salubrinal の投与によって歯槽骨吸収を抑制し、以下の四つの点から歯周病の重症化を軽減できたと考えられた。

まず一つ目として、salubrinal を投与することによって、破骨細胞数の増加の抑制が認められた。Li らは、salubrinal が卵巣摘出によって促進される破骨細胞形成を抑えることで骨吸収を抑制することを報告している。また Hamamura らは、salubrinal が破骨細胞の発生に重要な転写因子である nuclear factor of activated T-cells 1 (NFATc1) を抑制することにより、破骨細

胞形成を抑制したことを報告している。これらの報告と同様に、本研究結果も、salubrinal の投与により、歯周病によって誘発される TRAP 陽性破骨細胞数および歯槽骨吸収を抑制したと考えられた。

二つ目として、本研究において骨芽細胞数を計測したところ、実験的歯周病モデルマウスに salubrinal を投与することによって骨芽細胞数の増加が認められた。過去の論文では、salubrinal の投与は eIF2 $\alpha$  のリン酸化によって上昇する転写因子 (ATF4) を活性化することにより、骨芽細胞形成を促進すると報告されている。また、salubrinal はオートファジーの調節を介して骨形成を促進することや、骨形成不全症マウスに salubrinal を投与することで、骨の機械的強度が改善されたことも報告されている。これらの報告と同様に、本研究結果は、歯周組織における salubrinal の投与が骨芽細胞数を増加させることを示し、実験的歯周病モデルマウスにおいて salubrinal が骨芽細胞の分化を促進している可能性が考えられた。

三つ目として、免疫染色による炎症性サイトカインのスコアの比較では、実験的歯周病モデルマウスに salubrinal を投与することで TNF- $\alpha$  のスコアの減少を認め、局所において炎症が抑制されたと考えられた。変形性関節症マウスにおいて salubrinal を投与することで炎症を減弱させることや、salubrinal は口腔顔面の炎症性疼痛を軽減すること、炎症性サイトカインを抑制して大腸炎を改善することが報告されている。さらに実験的歯周病を発症させた動物に対し、TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の中和抗体を投与すると炎症性細胞浸潤が 8 割減少し、骨吸収が 6 割減少したこと、また TNF- $\alpha$  を抑制することは、骨の近くの炎症および破骨細胞活性を低下させたと報告されており、炎症性サイトカインの減少が歯槽骨吸収の抑制に関与すると考えられた。以上のことより、今回 salubrinal の投与によって、炎症を減弱させたと考えられた。

四つ目として、免疫染色による小胞体ストレスのスコアの比較において、salubrinal を投与することで染色スコアの減少を認めた。Marciniak らは、小胞体ストレスにより CHOP が活性化することを報告している。また、Yamada らは、小胞体ストレスは歯槽骨吸収を伴って歯周病を悪化させることを報告している。これらの報告と本研究の結果より、歯周組織における salubrinal の投与が小胞体ストレスを抑制することを示し、歯周病の進行を抑制している可能性が考えられた。

以上より、今回の実験で歯周病を惹起したマウスにおいて 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、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、また免疫染色による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、歯周病において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 投与は歯周病の進行を抑制し salubrinal によって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成を行い、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、以下の結果を得た。

### 1. 実験的歯周病モデルマウス作成実験について

上顎左側第一臼歯、第二臼歯間にリガチャーワイヤーを結紮したところ、コントロールと比較し

て、4、8、12 週後において有意な差をもっ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。つまり歯周病が惹起された。また、結紮をした4週後と比較して12 週後は有意な差をもっ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、経時的に歯周病が進行している所見が認められた。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

結紮をした上顎左側第一臼歯、第二臼歯間の歯槽骨残存率について、salubrinal を投与したところ、salubrinal 非投与と比較して、8、12 週後において歯槽骨残存率の減少が有意に抑制された。また、結紮側において salubrinal を投与した4、8、12 週後では経時的な変化は認められなかった。アタッチメントレベルにおいて、salubrinal を投与したところ、12 週後においてアタッチメントレベルの割合の増加が有意に抑制された。また、骨芽細胞数の減少の抑制、破骨細胞数の増加の抑制も認められた。

### 2) 炎症への影響について

結紮をした上顎左側第一臼歯、第二臼歯間において、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

結紮をした上顎左側第一臼歯、第二臼歯間において、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

血清骨代謝マーカーである血中 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。

以上の結果より、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、さらにリガチャーワイヤー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ことが示唆された。