

学位論文

歯槽骨吸収モデルマウスに対する
W9 ペプチドの歯槽骨修復効果

尾崎 友輝

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座
(主指導教員:吉成 伸夫 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

The restorative effects of W9 peptide on alveolar bone loss in
a mouse model with severely enhanced bone resorption

Yuki Ozaki

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Nobuo Yoshinari)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

歯周病は、*Porphyromonas gingivalis*菌など歯周病細菌の感染により発症する慢性の炎症性疾患である。種々の炎症性サイトカインの刺激により、骨芽細胞はReceptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)を発現する。RANKLは破骨細胞前駆細胞が発現する受容体Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)と結合して、破骨細胞の分化および骨吸収活性を促進して歯槽骨吸収を引き起こす。環状ペプチドであるWP9QY (W9)は、RANKと構造的相同性を有し、RANKLに結合してRANKL-RANKシグナルを阻害する。近年、W9は骨吸収を抑制する作用とともに、骨形成を促進する作用も有することが報告された。一方、RANKLのデコイ受容体であるOsteoprotegerin (OPG)は、RANKL-RANKシグナルを遮断することで、骨吸収を抑制する。そのため、OPG遺伝子欠損 (*OPG*^{-/-})マウスは骨吸収が亢進して、重度の歯槽骨吸収を起こす。そこで今回、我々は*OPG*^{-/-}マウスにW9を投与して、吸収された歯槽骨に対する修復効果を検討した。

歯槽骨吸収が惹起された12週齢の*OPG*^{-/-}マウスに、W9 (10 mg/kg)を1日3回5日間、皮下注射にて投与した。骨吸収抑制群として、*OPG*^{-/-}マウスに骨吸収抑制薬Bisphosphonateの一種であるRisedronate (0.1 mg/kg)を1日1回3日間、皮下注射にて投与した。対照群として、12週齢の野生型マウス (Wild-type, WT)または*OPG*^{-/-}マウスに生理食塩水を1日3回5日間、皮下注射にて投与した。投与開始から6日目に歯槽骨を採取し、以下の解析を行った。マイクロCT撮影画像より、歯槽骨吸収量を測定した。WTマウスと比較して、*OPG*^{-/-}マウスにおいて歯槽骨吸収の顕著な増加が観察された。W9投与およびRisedronate投与は、歯槽骨吸収量を有意に減少させた。第一臼歯の根間中隔の歯槽骨の骨形態計測より、*OPG*^{-/-}マウスにおいて破骨細胞数の有意な増加が観察された。W9投与およびRisedronate投与は、破骨細胞数を有意に減少させた。

WTマウスに比較して、*OPG*^{-/-}マウスにおいて骨芽細胞数の有意な増加が観察された。W9投与は、骨芽細胞数を有意に増加させたが、Risedronate投与は変化させなかった。骨芽細胞の分化を評価するため、OsterixおよびAlkaline phosphatase (ALP) の免疫組織化学染色を行った。*OPG*^{-/-}マウスにおいて、Osterix陽性およびALP陽性の骨芽細胞数の増加が観察された。W9投与は、Osterix陽性およびALP陽性の骨芽細胞数を増加させたが、Risedronate投与はそれを減少させた。骨芽細胞の分化を誘導する

Wnt/ β -cateninシグナルへの影響を評価するため、 β -cateninおよびWnt/ β -cateninシグナルを抑制する因子であるSclerostinの免疫組織化学染色を行った。*OPG*^{-/-}マウスにおいて、 β -catenin陽性の骨芽細胞数の増加が観察された。W9投与は、 β -catenin陽性の骨芽細胞数を増加させたが、Risedronate投与はそれを減少させた。*OPG*^{-/-}マウスにおいて、Sclerostin陽性の骨細胞数の有意な減少が観察された。W9投与はSclerostin陽性骨細胞数を増加させなかったが、Risedronate投与はそれを有意に増加させた。

以上の結果より、W9はWnt/ β -cateninシグナルを誘導して骨芽細胞分化を促進させることが示された。W9は、歯槽骨吸収抑制作用とともに骨形成促進作用を有する新規の歯周病治療薬となり得ることが示された。

緒言

歯周病は、*Porphyromonas gingivalis* 菌などの偏性嫌気性グラム陰性桿菌の感染により引き起こされる慢性炎症性疾患である^{1,2)}。歯周病細菌が放出するリポ多糖などの病原因子に対する免疫応答として、宿主側は炎症性サイトカインを分泌する³⁾。これらの炎症性サイトカインの刺激により骨芽細胞は破骨細胞分化因子である **Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)** を発現する^{4,5)}。RANKL は破骨細胞前駆細胞と成熟破骨細胞が発現する受容体 **Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)** と結合して、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化および破骨細胞の活性化を促進する⁵⁾。活性化した破骨細胞により歯槽骨吸収が引き起こされる。この歯槽骨吸収を抑制するためには、RANKL-RANK シグナルを阻害することが重要であると考えられる。

骨芽細胞が発現する **Osteoprotegerin (OPG)** は、RANKL のデコイ受容体であり、破骨細胞の分化および活性化を抑制する^{5,6)}。そのため、*OPG* 遺伝子欠損 (*OPG*^{-/-}) マウスは破骨細胞の分化および活性化が亢進して、骨吸収の亢進に起因する重篤な骨粗鬆症を呈する⁷⁾。興味深いことに *OPG*^{-/-} マウスは骨吸収のみならず、骨形成マーカーである血清 **Alkaline phosphatase (ALP)** 活性も高値を示し、組織学的にも骨形成の著しい亢進が認められる⁸⁾。さらに、*OPG*^{-/-} マウスに対して骨吸収抑制薬である **Bisphosphonate** を投与し骨吸収を強力に阻害すると、骨形成も抑制される⁸⁾。これらの知見より、骨吸収と骨形成のバランスを調節する骨代謝共役機構の存在が想定されている⁹⁾。

OPG^{-/-} マウスは、重度の歯槽骨吸収像を呈しており、**Bisphosphonate** を投与すると、亢進した歯槽骨吸収は抑制されることが報告されている¹⁰⁾。そのため、*OPG*^{-/-} マウスは、歯槽骨吸収を抑制する薬剤を評価するモデルとして有用であると考え

られる。

WP9QY (W9) は、腫瘍壊死因子 I 型受容体 (Type I tumor necrosis factor receptor) を模倣して作製された 9 個のアミノ酸から構成される環状ペプチドである¹¹⁾。W9 は TNF- α 誘導性の細胞障害を阻害することが報告されている¹¹⁾。W9 は RANK とも相同した配列を有している。そのため、W9 は RANKL に結合して RANKL-RANK シグナルを阻害することが示された¹²⁾。実際に W9 は、卵巣摘出および低カルシウム食飼育による骨粗鬆症モデルマウスの骨吸収を抑制することが報告された¹²⁾。さらに、W9 は骨吸収を抑制するのみならず、骨形成を促進することも報告されている¹³⁾。マウスに W9 を投与すると、大腿骨の皮質骨形成が促進された。また、W9 投与は、Bone morphogenetic proteins-2 (BMP-2) 誘導性の異所性骨形成を増強することも示された。さらに、骨芽細胞様株細胞である MC3T3-E1 細胞の培養系において、W9 刺激は ALP 活性および石灰化能を促進した。以上の実験結果より、W9 は骨吸収抑制作用とともに骨形成促進作用を有することが示唆された。

Wnt/ β -catenin シグナルは骨芽細胞の分化を促進して、骨形成を促進することが報告されている^{14,15)}。Wnt が受容体に結合すると、細胞質に β -catenin が蓄積する。蓄積した β -catenin は核内に移行し、T-cell factor/Lymphoid enhancer factor と結合して、標的遺伝子の転写を活性化する¹⁶⁾。一方、Wnt/ β -catenin シグナルは、Sclerostin や Dickkopf-1 により抑制される¹⁷⁾。Sclerostin は骨細胞が分泌する因子で Wnt 受容体に結合し、Wnt リガンドの受容体への結合を阻害する。このように、Wnt/ β -catenin シグナルは、骨代謝を調節する重要なシグナルであると理解されているが、歯槽骨における Wnt/ β -catenin シグナルの役割および調節機構の詳細は明確ではない。

歯周病治療において、喪失した歯周組織を再生させることが重要な課題である。1900 年代から骨移植を中心として、歯周組織を

再生させる試みが行われてきた。現在，歯周組織再生療法として骨移植術¹⁸⁾，組織再生誘導法¹⁹⁾（Guided tissue regeneration, GTR 法），Enamel matrix protein²⁰⁾を用いた術式が行われている。これらの治療方法は骨欠損の軽度な 2 壁性または 3 壁性骨欠損に対して有効である。しかし，重度の骨欠損症例においては有効性に限界があり，骨形成能を有する治療が望まれている。そこで我々は，W9 が歯槽骨吸収および骨形成に対してどのような効果を及ぼすかを調べることを目的とした。歯槽骨吸収モデルである *OPG*^{-/-}マウスに W9 を投与して，歯槽骨の修復効果とその機序を検討した。

実験材料および方法

1. マウスおよび試薬

C57BL/6J マウスは，日本 SLC 社（静岡）より購入した．*OPG*^{-/-} マウスは，CLEA ジャパン社（東京）より購入した．これらのマウスは，松本歯科大学ハイテクセンター内の動物飼育室にて飼育した．これらのマウスの交配により *OPG* 遺伝子ヘテロ欠損 (*OPG*^{+/-}) マウスを得た．*OPG*^{+/-} マウス同士の交配により得た *OPG*^{+/+} マウスを野生型 (Wild-type, WT) マウスとした．本研究では，これらの 12 週齢の雄性マウスを用いた．動物の飼育に関しては，松本歯科大学動物実験委員会が定める動物実験取扱規定に基づいて行った．実験に用いた分化誘導ペプチド W9 は，オリエンタル酵母工業社（東京）より供与を受けた．Risedronate は，LKT Laboratories 社 (St Paul, MN, USA) より購入した．Calcein は，Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) より購入した．ヒツジ血清は，Merck 社 (Darmstadt, Deutschland) より購入した．ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) は，和光純薬工業社（大阪）より購入した．抗 Osterix 抗体，抗 ALP 抗体および抗 β -catenin 抗体は，Abcam 社 (Cambridge, British) より購入した．抗 Sclerostin 抗体は，R&D Systems 社 (Minneapolis, MN) より購入した．

2. 薬剤の投与方法

マウスは WT マウス 1 群と *OPG*^{-/-} マウス 3 群の計 4 群（共に 12 週齢，各群 7 匹）に分けた．Vehicle 投与群として，WT 群と *OPG*^{-/-} マウスに，生理食塩水を 1 日 3 回 5 日間，イソフルランによる吸入麻酔下で，背部皮下に注射した（図 1A）．*OPG*^{-/-} マウスに，W9 (10 mg/kg) を 1 日 3 回 5 日間，背部皮下に注射した．骨吸収抑制群として，*OPG*^{-/-} マウスに，窒素含有 Bisphosphonate である Risedronate (0.1 mg/kg) を 1 日 1 回 3 日間，背部皮下に注射し

た．また，全てのマウスは，薬剤投与開始の3日前と3日後に，Calceinを背部皮下に注射した．マウスは薬剤投与開始から6日目に，ペントバルビタールを使用した全身麻酔下で血液を採取後，屠殺した．その後，4% Paraformaldehyde (PFA) で灌流固定を行い，上顎骨と下顎骨を回収した．上顎骨は4% PFAで24時間，4℃にて浸漬固定を行った後に，免疫組織化学染色に供した．下顎骨は70% エタノールで72時間，4℃にて浸漬固定を行った後に，Villanueva bone 染色に供した．

3. 上顎骨における歯槽骨吸収量の計測

上顎骨の歯槽骨吸収は，実験動物用3DマイクロX線CT撮影装置 (μ CT) (R mCT, 理学社, 東京) を使用して評価した．撮影は管電圧80 kV, 管電流160 mAの条件で行った．これらの画像は，i-viewソフトウェア (モリタ社, 京都) を用いて再構築を行い，咬合平面を水平に設定し，セメントエナメル境 (Cement-enamel junction, CEJ) から歯槽骨頂 (Alveolar bone crest, ABC) の間の距離を測定できる画像を得た (図1B)．これらの画像から，TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング社, 東京) を用いて，上顎第一臼歯～第三臼歯の頬側の8点の距離を測定した (図1C)．8点の距離の合計を，歯槽骨吸収量とした．

4. 下顎骨における根間中隔歯槽骨量の計測

下顎骨の根間中隔歯槽骨量の評価は， μ CT (ScanXmate-A080, コムスキャンテクノ社, 東京) を使用して分析を行った．撮影は管電圧30 kV, 管電流250 mAの条件で行った．下顎第一臼歯の近心根管および遠心根管を通る矢状断面で観察を行った (図1E)．根間中隔歯槽骨量の計測は，TRI/3D-BONを用いて，白い点線で示す領域 (Region of interest, ROI) の下顎骨第一臼歯の根間中隔歯槽骨の骨量 (Bone volume/Tissue volume%, BV/TV%) を測

定した。

5. 下顎骨における根間中隔歯槽骨の骨形態計測

下顎骨は，Villanueva bone 染色を行い，メタクリル酸メチル（和光純薬工業社）で包埋して，非脱灰研磨標本とした。根間中隔歯槽骨量は，ROI 面積あたりの根間中隔歯槽骨面積の割合を計測した（図 2A）。根間中隔歯槽骨面積あたりの多核巨細胞を計測した（破骨細胞数/骨面積）。根間中隔歯槽骨面積あたりの骨芽細胞を計測した（骨芽細胞数/骨面積）。

6. 上顎骨における根間中隔歯槽骨の免疫組織化学染色

4% PFA で固定した上顎骨は，10% EDTA 溶液で 4 週間，4℃にて脱灰を行った。脱灰した組織は，上昇エタノール系列にて脱水を行い，パラフィンで包埋した。包埋した組織は，4 μm の厚さに薄切した。W9 の骨形成作用を評価するため，Osterix，ALP，β-catenin および Sclerostin の免疫染色を行った。ALP および β-catenin 染色は，10 mM のクエン酸緩衝液で 3 時間，60℃にて処理して，抗原を賦活化させた。組織切片は，Dako Real（Dako 社，Santa Clara，CA，USA）で 30 分間処理して，内因性ペルオキシダーゼを除去した。Osterix，ALP および β-catenin 染色においては 10% ヒツジ血清，Sclerostin 染色においては 1% BSA で 1 時間処理して，抗原の非特異的結合を防ぐためのブロッキングを行った。組織切片は，250 倍希釈した抗 Osterix 抗体（Abcam），1000 倍希釈した抗 ALP 抗体（Abcam），500 倍希釈した抗 β-catenin 抗体（Abcam）および 50 倍希釈した抗 Sclerostin 抗体（R&D Systems 社）で 12 時間，4℃にて処理した。Osterix，ALP および β-catenin 染色においてはヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO（Rabbit）（ニチレイバイオサイエンス社，東京），Sclerostin 染色においては Anti-goat-HRP（Santa Cruz 社，Dallas，TX，USA）で 1 時間，二次抗体処理を行った。組織切片

は、Dako Envision+キット/HRP (DAB) (Dako 社) にて DAB 染色を行い、ヘマトキシリンにて核染色を行った。Sclerostin 染色は、TRAP との二重染色を行った。根間中隔歯槽骨面積は、ImageJ (Rasband WS, ImageJ, ver1.4.3.67 NIH, Bethesda, MD, USA) を使用して測定した。根間中隔歯槽骨面積あたりの Osterix 陽性の核を有する骨芽細胞数を算出した (Osterix 陽性の骨芽細胞数/骨面積)。根間中隔歯槽骨面積あたりの Sclerostin 陽性の骨細胞数を算出した (Sclerostin 陽性の骨細胞数/骨面積)。破骨細胞は、TRAP 染色により評価した。根間中隔歯槽骨面積あたりの TRAP 陽性の破骨細胞数を算出した (TRAP 陽性の破骨細胞数/骨面積)。

7. 血清 ALP 活性

採取した血液は、4℃で2時間静置後、4℃、5分間、3000 rpm で遠心分離して、血清を採取した。血清は、ラボアッセイ™ ALP (和光純薬工業社) を用いて発色させ、iMARK™ マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 社, Hercules, CA, USA) にて測定した。

8. 統計解析

実験結果の統計学的解析は、Stat View 5.0 software (SAS Institute 社, Cary, NC, USA) を使用した。分散分析には、Fisher's protected least significant difference test を用いた。 p 値は $p < 0.05$ を*, $p < 0.01$ を**として示し、 $p < 0.05$ を有意とした。実験結果は、平均値±標準偏差値で示した。

結果

1. W9 の *OPG*^{-/-}マウスにおける歯槽骨吸収に及ぼす影響

W9 の歯槽骨吸収に及ぼす影響を検討するため、歯槽骨吸収モデルである *OPG*^{-/-}マウスに W9 の投与実験を行った (図 1A). 骨吸収抑制群として、Risedronate の投与を行った。マウスは薬剤投与開始後、6 日目に回収して評価した。WT マウスの歯槽骨表面は滑らかな形状を呈しており、歯根は骨に覆われていた (図 1B). 12 週齢の *OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨表面は粗造であり、一部に根尖に及ぶ歯根の露出が観察された。W9 投与および Risedronate 投与により、*OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨表面の粗造や歯根の露出は減少した。上顎第一臼歯～第三臼歯の CEJ から ABC の間の距離を 8 点計測し、合計を歯槽骨吸収量とした (図 1C). 歯槽骨吸収量の定量結果より、*OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨吸収量は WT マウスに比較して有意に増加した (図 1D). W9 投与および Risedronate 投与により、*OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨吸収量は有意に減少した。以上の結果より、W9 投与および Risedronate 投与は、*OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨吸収を抑制した。

2. W9 の *OPG*^{-/-}マウスにおける歯槽骨量に及ぼす影響

W9 の *OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨量に及ぼす影響を検討した (図 1E). WT マウスの歯槽骨においては緻密な形態が観察された。一方、*OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨において多孔化が観察された。W9 投与および Risedronate 投与により、*OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨は多孔化の抑制が観察された。定量結果より、WT マウスに比較して、*OPG*^{-/-}マウスの骨量は有意に減少した (図 1F). W9 投与および Risedronate 投与により、*OPG*^{-/-}マウスの骨量は有意に増加した (図 1F). Villanueva bone 染色した下顎骨の研磨標本より、WT マウスの第一臼歯の根間中隔歯槽骨において皮質骨様の層板骨が観察された (図 2A). また、層状に配列した骨小腔が観察され

た．一方，*OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨において海綿骨様の骨が観察され，骨量は著しく減少していた．また，不規則な骨小腔の分布が観察された．W9投与および Risedronate 投与により，*OPG*^{-/-}マウスの骨量は増加した．骨形成を反映した骨小腔の規則的な配列が観察された．骨形態計測においても，W9投与および Risedronate 投与により，*OPG*^{-/-}マウスの骨量は有意に増加した（表 1）．以上の結果より，W9投与および Risedronate 投与は，*OPG*^{-/-}マウスの根間中隔歯槽骨量を回復させた．

3. W9 の *OPG*^{-/-}マウスにおける破骨細胞に及ぼす影響

W9 の *OPG*^{-/-}マウスにおける破骨細胞に及ぼす影響を検討するため，Villanueva bone 染色した下顎骨の研磨標本を用いて，第一臼歯の根間中隔歯槽骨における破骨細胞を観察した（図 2B）．WT マウスの歯槽骨表面に細胞体の小さい破骨細胞が僅かに観察された．*OPG*^{-/-}マウスの骨表面には細胞体の大きい破骨細胞が多数観察された．W9投与および Risedronate 投与により，*OPG*^{-/-}マウスの破骨細胞数の減少が観察された．しかし，細胞の大きさは変化しなかった．次に，破骨細胞マーカーである TRAP 染色により，上顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨における破骨細胞を観察した（図 2C）．*OPG*^{-/-}マウスにおいて，TRAP 陽性の破骨細胞数の顕著な増加が観察された．W9投与および Risedronate 投与により，TRAP 陽性の破骨細胞数の減少が観察された．TRAP 陽性の破骨細胞数の定量結果より，*OPG*^{-/-}マウスの根間中隔歯槽骨における TRAP 陽性破骨細胞数は有意に増加した（図 2D）．W9投与および Risedronate 投与により，TRAP 陽性破骨細胞数は有意に減少した．TRAP 陽性破骨細胞数は，Villanueva bone 染色した下顎骨と同様の傾向を示した．以上の結果より，W9投与および Risedronate 投与は，*OPG*^{-/-}マウスの根間中隔歯槽骨における破骨細胞数を減少させ，歯槽骨吸収を抑制することが示された．

4. W9 の *OPG*^{-/-}マウスにおける骨芽細胞に及ぼす影響

W9 の *OPG*^{-/-}マウスにおける歯槽骨形成に及ぼす影響を検討した。WT マウスの歯槽骨表面に扁平な骨芽細胞が観察された (図 3A)。 *OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨表面に細胞体のやや膨らんだ骨芽細胞が観察された。W9 投与により、大きく膨らんだ骨芽細胞が多数観察された。一方、Risedronate 投与により、扁平な骨芽細胞が多数観察された。骨形態計測による骨芽細胞数の定量結果より、 *OPG*^{-/-}マウスの根間中隔歯槽骨における骨芽細胞数は有意に増加した (表 1)。W9 投与により、骨芽細胞数は有意に増加した。一方、Risedronate 投与により、骨芽細胞数は変化しなかった。

W9 の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討するために、初期の骨芽細胞分化マーカーである Osterix の免疫染色を行った (図 3B)。活性化された骨芽細胞において、Osterix は核に局在する。WT マウスの根間中隔歯槽骨の骨表面に、Osterix 陽性の核を有する骨芽細胞が僅かに観察された。 *OPG*^{-/-}マウスの歯槽骨に多数の Osterix 陽性の骨芽細胞が観察された。W9 投与により、Osterix 陽性の骨芽細胞の増加が観察された。一方、Risedronate 投与により、Osterix 陽性の骨芽細胞はほとんど観察されなかった。Osterix 陽性の核を有する骨芽細胞数の定量結果より、 *OPG*^{-/-}マウスの Osterix 陽性骨芽細胞数は有意に増加した (図 3C)。W9 投与により、Osterix 陽性骨芽細胞数は有意に増加した。一方、Risedronate 投与により、Osterix 陽性骨芽細胞数は有意に減少した。

骨芽細胞の分化マーカーである ALP の免疫染色を行った (図 3D)。WT マウスの歯槽骨表面に、一層の ALP 陽性の骨芽細胞が観察された。 *OPG*^{-/-}マウスの骨表面に、二層にわたる ALP 陽性骨芽細胞が観察された。 *OPG*^{-/-}マウスへの W9 投与により、骨表面に、多層の ALP 陽性骨芽細胞が観察された。一方、Risedronate 投与は、ALP 陽性骨芽細胞に対して効果を示さなかった。さらに、W9 が血清中の骨形成マーカーに及ぼす影響を検討するため、血

清 ALP 活性を計測した (図 3E). WT マウスに比較して, *OPG*^{-/-} マウスの血清 ALP 活性は有意に増加していた. W9 投与により, *OPG*^{-/-} マウスの血清 ALP 活性は変化しなかった. 一方, Risedronate 投与により, *OPG*^{-/-} マウスの血清 ALP 活性は有意に減少した. 以上の結果より, W9 投与は *OPG*^{-/-} マウスの根間中隔歯槽骨における骨芽細胞の分化を促進させて, 骨芽細胞数を増加させることが示された. 一方, Risedronate 投与は骨芽細胞の分化および骨形成を促進しないことが示された.

5. W9 が Wnt/ β -catenin に及ぼす影響

W9 の骨芽細胞分化促進作用に, Wnt/ β -catenin シグナルが関与するかどうかを検討するため, 歯槽骨における β -catenin 発現を解析するために免疫染色を行った (図 4A). WT マウスの歯槽骨において, β -catenin 陽性の骨芽細胞はほとんど観察されなかった. *OPG*^{-/-} マウスにおいて, β -catenin 陽性細胞の増加が観察された. W9 投与により, β -catenin の染色強度の増加が観察された. 一方, Risedronate 投与により, β -catenin の染色強度の減少が観察された.

Sclerostin の発現に対する W9 の影響を検討するため, 歯槽骨に対して Sclerostin および TRAP の二重染色を行った (図 4B). WT マウスの歯槽骨において茶色に染まる Sclerostin 陽性の骨細胞が多数観察された. *OPG*^{-/-} マウスにおいて, Sclerostin 陽性の骨細胞数の減少が観察された. W9 投与により, Sclerostin 陽性の骨細胞数の減少傾向が観察された. 一方, Risedronate 投与により, Sclerostin 陽性の骨細胞数の増加が観察された. 定量結果より, WT マウスと比較して *OPG*^{-/-} マウスの Sclerostin 陽性の骨細胞数は有意に減少した (図 4C). W9 投与により, Sclerostin 陽性の骨細胞数は減少したままで変化しなかった. 一方, Risedronate 投与により, Sclerostin 陽性の骨細胞数は有意に増加した. 以上の結果より, W9 投与は Sclerostin 発現の抑制を介

して、Wnt/ β -catenin シグナルおよび骨形成を促進することが示唆された。

考察

本研究より、*OPG*^{-/-}マウスは、Sclerostin 発現の抑制を介して、歯槽骨の骨形成が亢進している可能性を示した。すなわち、*OPG*^{-/-}マウスにおいて、Sclerostin が関与する Wnt/ β -catenin シグナルを介して、骨吸収の促進と共役して骨形成の亢進が認められる。しかし、*OPG*^{-/-}マウスの場合、骨吸収の亢進が骨形成の亢進よりも著しいため、歯槽骨量は減少する。*OPG*^{-/-}マウスへの W9 投与は、二つの作用機構により歯槽骨の骨量減少を防止した。一つ目は、RANKL-RANK シグナルの抑制による骨吸収抑制作用であり、二つ目は、骨細胞の Sclerostin 発現の抑制を介する Wnt/ β -catenin の促進による骨形成促進作用である。これらの結果は、W9 が歯周炎や骨粗鬆症における骨量減少を防止する有用な薬剤となりうることを示唆するものである。

OPG^{-/-}マウスは、骨吸収と骨形成の共役機構を解析可能なマウスである⁸⁾。最近、我々は *OPG*^{-/-}マウスの骨代謝共役には Sclerostin 分泌制御が深く関わることを示した²¹⁾。*OPG*^{-/-}マウスにおいて、Sclerostin 発現は抑制されており、抗 RANKL 抗体を投与すると骨吸収の抑制とともに、Sclerostin 発現は上昇し、骨形成も抑制された。本研究でも、*OPG*^{-/-}マウスへの Risedronate 投与により、骨吸収は抑制され、その結果、Sclerostin 発現は上昇し、骨形成も抑制された。以上より、*OPG*^{-/-}マウスは、Sclerostin の分泌調節を介して、骨吸収と骨形成が共役したマウスであると考えられる。

OPG^{-/-}マウスへの W9 投与は Risedronate 投与の場合と同様に、歯槽骨吸収を抑制した。W9 の投与により、歯槽骨における破骨細胞数は有意に減少した。W9 は RANKL-RANK シグナルを阻害することが報告されている¹²⁾。骨髄マクロファージ培養系において、W9 は RANKL が誘導する破骨細胞形成を阻害した。米田²²⁾は、W9 は RANKL 誘導性のヒト破骨細胞分化に対して強い阻害

作用を示すが、同じ単球系を起源とする

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 誘導性のヒト樹状細胞の分化を抑制しないことを報告している。以上の知見は、*OPG*^{-/-}マウスにおける **W9** の骨吸収抑制作用は、**RANKL-RANK** シグナルを阻害することに起因すると考えられる。

OPG^{-/-}マウスへの **W9** 投与は、**Risedronate** 投与の場合と異なり、骨形成を促進させた。さらに、**W9** 投与により、血清 **ALP** は低下しなかった。*OPG*^{-/-}マウスにおける **Sclerostin** の発現は、**Risedronate** 投与により回復したが、**W9** 投与の場合、**Sclerostin** 発現は抑制されたままであった。これらの結果は、**W9** が直接骨細胞に作用して、**Sclerostin** 発現を抑制することを示唆している。一方、骨芽細胞を長期培養した骨細胞様細胞において、**W9** 刺激は **Sclerostin** の mRNA 発現を抑制しなかった（未公表データ）。**W9** の **Sclerostin** 発現制御機構については、今後さらなる検討が必要である。

OPG^{-/-}マウス由来の骨芽細胞の分化に対して、**W9** 刺激は濃度依存的に促進させた（未公表データ）。この知見は、**W9** の骨形成促進作用は **OPG** と独立した作用であることを意味している。また、**W9** は **BMP-2** が誘導する異所性骨形成を促進することが報告されている¹¹⁾。In vitro において、**W9** は **BMP-2** が誘導する骨芽細胞分化を促進することも報告されている¹³⁾。以上の知見は、**W9** は **BMP-2** シグナルを増強することに加え、**Sclerostin** 分泌を抑制することで骨形成を促進する因子であることを示唆する。

W9 は **RANKL** に結合して骨形成シグナルを惹起する可能性がある。 **W9** の骨芽細胞分化の促進作用は **RANKL** 欠損の骨芽細胞では弱い¹³⁾。また、**W9** は骨芽細胞の **mTORC1** シグナルを活性化することが報告されている²³⁾。これらの知見は、骨芽細胞において **RANKL** からのリバーシブルシグナルが骨芽細胞内に伝達されることを示唆する。また、*OPG*^{-/-}マウスにおける **BMP2** 誘導性の異所性骨の形成量は **WT** マウスと同等であることが報告されている⁸⁾。

この知見は、OPGが直接的に骨形成を促進する作用は有さないことを示唆している。すなわち、OPGとRANKLの結合とは独立し、W9とRANKLの結合あるいはRANKとRANKLの結合が骨形成促進シグナルを伝達すると想定される。今後の研究で、RANKLリバーシブルシグナルの本体が明らかにされることが期待される。

骨粗鬆症治療においてもBisphosphonateや抗RANKL抗体の投与は、骨量を維持または増加させる高い治療効果が報告されている²⁴⁻²⁷⁾。我々は、これらの骨吸収抑制薬がOPG^{-/-}マウスの歯槽骨吸収の進行を抑制することを報告した¹⁰⁾。しかし、喪失した歯槽骨を回復するのは困難である。現在、エムドゲインやFibroblast growth factor-2などの歯周組織再生薬が臨床や治験に用いられているが、重度歯周炎に対する既存の歯周組織再生薬の有効性には限界がある。W9は骨吸収抑制と骨形成促進の両方の作用を示す。W9を歯周局所に応用すれば、喪失した歯槽骨の再生効果が期待される。W9を臨床応用するにあたり、W9は抗炎症作用を有することが報告されているため¹¹⁾、W9は抗炎症作用も期待できる。また、W9は生体内での分解が早いため、W9を徐放性のある担体に含ませて投与するなどの工夫が必要である。今後、歯周組織に存在する細胞に対するW9の作用を検討することも重要な課題である。

以上の知見より、W9は歯槽骨の吸収抑制および形成促進を誘導して、OPG^{-/-}マウスの歯槽骨の喪失を防止した。W9は歯槽骨形成促進作用を有する歯周治療薬として臨床応用が期待される。

結論

本研究より，W9はOPG^{-/-}マウスの歯槽骨の吸収抑制とともに形成促進を誘導して，歯槽骨の修復効果を示した．W9はWnt/ β -cateninシグナルを介して，骨形成を促進することが示唆された．以上の結果より，W9は骨吸収抑制および骨形成促進の作用を有する歯周治療薬として有望であることが示された．

謝辞

本研究に際し，終始御懇意なる御指導を賜りました松本歯科大学歯科保存学講座 吉成伸夫教授，松本歯科大学総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御再建学講座 高橋直之教授，松本歯科大学口腔生化学講座 宇田川信之教授，ならびに松本歯科大学総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御再建学講座 小出雅則講師に謹んで謝意を申し上げます．また，本研究に多大なる御指導，御助言を賜りました松本歯科大学総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御再建学講座 二宮禎講師に厚く感謝申し上げます．本研究の遂行にあたり，W9の御供与を頂きましたオリエンタル酵母工業株式会社 長浜生物科学研究所 研究員 古屋優里子博士および長浜生物科学研究所長 保田尚孝博士に感謝申し上げます．本研究の遂行ならびに論文の作成にあたり，御助言，御協力頂きました，松本歯科大学歯科保存学講座ならびに松本歯科大学総合歯科医学研究所の各先生方に御礼申し上げます．

最後にこの研究を絶えず励ましてくれました両親（父正行，母恵子），兄（晴彦），姉（絵里，麻美）に心から感謝致します．

文献

1. Darveau RP (2010) Periodontitis : a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 8:481-90.
2. Miyajima S, Naruse K, Kobayashi Y, Nakamura N, Nishikawa T, Adachi K, Suzuki Y, Kikuchi T, Mitani A, Mizutani M, Ohno N, Noguchi T and Matsubara T (2014) Periodontitis-activated monocytes/macrophages cause aortic inflammation. *Sci Rep* 4:5171.
3. Hopkins SJ (2003) The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med* 5:45-57.
4. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J and Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-76.
5. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3597-602.
6. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T and Higashio K (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF

- inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139:1329-37.
7. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K and Ozawa H (1998) Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 247:610-5.
 8. Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H and Takahashi N (2003) Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 144:5441-9.
 9. 中村美どり, 中道裕子, 小出雅則, 宇田川信之 (2016) オステオプロテゲリンによる骨リモデリング制御. *THE BONE* 30:175-80.
 10. Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N and Udagawa N Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL overexpressing transgenic male mice (2013) *Endocrinology* 154:773-82.
 11. Takasaki W, Kajino Y, Kajino K, Murali R, and Greene MI (1997) Structure-based design and characterization of exocyclic peptidomimetics that inhibit TNF alpha binding to its receptor. *Nat Biotechnol* 15:1266-70.
 12. Aoki K, Saito H, Itzstein C, Ishiguro M, Shibata T, Blanque R, Mian AH, Takahashi M, Suzuki Y, Yoshimatsu M,

- Yamaguchi A, Deprez P, Mollat P, Murali R, Ohya K, Horne WC and Baron R (2006) A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. *J Clin Invest* 116:1525-34.
13. Furuya Y, Inagaki A, Khan M, Mori K, Penninger JM, Nakamura M, Udagawa N, Aoki K, Ohya K, Uchida K and Yasuda H (2013) Stimulation of bone formation in cortical bone of mice treated with a receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-binding peptide that possesses osteoclastogenesis inhibitory activity. *J Biol Chem* 288:5562-71.
14. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, and Karsenty G (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8:751-64.
15. Ahmadzadeh A, Norozi F, Shahrabi S, Shahjehani M and Saki N (2016) Wnt/beta-catenin signaling in bone marrow niche. *Cell Tissue Res* 363:321-35.
16. Eastman Q and Grosschedl R (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* 11:233-40.
17. Balemans W, PETERS E, Cleiren E, Ai M, Van Wesenbeeck L, Warman ML and Van Hul W (2008) The binding between sclerostin and LRP5 is altered by DKK1 and by high-bone mass LRP5 mutations. *Calcif Tissue Int* 82:445-53.
18. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME and Branch-Mays GL (2010) Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am* 54:55-71.
19. Nyman S, Lindhe J, Karring T and Rylander H (1982) New

- attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 9:290-6.
20. Heijl L (1997) Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol* 24:693-6.
21. Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Ozaki Y, Iimura T, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N (2015) 骨吸収の促進は骨細胞における sclerostin の発現を低下させ、骨形成を促進する。第33回日本骨代謝学会学術集会抄録集 p181.
22. 米田 紘一 (2014) ヒト破骨細胞の分化に対する W9 ペプチドの抑制作用 (学位論文). 松本歯科大学大学院歯学独立研究科 甲第146号
23. Sugamori Y, Mise-Omata S, Maeda C, Aoki S, Tabata Y, Murali R, Yasuda H, Udagawa N, Suzuki H, Honma M and Aoki K (2016) Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling. *Bioessays* 38:717-25.
24. Soen S, Umemura T, Ando T, Kamisaki T, Nishikawa M, Muraoka R, Ikeda Y, Takeda K, Osawa M and Nakamura T (2016) Efficacy on the risk of vertebral fracture with administration of once-weekly 17.5 mg risedronate in Japanese patients of established osteoporosis with prevalent vertebral fractures: a 156-week longitudinal observational study in daily practice. *J Bone Miner Metab* DOI:10.1007/s00774-016-0771-x
25. Gossiel F, Hoyle C, McCloskey EV, Naylor KE, Walsh J, Peel N and Eastell R (2016) The effect of bisphosphonate treatment on osteoclast precursor cells in postmenopausal

osteoporosis: The TRIO study. *Bone* 92:94-99.

26. Zebaze R, Libanati C, McClung MR, Zanchetta JR, Kendler DL, Høiseth A, Wang A, Ghasem-Zadeh A and Seeman E (2016) Denosumab reduces cortical porosity of the proximal femoral shaft in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 31:1827-34.
27. Sarah Zaheer, Meryl LeBoff and E. Michael Lewiecki (2015) Denosumab for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 11:461-70.

図表の説明

図 1. W9 投与による *OPG* マウスの歯槽骨への影響

- (A) W9 および Risedronate (Rise) の投与方法. W9 (10 mg/kg) は, 1 日 3 回 5 日間 (計 15 回) 皮下注射にて投与した.
Risedronate (0.1 mg/kg) は, 1 日 1 回 3 日間 (計 3 回) 皮下注射にて投与した. 6 日目に歯槽骨を回収した. 歯槽骨は μ CT により評価した.
- (B) 上顎歯槽骨の μ CT の三次元構築画像. スケールバー, 1 mm.
- (C) 歯槽骨吸収の測定部位. μ CT の三次元構築画像より歯槽骨頂 (ABC) からセメント-エナメル境 (CEJ) までの距離を 8 点計測した.
- (D) 歯槽骨吸収の定量結果. 計測した ABC-CEJ 間距離の 8 点を合計して, 歯槽骨吸収の指標とした ($n = 7$, * $P < 0.05$).
- (E) 根間中隔歯槽骨の μ CT 画像. 破線で囲む部位は根間中隔歯槽骨の定量部位を示す.
- (F) 根間中隔歯槽骨量の定量結果. μ CT 画像より下顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨量を三次元的に計測した ($n = 7$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

図 2. W9 投与による根間中隔歯槽骨の破骨細胞への影響

- (A) 下顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨の Villanueva bone 染色像 (矢状断面). スケールバー, 100 μ m.
- (B) 下顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨の破骨細胞組織像 (矢状断面). 白色の破線で囲んだ細胞は破骨細胞を示す. スケールバー, 25 μ m.
- (C) 上顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨の TRAP 染色像 (水平断面). 赤色の細胞は TRAP 陽性破骨細胞を示す. スケールバー, 50 μ m.
- (D) 上顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨における TRAP 陽性破骨細胞の定量結果. 骨面積あたりの TRAP 陽性破骨細胞数を計測し

た ($n = 5$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

図 3. W9 投与による根間中隔歯槽骨の骨芽細胞への影響

- (A) 下顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨の Villanueva bone 染色像 (矢状断面). 黒矢印は骨芽細胞を示す. スケールバー, 25 μm .
- (B) 上顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨の Osterix の免疫染色像 (水平断面). 黒矢印は Osterix 陽性骨芽細胞を示す. スケールバー, 25 μm .
- (C) 上顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨における Osterix 陽性骨芽細胞数の定量結果. 骨面積あたりの Osterix 陽性骨芽細胞数を計測した ($n = 7$, * $P < 0.05$).
- (D) 上顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨における ALP の免疫染色像 (水平断面). 骨表面の茶色の細胞は ALP 陽性骨芽細胞を示す. スケールバー, 25 μm .
- (E) 血清 ALP 活性 (units/ μl). ($n = 7$, ** $P < 0.01$).

図 4. W9 投与による根間中隔歯槽骨の Wnt/ β -catenin シグナルへの影響

- (A) 上顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨の β -catenin の免疫染色像 (水平断面). 骨表面の茶色の細胞は β -catenin 陽性骨芽細胞を示す. スケールバー, 25 μm .
- (B) 上顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨の Sclerostin と TRAP の二重染色像 (水平断面). 骨基質中の茶色の細胞は Sclerostin 陽性骨細胞を示す. 骨表面の赤色の細胞は TRAP 陽性破骨細胞を示す. スケールバー, 25 μm .
- (C) 上顎第一臼歯の根間中隔歯槽骨の Sclerostin 陽性骨細胞数の定量結果. 骨面積あたりの Sclerostin 陽性骨細胞数を計測した ($n = 7$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

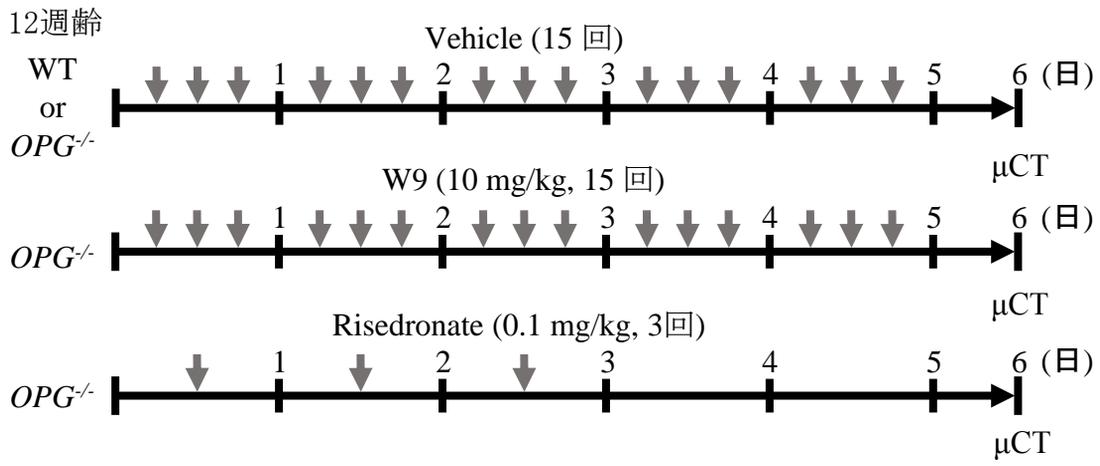
表1. 根間中隔歯槽骨の骨形態計測の結果

| 解析項目 | - | - | W9 | Risedronate |
|--------------------------------|------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | WT | <i>OPG</i> ^{-/-} | <i>OPG</i> ^{-/-} | <i>OPG</i> ^{-/-} |
| BV/TV (%) | 54.2±6.7 | 25.3±4.0 ^a | 37.1±3.1 ^{a,b} | 32.6±2.9 ^{a,b} |
| 破骨細胞数/骨面積 (N/mm ²) | 9.2±4.9 | 343.2±68.9 ^a | 121.5±24.4 ^{a,b} | 145.8±33.9 ^{a,b} |
| 骨芽細胞数/骨面積 (N/mm ²) | 272.8±84.1 | 1636.6±439.3 ^a | 2647.3±673.9 ^{a,b} | 1672.8±381.4 ^{a,c} |

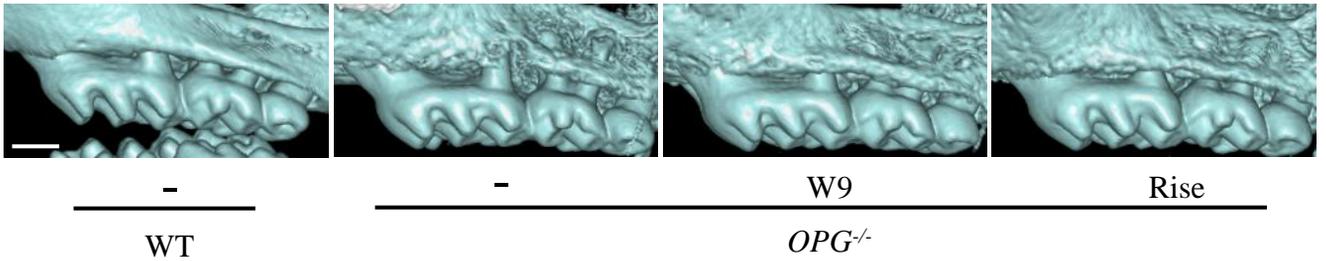
表は平均値±標準偏差値で示す。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。 各群間の有意差は、 a) WT 群との比較, b) *OPG*^{-/-}Vehicle投与群との比較, c) *OPG*^{-/-}W9投与群との比較として示す。

BV/TV, 骨量/組織量 ; N, 細胞数.

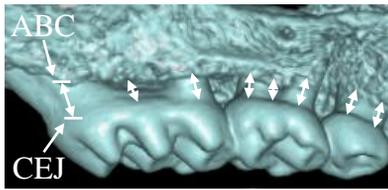
A



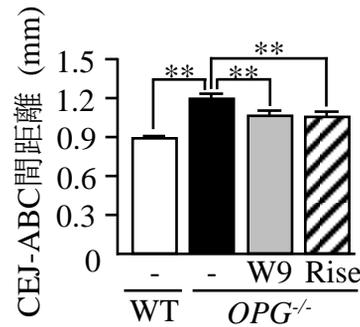
B



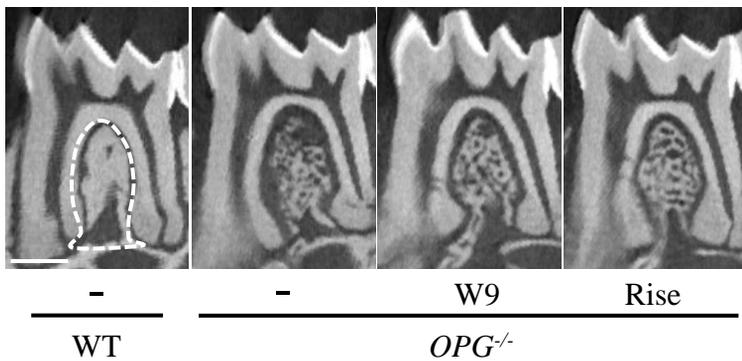
C



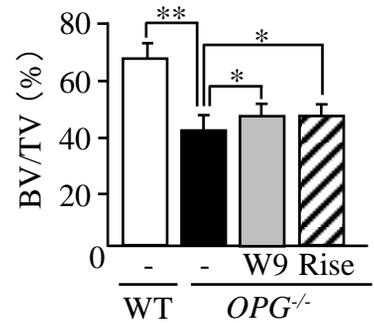
D

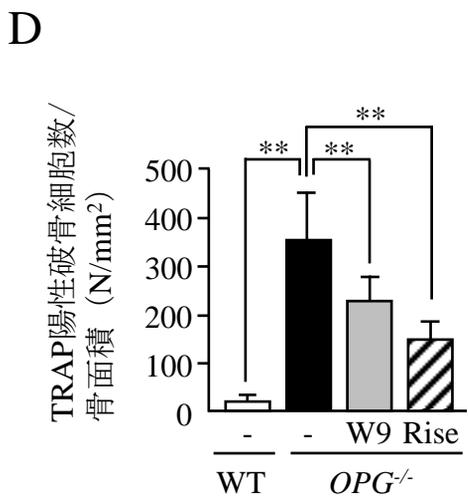
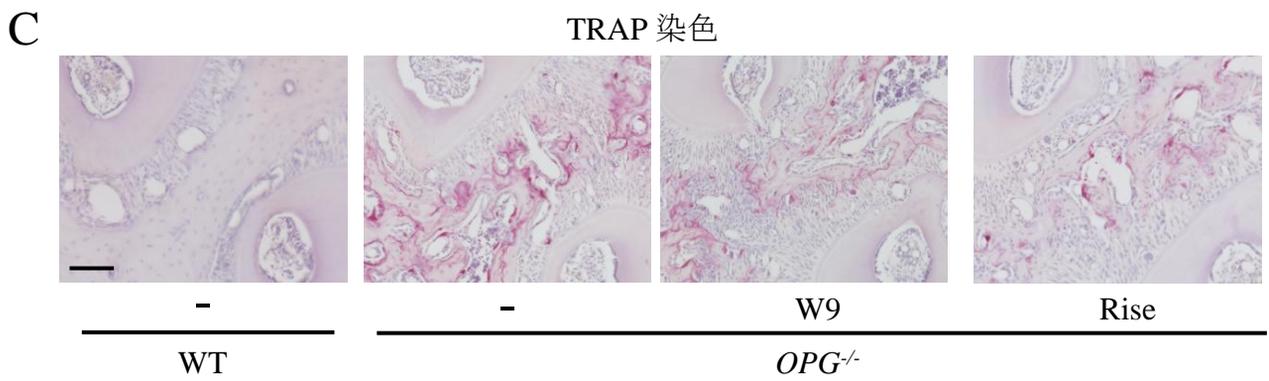
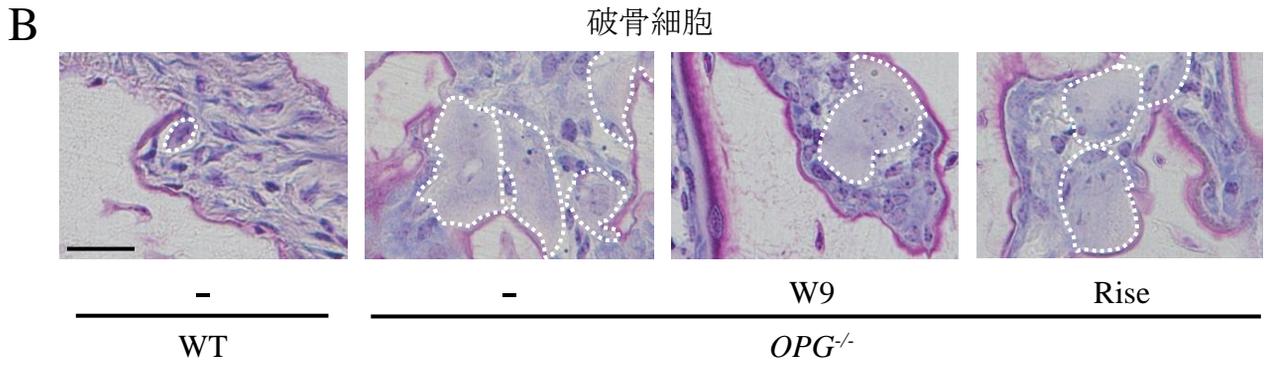
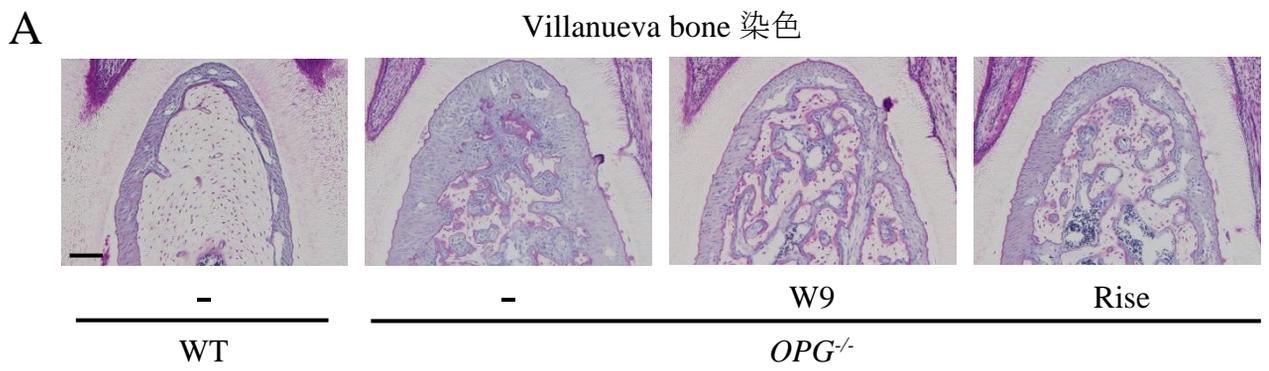


E



F





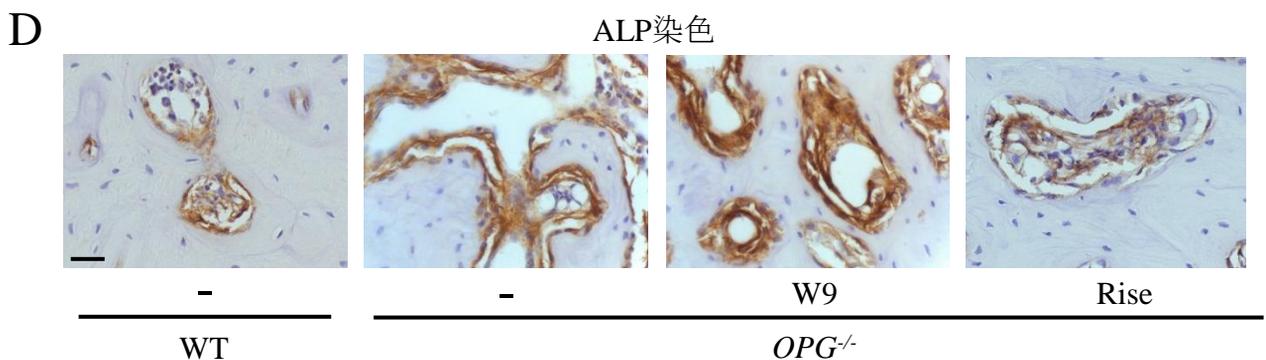
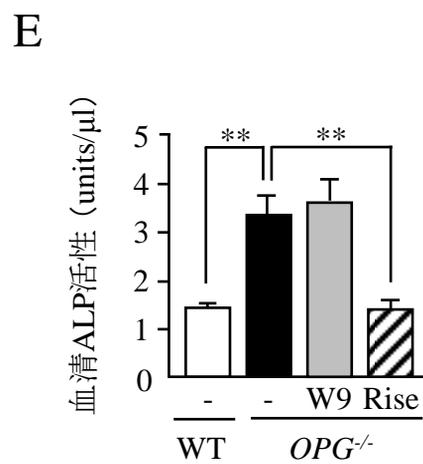
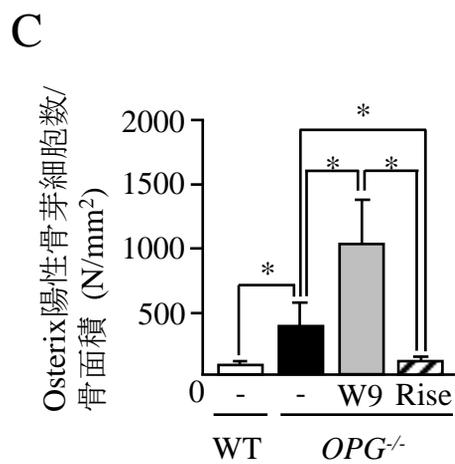
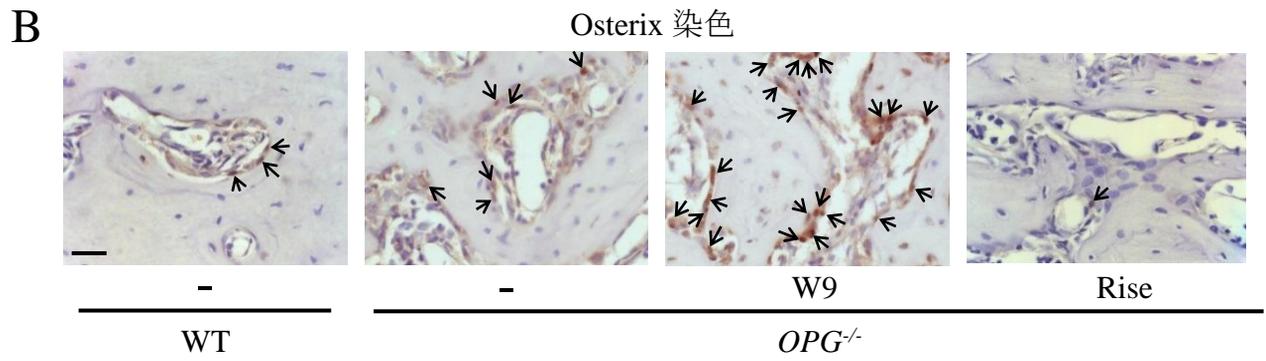
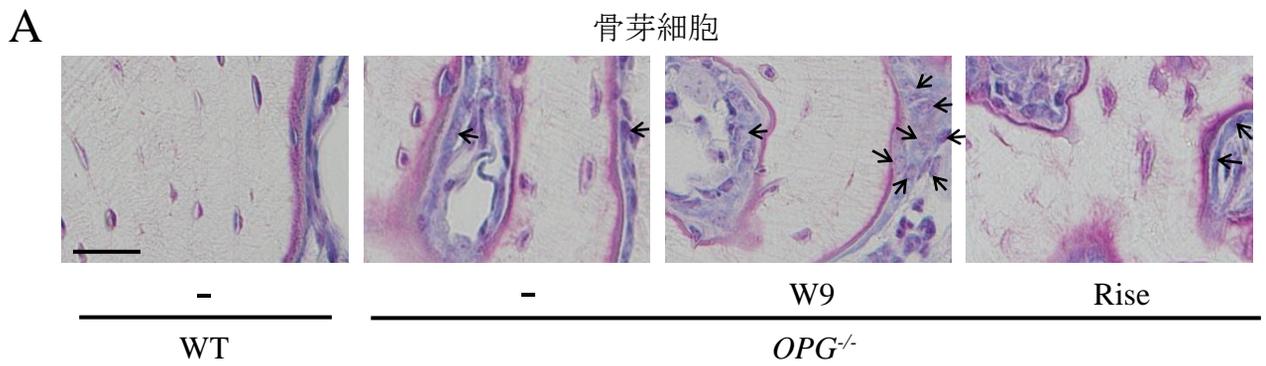
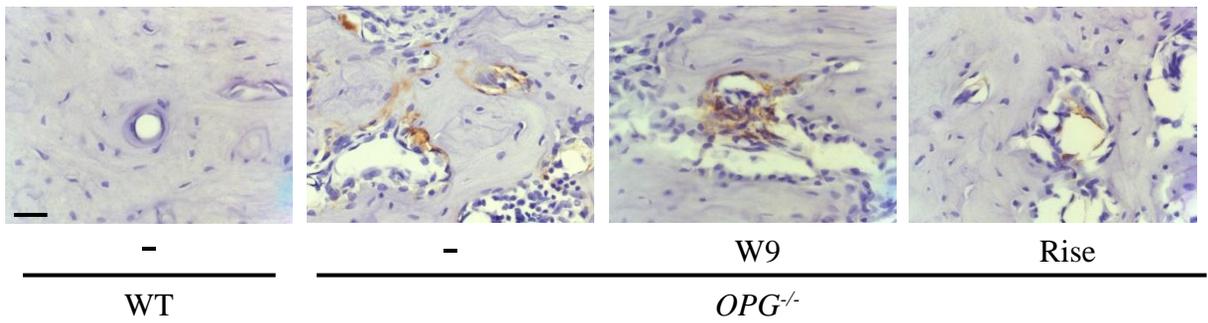


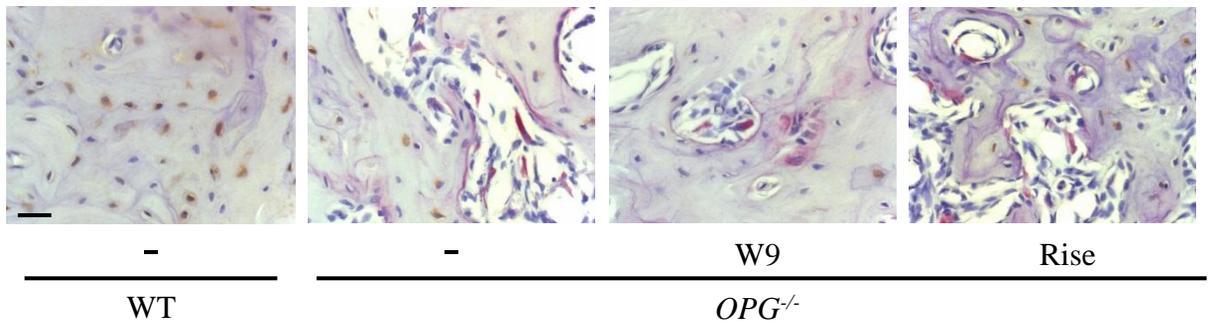
図3 尾崎 友輝

A

 β -catenin染色

B

SclerostinとTRAPの二重染色



C

