

真菌二次代謝産物(+)-terrein は絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて

炎症性骨吸収を抑制する

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

佐光 秀文

**(+)-Terrein Suppresses Bone Resorption in Mouse Ligature-induced
Periodontitis Model**

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Hidefumi SAKO

(令和元年 12 月 13 日受付)

緒言

歯周病は、口腔内の細菌バイオフィーム感染が原因となって発症する炎症性疾患である¹⁾。歯周病原細菌としては、*Porphyromonas gingivalis* を代表とするグラム陰性嫌気性細菌が挙げられ、これら口腔内の細菌感染に対して宿主の免疫反応が過剰に反応すると、歯槽骨吸収などの組織破壊が進行する²⁾。現行の歯周病治療は、歯周病原細菌の感染に対するスケーリングやルートプレーニングを中心とした細菌性バイオフィームの機械的除去が中心であり、炎症反応に関しては宿主に依存している。そのため、組織破壊をもたらす炎症反応そのものに対する新たな治療アプローチが求められている³⁾。

細菌感染が進行すると、まず好中球が歯肉溝に遊走し⁴⁾、次いでマクロファージ、樹状細胞、およびT細胞などの免疫細胞⁵⁾が結合組織に浸潤する。これらの免疫細胞は、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor : TNF) - α 、インターロイキン (interleukin : IL) -1 β , IL-6, および IL-17 などの多様な炎症性サイトカインを産生する⁶⁾。IL-6 は、免疫細胞や線維芽細胞など多様な細胞から産生される炎症性サイトカインの一つである⁷⁾。IL-6 の作用として、樹状細胞の増殖・分化作用⁸⁾と receptor activator for nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) 発現誘導性の破骨細胞分化作用⁹⁾を有することが知られている。また、口腔細菌の感染によって歯根膜線維芽細胞から分泌される IL-6 は T

helper 17 (Th17) 細胞の分化を促進する。そして、Th17 細胞から分泌された IL-17 は好中球の遊走を促進するとともに、骨芽細胞および歯根膜細胞における RANKL 発現を誘導し、強力な骨吸収作用を示すことが明らかとなっている¹⁰⁾。したがって、IL-6 の作用を制御することによって、歯周炎症による組織破壊を制御することが可能になると考えられる。しかし、現在の歯周病治療において、これら生体の炎症反応に対するアプローチはなされていない。一方で、TNF- α や IL-6 誘導性の組織破壊^{11,12)}は、歯周病だけではなく関節リウマチの進行にも深く関与しており、TNF- α や IL-6 を標的とした分子標的薬（抗体医薬）がすでに上市され、従来の抗リウマチ薬であるメトトレキサートを上回る効果をあげている^{13,14)}。しかし、これら分子標的薬は炎症性サイトカインの作用を遮断し、宿主の免疫応答を強力に抑制するため、易感染状態に陥るという反作用に十分注意した対応が必要である。そのため、宿主の免疫反応に関わる TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインの作用を完全に遮断するのではなく、緩徐に炎症性サイトカインの作用を抑制することができれば、炎症性骨破壊を主病態とする関節リウマチや歯周病の新たな治療に応用できると考えられる。

自然界に存在する天然化合物の中から、分子標的薬とは異なる作用機序で、TNF- α や IL-6 の作用を抑制し、抗炎症効果を期待できる化合物として(+)-terrein（図 1）に着眼した。(+)-terrein は真菌 *Aspergillus terreus* から二次代謝産物として分離された分子

量 154.16 の低分子化合物である¹⁵⁾。天然物の(+)-terrein はこれまでに、バイオフィルム形成抑制効果¹⁶⁾、前立腺癌細胞におけるアンジオゲニン分泌抑制効果¹⁷⁾、および歯髄炎症の抑制効果¹⁸⁾など多彩な生物学的効果を有することが報告されている。また、我々の研究グループは (+)-terrein と同様の構造を有する化合物を有機化学的に合成する経路を確立した¹⁵⁾。さらに、この有機化学的に合成した(+)-terrein は、IL-6 そのものではなく、ヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 誘導性の血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 分泌の抑制効果¹⁹⁾、ヤヌスキナーゼ (Janus activated kinase : JAK) 1 のリン酸化阻害による IL-6 誘導性マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor : M-CSF) 分泌の抑制効果²⁰⁾、および破骨細胞分化に必須である転写因子 nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1) 発現の抑制による RANKL 誘導性破骨細胞分化の抑制効果²¹⁾を有することを明らかにした。以上の *in vitro* の知見から、(+)-terrein の IL-6 誘導性の炎症抑制効果と、破骨細胞分化の抑制効果を歯周炎症組織において効果的に作用させることができれば、歯周組織における炎症性骨吸収を抑制できると仮定した。しかし、(+)-terrein の *in vivo* における抗炎症効果と骨吸収抑制効果は未だ不明である。

本研究では、(+)-terrein の *in vivo* における炎症性骨吸収抑制効果を検討するため、絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用い、抗炎症効果、骨吸収抑制効果、および生体安全

性について検討した。

材料と方法

1. 試薬

(+)-terrein は Mandai ら 19)の方法に従って L-酒石酸から合成したものを，岡山大学大学院自然科学研究科合成プロセス化学研究室の菅誠治教授，萬代大樹助教（現岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科講師）から恵与を受け，リン酸緩衝生理食塩液（phosphate-buffered saline : PBS, pH 7.2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）で希釈し，用いた。

2. 絹糸結紮歯周炎マウスモデルの作製（図 2）

10 週齢の C57BL/6 野生型雌性マウス（日本クレア株式会社，東京，日本）を使用し，Abe ら 22)の方法を一部改変して歯周炎マウスモデルを作製した。すなわち，マウスに全身麻酔を行った後，上顎左側第二臼歯歯頸部に 6-0 絹糸を結紮した。さらに，歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* W83 株を 37 °C で嫌気培養し，OD 600 = 0.8 (1.0×10^8 CFU/mL) に調整した菌液 200 μ L を絹糸に浸透させ，歯周組織に炎症を誘導した。歯周炎マウスは，歯周炎誘導 7 日後に(+)-terrein の抗炎症効果を観察する 2 群と，14 日後に(+)-terrein の骨吸収抑制効果と生体安全性を観察する 2 群に振り分けた。すなわち，歯周炎誘導 7 日後に(+)-terrein の抗炎症効果を観察する群は，① PBS

投与群と② (+)-terrein (30 mg/kg) 投与群の 2 群に分け、絹糸結紮 1 日後に菌液を浸透させ、3 日後と 5 日後に腹腔内投与を行い、7 日後に CO₂ ガスを用いて安楽死させた。さらに、絹糸の結紮と菌液の浸透を行わない非歯周炎マウスを歯周炎マウスの陰性コントロールとし、③ PBS 投与群と④ (+)-terrein (30 mg/kg) 投与群の 2 群に分け、実験開始 3 日後と 5 日後に腹腔内投与を行い、7 日後に同様に安楽死させた。歯周炎誘導 14 日後に(+)-terrein の骨吸収抑制効果と生体安全性を観察する群は、⑤ PBS 投与群と⑥ (+)-terrein (30 mg/kg) 投与群の 2 群に分け、絹糸結紮 1 日後と 7 日後に菌液を浸透させ、3, 5, 10, および 12 日後に腹腔内投与を行い、14 日後に同様に安楽死させた。さらに、非歯周炎マウスを⑦ PBS 投与群と⑧ (+)-terrein 投与群の 2 群に分け、実験開始 3, 5, 10, および 12 日後に腹腔内投与を行い、14 日後に同様に安楽死させた。①と②の各群にはマウス 20 匹を使用し、その中の 4 匹は上顎骨と血液の採取に用い、残りの 16 匹は歯肉の採取に用いた。③, ④, ⑤, および⑥の各群にはマウス 4 匹を使用し、上顎骨と血液の採取に用いた。⑦と⑧の各群にはマウス 4 匹を使用し、上顎骨と血液に加えて、肝臓と腎臓の採取に用いた。全ての動物実験は、岡山大学動物実験委員会承認 (OKU-2018748) の下で実施し、SPF 環境下で飼育を行い、実験期間中にマウスが死亡した場合は、実験結果から除外を行った。

3. micro-computed tomography（マイクロ CT）による画像解析

歯槽骨吸収を観察するために、前項の各群のマウスから採取した上顎骨を、動物用マイクロ CT 撮影装置（Skyscan : Bruker, Kontich, Belgium）を用いて 4.5 μm のスライス幅で撮影し、付属の解析ソフトウェア（再構成ソフト, NRecon : Bruker）を用いて再構成した。画像処理ソフトウェア Image J（National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）を用いて、Park ら²³⁾の方法を参考に、上顎左側第二臼歯の近心頬側根を含む 10 枚の矢状断画像において、近心のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を計測し、歯槽骨吸収量を定量した（図 3）。

4. 組織学的解析

①, ②, ③, および④の各群から採取した上顎骨を 4 %パラホルムアルデヒド溶液（pH 7.4 : 和光純薬, 大阪, 日本）で 1 日間の組織固定を行った。脱灰のためエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（10 % EDTA 2Na 溶液, pH 7.0, 武藤化学株式会社, 東京, 日本）に 10 日間浸漬し、エタノール系列で脱水後にパラフィン包埋してブロックを作製し、4.5 μm 間隔で薄切を行い、パラフィン切片を作製した。その後、以下の染色方法を用いて病理組織学的解析を行った。

(1) ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin-Eosin : HE）染色

作製したパラフィン切片を，通法に従って HE 染色を行った後，カバーガラスと Mount-Quick（大道産業株式会社，東京，日本）を用いて封入した。その後，光学顕微鏡下（BX-50：オリンパス，大阪，日本）にて組織像を観察した。

（2）酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（tartrate-resistant acid phosphatase：TRAP）染色

作製したパラフィン切片を，通法に従って TRAP 染色液（コスモ・バイオ株式会社，東京，日本）を用いて染色を行った後，カバーガラスと Mount-Quick Aqueous（大道産業株式会社，東京，日本）を用いて封入した。その後，光学顕微鏡下にて組織像を観察した。上顎左側第一臼歯遠心頬側根と上顎左側第二臼歯近心頬側根間の歯槽骨表層に接した状態で存在し，かつ 3 核以上を有する TRAP 陽性細胞を破骨細胞として，その細胞数を計測した。なお，各マウスから作製した切片を 1 匹につき無作為に 2 枚ずつ選択し，各群 3 匹計 6 枚の切片から破骨細胞数を計測した。

（3）免疫組織化学（immunohistochemistry：IHC）染色

作製したパラフィン切片を，脱パラフィンと再水和を行い，アビジンビオチンペルオキシダーゼシステムを使用し，VECTASTAIN *Elite* ABC Rat kit（Vector Laboratories，Burlingame，CA，USA）を用いて IHC 染色を行った。組織切片は，0.3 %過酸化水素メタノール溶液に室温で 30 分間浸漬し，内因性ペルオキシダーゼ活性を除去し，ト

リプシン（Thermo Fisher Scientific）で 15 分間処理して抗原賦活化を行った。正常ウサギ血清により 15 分間ブロッキングした後，一次抗体を添加し，4 °C で一晩反応させた。一次抗体は，末梢好中球と単球のマーカータンパク質に特異的な抗体である抗 Ly-6g, 6c 抗体（Rat-poly ; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA）を 100 倍に PBS で希釈して使用した。PBS で洗浄し，ウサギ抗ラットビオチン標識二次抗体を PBS で 200 倍に希釈して添加し，25 °C，30 分反応させた。アビジン-ビオチン標識酵素複合体を添加し，30 分反応させた後，0.01 % 3,3'-diaminobenzidine（DAB ; ナカライテスク株式会社，京都，日本）を添加して発色させた。最後に，Mayer's Hematoxylin（和光純薬）により細胞核を対比染色し，カバーガラスと Mount-Quick を用いて封入後に観察を行い，陽性細胞を好中球として計測した。

5. 歯周組織における炎症性骨吸収関連遺伝子の解析

①と②の各群から上顎左側第二臼歯の口蓋側歯肉を採取し，全 RNA を抽出した。そして RNA を安定化するために，直ちに RNeasy Lysis Buffer（QIAGEN, Hilden, Germany）に浸漬した。その後，1 日以内に，RNeasy Plus Mini Kit（QIAGEN）を用いて，RNA を抽出した。抽出した RNA の純度と濃度を Nano Drop 2000（Thermo Fisher Scientific）を用いて測定し，A260/A280 の値が 1.8 以上であることを確認後，RNA 濃度が 3~5

μg/mL となるように希釈した。

- (a) 逆転写反応:抽出した RNA を鋳型とし, cDNA 合成反応試薬である Super Script

IV VIRO Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて, 逆転写反応

を行った。すなわち, RNA 濃度を調整した溶液 16 μL と Super Script IV VIRO

Master Mix 4 μL を混合し, 25 °C で 10 分間熱処理を行って, オリゴ dT プライ

マーをアニーリングした。そして, 50 °C で 10 分間の逆転写反応を行い, cDNA

を合成した。その後, 85 °C で 5 分間の熱処理を行い, 逆転写酵素を不活化し

た。

- (b) リアルタイム RT-PCR (real time reverse transcription-polymerase chain reaction) :

歯周組織において炎症性骨吸収に関連が深い, IL-17A, TNF-α, および

osteoprotegerin (OPG) の遺伝子発現を解析した。なお, グリセルアルデヒド-3-

リン酸デヒドロゲナーゼ (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : GAPDH)

遺伝子²⁴⁾, *IL-17A*²⁵⁾, *TNF-α*²⁴⁾, および *OPG*²⁶⁾ の増幅には既報に基づいて, プ

ライマー配列を設計し (表 1), 合成したものを用了。合成した cDNA 溶液 2

μL を, 1 μM に調製した PCR プライマー各 0.5 μL, POWER SYBER Green Master

Mix (Thermo Fisher Scientific) 10 μL, および RNase-free water 7 μL と混合し,

7300 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて, 95 °C で 15 秒

の熱変性ならびに 60 °C で 1 分のアニーリングと伸長反応を 50 サイクル行った。この反応によって産生された PCR 産物が発する蛍光量を、SDS vLX with RQ Software (Thermo Fisher Scientific) を用い計測した。なお、RNA 発現量は、*GAPDH* を内在性コントロールとして、比較 Ct 法²⁷⁾にて定量を行った。なお、同個体の絹糸を結紮しなかった反対側（右側）に対する、結紮側（左側）の相対発現比を求め、遺伝子発現量を算出した。結紮側において遺伝子発現量が 0.5 以下および 10 以上を示した場合は、外れ値として除外した。

5. 血清中炎症性サイトカインの解析

①, ②, ③, および④の各群のマウスの心臓から新鮮血液を採取し、4 °C で 875.17 x g にて 15 分間遠心分離を行い、血清を採取した。歯周炎症組織において産生が亢進する炎症性サイトカイン TNF- α と IL-6 について、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて血清中の炎症性サイトカインの解析を行った。ELISA MAX Deluxe (BioLegend, San Diego, CA, USA) を用い、マイクロプレート上の各ウェルに、特異的な捕捉抗体を、2 °C, 16 時間反応させた。PBS with Tween 20 (PBS-T : 和光純薬) で 4 回洗浄後、非特異的反応を防止するために、ブロッキングバッファーを加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、PBS-T で 4 回洗浄後に、採取し

た血清を PBS で 10 倍に希釈し、4.4, 15.6, 62.5, 250, および 1,000 pg/mL に希釈したスタンダードとともに室温で 2 時間反応させた。そして、PBS-T で 4 回洗浄後に、ビオチン標識された検出抗体を室温で 1 時間反応させた。さらに、シグナル増幅を目的として、PBS-T で 4 回洗浄後にストレプトアビジンを室温で 30 分間反応させた。そして、PBS-T で 5 回洗浄後に、発色基質を室温で 15 分間反応させ、発色させた。発色反応の停止のため、2 N の硫酸を 100 μ L 添加し、マイクロプレートリーダー SH-1000 Lab（コロナ電気、ひたちなか、日本）を用いて 450 nm の波長における吸光度を測定した。すべての試験は一個体につき 2 ウェルを用いて行い、血清中 TNF- α と IL-6 の濃度を定量し、検出限界以下の結果については、濃度を 0 とした。

6. (+)-terrein の生体安全性の解析

⑦と⑧の各群のマウス（平均体重 26.6 ± 1.5 g）を用い、(+)-terrein の生体安全性について検討した。投与期間中は 7 日間ごとに体重の測定を行い、投与開始後 14 日後に、CO₂ ガスによって安楽死させ、薬物代謝の主要臓器である腎臓と肝臓を摘出し、4 %パラホルムアルデヒド溶液（pH 7.4）で 1 日間の組織固定を行った。組織固定後に、エタノール系列で脱水した。パラフィン包埋してブロックを作製後、4.5 μ m 間隔で薄切し、パラフィン切片を作製した。その後 HE 染色を用いて、肝臓および腎臓の

組織学的変化について観察した。

7. 統計解析

Shapiro-Wilk test を用いて得られたデータについて正規性を有することを確認し，one-way analysis of variance (one-way ANOVA) を用いて多重比較検定を行った。さらに Tukey-Kramer test を用いて群間比較を行った。2 群間の差の検定は，Student's *t*-test を用いて群間比較を行った。各々の統計処理には，統計解析ソフト GraphPad Prism8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用い，*p* 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

結果

1. マイクロ CT による歯槽骨吸収の評価

PBS を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した非歯周炎マウスに対して、歯槽骨吸収が有意に亢進し、絹糸の結紮による歯周炎の誘導が確認された ($p<0.001$, 図 4 a, b)。また、PBS を投与した非歯周炎マウスは、(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスに対して、歯槽骨吸収に統計学的に有意差はみられず、(+)-terrein が健常な歯槽骨に影響がないことを確認した (図 4 a, b)。(+) -terrein を投与した歯周炎マウスは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、絹糸結紮 7 日後と 14 日後の歯槽骨吸収が有意に抑制された (それぞれ $p<0.001$, $p=0.005$, 図 4 a, b)。

2. 好中球の浸潤と破骨細胞発現の評価

HE 染色において、PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスともに、歯周組織に炎症像は観察されなかった (図 5 a)。PBS を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した非歯周炎マウスに対して、結紮糸による上皮の陥凹、上皮組織の炎症性細胞浸潤、および歯槽骨吸収が観察された (図 5 a)。(+) -terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、上皮組織の炎症性細胞浸潤、および歯槽骨吸収が抑制されていた (図 5 a)。IHC 染色において、PBS

を投与した非歯周炎マウスと(+)terrein を投与した非歯周炎マウスともに、好中球は観察されなかった (図 5 a)。PBS を投与した歯周炎マウスでは好中球の浸潤がみられた (図 5 a)。(+)terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、好中球の浸潤が減少した (図 5 a)。TRAP 染色において、PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)terrein を投与した非歯周炎マウスともに、破骨細胞は観察されなかった (図 5 a, b)。PBS を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)terrein を投与した非歯周炎マウスに対して、破骨細胞数が有意に増加した (ともに $p<0.001$, 図 5 a, b)。(+)terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、破骨細胞数が有意に減少した ($p=0.04$, 図 5 a, b)。

3. 歯周炎誘導から 7 日後の歯周組織中の炎症性骨吸収関連遺伝子の評価

PBS を投与したマウスにおいて、歯周炎誘導部 (結紮側) では、歯周炎未誘導部 (非結紮側) に対して、*TNF- α* mRNA の発現が有意に上昇した ($p=0.01$, 図 6 a)。また、(+)terrein を投与したマウスでは、PBS を投与したマウスに対して、歯周炎誘導部における *TNF- α* mRNA の発現が有意に減少した ($p=0.005$, 図 6 a)。PBS を投与したマウスにおいて、歯周炎誘導部では、歯周炎未誘導部に対して、*IL-17A* mRNA の発現が有意に上昇した ($p=0.01$, 図 6 b)。また、(+)terrein を投与したマウスでは、PBS を投

与したマウスに対して、歯周炎誘導部における *IL-17A* mRNA の発現が、統計学的有意差はないものの、減少傾向にあった（図 6 b）。PBS を投与したマウスにおいて、歯周炎誘導部では、歯周炎未誘導部に対して、統計学的有意差はないものの、*OPG* mRNA の発現が増加する傾向にあった（図 6 c）。また、(+)-terrein を投与したマウスでは、PBS を投与したマウスに対して、歯周炎誘導部における *OPG* mRNA の発現が、統計学的有意差はないものの、増加傾向にあった（図 6 c）。

4. 歯周炎誘導から 7 日後の血清中の炎症性サイトカインの評価

PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスともに、血清中に TNF- α と IL-6 は確認されなかった（図 7 a, b）。また、PBS を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスに対して、血清中 TNF- α の濃度は有意に上昇した（それぞれ $p=0.02$, 図 7 a）。(+)-terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、血清中 TNF- α の濃度は歯周炎未誘導レベルにまで有意に低下した（ $p=0.02$, 図 7 a）。また、PBS を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスに対して、統計学的な有意差がなかったものの、血清中 IL-6 の濃度は

上昇する傾向がみられた（図 7 b）。一方，(+)-terrein を投与した歯周炎マウスでは，PBS を投与した歯周炎マウスに対して，統計学的な有意差がなかったものの，血清中 IL-6 の濃度は低下する傾向がみられた（図 7 b）。

5. (+)- Terrein の生体安全性の評価

(+)-Terrein 投与マウスは，PBS 投与マウスと比較して，実験開始 7，14 日後に明らかな体重の変化はみられなかった（図 8 a）。また，肝臓と腎臓の HE 染色において，(+)-Terrein 投与マウスは，PBS 投与マウスと比較して，肝臓での類洞の閉塞と肝細胞の壊死像や，腎臓での糸球体の炎症像と尿細管の壊死像は観察されず，肝臓と腎臓ともに異常はみられなかった。（図 8 b）。

考察

本研究の結果から，(+)-terrein が，絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて，IL-6 の産生を抑制することなく，①歯槽骨吸収抑制作用，②破骨細胞形成の抑制作用，および③歯周組織と血清中における TNF- α の産生抑制作用を有することが，明らかになった。

先行研究 (*in vitro*) において，(+)-terrein が RANKL 誘導性の破骨細胞分化を抑制する²¹⁾ ことが報告されている。本研究 (*in vivo*) において，(+)-terrein を投与した歯周炎マウスの歯槽骨吸収が抑制された機序の一つとして，(+)-terrein が歯周炎組織中の破骨細胞の分化を抑制し，その結果，歯槽骨吸収を抑制した可能性が示唆される。また，(+)-terrein は，歯周炎マウスの歯周組織中への好中球浸潤を抑制した。そして，血清中の TNF- α の濃度低下と歯周組織中の TNF- α mRNA の発現を低下させた。先行研究において，TNF- α は好中球の活性化²⁸⁾ と破骨細胞の分化を促進²⁹⁾ することが報告されている。(+)-terrein の免疫応答に与える作用の一つとして，歯周組織における TNF- α の産生を抑制し，好中球の浸潤および破骨細胞の形成抑制といった一連の抗炎症効果を誘導することが示唆される。

本研究において，(+)-terrein 投与群と PBS 投与群で体重変化に差は無く，腎臓や肝

臓の組織像に明らかな異常は観察されなかったことから、(+)-terrein には副作用が少ない可能性が示唆された。さらに、IL-6 の産生を完全に抑制することなく歯槽骨吸収の抑制作用を示した結果から、(+)-terrein が抗体医薬といった分子標的薬とは異なる機序で炎症性骨吸収を抑制する可能性が示唆される。

また、(+)-terrein は有機化学的に合成可能であり、その化学構造を自由に設計し、より効果の高い新たな誘導体を合成することが可能と考えられる。そのため、有機化学的に合成可能な(+)-terrein を応用した治療薬を開発することができれば、社会的にも意義が高いと考えられる。

一方、(+)-terrein の臨床応用を検討する上で、未だ明らかとなっていない直接的な標的分子や代謝経路の解明が必要である。すなわち、(+)-terrein 投与後の効果持続期間は不明であり、(+)-terrein の投与期間と時間経過に伴う免疫反応に対する(+)-terrein の影響をより詳細に検討する必要がある。また、(+)-terrein は *in vitro* において抗 IL-6 効果を有することが報告されている¹⁹⁾。IL-6 は歯周炎組織において Th17 細胞への分化を誘導して、破骨細胞分化を亢進することが知られている¹⁰⁾。本研究において、(+)-terrein が歯周炎組織における破骨細胞の形成を抑制した結果から、(+)-terrein が Th17 細胞分化にも影響を及ぼす可能性が示唆される。そのため、今後(+)-terrein が T 細胞の分化に与える影響を検討する必要があると考えられる。

以上のような(+)-terrein の新たな機序を今後解明できれば，炎症性骨吸収治療薬としての(+)-terrein の可能性をさらに高めることにつながると考えられる。

結論

絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて、(+)-terrein により TNF- α の産生が抑制された結果、破骨細胞の分化が抑制されると共に歯槽骨の吸収が抑制されたことが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また、様々な面にわたり、終始ご指導賜り、貴重な御助言と御協力を下さいました岡山大学病院歯周科の大森一弘講師、(+)-terrein を恵与下さった岡山大学大学院自然科学研究科合成プロセス化学研究室の菅誠治教授、萬代大樹助教（現岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科講師）、ならびに歯周病態学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態
学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- ・ 第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会（2018 年 11 月，京都）
- ・ 第 39 回日本歯科薬物療法学会学術大会（2019 年 3 月，千葉）

参考文献

- 1) Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S. and Johnson, N.W.: Periodontal diseases. *Lancet*, **366**, 1809-1820, 2005.
- 2) Van Dyke T.E. and Serhan, C.N.: Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J. Dent. Res.*, **82**, 82-90, 2003.
- 3) Bartold, P.M. and Van Dyke T.E.: Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol. 2000*, **75**, 317-329, 2017.
- 4) Tracey, KJ.: The inflammatory reflex. *Nature*, **420**, 853-9, 2002.
- 5) Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H. and Van Dyke TE.: Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol. 2000*, **64**, 57-80, 2014.
- 6) Okada, H. and Murakami S.: Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **9**, 248-66, 1998.
- 7) Kishimoto, T.: Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Crit. Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 1-21, 2005.
- 8) Park, S.J., Nakagawa, T., Kitamura, H., Atsumi, T., Kamon, H., Sawa, S., Kamimura, D., Ueda, N., Iwakura, Y., Ishihara, K., Murakami, M. and Hirano, T.: IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J. Immunol.*, **173**, 3844-54, 2004.

- 9) Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C.H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Matsuda, T. and Hirano, T.: IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol.*, **145**, 3297-303, 1990.
- 10) Tsukasaki, M., Komatsu, N., Nagashima, K., Nitta, T., Pluemsakunthai, W., Shukunami, C., Iwakura, Y., Nakashima, T., Okamoto, K. and Takayanagi, H.: Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat. Commun.*, **9**, 701, 2018.
- 11) Moelants, E.A., Mortier, A., Van Damme J. and Proost, P.: Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol. Cell Biol.*, **6**, 393-401, 2013.
- 12) Hashizume, M. and Mihara M.: The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*, 2011.
- 13) Alfonso-Cristancho, R., Armstrong, N., Arjunji, R., Riemsma, R., Worthy, G., Ganguly, R. and Kleijnen, J.: Comparative effectiveness of biologics for the management of rheumatoid arthritis: systematic review and network meta-analysis. *Clin. Rheumatol.*, **36**, 25-34, 2017.
- 14) Lipsky, P.E., Van der Heijde D.M., St Clair E.W., Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., Harriman, G.R. and Maini, R.N.: Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Anti-Tumor*

Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group.

N. Engl. J. Med., **343**, 1594-602, 2000.

- 15) Raistrick, H. and Smith, G.: Studies in the biochemistry of micro-organisms: the metabolic products of *Aspergillus terreus* Thom. A new mould metabolic product-terrein. *Biochem. J.*, **29**, 606-11, 1935.
- 16) Kim, B., Park, J.S., Choi, H.Y., Yoon, S.S. and Kim, W.G.: Terrein is an inhibitor of quorum sensing and c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*: a connection between quorum sensing and c-di-GMP. *Sci. Rep.*, **8**, 8617, 2018.
- 17) Arakawa, M., Someno, T., Kawada, M. and Ikeda, D.: A new terrein glucoside, a novel inhibitor of angiogenin secretion in tumor angiogenesis. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **61**, 442-8, 2008.
- 18) Lee, J.C., Yu, M.K., Lee, R., Lee, Y.H., Jeon, J.G., Lee, M.H., Jhee, E.C., Yoo, I.D. and Yi, H.K.: Terrein reduces pulpal inflammation in human dental pulp cells. *J. Endod.*, **34**, 433-7, 2008.
- 19) Mandai, H., Omori, K., Yamamoto, D., Tsumura, T., Murota, K., Yamamoto, S., Mitsudo, K., Ibaragi, S., Sasaki, A., Maeda, H., Takashiba, S. and Suga, S.: Synthetic (+)-terrein suppresses interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor induced-secretion of vascular

- endothelial growth factor in human gingival fibroblasts. *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 5338-44, 2014.
- 20) Yamamoto, S., Omori, K., Mandai, H., Nakayama, M., Nakagawa, S., Kobayashi, H., Kunimine, T., Yoshimura, H., Sakaida, K., Sako, H., Ibaragi, S., Yamamoto, T., Maeda, H., Suga, S. and Takashiba, S.: Fungal metabolite (+)-terrein suppresses IL-6/sIL-6R-induced CSF1 secretion by inhibiting JAK1 phosphorylation in human gingival fibroblasts. *Heliyon*, **4**, 11, 2018.
- 21) 中川沙紀：真菌二次代謝産物である(+)-terreinがマウス骨髄由来マクロファージにおいてRANKL誘導性破骨細胞分化に及ぼす影響と標的分子の解明. 岡山歯誌, **37**, 学位論文, 2018.
- 22) Abe, T. and Hajishengallis, G.: Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J. Immunol. Methods*, **394**, 1-2, 2013.
- 23) Park, C.H., Abramson, Z.R., Taba, M Jr., Jin, Q., Chang, J., Kreider, J.M., Goldstein, S.A. and Giannobile, W.V.: Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J. Periodontol.*, **78**, 273-81, 2007.
- 24) Nissen, L.S., Jemtland, R., Gautvik, V.T., Pedersen, M.E., Paro, R., Fortunati, D., Pierroz, D.D., Stadelmann, V.A., Reppe, S., Reinholt, F.P., Del, A., Rucci, N., Teti, A., Ferrari, S.

- and Gautvik, K.M.: Osteopenia, decreased bone formation and impaired osteoblast development in Sox4 heterozygous mice. *J. Cell Sci.*, **120**, 2785-95, 2007.
- 25) Amendola, A., Butera, A., Sanchez, M., Strober, W. and Boirivant, M.: Nod2 deficiency is associated with an increased mucosal immunoregulatory response to commensal microorganisms. *Mucosal. Immunol.*, **2**, 391-404, 2014.
- 26) Ji, D., Liang, Z., Liu, G., Zhao, G. and Fang, J.: Bufalin attenuates cancer-induced pain and bone destruction in a model of bone cancer. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **390**, 1211-1219, 2017.
- 27) Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, **25**, 402-8, 2001.
- 28) Ferrante A.: Activation of neutrophils by interleukins-1 and -2 and tumor necrosis factors. *Immunol. Ser.*, **57**, 417-36, 1992.
- 29) Osta, B., Benedetti, G. and Miossec, P.: Classical and Paradoxical Effects of TNF- α on Bone Homeostasis. *Front Immunol.*, **5**, 2014.

表の説明

表 1. 本研究で用いたプライマー

標的遺伝子	塩基配列	増幅される長さ (bp)
<i>Gapdh</i>	F:5' -CACCATGGAGAAGGCCGGGG- 3'	418
	R:5' -GACGGACACATTGGGGGTAG- 3'	
<i>Il-17a</i>	F:5' -GCTCCAGAAGGCCCTCAGA- 3'	140
	R:5' -CTTTCCCTCCGCATTGACA - 3'	
<i>Tnf-α</i>	F:5' -CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA- 3'	175
	R:5' -TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC- 3'	
<i>Opg</i>	F:5' -ACCCAGAAACTGGTCATCAGC- 3'	157
	R:5' -CTGCAATACACACACTCATCACT- 3'	
	F : Forward, R : Reverse	

図の説明

図 1. (+)-terrein の構造式

Me : メチル基。

図 2. 動物実験のタイムスケジュール

10 週齢の C57BL/6 野生型雌性マウスの上顎左側第二臼歯歯頸部に 6-0 絹糸を結紮し、さらに、*Porphyromonas gingivalis* W83 株の菌液を絹糸に浸透させ、歯周組織に炎症を誘導した。歯周炎誘導 7 日後に(+)-terrein の抗炎症効果を観察する群と、14 日後に(+)-terrein の骨吸収抑制効果と生体安全性を観察する群を作製した。PBS または (+)-terrein をマウス投与後、安楽死させ、各種組織を採取し、解析を行った。

図 3. マイクロ CT における歯槽骨吸収の定量方法

マイクロ CT 像から、上顎左側第二臼歯の近心頬側根を含む矢状断画像において、近心のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を計測し、歯槽骨吸収量を定量した。M1 : 上顎左側第一臼歯、M2 : 上顎左側第二臼歯、M3 : 上顎左側第三臼歯。

図 4. 歯槽骨吸収のマイクロ CT 像

(a) 歯周炎誘導から 14 日後の骨吸収像（矢状断）

各群における代表的な骨吸収像（N=3~4）を示す。PBS：PBS 投与を投与した非歯周炎マウス群，TER：(+)-terrein を投与した非歯周炎マウス群，歯周炎：PBS 投与を投与した歯周炎マウス群，歯周炎+TER：(+)-terrein を投与した歯周炎マウス群。

PBS を投与した歯周炎マウスでは，PBS を投与した非歯周炎マウスに対して，歯槽骨吸収が亢進し，絹糸の結紮による歯周炎の誘導が確認された。(+) -terrein を投与した歯周炎マウスは，PBS を投与した歯周炎マウスに対して，上顎左側第二臼歯の近遠心と分岐部における歯槽骨の吸収が抑制された像がみられた。

(b) 歯槽骨吸収量

各群（N=3~4）における 7 日後と 14 日後の骨吸収量（平均 ± 標準偏差）をセメントエナメル境から歯槽骨頂間の長さで示した。エラーバー：標準偏差，ドット：実測値。PBS：PBS 投与を投与した非歯周炎マウス群，TER：(+)-terrein を投与した非歯周炎マウス群，歯周炎：PBS 投与を投与した歯周炎マウス群，歯周炎+TER：(+)-terrein を投与した歯周炎マウス群。

PBS を投与した歯周炎マウスでは，PBS を投与した非歯周炎マウスに対して，絹糸結紮 7 日後と 14 日後の歯槽骨吸収が有意に亢進し，絹糸結紮による歯周

炎の誘導が確認された ($p<0.001$, ANOVA/Tukey-Kramer test)。(+) -terrein を投与した歯周炎マウスでは, PBS を投与した歯周炎マウスに対して, 絹糸結紮 7 日後と 14 日後の歯槽骨吸収が有意に抑制された (それぞれ $p<0.001$, $p=0.005$, ANOVA/Tukey-Kramer test)。

図 5. 歯周組織中の好中球浸潤像と破骨細胞数

(a) 歯周炎誘導から 7 日後の組織像

各群における HE 染色像, IHC 染色 (抗 Ly-6g 抗体: 好中球), および TRAP (破骨細胞) 染色像 (N=3~4) の代表例を示す。HE 染色像の黒線枠内で囲んだ部位の拡大像を下段に示す。画像横の数字: 拡大率, スケールバー: 500 μm (拡大率 40 倍時) および 200 μm (拡大率 200 倍時)。PBS: PBS 投与を投与した非歯周炎マウス群, TER: (+) -terrein を投与した非歯周炎マウス群, 歯周炎: PBS 投与を投与した歯周炎マウス群, 歯周炎+TER: (+) -terrein を投与した歯周炎マウス群。HE: HE 染色像, 抗 Ly-6g: 抗 Ly-6g 抗体 IHC 染色像, TRAP: TRAP 染色像。

HE 染色において, PBS を投与した非歯周炎マウスでは, 歯周組織に炎症像は観察されなかった。PBS を投与した歯周炎マウスでは, PBS を投与した非歯周

炎マウスに対して、結紮糸による上皮の陥凹、上皮下組織の炎症性細胞浸潤、および歯槽骨吸収が観察された。(+)terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、上皮下組織の炎症性細胞浸潤、および歯槽骨吸収が抑制されていた。IHC 染色において、PBS を投与した非歯周炎マウスでは、好中球は観察されなかった。PBS を投与した歯周炎マウスでは好中球の浸潤がみられた。(+)terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、好中球の浸潤が減少した。TRAP 染色において、PBS を投与した非歯周炎マウスでは、破骨細胞は観察されなかった。PBS を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した非歯周炎マウスに対して、破骨細胞数が増加した。(+)terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、破骨細胞数が減少した像がみられた。

(b) 破骨細胞数の比較

TRAP 染色陽性かつ 3 核以上を有する細胞を破骨細胞と定義し、上顎左側第二臼歯の近心歯槽骨表面の破骨細胞数を計測した (N=3~4, 平均 ± 標準偏差)。

エラーバー：標準偏差，ドット：実測値。PBS：PBS 投与を投与した非歯周炎マウス群，TER：(+)terrein を投与した非歯周炎マウス群，歯周炎：PBS 投与を

投与した歯周炎マウス群, 歯周炎+TER:(+)-terrein を投与した歯周炎マウス群。

PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスともに、破骨細胞は観察されなかった。PBS を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスに対して、破骨細胞数が有意に増加した（ともに $p<0.001$, ANOVA/Tukey-Kramer test）。(+)-terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、破骨細胞数が有意に減少した（ $p=0.04$, ANOVA/Tukey-Kramer test）。

図 6. 歯周炎誘導から 7 日後の歯周組織中の炎症性骨吸収関連遺伝子の発現

歯肉から抽出した全 RNA を用いて、遺伝子発現を解析した（RT-PCR 法）。非結紮側の遺伝子発現量を陰性コントロールとし、同一個体における絹糸結紮側の遺伝子発現量を相対値で示した（ $N=5\sim11$ 平均 $\pm$ 標準偏差）。エラーバー：標準偏差，ドット：実測値，点線：遺伝子発現量のコントロール。歯周炎：歯周炎の誘導（絹糸の結紮），PBS：PBS 投与群，TER：(+)-terrein 投与群。

PBS を投与したマウスにおいて、歯周炎誘導部では、歯周炎未誘導部に対して、TNF- α mRNA の発現が有意に上昇した（ $p=0.01$, ANOVA/Tukey-Kramer test）。また、(+)-terrein を投与したマウスでは、PBS を投与したマウスに対して、歯周炎誘導部におけ

る TNF- α mRNA の発現が有意に減少した ($p=0.005$, ANOVA/Tukey-Kramer test)。PBS を投与したマウスにおいて、歯周炎誘導部では、歯周炎未誘導部に対して、IL-17A mRNA の発現が有意に上昇した ($p=0.01$, ANOVA/Tukey-Kramer test)。また、(+)-terrein を投与したマウスでは、PBS を投与したマウスに対して、歯周炎誘導部における IL-17A mRNA の発現が、統計学的有意差はないものの、減少傾向にあった。PBS を投与したマウスにおいて、歯周炎誘導部では、歯周炎未誘導部に対して、統計学的有意差はないものの、OPG mRNA の発現が増加する傾向にあった。また、(+)-terrein を投与したマウスでは、PBS を投与したマウスに対して、歯周炎誘導部における OPG mRNA の発現が、統計学的有意差はないものの、増加する傾向にあった。

図 7. 歯周炎誘導から 7 日後の血清中の炎症性サイトカイン量

血清中の炎症性サイトカイン量を ELISA 法で定量した ($N=3\sim 4$, 平均 $\pm$ 標準偏差)。エラーバー：標準偏差，ドット：実測値。PBS：PBS 投与を投与した非歯周炎マウス群，TER：(+)-terrein を投与した非歯周炎マウス群，歯周炎：PBS 投与を投与した歯周炎マウス群，歯周炎+TER：(+)-terrein を投与した歯周炎マウス群。

PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスともに，血清中に TNF- α と IL-6 は確認されなかった。また，PBS を投与した歯周炎マウスでは，

PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスに対して、血清中 TNF- α の濃度は有意に上昇した（それぞれ $p=0.02$, ANOVA/Tukey-Kramer test）。

(+)-terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、血清中 TNF- α の濃度は歯周炎未誘導レベルにまで有意に低下した（ $p=0.02$, ANOVA/Tukey-Kramer test）。また、PBS を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した非歯周炎マウスと(+)-terrein を投与した非歯周炎マウスに対して、統計学的な有意差がなかったものの、血清中 IL-6 の濃度は上昇する傾向がみられた。一方、(+)-terrein を投与した歯周炎マウスでは、PBS を投与した歯周炎マウスに対して、統計学的な有意差がなかったものの、血清中 IL-6 の濃度は低下する傾向がみられた。

図 8. (+)- terrein の生体安全性

(a) 体重への影響

非歯周炎マウスにおける、実験開始から 7 日後および 14 日後までの体重変化を、実験開始時の体重をベースライン（100 %）とした際の相対値（平均 $\pm$ 標準偏差）によって、観察した（N=4）。エラーバー：標準偏差。PBS : PBS 投与群，TER : (+)-terrein 投与群。

(+)-Terrein 投与マウスは、PBS 投与マウスと比較して、実験開始 7, 14 日後に

明らかな体重の変化はみられなかった。

(b) 肝臓と腎臓への影響

非歯周炎マウスにおける, 実験開始から 14 日後に採取した肝臓と腎臓を HE 染色し, 組織学的形態の変化を観察した。代表的な組織像 (N=4) を示す。スケールバー : 200 μm (拡大率 200 倍時) PBS : PBS 投与群, TER : (+)-terrein 投与群。

(+)-Terrein 投与マウスは, PBS 投与マウスと比較して, 肝臓での類洞の閉塞と肝細胞の壊死像や, 腎臓での糸球体の炎症像と尿細管の壊死像は観察されず, 異常像はみられなかった。