

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

## 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍)	勝又裕太(静岡県)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	甲第503号
学位授与年月日	令和2年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学位論文題目	Single Local Injection of Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatin Attenuates Bone Resorption and Orthodontic Tooth Movement in Mice (エピガロカテキンガレート修飾ゼラチンの単回局所注射は、マウスの骨吸収および矯正学的歯の移動を軽減する) Polymers 2018, 10(12), 1384; <a href="https://doi.org/10.3390/polym10121384">https://doi.org/10.3390/polym10121384</a>
論文審査委員	主査 教授 濱田良樹 副査 教授 二藤彰 副査 教授 友成博

## 内容の要旨

## 【緒言】

破骨細胞は骨組織を吸収する多核細胞であり、生理学的骨リモデリングに関与し骨の恒常性維持に貢献している。破骨細胞の骨吸収は、歯科矯正治療における歯科矯正歯の移動を可能にする。しかしながら、破骨細胞の過度の活性化は歯周病などの骨破壊性疾患の原因ともなる。我々は以前に、緑茶成分である Epigallocatechin gallate (EGCG) が抗酸化能のマスターレギュレーターである転写因子 Nrf2 を介して抗酸化酵素の発現を増加し、細胞内活性酸素 (ROS) シグナル伝達を減弱させ、破骨細胞分化・活性化を抑制することを報告した (JDR2015)。しかし EGCG 単体溶液では局所血流により有効濃度の長期維持ができず頻回投与が必要なため、臨床応用が難しいことが予想された。そこで EGCG をゼラチンと結合させ徐放性を付与した EGCG 修飾ゼラチン (EGCG-GL) を作製した (IJMS2015)。

本研究課題では、EGCG-GL は単回投与で破骨細胞を減少させ、歯の移動を抑制できると仮説を立て、その検証を細胞培養実験および動物実験を用いて行った。

## 【資料および方法】

*In vitro* において EGCG-GL の EGCG 徐放性試験を行った。すなわち同濃度の EGCG-GL および EGCG 溶液にタンパク分解酵素を添加し、37°C で4時間インキュベートしゼラチンを分解、遊離 EGCG の分離を4回繰り返して、抗 EGCG 抗体を用いた ELISA 法にて各分画の遊離 EGCG 濃度を測定した。また、マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 cell (RAW cell) を用いて、細胞毒性試験、抗酸化酵素発現解析、細胞内 ROS 検出、破骨細胞形成試験を行った。細胞毒性試験は、RAW cell を様々な濃度の EGCG-GL 存在下で1日培養、その後 AlamarBlue Cell Viability 試薬を用いて評価した。抗酸化酵素発現解析は、RAW cell を EGCG-GL またはゼラチン存在下で培養後、RNA 抽出、逆転写を行い、real-time RT-PCR を用いて Nrf2 および抗酸化酵素群の発現解析を行った。細胞内 ROS 検出は、RAW cell を EGCG-GL またはゼラチンで前処理後、組換え receptor activator of nuclear factor kappa $\beta$  ligand (RANKL) で6時間刺激し、洗浄、細胞懸濁後、2%FBS 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で蛍光スーパーオキシドプローブ処理を氷上で30分間行った。洗浄後、AccuriC6 フローサイトメーターを用いて細胞内 ROS を検出し、FlowJo 分析ソフトウェアを用いてデータを処理した。単球/マクロファージの生存細胞画分は、前方散乱/側面散乱プロットでゲーティングし、細胞内 ROS レベルは FL-1 チャネルでモニターした。

破骨細胞形成試験は、RAW cell を、組換え RANKL および EGCG-GL の存在下・非存在下で培養後、酸性ホスファターゼキットを使用して、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色した。暗赤色の多核細胞 (3 核以上) を TRAP 陽性の多核細胞すなわち破骨細胞としてカウントした。

*In vivo* において Lipopolysaccharide (LPS) 誘発骨破壊実験 (動物実験承認番号: 28A087), および歯の移動実験 (動物実験承認番号: 28A031) を行った。LPS 誘発骨破壊実験は、6 週齢 BALB/C 雄性マウス 15 匹を EGCG-GL 群 5 匹, LPS 群 5 匹, および LPS+EGCG-GL 群 5 匹に分け、頭蓋冠の正中線部へ以下の注射を行った。1 日目にゼラチン溶液または EGCG-GL と LPS 溶液または PBS をそれぞれの群へ注射, 3, 5, 7, 9 日目に LPS 溶液または PBS を注射した。11 日目に屠殺, 4% パラホルムアルデヒド PBS 溶液で浸漬固定し、マイクロ CT 撮影を行った。その後、通法に従い脱灰後にパラフィン切片を作製、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG を抗 8-OHdG ポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。歯の移動実験は、6 週齢 BALB/C 雄性マウス 13 匹をゼラチン群 4 匹, 低濃度 EGCG-GL 群 4 匹, 高濃度 EGCG-GL 群 5 匹の 3 群に分け、上顎第一臼歯口蓋側歯周組織にゼラチンまたは EGCG-GL の単回局所投与を行い、NiTi ワイヤーを装着し臼歯を口蓋側へ 3 週間移動した。1 週毎に上顎の精密印象を採得し模型を作製、歯の移動量を測定した。屠殺後、通法に従いパラフィン切片を作製、TRAP 染色にて歯槽骨表面の破骨細胞数の計測を行った。

### 【結 果】

徐放性試験において、EGCG 溶液は最初の分画でのみ高濃度の EGCG が検出されたが、その後の分画ではほぼゼロに減少した。一方、EGCG-GL では 4 回目の分画においても同濃度の EGCG が検出された。また培養細胞を用いた実験では、細胞毒性試験において、EGCG-GL は最終濃度で 0.7 mgEGCG/L までの濃度において細胞傷害性を示さなかったため、以降の細胞実験では最終濃度 0.07 mgEGCG/L の EGCG-GL を用いることとした。抗酸化酵素発現解析において、EGCG-GL 群はゼラチン群と比較して、Nrf2 および抗酸化酵素の発現が有意に増加していた。細胞内 ROS 検出において、EGCG-GL は RANKL による細胞内 ROS シグナル増加を低下させた。破骨細胞形成試験において、RANKL 群と比較し RANKL+EGCG-GL 群では TRAP 陽性多核細胞数は有意に減少し、EGCG-GL は RANKL による破骨細胞形成を抑制した。

LPS 誘発骨破壊実験ではマウス頭蓋冠への EGCG-GL 単回局所投与は、LPS による酸化ストレスを低減し、LPS 誘発骨破壊を阻止した。また、歯の移動実験では EGCG-GL 単回局所投与で破骨細胞数を有意に減少させ、濃度依存的に歯の移動量を減少させた。

### 【考 察】

徐放性確認試験において EGCG-GL は基材分解に伴う EGCG の徐放性を示した。また、EGCG-GL は Nrf2 を介して抗酸化酵素の発現を増加し、細胞内 ROS シグナルの伝達を減弱させ、破骨細胞分化・活性化を抑制した。*In vivo* では EGCG-GL の単回局所投与は破骨細胞形成を阻害し、EGCG 溶液の反復注射と同様に矯正学的歯の移動を減衰させ、EGCG-GL によって破骨細胞分化・活性化を抑制する EGCG の有効濃度が長期維持されたことを示した。EGCG 溶液では、局所血流により有効濃度の長期維持ができず頻回投与が必要であることから臨床応用は難しいと予想されたが、EGCG-GL は EGCG 徐放性を示し、単回局所投与で EGCG の有効濃度を長期維持でき、その問題を解決した。このことから EGCG-GL は骨破壊性疾患の予防や歯列矯正治療において歯の動きの調節に臨床応用が可能であると考えられる。

### 審査の結果の要旨

破骨細胞による骨吸収は、歯科矯正的な歯の移動を可能にするが、破骨細胞の過度な活性化は歯周病などの骨破壊性疾患の原因にもなる。これまでに申請者は、Epigallocatechin gallate (EGCG) は、転写因子 Nrf2 を介して抗酸化酵素の発現を促し、細胞内活性酸素 (ROS) シグナル伝達を減弱させ、結果的に破骨細胞の分化・活性化を抑制することを報告している。一方、EGCG 単体溶液の局所投与では、局所における有効濃度の長期維持ができないので、EGCG の徐放性を付与するために EGCG 修飾ゼラチン (EGCG-GL) を作製した。

本研究では、EGCG-GL の単回投与で歯の移動を抑制できるという仮説を立て、その検証を行うことを目的に EGCG-GL の EGCG 徐放性試験を行った。また、マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 cell (RAW cell) を用いた細胞毒性試験、抗酸化酵素発現解析、細胞内 ROS 検出、破骨細胞形成試験を行った。さらに、マウスを用いた Lipopolysaccharide (LPS) 誘発骨破壊実験、ならびに歯の移動実験を行った。

その結果、EGCG-GL の EGCG 徐放性が確認され、細胞毒性 (細胞傷害性) は認められなかった。また、EGCG-GL 存在下では、抗酸化酵素発現解析において Nrf2 および抗酸化酵素の発現が有意に増加し、細胞内 ROS 検出において RANKL による細

胞内 ROS シグナル増加が低下し、破骨細胞形成試験において RANKL による破骨細胞形成が抑制された。さらに、マウスを用いた LPS 誘発骨破壊実験において、EGCG-GL は LPS による酸化ストレスを低減し、LPS 誘発骨破壊を阻止した。また、歯の移動実験では、EGCG-GL 単回局所投与によって、破骨細胞数が有意に減少し、濃度依存的に歯の移動量が減少した。

以上より、EGCG-GL の単回局所投与は、局所における EGCG 有効濃度の長期維持を可能にし、EGCG 単体溶液の反復注射と同様に歯科矯正的な歯の移動を減衰させることが示された。本研究の成果は、EGCG-GL が歯科矯正的な歯の動きの調節のみならず、骨破壊性疾患の予防にも有用であることを示唆する貴重なデータと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。