

学位論文

大豆レシチンリポソーム化ラクトフェリンの抗炎症効果

: 人為的な歯の移動時の炎症制御への応用

学位申請者 川添 亜希

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座歯科矯正学分野

(主指導教員 : 丹根 一夫 教授)

2011 年

目次

	ページ
緒言	1
材料および方法	4
I. LPS 誘導歯周組織破壊に対する SLbLF 経口投与効果の検討	4
1. 実験動物と実験手順	4
2. 組織切片の作製	5
3. 接合上皮内の好中球数の算定	5
4. 歯槽骨縁の破骨細胞数の算定	6
5. TNF- α の免疫組織化学的解析	6
II. LPS 誘導歯周組織破壊を伴う実験的歯の移動に及ぼす SLbLF 経口投与の効果の検討	7
1. 実験動物と実験手順	7
2. 歯の移動距離の計測	8
3. 組織切片の作製	9
4. 接合上皮の深行増殖量の計測	9
5. 圧迫側における破骨細胞数の算定	9
6. TNF- α の免疫組織化学的解析	10

III.	骨芽細胞による破骨細胞誘導に対する bLF の効果の検討	10
1.	LPS 刺激による破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果の検討	10
2.	機械的圧縮刺激による破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果の検討	11
3.	LPS 刺激および機械的圧縮刺激による破骨細胞誘導における COX-2 / PGE ₂ 経路の関与の検討	12
4.	LPS 刺激および PGE ₂ 刺激による破骨細胞誘導に対する bLF の影響の検討	13
IV.	bLF による抗炎症作用の分子生物学的メカニズムの検討	14
1.	TLR4 (Toll like receptor 4) を介した NF-κB (Nuclear factor of κB) および MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 経路に対する bLF の影響についての検討	14
2.	IKK 複合体形成に対する bLF の影響についての検討	16
3.	LPS 以外の刺激に対する bLF の影響についての検討	16
V.	統計学的処理	18
	結果	19
I.	LPS 誘導歯周組織破壊に対する SLbLF 経口投与の効果	19
1.	接合上皮内の好中球の出現状況	19
2.	LPS 刺激後に誘導される破骨細胞の出現状況	20
3.	TNF-α の免疫組織化学的解析	22

II. LPS 誘導歯周組織破壊を伴う実験的歯の移動に及ぼす SLbLF 経口投与の効果	23
1. 歯の移動距離	23
2. 接合上皮の深行増殖量	24
3. 圧迫側における歯槽骨吸収	25
4. 圧迫側における破骨細胞出現状況	26
5. TNF- α の免疫組織化学的解析	28
III. 骨芽細胞による破骨細胞誘導に対する bLF の効果	29
1. LPS 刺激による破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果	29
2. 機械的圧縮刺激による破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果	30
3. LPS 刺激および機械的圧縮刺激による RANKL 発現における内因性 PGE ₂ の関与の検討	31
4. LPS 刺激および PGE ₂ 刺激による破骨細胞誘導に対する bLF の影響	31
IV. bLF による抗炎症作用の分子生物学的メカニズム	33
1. TLR4 を介した NF- κ B 経路における bLF の影響	33
2. TLR4 を介した MAPK 経路における bLF の影響	34
3. IKK 複合体形成に対する bLF の影響	35
4. Flagellin 刺激により誘導される TNF- α 発現に及ぼす bLF の影響	36
5. TNF- α 刺激により誘導される RANKL 発現に及ぼす bLF の影響	37

考察	38
I. SLbLF の安全性および有用性について	38
II. LPS 誘導歯周組織破壊に対する SLbLF 経口投与の効果について	41
III. LPS 誘導歯周組織破壊を伴う実験的歯の移動に及ぼす SLbLF 経口投与の効果について	42
IV. 炎症反応および矯正力に伴う破骨細胞誘導に対する SLbLF 経口投与の作用メカニズムの違いについて	45
V. bLF による抗炎症作用の分子生物学的メカニズムについて	48
総括	53
参考文献	55
謝辞	66

緒言

矯正歯科治療時には、歯の位置異常と複雑な装置の存在によりブラッシングが難しくなることから、口腔衛生状態が不良となり、歯周組織の炎症が惹起される¹⁾。また、歯周組織の炎症状態下で矯正力を加えると、アタッチメントロスが生じ、歯周組織破壊が急速に進行する可能性がある¹⁾。したがって、歯周組織の炎症を伴う不正咬合患者では、歯周組織の炎症を制御しながら矯正歯科治療を進める必要がある。歯周疾患の発症と進行には、主に歯周ポケット内に存在する歯周病原菌由来の lipopolysaccharide (LPS) が関与する^{2,3)}。LPS が誘導する歯周組織破壊には、浸潤細胞や歯周組織構成細胞が産生する炎症性サイトカインの複雑なネットワークが重要な役割を果たす。特に、tumor necrosis factor - alpha (TNF- α) は LPS 刺激後、短時間で産生され、他のサイトカイン誘導能や破骨細胞性骨吸収刺激作用を有し、歯周組織破壊に関わるサイトカインネットワークにおいて中心的な役割を果たしている⁴⁻⁶⁾。Miyachi ら^{7,8)} は、ラット歯肉溝から LPS を投与することにより、LPS 誘導ラット歯周組織破壊モデルを作製した。このモデルにおいては、LPS 投与により好中球遊走、血管拡張・充血、破骨細胞性骨吸収などの変化が誘導され、歯周組織細胞における TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカイン発現が一過性に上昇することを報告している。また、Yamano ら⁹⁾ も LPS 投与後の歯周組織において TNF- α 陽性細胞が多数観察されたことから、TNF- α が破骨細胞増加などの歯周組織破壊に直接関わ

っていると報告している。

一方、ラクトフェリン (LF) は鉄トランスポーターファミリーに属する 80kDa の多機能タンパク質で、ヒトをはじめとする哺乳動物の母乳や唾液、涙、血漿、鼻汁、好中球などに存在し、感染防御に重要な役割を果たすことが知られている¹⁰⁻¹⁴⁾。LF の機能は多彩で、抗炎症作用¹⁵⁻¹⁸⁾、抗菌作用¹⁹⁻²²⁾、抗ウイルス作用²³⁻²⁵⁾、抗腫瘍作用²⁶⁻²⁸⁾、抗疼痛作用²⁹⁾、免疫調節作用³⁰⁾、抗ストレス作用³¹⁾などの生理作用を有する。また、ウシ LF (bLF) は、カゼインについて牛乳に多く (1.9mg/ml) 含まれるタンパク質で³²⁾、安全性の高い食品由来物質として注目され、さまざまな食品に添加されたり、サプリメントとして服用されている^{33,34)}。

しかしながら、経口摂取された bLF の多くは胃でペプシンやトリプシンなどの酵素により消化分解され、小腸から吸収される bLF 量は極めて少ないため、bLF の抗炎症作用や免疫調節作用が十分に発揮されなくなる³⁵⁾。そこで、胃での分解を防ぎ、bLF を確実に腸へ到達させ、小腸における吸収量を増加させることを目的として、さまざまな腸溶 bLF 製剤が開発されている。現在は、経口摂取用錠剤やカプセル剤、顆粒剤などを腸溶性皮膜で被覆するドラッグデリバリーシステムの技術を利用した腸溶 bLF 製剤が広く用いられているが、近年、腸溶 bLF 製剤のさらなる工夫として、PEG (ポリエチレングリコール誘導体) 化 bLF³⁶⁾ やリポソーム化 bLF³⁷⁾ などが開発されている。リポソーム化 bLF

は、リン脂質二重構造膜の中に多量の bLF を内包することによって、腸への到達量を高めたものである³⁷⁾。Ishikado ら³⁸⁾は、リポソーム化 bLF の消化試験において消化に対する抵抗性が向上することと、リポソーム化 bLF を 7 日間経口投与したマウス末梢血から採取した単球を LPS で刺激したところ、TNF- α の産生量はコントロール群に比べて 1/4 程度に減少することをすでに報告している。また Yamano ら⁹⁾は、卵黄由来のリン脂質を使用した卵黄レシチンによるリポソーム化 bLF の経口投与が、LPS の誘導する破骨細胞性骨吸収を著しく抑制することを明らかにした。

本研究では、卵黄レシチンよりも安価でかつ調整が容易な大豆レシチンによるリポソーム化 bLF (SLbLF) を用いることとし、SLbLF 経口投与が TNF- α をターゲットとした歯周組織破壊の新しい予防・治療薬となる可能性を検討することを目的とし、以下の検討を行った。

材料および方法

本研究におけるすべての実験は、広島大学動物実験指針および広島大学動物実験施設内規に従って行われた。

I. LPS 誘導歯周組織破壊に対する SLbLF 経口投与効果の検討

1. 実験動物と実験手順

Ishikado ら¹⁰⁾の方法により作製された SLbLF (サンスター, 大阪) を実験に用いた。7 週齢 Wistar 系雄性ラット (各群 6 匹, 計 54 匹) (日本チャールズリバー, 横浜) に 500mg/kg/day の割合で調整した SLbLF 含有溶液を 7 日間経口摂取 (SLbLF 群) させた。次いで, 10% ペントバルビタールナトリウム (600mg/100gB.W.) (シェリング・プラウ アニマルヘルス, 大阪) による全身麻酔下にて, 5mg/ml 濃度の *E.coli* 由来 LPS 026:B6 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) を浸漬した綿栓 (直径 2mm, 長さ 8mm) を上顎臼歯口蓋側歯肉に 1 時間にわたり静置し, 歯肉溝から LPS (Sigma Aldrich) を浸透投与した。図 1 の実験スケジュールに従い, このモデルで破骨細胞増加が明らかにされている 3 時間後および 3 日後⁹⁾ に上顎臼歯部を上顎骨ごと摘出した。なお, bLF (森永乳業, 東京) 含有溶液を経口投与した非リポソーム化 bLF 群 (bLF 群), bLF 非含有溶液 (蒸留水) を経口投与した対照群についても同様の処置を行った。

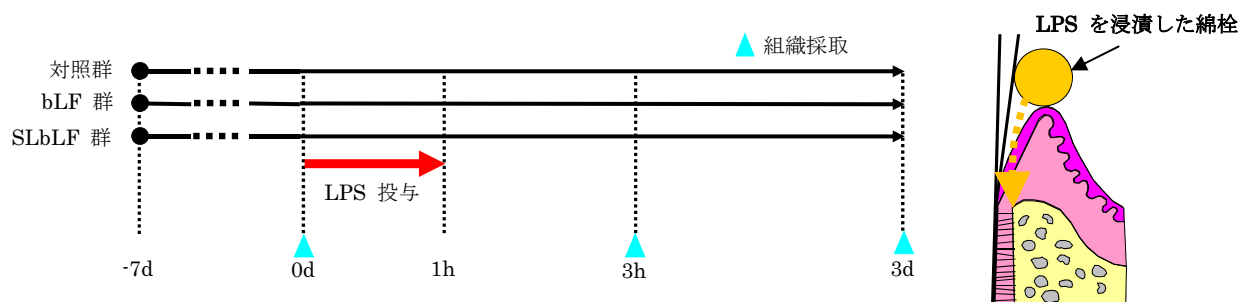


図 1 実験スケジュールおよび LPS 投与部位

SLbLF 群では, LPS 投与開始 1 週間前から実験終了時まで SLbLF を経口摂取させている. bLF 群および対照群についても同様の処置を行っている.

2. 組織切片の作製

4% periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) (8% paraformaldehyde (Merck KgaA, Darmstadt, Germany), 0.1M lysine (Sigma Aldrich), 0.01M periodate (Sigma Aldrich)) 固定液を用いて 4 °C, 24 時間固定後, 染色性の低下及び過脱灰を防ぐために, リン酸緩衝液で溶解した 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) -4Na (Sigma Aldrich) を用いて, 4 °C で約 10 日間低温脱灰した. その後, 組織の収縮などの影響を少なくするために脱水処理を工夫した acetone methylbenzoate xylene (AMeX) 処理法を用いてパラフィン包埋し, 厚さ 4.5 μ m の前頭断連続切片を作製した.

3. 接合上皮内の好中球数の算定

作製した標本をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し, 接合上皮内に遊走した好中球を光学顕微鏡 (BH2-BHSU, オリンパス, 東京) 下で観察した後, 接合上皮部位の単位面積あたりの好中球数を算定した (図 2A).

4. 歯槽骨縁の破骨細胞数の算定

HE 染色切片上で歯槽骨縁に沿って出現する破骨細胞を観察した。次いで、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase) 染色を施し、歯根膜側歯槽骨縁に沿って出現する TRAP 陽性の破骨細胞数を、光学顕微鏡 (オリンパス) 下にて歯槽骨頂から 0.1mm の範囲内で組織計測学的に算定した (図 2B)。

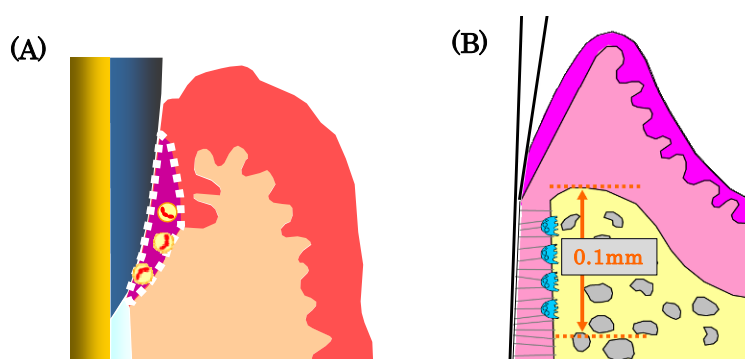


図 2 好中球 (A) および破骨細胞数 (B) の計測部位

5. TNF- α の免疫組織化学的解析

免疫組織化学的染色には ヒストファイブシンプルステイン法 (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を用いた。脱パラフィン後, 0.3% 過酸化水素水 (Sigma Aldrich) 添加メタノール (純正化学, 東京) にて内因性ペルオキシターゼ処理を 60 分間行い, 続いて Protein Block (DAKO Denmark A/S., Glostrup, Denmark) を用いて非特異的反応のプロッキング処理を 30 分間行った。その後, 原液を 250 倍に希釈した抗 TNF- α ヤギポリクロナール抗体 (R&D System, Inc., Minneapolis, MN, USA) を用いて, 4 °C で 24 時間反応させた。PBS (Sigma Aldrich) で洗浄後, シンプルステイン ラット MAX-PO (ニチレイ

バイオサイエンス) を 30 分間作用させた。発色には 3, 3' - diaminobenzidine (DAB) 基質 (DAKO) を用いた。その後、ヘマトキシリンで対比染色し、非水溶性封入剤で封入後、光学顕微鏡 (オリンパス) 下で TNF- α 陽性細胞を観察した。陰性コントロールとして、一次抗体の代わりに PBS (Sigma Aldrich) を作用させたものを用いた。

II. LPS 誘導歯周組織破壊を伴う実験的歯の移動に及ぼす SLbLF 経口投与の効果の検討

1. 実験動物と実験手順

7 週齢 Wistar 系雄性ラット (各群 8 匹, 計 32 匹) (日本チャールズリバー) を用いた。図 3 に示す実験スケジュールに従って、まず上顎第一臼歯を抜歯し、28 日間放置することによって抜歯窩の治癒を図った後、上顎第二臼歯の牽引を開始した。10% ペントバルビタールナトリウム (シェリング・プラウ アニマルヘルス) による全身麻酔下にて、第二臼歯にリガチャーワイヤー (TOMY International, 東京) を巻きつけ、レジンによる固定を行った。リガチャーワイヤーにはニッケルチタンクローズドコイルスプリング (ロッキーマウンテンモリタ, 東京) を予め結び付けておくことでクローズドコイルスプリング (ロッキーマウンテンモリタ) が歯から脱落しないように固定を行った。次に、上顎切歯から 1mm 離れた位置に矯正用インプラント (直径 1.8mm, 長さ 6mm) (Dual-Top Anchor Screw, Jeil Medical Co., Seoul, Korea) を植立し、クローズドコイルスプリング (ロッキーマウンテンモリタ) の端をリガチャーワイヤーにてインプラント (Jeil Medical Co.) に固

定した。その際、牽引力が 20g となるように調節を行った。第二臼歯の牽引は 7 日間行った。なお、SLbLF (サンスター) は牽引開始 7 日前より経口摂取させた。また、LPS 投与群には牽引開始 0 日目、および 3 日目に 実験 I と同様の方法で 5mg/ml 濃度の *E.coli* 由来 LPS 026:B6 (Sigma Aldrich) を投与した。

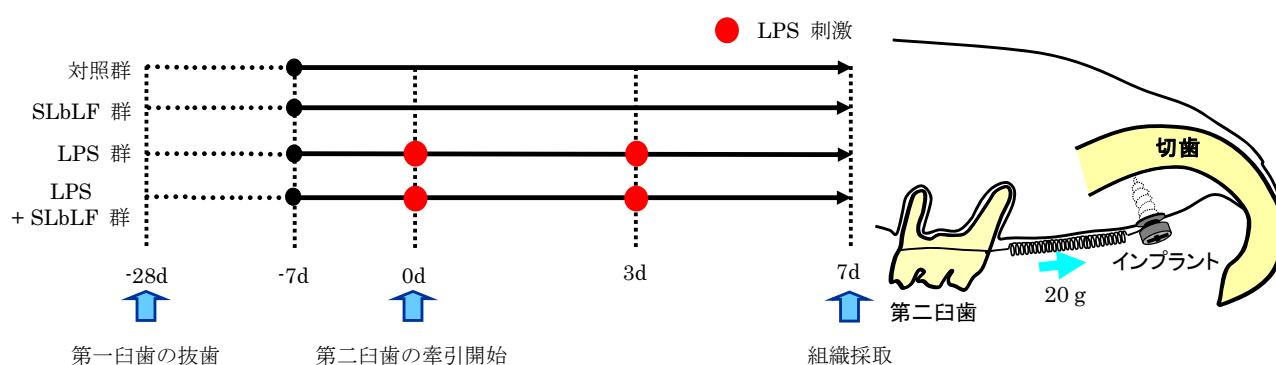


図 3 実験スケジュールおよびラット実験的歯の移動モデル

第二臼歯の牽引開始 1 週間前より牽引終了時まで bLF 非含有溶液 (蒸留水) を経口投与した群を対照群、SLbLF 溶液を経口投与した群を SLbLF 群とする。さらに、対照群および SLbLF 群に LPS 投与を行ったものをそれぞれ LPS 群、LPS + SLbLF 群とする。

2. 歯の移動距離の計測

7 日間の牽引終了後、上顎臼歯部をシリコン印象剤にて印象採得し、作製した石膏模型上で、上顎第二臼歯と第三臼歯間の距離を実体顕微鏡 (SZ, オリンパス, 東京) 下でデジタルノギス (ミットヨ, 川崎) を用いて小数点第 2 位まで計測し、移動距離を算出した (図 4)。

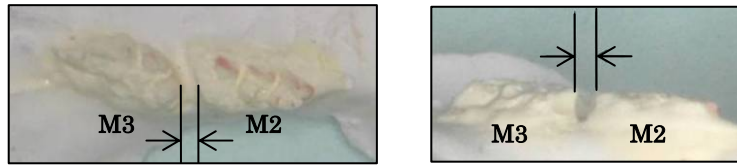


図 4 歯の移動距離の計測

3. 組織切片の作製

ラットを屠殺後、上顎臼歯部を上顎骨ごと摘出し、実験 I-2 と同様の方法で 4% PLP (Merck KgaA) にて固定後、10% EDTA- 4Na (Sigma Aldrich) リン酸緩衝液にて低温脱灰し、AMeX 法にてパラフィンに包埋し、上顎第二臼歯近心根を含む厚さ 4.5 μ m の矢状断連続切片標本を作製した。

4. 接合上皮の深行増殖量の計測

作製した標本を HE 染色し、接合上皮の深行増殖を光学顕微鏡 (オリンパス) 下で観察した後、セメントエナメル境 (CEJ) から接合上皮歯根側端の距離を算出し、接合上皮の深行増殖量とした (図 5A)。

5. 圧迫側における破骨細胞数の算定

HE 染色標本上で、圧迫側、すなわち上顎第二臼歯近心根近心面の歯根膜側歯槽骨における歯槽骨吸収像および破骨細胞出現状況を観察した。次いで、TRAP 染色を施し、歯槽骨頂部 (図 5B) および歯槽骨中央部 (図 5C) の単位面積当たりの破骨細胞数を、光学顕微鏡 (オリンパス) 下にて組織計測学的に算定した。

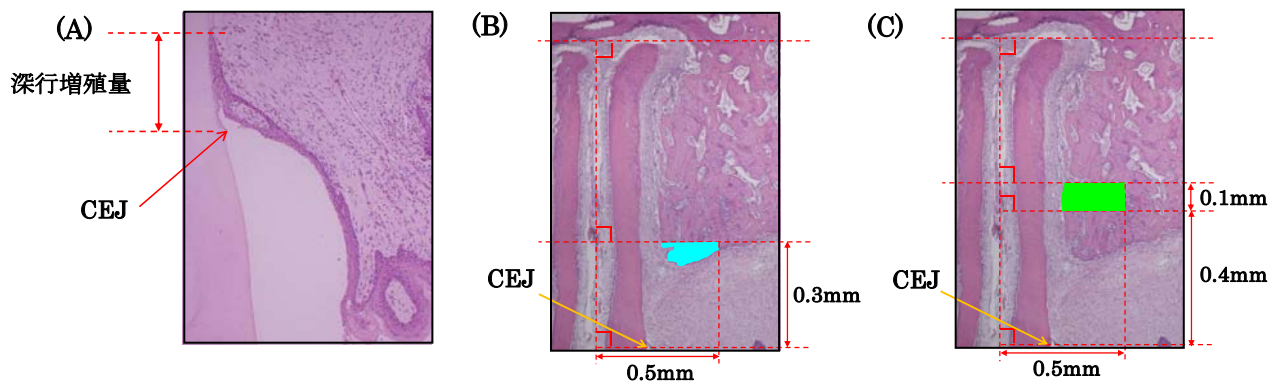


図 5 接合上皮の深行増殖量 (A) および破骨細胞数 (B, C) の計測部位
CEJ: セメントエナメル境

6. TNF- α の免疫組織化学的解析

TNF- α の免疫組織化学的染色は、実験 I-5 と同様の方法で行い、ヘマトキシリンで対比染色し、非水溶性封入剤で封入後、光学顕微鏡（オリンパス）下で TNF- α 陽性細胞を観察した。

III. 骨芽細胞による破骨細胞誘導に対する bLF の効果の検討

1. LPS 刺激による破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果の検討

6 well 培養プレート (FALCON[®], Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に 3.5×10^5 cell/dish の密度で マウス骨髄由来間葉系細胞株 (ST2 細胞) (理化学研究所, 和光) を播種し, 100U/ml の Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, GrandIsland, NE, USA) を加えた 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) 含有 Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM, Invitrogen) 中で 48 時間培養後,

Aggregatibacter Actinomycetemcomitans (A.a.) ATCC29522 株由来 LPS (九州歯科大学口腔微生物学講座, 西原達次先生より供与) を 100ng/ml の濃度で添加した. 2, 4, 6, 12, 24 時間後に細胞を回収した後, mRNA を抽出した. なお, bLF 群では LPS 投与 4 時間前より 10 μ g/ml 濃度の bLF を前投与し, bLF を PBS (Sigma Aldrich) で洗浄した後 LPS 刺激を加えた.

mRNA 抽出には, RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い, total RNA を抽出し, 吸光光度計 (NANODROP1000, Thermo Fisher Scientific K. K., 横浜) により RNA 濃度を測定し, 1 μ g の total RNA から Rever Tra Ace[®] (東洋紡, 大阪) を用いて cDNA を合成した. その後, 表 1 に示す破骨細胞関連因子に特異的なプライマーを作製し, Applied Biosystems StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, 東京) を用いて, TagMan[®] assay または SYBR[®] Green assay による定量 PCR を行った. TagMan[®] assay には TagMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), SYBR[®] Green assay には Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いた.

2. 機械的圧縮刺激による破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果の検討

6 well 培養プレート (FALCON[®], Becton Dickinson and Company) に 3.5 \times 10⁵ cell/dish の密度で ST2 細胞 (理化学研究所) を播種し, 10% FBS (Invitrogen) 含有

α -MEM (Invitrogen) 中で 48 時間培養後，培養液中に 1.5% Agarose-Me gel (ナカライテスク，京都) を置き，その上から 0.5gw のおもりを用いて 0.05kPa の機械的圧縮刺激を加え，2, 4, 6, 12, 24 時間後に細胞を回収し，実験Ⅲ-1 と同様に real time RT-PCR 法にて，TNF- α ，COX-2，RANKL，OPG の発現を検討した．なお，bLF 群では，機械的圧縮刺激開始 4 時間前より 10 μ g/ml 濃度の bLF を前投与し，bLF を PBS (Sigma Aldrich) で洗浄した後，機械的圧縮刺激を加えた．

3. LPS 刺激および機械的圧縮刺激による破骨細胞誘導における COX-2 / PGE₂ 経路の関与の検討

6 well 培養プレート (FALCON[®], Becton Dickinson and Company) に 3.5×10^5 cell/dish の密度で ST2 細胞 (理化学研究所) を播種し，10% FBS (Invitrogen) 含有 α -MEM (Invitrogen) 中で 48 時間培養後，実験Ⅲ-1 および 2 と同様の方法で *A.a.* 由来 LPS (100ng/ml) と機械的圧縮刺激 (0.05kPa) を加え，24 時間後に細胞を回収し，実験Ⅲ-1 と同様に real time RT-PCR 法にて，RANKL の発現を検討した．なお，内因性の PGE₂ 産生を抑制するために COX-2 選択的阻害薬である NS398 (5.0 μ M) (Cayman Chemical Company, Michigan, MI, USA) を，LPS および機械的圧縮刺激開始 2 時間前に投与した．

表 1 定量 PCR に用いたプライマーおよびプローブ

Primer	Sequence	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)				
TagMan[®] assay							
TNF- α	Forward	5'-CCAAATGGCCTCCCTCAT-3'	86				
	Reverse	5'-GCTACAGGCTTGTCACCTCGAATT-3'					
	TagMan probe	5'-CCCAGACCCTCACACTCAGATCATCTTC-3'		60			
SYBR[®] Green assay							
COX-2	Forward	5'-TTCAAAGAAGTGCTGGAAAAGGT-3'	304				
	Reverse	5'-GATCATCTCTACCTGAGTGCTTTT-3'					
RANKL	Forward	5'-CACACCTCACCATCAATGC-3'	207				
	Reverse	5'-AGTCTGTAGGTACGCTTCC-3'					
OPG	Forward	5'-CTGCTGAAGCTGTGGAAA-3'	206				
	Reverse	5'-GATTTGCAGGTCTTTCTCG-3'					
18S	Forward	5'-TGTGGTGTGAGGAAAGCAG-3'	155				
	Reverse	5'-TCCCATCCTTCACATCCTTC-3'					
<table border="0" style="width: 100%; border: 1px dashed black;"> <tr> <td>TNF-α : tumor necrosis factor-alpha</td> <td>COX-2 : cyclooxygenase-2</td> </tr> <tr> <td>RANKL : receptor activator for nuclear factor κB ligand</td> <td>OPG : osteoprotegerin</td> </tr> </table>				TNF- α : tumor necrosis factor-alpha	COX-2 : cyclooxygenase-2	RANKL : receptor activator for nuclear factor κ B ligand	OPG : osteoprotegerin
TNF- α : tumor necrosis factor-alpha	COX-2 : cyclooxygenase-2						
RANKL : receptor activator for nuclear factor κ B ligand	OPG : osteoprotegerin						

4. LPS 刺激および PGE₂ 刺激による破骨細胞誘導に対する bLF の影響の検討

6~8 週齢 ddY 雄性マウス（日本チャールズリバー）の大腿骨から骨髓細胞を採取し、96 well 培養プレート（FALCON[®], Becton Dickinson and Company）に 2×10^5 cells/well の密度で播種し、20ng/ml の mouse M-CSF (R&D Systems) を添加した 10% FBS (Invitrogen) 含有 α -MEM (Invitrogen) で 24 時間培養して破骨細胞前駆細胞を誘導した (0 日目). その後 10% FBS (Invitrogen) 含有 α -MEM (Invitrogen) にて、生後 2 日齢 ddY 雄性マウス（日本チャールズリバー）の頭蓋骨から採取した骨芽細胞 (1×10^4

cells/well) と骨髄細胞を 7 日間共培養した。共培養 1 日目から *A.a.* 由来 LPS (1 μ g/ml) あるいは PGE₂ (100ng/ml) (Cayman Chemical) の添加を開始した。なお、bLF 群では LPS および PGE₂ の添加開始 4 時間前に bLF を投与した。共培養終了後、10% 中性緩衝ホルマリン固定およびエタノール・アセトン固定を行い、TRAP 染色を施し、well 内に出現する TRAP 陽性細胞数を算定した。

IV. bLF による抗炎症作用の分子生物学的メカニズムの検討

1. TLR4 (Toll like receptor 4) を介した NF- κ B (Nuclear factor of κ B) および MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 経路に対する bLF の影響についての検討

60mm 径 Dish (FALCON[®], Becton Dickinson and Company) に 1.0×10^6 cell/dish の密度で ST2 細胞 (理化学研究所) を播種し、10% FBS (Invitrogen) 含有 α -MEM (Invitrogen) 中で 48 時間培養後、*A.a.* 由来 LPS (100ng/ml) を添加し、0, 5, 15, 30, 45, 60 min 後に細胞を回収した。なお、bLF 群では LPS 投与 4 時間前より 10 μ g/ml 濃度の bLF を前投与し、bLF を PBS (Sigma Aldrich) で洗浄後、LPS 刺激を加えた。タンパクの抽出および Western blot 法は、以下に示す方法で行った。

タンパクの抽出は、Triton lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH7.4), 125mM NaCl, 2% Triton X-100 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 5mM EDTA, 0.1M NaF, 10 μ g/mL leupeptin (Sigma Aldrich), 0.1 μ g/mL trypsin inhibitor, 0.1 μ g/mL aprotinin

(Sigma Aldrich), 50 μ g/mL phenylmethanesulfonyl fluoride (和光純薬)] を用いて行い, Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) によりタンパク濃度を測定した. 20 μ g のタンパクを Laemmli' s sample buffer に混和し, 100 °Cで 3 分間変性させた後, 8~10% sodium dodecyl sulfate (GE ヘルスケアバイオサイエンス, 東京) -polyacrylamide gel で電気泳動 (SDS-PAGE) し, ニトロセルロースメンブレン (PROTRAN, WHATMAN, GmbH., Dassel, Germany) に転写した. 転写後のメンブレンを, 3% スキムミルク (森永製菓, 東京) 含有 wash buffer [137mM NaCl (Sigma Aldrich), 8.1mM Na₂HPO₄-12H₂O (Sigma Aldrich), 2.68mM KCl (和光純薬), 1.47mM KH₂PO₄ (和光純薬)] に浸し, 室温で 1 時間作用させた後, 一次抗体を 3% スキムミルク含有 wash buffer にて希釈し, 室温で 2 時間作用させた. 二次抗体は, 抗 mouse または抗 rabbit biotinylated secondary antibody (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用い, 室温で 1 時間作用させた. 目的抗原の化学発光検出には, ECL western blotting detection system (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いた.

Western blot 法の検討には, 抗 phospho IKK β 抗体 (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA), 抗 phospho I κ B α 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 抗 I κ B α 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 phospho p38 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 phospho JNK 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗

phospho ERK 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 IRAK1 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた. また, 内在性コントロールとして抗 β actin 抗体 (Sigma Aldrich) を用いた.

2. IKK 複合体形成に対する bLF の影響についての検討

IKK 複合体は, IKK α , IKK β および NEMO により構成されている³⁹⁾. そこで, bLF が IKK 複合体形成に及ぼす影響について, 免疫沈降法を用いて検討を行った.

実験IV-1 と同様に抽出したタンパク 1mg に Triton lysis buffer を加え 1ml に調整した後, 抗 IKK β 抗体 (Cell Signaling Technology) および抗 NEMO 抗体 (Becton Dickinson and Company) を 20 μ l 加え, 4 $^{\circ}$ C で 3 時間回転混和した. 次に, 20 μ l の protein G agarose (Roche Diagnostics) を加え, さらに 4 $^{\circ}$ C で 3 時間回転混和した. その後, 遠心して上清を除いたペレットに, sample buffer を 15 μ l 加え, 100 $^{\circ}$ C で 3 分間変性し, 遠心後, この上清を Western blot 法を用いて解析した. Western blot 法の検討には, 抗 IKK α 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 IKK β 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 NEMO 抗体 (Becton Dickinson and Company) を用いた.

3. LPS 以外の刺激に対する bLF の影響についての検討

グラム陰性細菌の細菌性鞭毛に存在するタンパクである Flagellin⁴⁰⁾ は TLR5 を介して TLR4 と同様に NF- κ B 経路を活性化することにより TNF- α 産生を促進する⁴¹⁾.

また、LPS 刺激で誘導される TNF- α は、TNF レセプターに結合し、TLR4 および TLR5 を介した NF- κ B 経路とは異なる NF- κ B 経路を活性し、RANKL をはじめとする種々の サイトカイン発現を誘導することが知られている⁴²⁾。そこで、この 2 つの刺激に対する bLF の影響について検討した。

6 well 培養プレート (FALCON[®], Becton Dickinson and Company) に 3.5×10^5 cell/dish の密度で ST2 細胞 (理化学研究所) を播種し、10% FBS (Invitrogen) 含有 α -MEM (Invitrogen) 中で 48 時間培養後、recombinant Flagellin from Salmonella typhimurium (TLR5 ligand) (1ng/ml) (InvivoGen, San Diego, CA, USA) 刺激 または recombinant human TNF- α (10 μ g/ml) (R&D System) 刺激を加え、2 時間および 24 時間後の細胞を回収し、実験 III-1 と同様の方法で cDNA 合成を行った。なお、bLF 群では LPS 投与 4 時間前より 10 μ g/ml 濃度の bLF を前投与し、bLF を PBS (Sigma Aldrich) で洗浄した後、各刺激を加えた。

PCR は、rTaq-DNA polymerase (Qiagen) を使用し、DNA サーマルサイクラー (MyCycler[™], Bio-Rad Laboratories) を用いて DNA を増幅した。PCR 条件は、変性反応 (94 $^{\circ}$ C, 30 秒)、表 2 に示すプライマーを用い、各条件でのアニーリング反応 (30 秒)、伸長反応 (68 $^{\circ}$ C)、を 1 サイクルとして、表 2 に示すサイクル数反応させた。72 $^{\circ}$ C, 10 分で DNA 鎖を完全に伸長させた後、反応液を 1.5% Agarose-Megel (ナカライテスク) で

電気泳動し, ethidium bromide solution (Sigma Aldrich) にて可視化した.

表 2 PCR に用いたプライマー

Primer	Sequence	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Cycles
TNF- α	Forward 5'-GCCTCAGCCTCTTCTCATTC-3' Reverse 5'-GCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'	209	58	32
RANKL	Forward 5'-CGCTCTGTTTCCTGTACTTTTCGAGCG-3' Reverse 5'-TCGTGCTCCCTCCTTTCATCAGGTT-3'	608	58	33
18S	Forward 5'-TGTGGTGTGAGGAAAGCAG-3' Reverse 5'-TCCCATCCTTCACATCCTTC-3'	155	60	30

TNF- α : tumor necrosis factor-alpha RANKL : receptor activator for nuclear factor κ B ligand

V. 統計学的処理

データの統計処理には Excel 統計 2008 ソフトを使用し, Kolmogorov-Smimo test ならびに Bartlett test を用いてデータ分布の分析後, ANOVA ならびに Scheffe test を用いて, 有意水準を $P < 0.05$ あるいは $P < 0.01$ とし, 平均の有意差検定を行った.

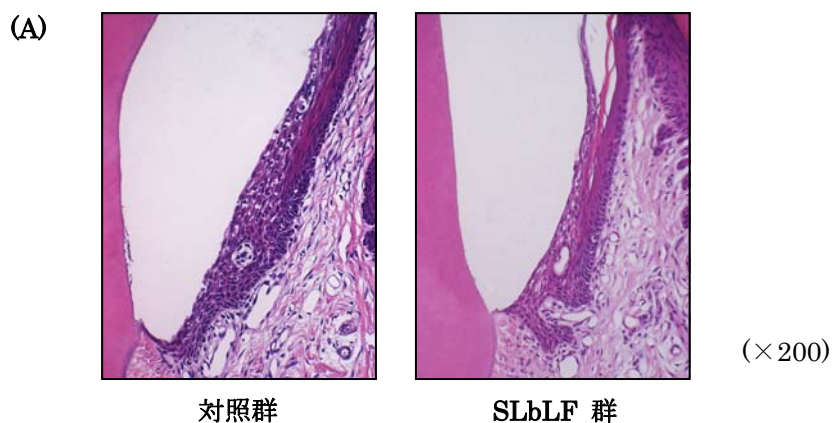
結果

I. LPS 誘導性歯周組織破壊に対する SLbLF 経口投与の効果

1. 接合上皮内の好中球の出現状況

対照群では、LPS 投与により接合上皮内および接合上皮直下結合組織に出現する多数の好中球が認められたのに対し、SLbLF 群では、接合上皮内および上皮直下に出現する好中球は著しく減少していた (図 6A).

図 6B は接合上皮内に出現した好中球数の変化を示す。SLbLF 前投与は、LPS 投与 3 時間および 3 日後に認められる好中球増加を、有意に減少させた ($P<0.01$)。また、bLF 前投与においても有意な減少が認められ (3 時間 ; $P<0.05$, 3 日 ; $P<0.01$)、その効果は SLbLF 群と有意差がなかった。



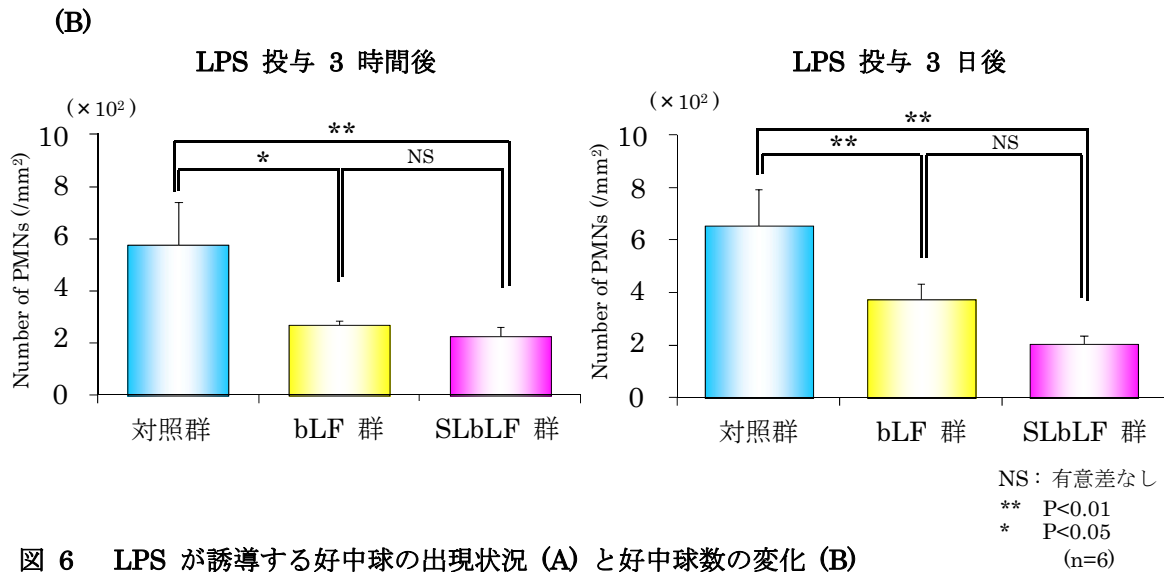


図 6 LPS が誘導する好中球の出現状況 (A) と好中球数の変化 (B)

(A) LPS 投与によって対照群では、多数の好中球が観察される。一方、SLbLF 群では接合上皮内における好中球数は減少する。

(B) SLbLF 前投与は、LPS による接合上皮内への好中球増加を有意に減少させる。

2. LPS 刺激後に誘導される破骨細胞の出現状況

対照群では、LPS 投与によって歯根膜側歯槽骨縁に沿って多数の破骨細胞や単核の前破骨細胞が誘導され、不規則な吸収窩が多数形成された。一方、SLbLF 群では観察期間を通して、破骨細胞の著明な出現や吸収窩の形成はほとんど観察されなかった (図 7)。

図 8 に各群における TRAP 陽性の破骨細胞数を示す。SLbLF 前投与は、LPS 投与 3 時間および 3 日後に誘導される破骨細胞出現を有意に減少させた (P<0.01)。bLF 前投与でも破骨細胞誘導の減少が認められたが、SLbLF 群の方がより強い効果を示した。

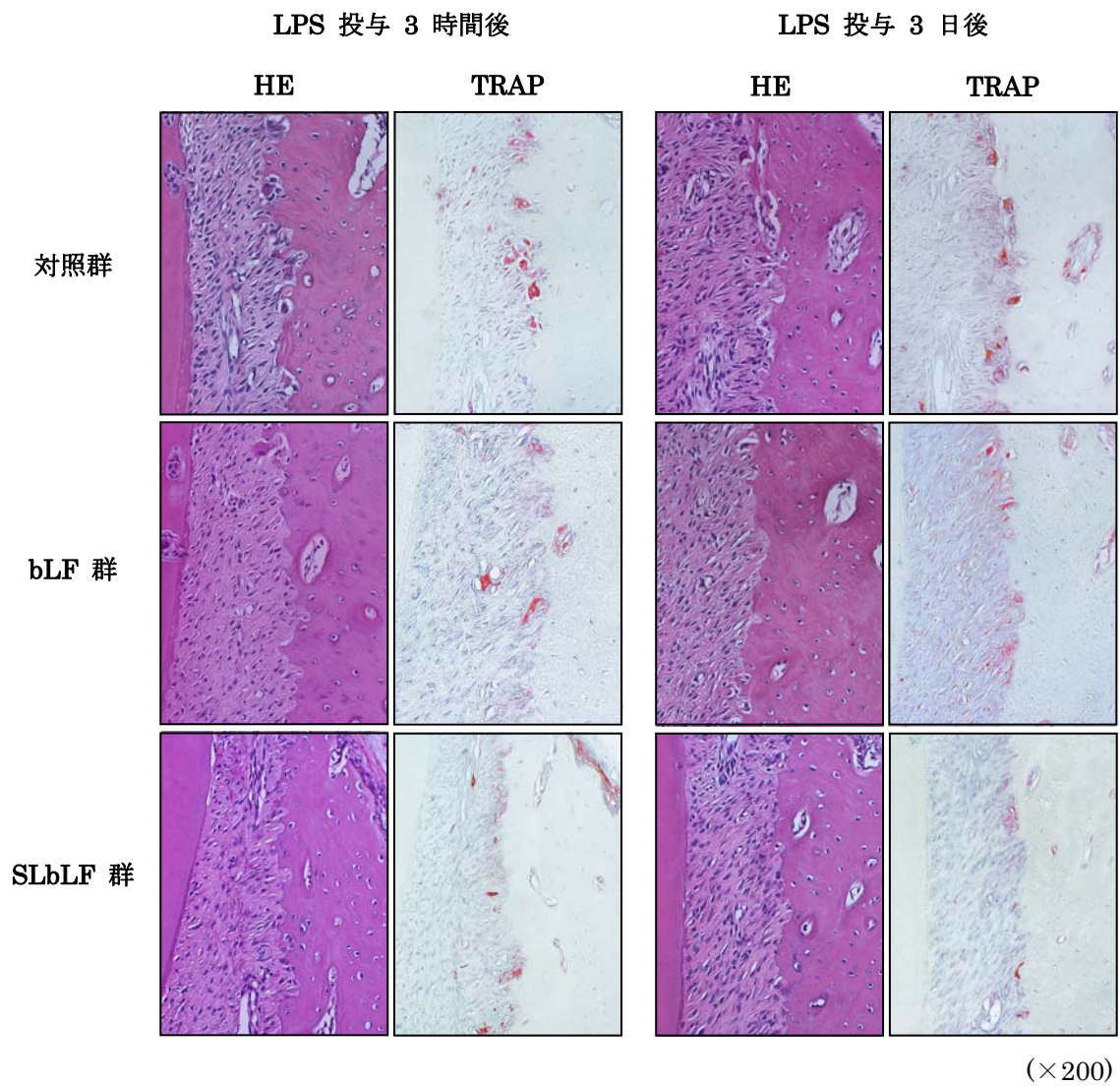
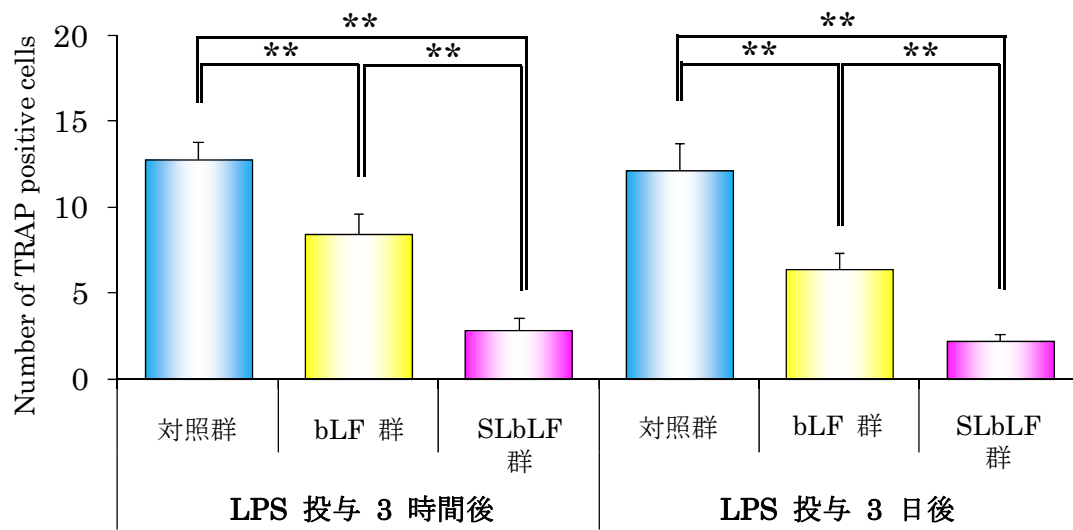


図 7 LPS 刺激により誘導された歯槽骨縁の破骨細胞出現状況

対照群では LPS 投与により歯根膜側歯槽骨縁に沿って 3 時間および 3 日後に, TRAP 陽性多核破骨細胞や単核前破骨細胞が誘導される。一方, SLbLF 前投与では 3 時間および 3 日後ともに, LPS による破骨細胞誘導はみられない。bLF 前投与でも破骨細胞誘導の減少が認められるが, SLbLF 群の方がより強い効果を示す。



** P<0.01
(n=6)

図 8 TRAP 陽性細胞数の変化

SLbLF 前投与は、LPS 投与 3 時間および 3 日後に誘導される破骨細胞を有意に減少させる。

3. TNF- α の免疫組織化学的解析

対照群では、LPS 投与 3 時間後に TNF- α が接合上皮細胞に発現した。LPS 投与 3 日後になると、接合上皮での発現は減少したが、TNF- α 陽性の線維芽細胞や骨芽細胞が歯根膜部に多数観察された。一方、SLbLF 群では、観察期間を通して TNF- α 陽性細胞はほとんど認められなかった。

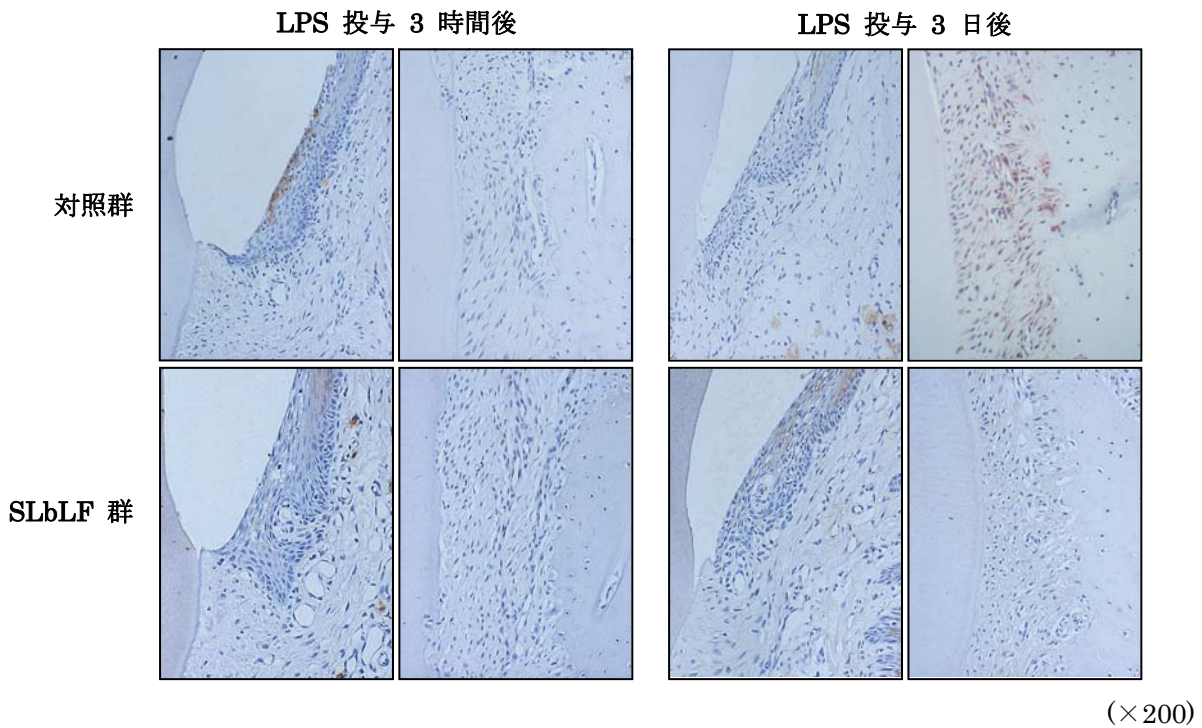


図 9 TNF- α の免疫組織化学的染色像

対照群では、LPS 投与 3 時間後の接合上皮、および 3 日後の歯根膜部に TNF- α 陽性細胞が多数観察される。一方、SLbLF 群では TNF- α 陽性細胞はほとんど観察されない。

II. LPS 誘導歯周組織破壊を伴う実験的歯の移動に及ぼす SLbLF 経口投与の効果

1. 歯の移動距離

7 日間の歯の牽引により、対照群では平均 0.46mm、SLbLF 群では平均 0.47mm、LPS 群では平均 0.49mm、LPS+SLbLF 群では平均 0.47mm の歯の移動が認められ、各群間に有意な差は認められなかった (図 10)。

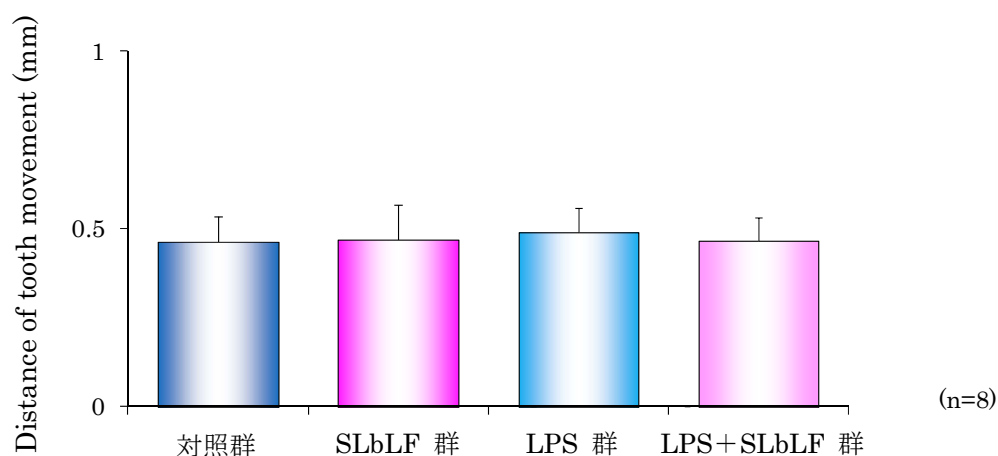


図 10 歯の移動距離

歯の移動距離に、各群間で有意な差は認められない。

2. 接合上皮の深行増殖量

対照群および LPS 群では、セメント質に沿って接合上皮の深行増殖が認められたのに対し、SLbLF 群および LPS+SLbLF 群では接合上皮の根尖側端はほぼセメント-エナメル境部に位置していた (図 11A)。組織計測の結果においても、経口投与した SLbLF は LPS 刺激による接合上皮の深行増殖を有意に抑制するばかりでなく ($P<0.01$), 対照群でみられた深行増殖も有意に減少させた ($P<0.05$) (図 11B)。

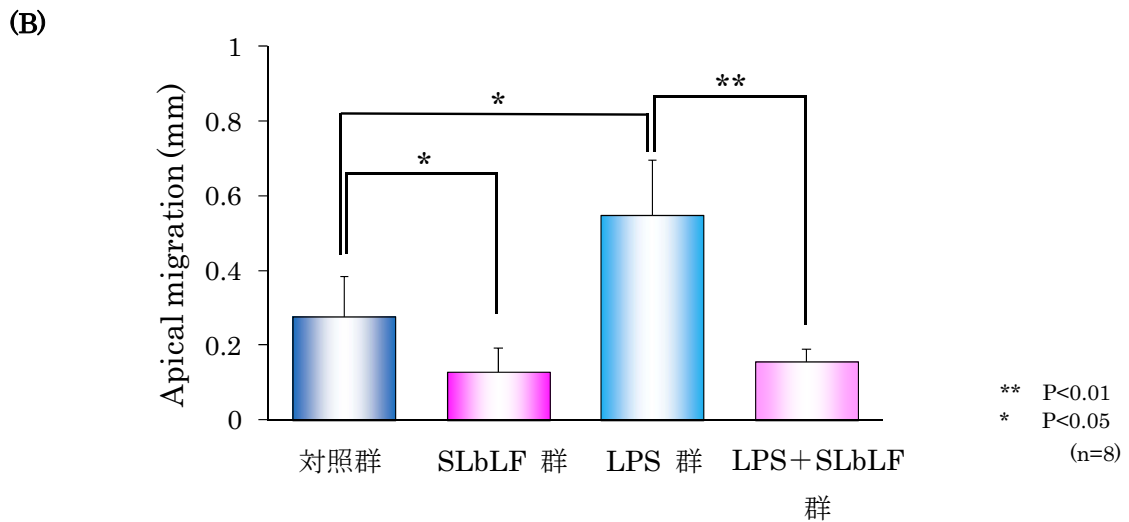
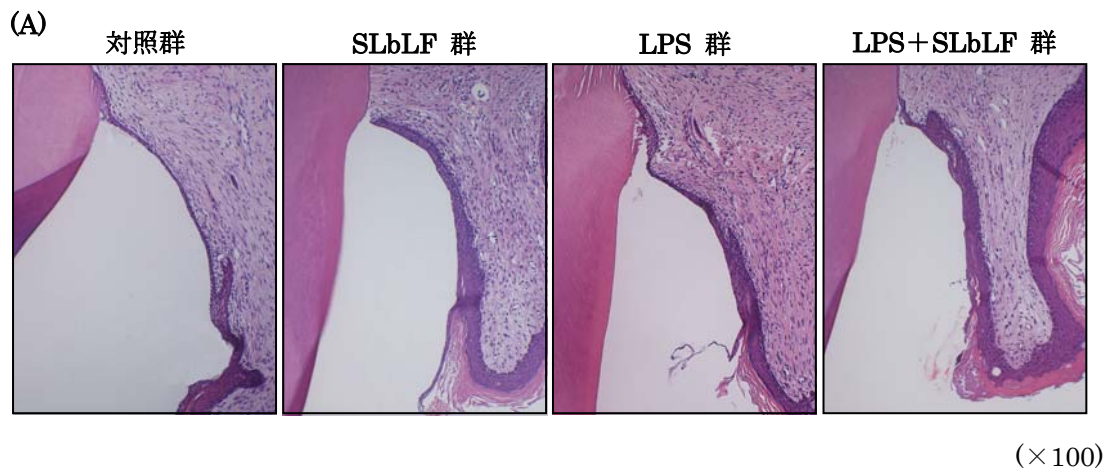


図 11 接合上皮の深行増殖

(A), (B) 对照群および LPS 群で認められる接合上皮の深行増殖は, SLbLF 群および LPS+SLbLF 群で有意に減少する.

3. 圧迫側における歯槽骨吸収

LPS 群では, LPS 投与により誘導される歯槽骨頂部での水平的な歯槽骨吸収が認められたのに対し, LPS+SLbLF 群では認められなかった. また, 对照群および SLbLF 群でも水平的な歯槽骨吸収は認められなかった (図 12).

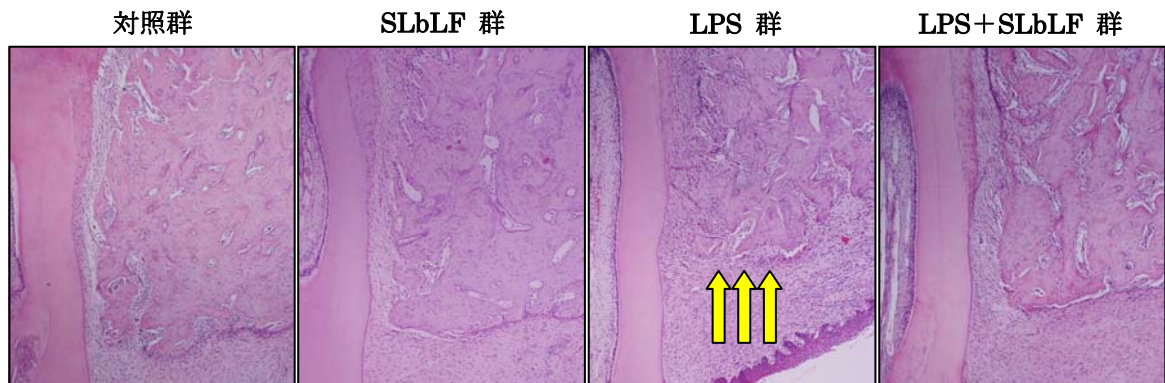


図 12 圧迫側の歯槽骨吸収

LPS 群では、LPS 投与による水平的な歯槽骨吸収が認められるが（矢印）、LPS+SLbLF 群では認められない。

4. 圧迫側における破骨細胞出現状況

LPS 群では、LPS 投与により歯槽骨頂部に多くの破骨細胞誘導が認められた。

一方、LPS+SLbLF 群では、LPS 投与により誘導される歯槽骨頂部の破骨細胞は極めて少なかった（図 13A）。

図 13B は、LPS 投与の直接的影響が大きいと考えられる歯槽骨頂部の単位面積当たりの TRAP 陽性の破骨細胞数を示す。LPS 群では、LPS 投与により歯槽骨頂部の有意な破骨細胞誘導が認められた ($P<0.01$)。一方、LPS+SLbLF 群では、LPS による破骨細胞誘導は有意に減少していた ($P<0.01$)。また、SLbLF 群では対照群と比較して、同部の破骨細胞数は有意に減少していた ($P<0.05$)。

図 13C は、LPS の直接的影響が少ないと考えられる歯槽骨中央部付近の単位面積当

りの TRAP 陽性の破骨細胞数を示す。その結果、検討した 4 群間において出現する破骨細胞数に差は認められなかった。

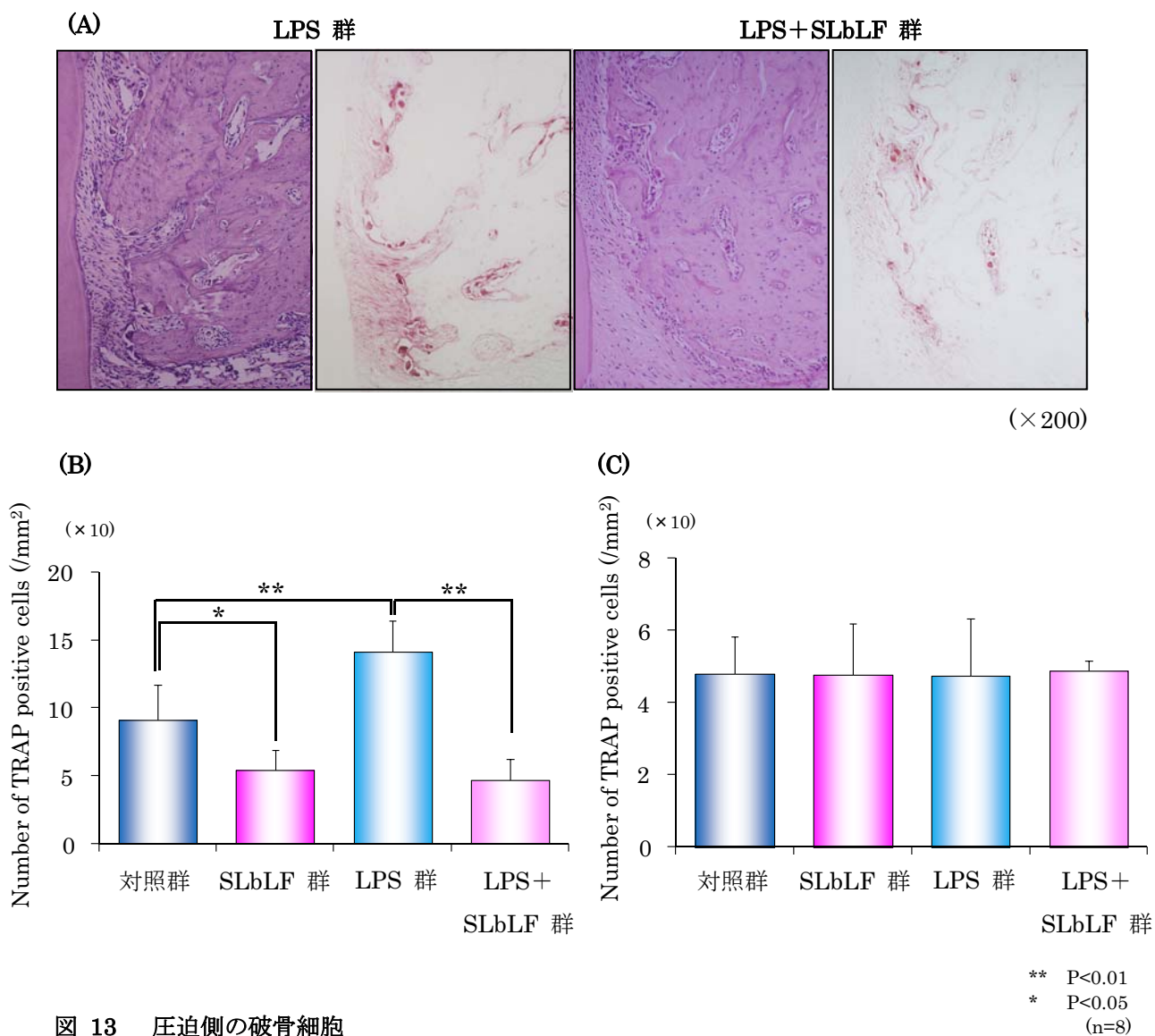


図 13 圧迫側の破骨細胞

- (A) LPS 群では歯槽骨頂部の破骨細胞増加が認められるが、LPS+SLbLF 群では認められない。
 (B) 歯槽骨頂部の単位面積当たりの破骨細胞数を示す。LPS+SLbLF 群では LPS 投与による破骨細胞増加を有意に抑制する。
 (C) 歯槽骨中央部付近の単位面積当たりの破骨細胞数を示す。各群間に差は認められない。

5. TNF- α の免疫組織化学的解析

図 14 は、上顎第二臼歯近心根圧迫側の TNF- α 染色所見を示す。比較的至適な矯正力に近い負荷を加えた対照群の歯周組織では、TNF- α 産生はほとんど認められなかった。LPS 群では、歯槽骨頂部を中心に TNF- α 陽性細胞が多数発現していたが、LPS+SLbLF 群では TNF- α 陽性細胞は著しく少なかった。

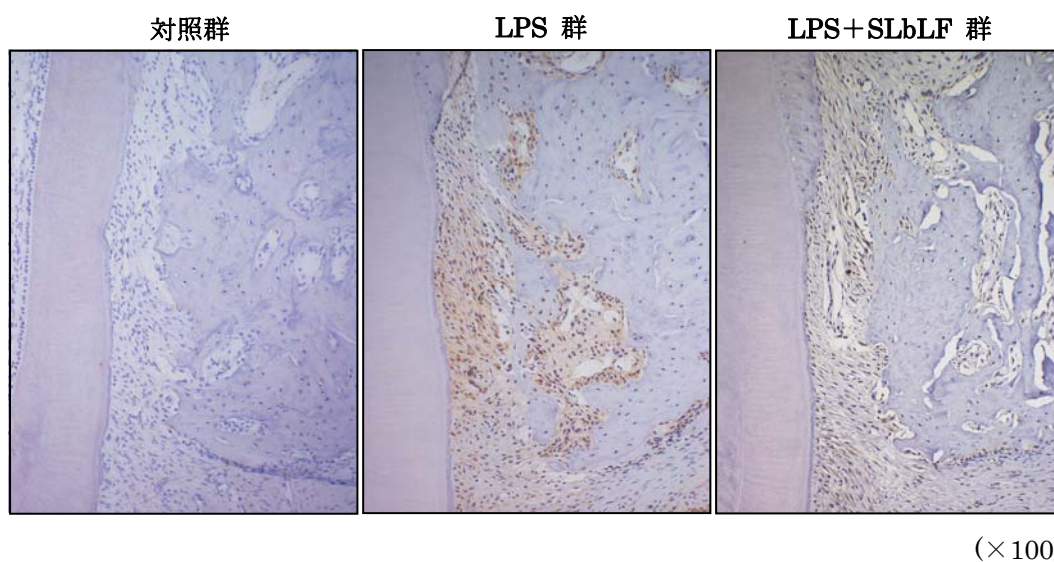


図 14 TNF- α の免疫組織化学的染色像

LPS 群では、TNF- α 陽性細胞が多数観察される。一方、LPS+SLbLF 群では TNF- α 陽性細胞は著しく減少する。

Ⅲ. 骨芽細胞による破骨細胞誘導に対する bLF の効果

1. LPS 刺激による破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果

LPS 刺激により、TNF- α 、RANKL、COX-2 の発現が有意に上昇し、OPG 発現が有意に低下した ($P<0.01$)。また、bLF は LPS の誘導する TNF- α および RANKL 発現亢進を有意に抑制し ($P<0.01$)、OPG 発現低下をコントロールレベルまで有意に回復させた ($P<0.05$)。一方、LPS の誘導する COX-2 発現亢進に対して、bLF の影響は認められなかった (図 15)。

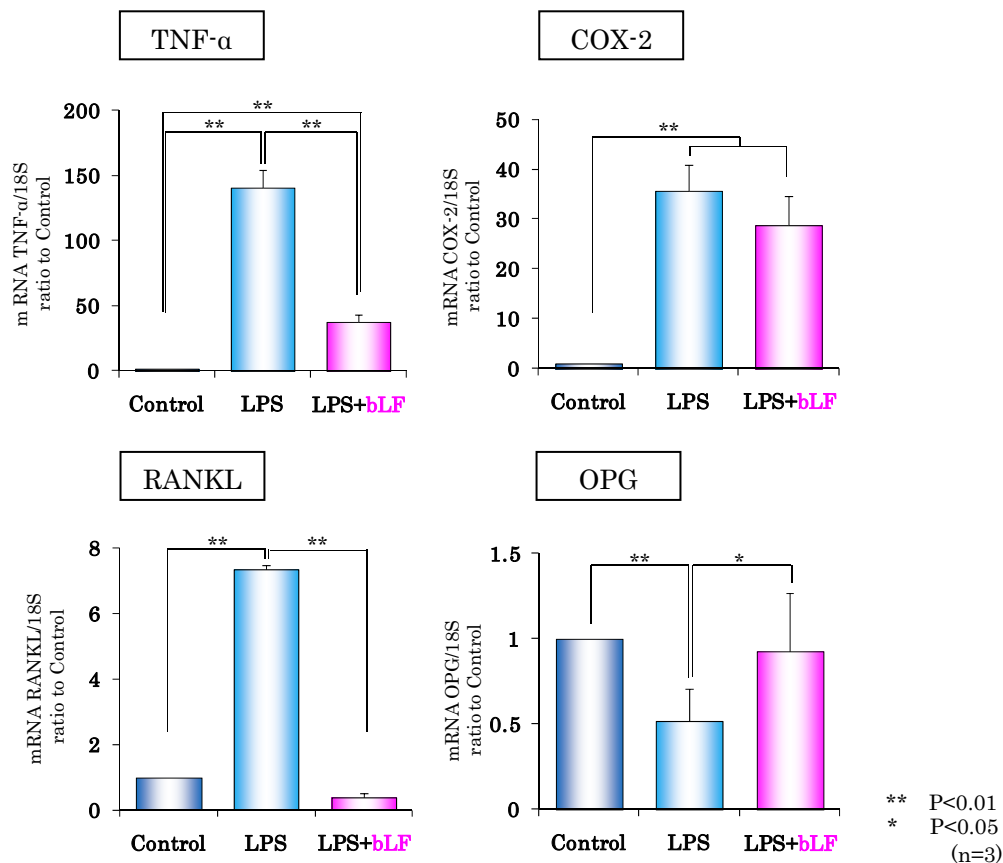


図 15 LPS 刺激時の ST2 細胞における破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果

bLF は LPS の誘導する TNF- α 、RANKL 発現亢進を有意に抑制し、OPG 発現低下をコントロールレベルまで有意に回復させる。一方、LPS の誘導する COX-2 発現亢進には影響しない。

2. 機械的圧縮刺激による破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果

機械的圧縮刺激により、COX-2 および RANKL 発現が上昇し、TNF- α および OPG 発現の低下が認められた ($P < 0.01$). また、bLF は機械的圧縮刺激による TNF- α , COX-2, RANKL, OPG 発現に影響しなかった (図 16).

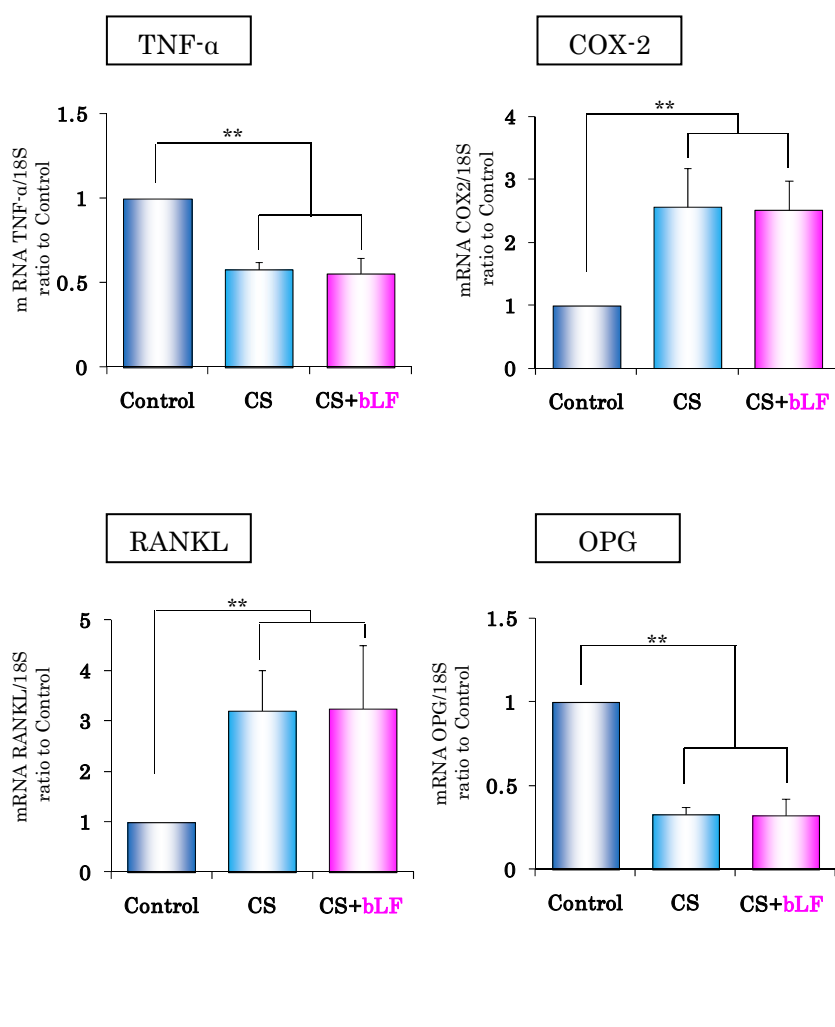


図 16 機械的圧縮刺激時の ST2 細胞における破骨細胞関連因子の発現に対する bLF の効果
 bLF は機械的圧縮刺激の誘導する TNF- α , COX-2, RANKL, OPG 発現に影響しない。

3. LPS 刺激および機械的圧縮刺激による RANKL 発現における内因性 PGE₂ の関与の検討

COX-2 選択的阻害剤である NS 398 による内因性 PGE₂ 合成阻害は, LPS 刺激により誘導される RANKL 発現を抑制しなかったが, 機械的圧縮刺激により誘導される RANKL 発現を有意に抑制した (P<0.01) (図 17).

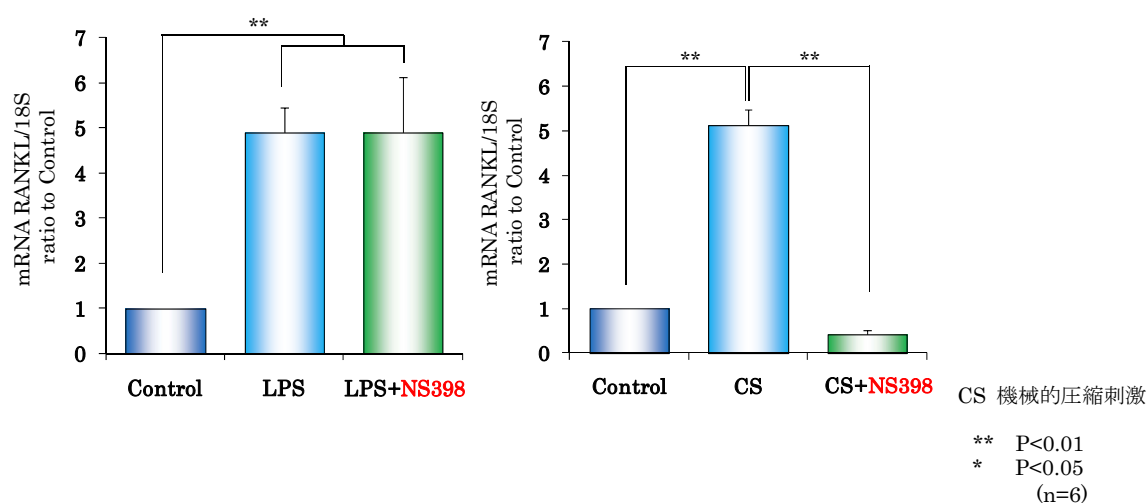


図 17 LPS および機械的圧縮刺激による破骨細胞誘導と COX-2/PGE₂ 経路の関係

NS 398 による内因性 PGE₂ 合成抑制は, LPS 刺激による RANKL 発現には影響しないが, 機械的圧縮刺激による RANKL 発現は有意に抑制する.

4. LPS 刺激および PGE₂ 刺激による破骨細胞誘導に対する bLF の影響

骨芽細胞と骨髄細胞の共培養では, LPS 刺激によって, TRAP 陽性細胞数が有意に増加したが, bLF 添加により, TRAP 陽性破骨細胞数は有意に減少した (P<0.01). 一方, PGE₂ 刺激によって誘導される TRAP 陽性破骨細胞数の増加に対する bLF の影響は認められなかった (図 18).

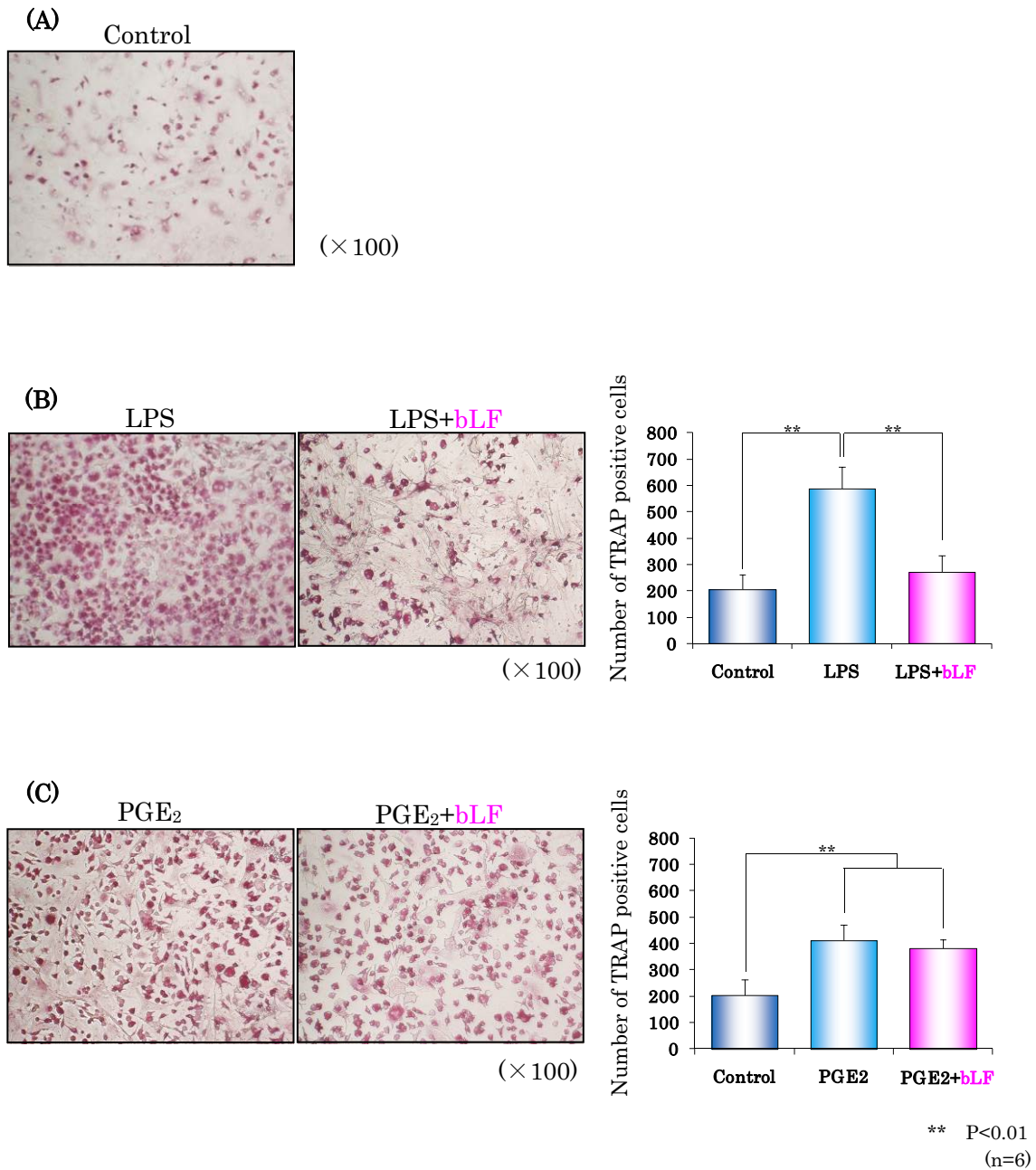


図 18 骨芽細胞と骨髄細胞の共培養系を用いた破骨細胞誘導能

- (A) 共培養系における生理的な破骨細胞誘導。
 (B) bLF は LPS 刺激によって誘導される TRAP 陽性の破骨細胞数を有意に抑制する。
 (C) bLF は PGE₂ 刺激によって誘導される TRAP 陽性の破骨細胞数には影響しない。

IV. bLF による抗炎症作用の分子生物学的メカニズム

1. TLR4 を介した NF- κ B 経路における bLF の影響

LPS 刺激後 15 分で I κ B α がリン酸化され, 30 分で I κ B α が分解された. 一方, LPS + bLF 群では I κ B α のリン酸化, および I κ B α の分解がみられなかった (図 19A).

次に, I κ B α より上流にある IKK β のリン酸化を, 脱リン酸化阻害剤である Okada 酸 (0.5mM) (Sigma Aldrich) を用いて脱リン酸化抑制した状態で LPS 刺激後 15 分で観察した結果を図 19B に示す. LPS + bLF 群では IKK β および I κ B α のリン酸化がみられなかった.

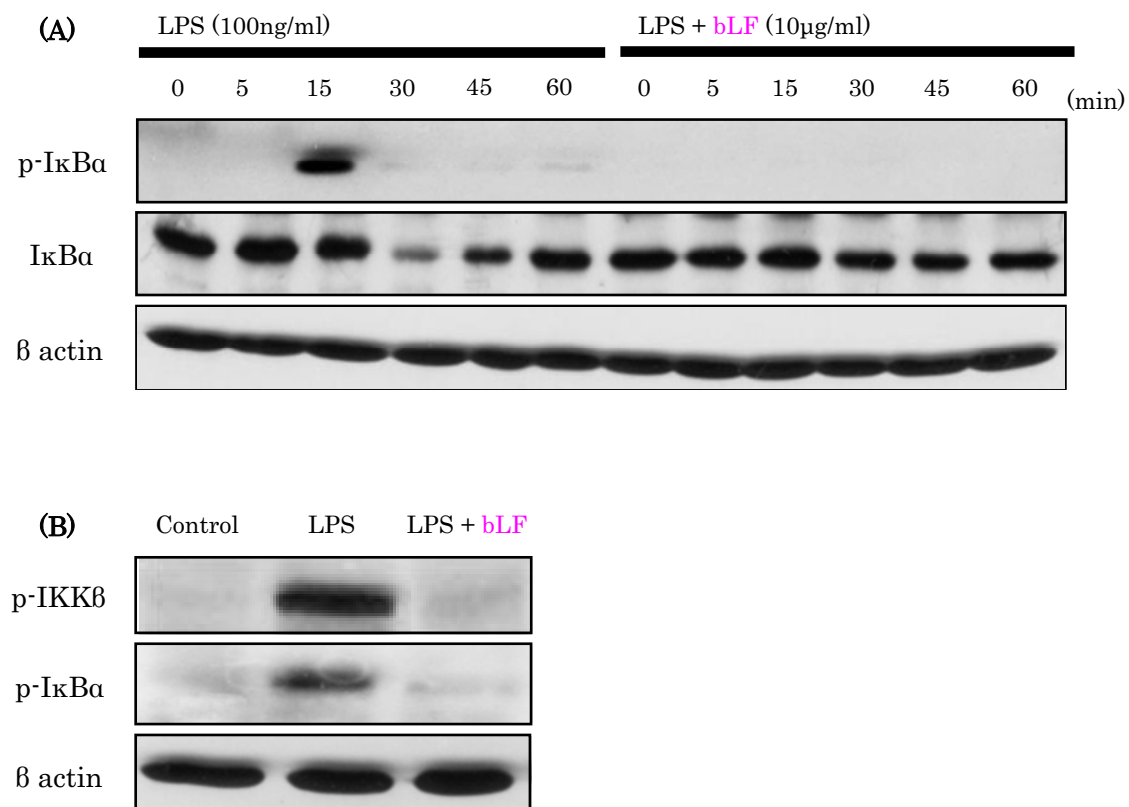


図 19 bLF が TLR4 を介した NFκB 経路に及ぼす影響

- (A) LPS 刺激後 15 分で IκBα がリン酸化され、30 分で IκBα が分解されている。一方、LPS+bLF 群では IκBα のリン酸化、および IκBα の分解がみられない。
- (B) Okada 酸を用いて、脱リン酸化を抑制した状態で LPS 刺激後 15 分に局限してリン酸化を観察すると、LPS + bLF 群では、IKKβ および IκBα のリン酸化がみられない。

2. TLR4 を介した MAPK 経路における bLF の影響

LPS 刺激後 5 分で ERK1/2, 15 分で p38, 30 分で JNK がリン酸化された。

LPS+bLF 群でも同様に ERK1/2, p38, JNK のリン酸化がみられた。また LPS 刺激によって起こる IRAK1 の分解が、LPS + bLF 群でも同様にみられた (図 20)。

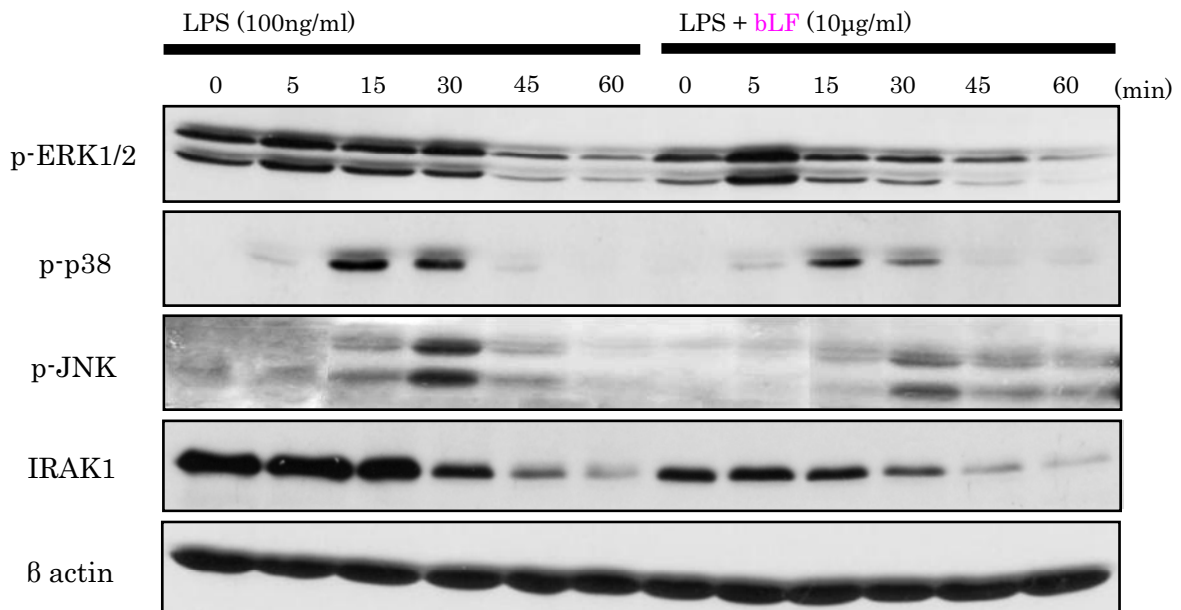


図 20 bLF が TLR4 を介した MAPK 経路に及ぼす影響

LPS 刺激によって ERK1/2, p38, JNK のリン酸化、および IRAK1 の分解がみられる。LPS + bLF 群でも同様に、LPS による MAPK 経路の活性化が確認できる。

3. IKK 複合体形成に対する bLF の影響

bLF が IKK 複合体形成に与える影響について、免疫沈降法を用いて検討した。

その結果, bLF の存在により, IKK β と NEMO が結合できないことが確認された (図 21)。

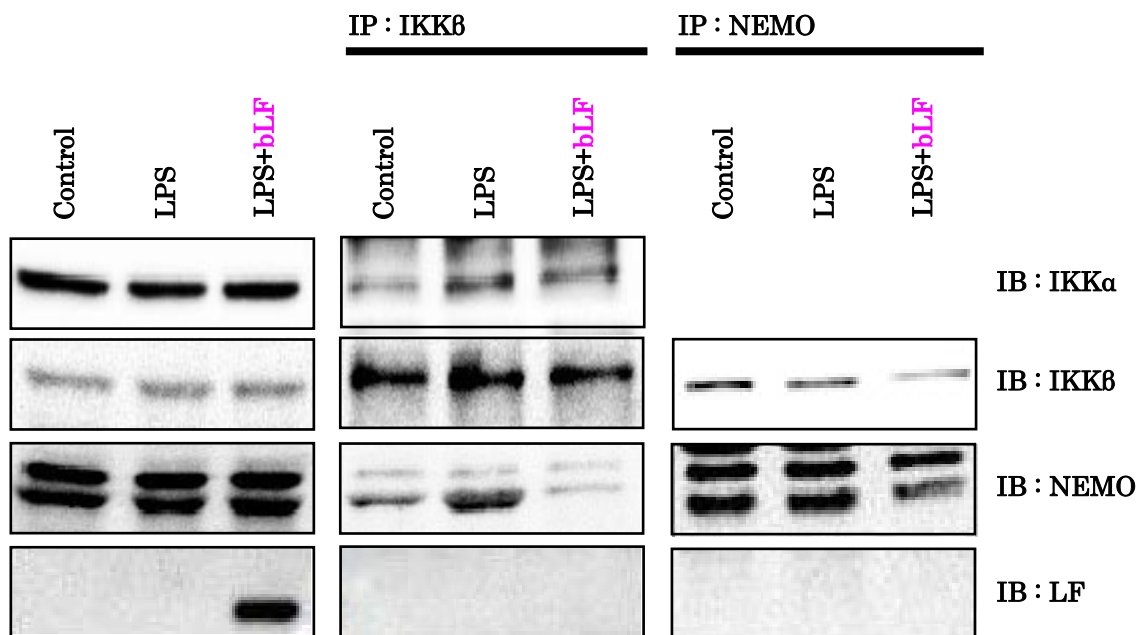


図 21 免疫沈降法

bLF は IKK β と NEMO の結合を強く抑制する。

4. Flagellin 刺激により誘導される TNF- α 発現に及ぼす bLF の影響

Flagellin 刺激による TNF- α 産生に及ぼす bLF の影響について検討したところ、Flagellin 刺激時には TNF- α 発現が認められたが、Flagellin+bLF 群では TNF- α 発現が完全に抑制された (図 22)。したがって、TLR5 を介する Flagellin 刺激時においても bLF は TNF- α 発現を抑制することが示された。

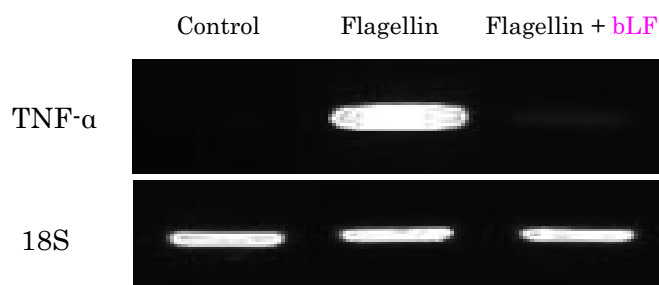


図 22 bLF が Flagellin 刺激により誘導される TNF- α 発現に及ぼす影響

bLF は Flagellin により誘導される TNF- α 発現を抑制する。

5. TNF- α 刺激により誘導される RANKL 発現に及ぼす bLF の影響

TNF- α 刺激による RANKL 発現に及ぼす bLF の影響について検討したところ、TNF- α 刺激により誘導される RANKL 発現を bLF は抑制しなかった (図 23).

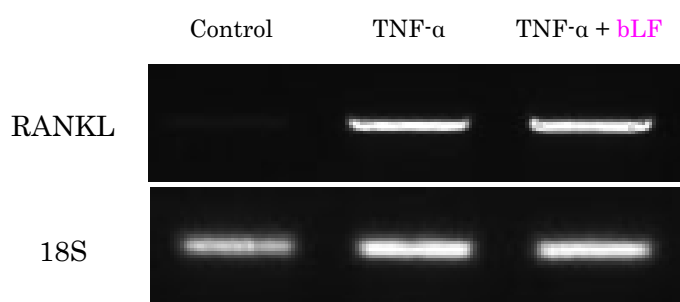


図 23 bLF が TNF- α 刺激により誘導される RANKL 発現に及ぼす影響

bLF は TNF- α により誘導される RANKL 発現に影響しない.

考察

I. SLbLF の安全性および有用性について

LF は、ヒトをはじめとする哺乳動物の母乳、唾液や涙などに存在し^{10・14)}、炎症時には白血球から LF が多く分泌されるなど⁴³⁾、乳児の免疫反応や成人の粘膜表面での感染防御に重要な役割を果たすことが知られている^{10・14)}。LF の必要摂取量は、1 日あたり 500mg~1000mg であるが、乳児は母乳より 1 日あたり 2g 以上の LF を摂取していると言われている⁴⁴⁾。現在、市販されている LF のほとんどはウシ由来の LF (bLF) である。ヒト由来の LF と bLF は別種であり、それぞれを構成する分子配列が異なっている。しかしながら、ヒト由来の LF と同様に、bLF は抗菌作用や抗ウイルス作用、炎症性サイトカインの分泌抑制作用、腫瘍増殖抑制作用などの様々な活性を有する多機能タンパク質で、牛乳から活性を保持した高品質のものを工業的規模で抽出することが可能であるため、さまざまな食品に添加されたりサプリメントとして服用されている^{32, 33)}。

この bLF を疾患の治療に用いたいくつかの報告がある。Iwasa ら⁴⁵⁾ は、C 型慢性肝炎患者に bLF (3.6g/day) を 6 ヶ月摂取させても、副作用を生じることなく血中ウイルス量の減少や、肝機能指標および酸化ストレスマーカー (血中 GPT 値など) の改善や、肝機能指標の維持効果がみられたと報告している。Kozu ら⁴⁶⁾ は、5mm 以下の大腸ポリープを有する患者に bLF (3.0g/day) を 1 年間摂取させることにより大腸ポリープが縮小し

たと報告したが、患者に bLF 投与による副作用は認められないことを確認した。さらに、Yamauchi ら^{47,48)} は、bLF を用いた実験動物での 13 週間反復投与試験や、微生物での復帰突然変異試験などの安全性試験で、bLF の高い安全性を確認しており、bLF は副作用のない安全性の高い食品由来物質であるといえる。

しかしながら、bLF を経口摂取した場合、ペプシンやトリプシンのような消化酵素により約 80% 以上が胃で分解されるといわれており、小腸まで到達する bLF 量は激減し、bLF の抗炎症作用や免疫調節作用が十分に発揮されないとされている³⁴⁾。そのため、胃での分解を抑制し、bLF を腸まで確実に到達させ、小腸における吸収量を増加させることを目的として、さまざまな腸溶 bLF 製剤が開発されてきた。本研究では、bLF のドラッグデリバリーシステムとしてレシチンによるリポソーム化に着目した。リポソーム化 bLF は、親水基を外側に、疎水基を内側に向けたリン脂質二重構造膜の中に bLF を内包することによって、腸への到達量を高めたものである^{49,50)}。Ishikado ら¹⁰⁾ は卵黄レシチンリポソーム化 bLF (LbLF) を 1 週間経口投与したマウスの末梢血単球からの LPS 刺激による TNF- α 産生が著しく抑制されることを報告した。また、Yamano ら⁹⁾ は、ラットに経口摂取させた LbLF が LPS の誘導する好中球遊走や破骨細胞性骨吸収などの歯周組織変化に対して確実な抑制効果を発揮することを明らかにした。

本研究では、卵黄レシチンよりも安価でかつ調整が容易な大豆レシチンを用いた、リ

ポソーム化ウシラクトフェリン (SLbLF) を作製し、飲料水に混和してラットに経口摂取させることとした。

レシチンは、脳や細胞膜をはじめ、生体のさまざまな部位に存在し、近年ドラッグデリバリーシステムとして医薬品や化粧品などに広く利用されている⁵¹⁾。レシチンを多く含む代表的な食品には、卵黄 (350mg/100g)、大豆 (1480mg/100g) があり、それぞれ卵黄レシチン、大豆レシチンと呼ばれている⁵²⁾。卵黄レシチンには中性脂肪や LDL の増加につながる飽和脂肪酸が多く含まれているのに対し、大豆レシチンは中性脂肪や LDL を減少させ、HDL を増加させる不飽和脂肪酸を多く含んでいる⁵¹⁾。Evans ら⁵³⁾ は、閉経後の健康女性に大豆レシチン (20g/day) を 4 週間摂取させると、脂質プロファイルの有意な改善が認められたと報告している。また Son ら⁵⁴⁾ は、大豆レシチンの主な構成物である 1,2-Dilinoleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DLPC) には抗炎症作用があると報告している。このことから、大豆レシチンは卵黄レシチンよりも臨床応用への優れた利点を有していると考えられる。さらに、本研究では、Yamano ら⁹⁾ の LbLF を用いた研究と同等の LPS 誘導歯周組織破壊抑制効果を示した。本研究で用いた SLbLF と Yamano ら⁹⁾ が用いた LbLF の摂取量から、体内に取り込まれた bLF 量を換算すると、SLbLF 摂取により 375.92mg/kg/day の bLF を、一方 LbLF 摂取により 470mg/kg/day の bLF を摂取したこととなり、SLbLF の方が LbLF よりも少ない bLF 摂取量で、同等の抗炎症

症効果を発揮することができたことになる。そのメカニズムとしては、大豆レシチンが bLF の体内への取り込み効率を向上させている可能性や、大豆レシチン自体が持つ抗炎症作用が bLF の抗炎症作用を促進している可能性などが考えられるため、今後さらなる詳細な検討が必要である。

II. LPS 誘導歯周組織破壊に対する SLbLF 経口投与の効果について

歯周組織の炎症発現には、歯周ポケット内に存在するグラム陰性細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* や *Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS が関与する^{2, 3)}。歯周ポケット内で LPS が放出されると、接合上皮細胞やマクロファージ、線維芽細胞、骨芽細胞などの歯周組織構成細胞による炎症性サイトカイン、特に TNF- α 産生が亢進する^{4-6, 55)}。TNF- α は、炎症の主なメディエーターであり、炎症の初期段階で産生され、その後 TNF- α によって IL-1 β , IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインが産生される⁵⁵⁾。また TNF- α は、破骨細胞性骨吸収刺激作用を有し、歯周組織破壊に関わるサイトカインネットワークにおいて中心的な役割を果たしている^{4-6, 55)}。

本研究で用いたラット歯周組織破壊モデルでは、歯肉溝から浸透した LPS は、接合上皮細胞からの TNF- α の産生を促進するとともに、産生された TNF- α が IL-1 β , IL-8 などのサイトカインを誘導することで、接合上皮直下の結合組織における血管の拡張や、好中球浸潤などの炎症反応を成立させる^{7, 56)}。さらに、TNF- α の陽性領域は経時的に深部

の歯根膜組織へと波及し、歯槽骨縁に沿って活発な破骨細胞性骨吸収を誘導する⁸⁾。本実験では、SLbLFの経口投与が宿主細胞からのTNF- α 産生を抑制し、歯周組織におけるLPS誘導性破骨細胞発現や、接合上皮内にみられる好中球遊走を抑制することが示された。これらの結果は、LbLFを用いたYamanoら⁹⁾の報告と同じであった。また、Yamanoら⁹⁾は、LbLF経口投与によりbLFが腸に到達し、血流を介して全身に運ばれ、局所の構成細胞内に取り込まれ、効果を発揮すると報告している。本研究で使用したSLbLF経口投与でも同様に、bLFが小腸で吸収され、歯周組織で抗炎症作用を発揮したものと考えられる。しかしながら、80kDaの高分子タンパク質であるbLFがまったく分解されずに小腸で吸収されるとは考えにくい。そのため、小腸におけるbLFの吸収機序や、吸収後のbLFの各組織への搬送経路については、今後詳細に検討する必要がある。

III. LPS誘導歯周組織破壊を伴う実験的歯の移動に及ぼすSLbLF経口投与の効果について

矯正歯科治療を必要とする患者の口腔内は、不正咬合による形態的、機能的障害のために自浄性が低い。これに加えて、複雑な矯正装置を長期に装着することから、う蝕や歯周疾患などのリスクが高い¹⁾。また、歯周組織の炎症状態で矯正力を加えると、アタッチメントロスや異常な歯槽骨吸収が生じ、歯周組織破壊が急速に進行し、さらに歯根吸収が生じる可能性がある^{1, 57)}。このような状況を考慮すると、矯正歯科治療時には口腔衛生

状態を適切に管理し、歯周組織の炎症を取り除くことが非常に重要である。現在、マルチブラケット装置をはじめとする固定式の矯正装置を装着している患者には、ブラッシングなどの口腔衛生指導の徹底、フッ素塗布、高濃度リン酸酸性フッ化ナトリウム溶液による洗口法など実施されている^{58,59)}。しかしながら、一部の矯正歯科治療患者の口腔衛生管理は不十分であり、炎症制御のために何らかの補助的介入が必要となる⁶⁰⁾。

SLbLF 経口摂取は、LPS 刺激による TNF- α の産生を抑制するため、矯正歯科治療患者がブラッシングと併用して摂取することで、口腔衛生不良に伴う異常な歯周組織破壊を、患者レベルで制御できる可能性がある。しかしながら、それと同時に SLbLF は LPS により誘導される破骨細胞性骨吸収を抑制するため、矯正歯科治療時の破骨細胞性骨吸収も抑制するのではないかという疑問が生じる。そこで、SLbLF が矯正歯科治療時の歯の移動に影響することなく、歯周組織の炎症制御に応用可能かどうかについて検討するために、実験的歯の移動モデルに LPS 投与を行い、SLbLF 経口投与が LPS の誘導する歯周組織破壊と矯正力が誘導する骨吸収に及ぼす影響を確認した。

本実験モデルでは、ラット上顎第二臼歯を 20g の力で 7 日間牽引した。これまでにラットを用いた実験で、King ら⁶¹⁾は 40g から 60g の力で上顎第一臼歯を 14 日間牽引すると移動量は約 0.4mm であり、また矯正力が 40g 以上になると歯の移動速度は変わらないと報告している。Gonzales ら⁶²⁾は 50g の力で上顎第一臼歯を牽引した時の移

動量は、14 日で 0.4mm、28 日で 0.64mm であったと報告している。本実験では、歯の移動距離は、全群間に有意な差は認められず、平均 0.47mm であった。King ら⁶¹⁾ や Gonzales ら⁶²⁾ が実験に用いたラット上顎第一臼歯は 5 根存在し、近心根は他の根に比べて太く、さらに近心に傾斜しているため、上顎第一臼歯を近心へ牽引した場合、傾斜移動を起こしやすい⁶³⁾。一方、本実験で牽引した上顎第二臼歯は 4 根であり、歯根の太さがほぼ均等であるため、比較的歯体移動させることが可能である。また、従来の研究において、持続的で過度の矯正力は歯根吸収を引き起こすことが報告されている^{64, 65)}。本実験では、全群とも歯根吸収は認められなかったため、20g の力は上顎第二臼歯を歯体移動させるためには、比較的至適な牽引力であると推測される。

本研究で用いたモデルにおいて、SLbLF 経口投与は、矯正装置および LPS 刺激が惹起する炎症に伴う接合上皮の深行増殖、歯槽骨吸収、破骨細胞誘導を有意に抑制したが、矯正力による破骨細胞誘導には影響しなかった。さらに、対照群と SLbLF 群とでは歯の移動距離に変化はなかった。SLbLF が矯正力による破骨細胞性骨吸収を抑制しない理由として、炎症と機械的圧縮刺激に伴う骨吸収の発現機序や関与するメディエーターが異なる可能性が考えられる。Matsuzaki ら⁵⁵⁾ は、炎症の主なメディエーターは TNF- α であると報告している。また Miyachi ら⁸⁾ は、歯周組織の炎症性骨吸収には TNF- α が重要な役割を果たすことを示している。一方、Sanuki ら⁶⁶⁾ は、骨芽細胞において圧縮刺激

はプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を介した破骨細胞分化を引き起こすと報告している。また Grieve ら⁶⁷⁾ は、歯に対して持続的な力を加えると、短時間で歯根膜内の PGE₂ のレベルが上昇するため、機械的圧縮刺激による骨吸収では特に PGE₂ が重要なメディエーターであることを明らかとした。本実験モデルでも、LPS 投与によって歯槽骨頂部付近に TNF-α の発現上昇が誘導されるが、LPS + SLbLF 群では TNF-α 発現を著しく抑制し、LPS 投与によって誘導される破骨細胞増加も著しく減少していた。また、本実験モデルでは矯正力により、ラット第二臼歯近心根の近心面全体が圧迫域となり、歯根膜側歯槽骨縁に沿って全体的に破骨細胞が出現した。SLbLF 経口投与群では、LPS の作用の及ばない歯槽骨中央部付近での破骨細胞数の減少は認められなかった。したがって、bLF は LPS – TNF-α – RANKL の経路は抑制するが、機械的圧縮刺激 – PGE₂ – RANKL の経路には作用しない可能性が考えられた。

IV. 炎症反応および矯正力に伴う破骨細胞誘導に対する SLbLF 経口投与の作用メカニズムの違いについて

LPS 刺激および機械的圧縮刺激に伴う骨芽細胞による破骨細胞誘導に及ぼす bLF の影響について *in vitro* 実験系で検討を行った結果、bLF は LPS の誘導する COX-2 発現には影響せず、TNF-α, RANKL 発現上昇を抑制した。一方、機械的圧縮刺激時には COX-2 および RANKL 発現上昇が認められたが、bLF はこれらの骨関連因子の遺伝子発現に影

響しなかった。さらに、本実験で用いた 0.05kPa の至適な機械的圧縮刺激においては TNF- α の発現亢進は確認できなかった。したがって、炎症に伴う破骨細胞誘導は TNF- α 依存であり、bLF は LPS による TNF- α 産生抑制を介して破骨細胞誘導を抑制したといえる。一方、機械的圧縮刺激に伴う破骨細胞誘導は COX-2/PGE₂ 依存であり、bLF は COX-2 発現を抑制しないため破骨細胞誘導にも影響しなかったと考えられる。次に LPS 刺激と機械的圧縮刺激後の RANKL 発現における、内因性 PGE₂ の関与を明らかにするために、COX-2 選択的阻害剤である NS398 による PGE₂ 産生抑制の影響を検討した。NS398 投与は、LPS により誘導される RANKL 発現には影響を及ぼさなかったが、機械的圧縮刺激により誘導される RANKL 発現を、ほぼ完全に抑制したことからも、機械的圧縮刺激のメディエーターとして PGE₂、また LPS 刺激によるメディエーターとして TNF- α が重要であることが明らかとなった。さらに、bLF は骨芽細胞と骨髄細胞との共培養系においても LPS による破骨細胞形成を抑制したが、PGE₂ による破骨細胞形成には影響しなかった。以上のことから、bLF は炎症の主なメディエーターである TNF- α 産生を抑制するが、機械的圧縮刺激の主なメディエーターである PGE₂ 産生には影響しないことが明らかとなった。

また、本研究の *in vitro* において 至適な矯正力として骨芽細胞に 0.05kPa (0.5g/cm²) の直接的な機械的圧縮刺激を加えた。これまでの報告によると、細胞に機械的圧縮刺激を

直接加えた場合、 2g/cm^2 を超える機械的圧縮刺激は、細胞にとって過大な力であるとされている^{68, 69)}。そこで予備実験において、過大な力として 2g/cm^2 、および至適な力として 0.5g/cm^2 の機械的圧縮刺激を加えてみたところ、 0.5g/cm^2 の機械的圧縮刺激時には $\text{TNF-}\alpha$ の発現上昇は認められなかったが、 2g/cm^2 の機械的圧縮刺激時には $\text{TNF-}\alpha$ の発現が上昇した。Ogasawara ら⁷⁰⁾ は、ラット実験的歯の移動モデルにおいて、過大な矯正力を加えるとラット歯周組織において $\text{TNF-}\alpha$ 産生が引き起こされることを確認している。Yamaguchi ら⁷¹⁾ は、矯正歯科治療中に重度の歯根吸収が生じた歯の歯髄細胞では IL-18 、 IL-6 、 $\text{TNF-}\alpha$ などの炎症性サイトカイン産生が亢進し、これらのサイトカインが歯根吸収に強く関与していると報告している。また Zhang ら⁷²⁾ は、歯根吸収に関与する破歯細胞の分化、誘導には $\text{TNF-}\alpha$ が主に関わっていると報告している。したがって、過度の矯正力に伴って生じる異常な骨吸収や歯根吸収には、至適矯正力では産生されない $\text{TNF-}\alpha$ が関与していることが示唆される。本研究で用いた 0.05kPa の機械的圧縮刺激時には $\text{TNF-}\alpha$ 産生は生じず、 bLF の関与は認められなかったが、過度な矯正力がもたらす $\text{TNF-}\alpha$ 産生上昇を介した異常な骨吸収や歯根吸収に対しては、 bLF が抑制する可能性がある。 bLF と過剰な矯正力がもたらす異常な骨吸収や歯根吸収などの関係については、今後より詳細な検討が必要と思われる。

V. bLF による抗炎症作用の分子生物学的メカニズムについて

LPS は標的細胞の細胞膜上に存在する TLR ファミリーの一つである, TLR4 を介して効果を発揮することが知られている^{73, 74}). 図 24 は, LPS 刺激によるシグナル伝達経路を示す. LPS は LPS 結合タンパク質 (LBP) により捕捉され, CD14 分子へと輸送されると, LPS-CD14 複合体が TLR4 に結合する⁷⁵). TLR4 に LPS が結合するとアダプタータンパク質である MyD88 (Myeloid Differentiation Protein-88) を介してセリン/スレオニンキナーゼである IRAK (IL-1 Receptor Associating Kinase) を活性化する⁷⁶). さらに IRAK の下流にあるアダプタータンパク質 TRAF-6 (TNF Receptor-associated Factor-6) を介して炎症反応に関与する NF- κ B (Nuclear Factor κ B) や MAPK ファミリー等の活性化を引き起こし, 転写活性を示す^{76, 77}). なかでも NF- κ B は, さまざまなサイトカインやアポトーシス関連因子の転写を活性化することが知られており, 特に炎症反応の調節機構として非常に重要な働きをしている. NF- κ B はそれ自身もしくは他の分子と二量体をつくって活性化するが, 通常この複合体はさらに I κ B α と結合していて活性化が抑制されている⁷⁸). しかし, LPS などの炎症刺激により I κ B α が急速にリン酸化されると, リン酸化を受けた I κ B α がプロテアソーム複合体により分解され, これにより NF- κ B 複合体は活性化されて核内に移行し, 標的の遺伝子の転写を活性化する^{78, 79}). この I κ B α のリン酸化は IKK α , IKK β , NEMO (IKK γ) から構成される I κ B キナーゼ複合体 (IKK

複合体) により引き起こされる⁸⁰⁾。IKK α と IKK β は 触媒サブユニットであるのに対して、NEMO は調節サブユニットとして作用していることが知られている。実際、NEMO を欠失した細胞では、LPS, TNF- α , IL-1 β などの刺激に対して IKK の活性化や NF- κ B と DNA との結合の活性化のいずれも起きないことが知られている^{80, 81)}。

このような背景から本研究では、bLF による抗炎症作用の分子生物学的メカニズムを検討するために、まず骨芽細胞様細胞株である ST2 細胞を用いて LPS による細胞内シグナル伝達経路を確認した。ST2 においてもこれまでの報告と同様に、LPS 刺激により I κ B α のリン酸化と I κ B α の分解、ERK1/2, JNK, p38 のリン酸化が確認できたことから、LPS 刺激は骨芽細胞においても NF- κ B や MAPK の活性化を引き起こすことが明らかとなった。そこで、bLF 投与後に同様に LPS 刺激を行ったところ I κ B α のリン酸化ならびに I κ B α の分解が強力に抑制されていることが示された。一方、IRAK1 の分解や ERK1/2, JNK, p38 のリン酸化は bLF 投与により抑制されなかったことから、bLF は NF- κ B 経路を特異的に抑制していることが示唆された。そこで、NF- κ B に特異的な経路の最も上流である IKK β のリン酸化を調べたところ、bLF 投与により LPS により引き起こされる IKK β のリン酸化も抑制されていることが明らかとなった。これらのことから、bLF が IKK β のリン酸化を何らかの形で抑制していることにより NF- κ B 経路の活性が起らないと推察された。前述のように IKK β のリン酸化には IKK 複合体の形成が不可

欠である^{80, 81)}. そこで IKK 複合体形成に着目して検討を進めたところ, LPS 群では IKK β と NEMO の結合が生じて複合体形成が起こっているのに対して, bLF 投与群では IKK β と NEMO の結合が阻害されていることが明らかとなった.

これらのことから, bLF は IKK 複合体形成を阻害することで NF- κ B の活性を特異的に抑制していることが示唆された (図 24). これまでに, IKK β の活性化を抑制する機構については ATP 産生を競合的に阻害する機構⁸²⁾ や IKK β と NEMO の結合を競合的に阻害する機構⁸³⁾, または K63 のユビキチン化抑制による機構⁸⁴⁾ などが報告されている. 本研究では, bLF は IKK β ならびに NEMO のいずれとも直接結合していなかったことから, bLF 投与により間接的に IKK 複合体形成が抑制されていることが推察される. しかし, bLF のこのような抑制効果は bLF が何らかの受容体に結合することにより引き起こされるものか, 細胞内に取り込まれた bLF が何らかの形で作用しているのかなど, 未だ不明な点も多い. bLF の受容体としては low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), CD14, nucleolin (Ncl), intelectin-1 (Itln-1) などが報告されている⁸⁵⁾. 骨芽細胞には, bLF 受容体として LRP1 が発現することは確認されているが⁸⁵⁾, 本研究では骨芽細胞における LRP1 の役割について明らかにするには至らなかった. しかし, 本研究により bLF の抗炎症効果の分子生物学的メカニズムの一端, なかでも bLF が IKK β のリン酸化を特異的に抑制することにより, NF- κ B の活性化を制御することが明らかとさ

れたのは非常に重要な知見である。近年、NF- κ B の活性化の制御は、骨吸収を伴う疾患、例えば関節リウマチ (RA: Rheumatoid Arthritis)、骨粗鬆症、骨破壊を伴う癌などの疾患において非常に重要な分子であることが明らかとなっているからである。特に、RA に対しては IKK β の活性化を抑制する NF- κ B 阻害剤が有効であるという報告や⁸²⁾、骨粗鬆症に対しては RANKL 阻害剤のような NF- κ B 阻害剤がきわめて有効であると報告されている⁸⁶⁾。しかしながら、これらの NF- κ B 阻害剤を長期にわたり服用すると、免疫抑制による重篤な感染症や、生理的な骨リモデリング過剰抑制による骨壊死などの副作用を引き起こす⁸⁷⁾。近年、bLF は TLR4 受容体を介して軽度に NF- κ B を活性化し、免疫力を高める一方で、LPS と結合することにより LPS 刺激による異常な NF- κ B の活性化を抑制することが報告されている^{88, 89)}。したがって、bLF が長期服用においても副作用がほとんどない非常に安全な生体由来物質であることを考え合わせると、近い将来、関節リウマチや歯周病などの骨吸収を伴う疾患に対する予防もしくは治療薬としての応用が強く期待される。

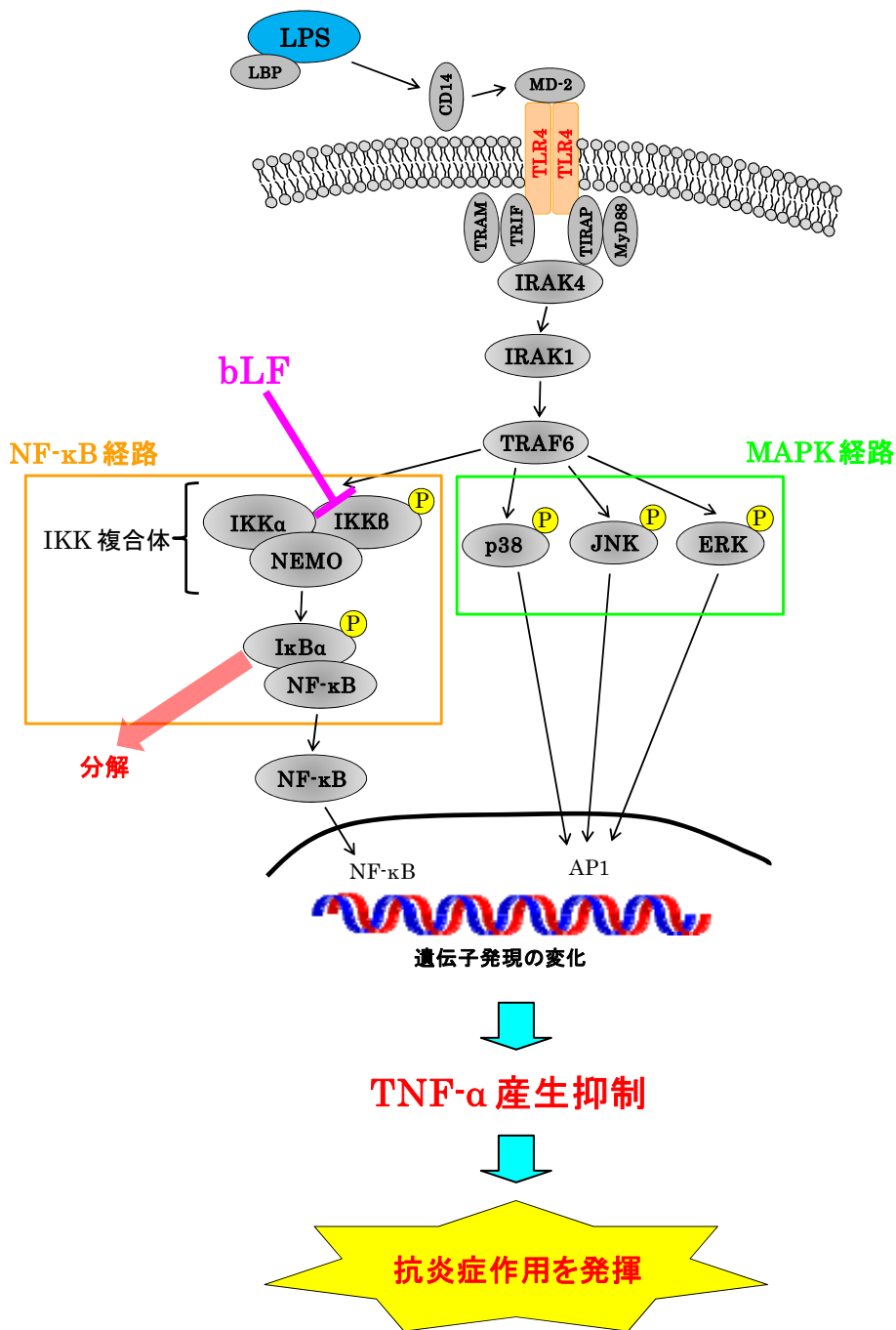


図 24 骨芽細胞における bLF による抗炎症作用の分子生物学的メカニズム

bLF は IKKβ と NEMO の結合を阻害することにより、NF-κB 経路の活性化を抑制する。その結果、TNF-α 産生が抑制され、抗炎症作用を発揮する。

総括

本研究では、矯正歯科治療時の歯周組織の炎症制御における SLbLF 経口投与の有用性とそのメカニズムを明らかにすることを目的とし、以下の結果を得た。

1. SLbLF 経口投与は、歯周組織における LPS 誘導性 TNF- α 産生を強く抑制することにより、好中球浸潤や破骨細胞性骨吸収を抑制することが示された。
2. SLbLF 経口投与は、LPS により誘導される接合上皮の深行増殖、歯槽骨吸収を有意に抑制するとともに、歯周組織における TNF- α 産生も抑制した。また SLbLF 経口投与は、LPS によって誘導される破骨細胞増加は抑制するが、矯正力によって誘導される破骨細胞増加には影響しないことが示された。
3. bLF は LPS の誘導する TNF- α , RANKL 発現上昇を有意に抑制し、OPG 発現低下を有意に抑制したことから、炎症に伴う破骨細胞誘導を抑制することが示された。
一方 bLF は、機械的圧縮刺激の誘導する TNF- α , COX-2, RANKL, OPG 発現に影響しなかったことから、矯正力に伴う破骨細胞誘導には影響しないことが示された。
4. LPS が TLR4 に結合すると、NF- κ B 経路が活性化され、IKK β および I κ B α のリン酸化が起こり、遺伝子発現の変化が起こる。bLF の前投与は、IKK β に特異的に作用し、IKK 複合体形成を阻害することで NF- κ B 経路の活性化が抑制されることが示された。

以上の結果より, SLbLF は LPS により活性化される NF- κ B 経路を特異的に抑制することで TNF- α 産生を抑制し, 抗炎症効果を発揮することが示された.

したがって, SLbLF は矯正歯科治療時の歯の移動に影響することなく, 歯周組織の炎症制御を目的とした予防薬, あるいは治療薬として応用可能であることが実証された.

参考文献

- 1) 加藤熙. 臨床家のための歯周病患者の局所矯正治療. 医歯薬出版. 東京. 2007: 37-40
- 2) Zaric S, Shelburne C, Darveau R, Quinn DJ, Weldon S, Taggart CC, Coulter WA. Impaired immune tolerance to porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide promotes neutrophil migration and decreased apoptosis. *Infect Immun.* 2010: 78: 4151-4156
- 3) Nociti FH, Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ. Cementoblast gene expression is regulated by porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide partially via toll-like receptor-4/ MD-2. *J Dent Res.* 2004: 83: 602-607
- 4) Tomomatsu N, Aoki K, Alles N, Soysa NS, Hussain A, Nakachi H, Kita S, Shimokawa H, Ohya K, Amagasa T. LPS-induced inhibition of osteogenesis is TNF-alpha dependent in a murine tooth extraction model. *J Bone Miner Res.* 2009: 24: 1770-1781
- 5) McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interferon- γ by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J Periodontal Res.* 1990: 25: 207-214
- 6) Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res.* 1988: 67: 1131-1135
- 7) Miyauchi M, Kitagawa S, Hiraoka M, Saito A, Sato S, Kudo Y, Ogawa I, Takata T. Immunolocalization of CXC chemokine and recruitment of polymorphonuclear leukocytes in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Histochem Cell Biol.* 2004: 121: 291-297
- 8) Miyauchi M, Sato S, Kitagawa S, Hiraoka M, Kudo Y, Ogawa I, Zhao M, Takata T. Cytokine expression in rat molar gingival periodontal tissues after topical application of lipopolysaccharide. *Histochem Cell Biol.* 2001: 116: 57-62

- 9) Yamano E, Miyauchi M, Furusyo H, Kawazoe A, Ishikado A, Makino T, Tanne K, Tanaka E, Takata T. Inhibitory effects of orally administrated liposomal bovine lactoferrin on the LPS-induced osteoclastogenesis. *Lab Invest.* 2010; 90: 1236-1246
- 10) Ishikado A, Imanaka H, Takeuchi T, Harada E, Makino T. Liposomalization of lactoferrin enhanced its anti-inflammatory effects via oral administration. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 1717-1721
- 11) Orla M. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr.* 2001; 20: 389-395
- 12) Bezwoda WR, Mansoor N. Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative studies of isolation, quantitation, characterization and iron binding properties. *Biomed Chromatogr.* 1989; 3: 121-126
- 13) Moguilevsky N, Masson PL, Courtoy PJ. Lactoferrin uptake and iron processing into macrophages: a study in familial haemochromatosis. *Br J Haematol.* 1987; 66: 129-136
- 14) Banyard MR, Maeda K. The isolation and identification of lactoferrin from bovine tears. *Aust J Exp Bio Med Sci.* 1978;56: 481-492
- 15) Guillen C, McInners IB, Vaughan D, Speekenbrink AB, Brock JH. The effects of local administration of lactoferrin on inflammation in murine autoimmune and infectious arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 2073-2080
- 16) Yamaguchi M, Matsuura M, Kobayashi K, Sasaki H, Yajima T, Kuwata T. Lactoferrin protects against development of hepatitis caused by sensitization of Kupffer cells by lipopolysaccharide. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8: 1234-1239
- 17) Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M, Griffiths CE. Lactoferrin: influences on langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation. *Biochem Cell Biol.* 2002; 80: 103-107

- 18) Hayashida K, Kaneko T, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E. Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. *J Vet Med Sci.* 2004; 66: 149-154
- 19) Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun.* 1980; 28: 893-898
- 20) Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1121: 130-136
- 21) Shin K, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H, Tomita M, Otsuka Y, Yamazaki S. Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Lett Appl Microbiol.* 1998; 26: 407-411
- 22) Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Teraguchi S, Tamura Y, Yamaguchi H, Abe S. Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2619-2623
- 23) Valenti P, Marchetti M, Superti F, Amendolia MG, Puddu P, Gessani S, Borghi P, Belardelli F, Antonini G, Seganti L. Antiviral activity of lactoferrin. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 443: 199-203
- 24) Murphy ME, Kariwa H, Mizutani T, Tanabe H, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *J Vet Med Sci.* 2001; 63: 637-645
- 25) Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* 2001; 52: 225-239
- 26) Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.* 1994; 54: 2310-2312

- 27) Yoo YC, Watanabe S, Watanabe R, Hata K, Shimazaki K, Azuma I. Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. *Jpn J Cancer Res.* 1997; 88: 184-190
- 28) Tsuda H, Sekine K, Fujita K, Ligo M. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanism—a review of experimental and clinical studies. *Biochem Cell Biol.* 2002; 80: 131-136
- 29) Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E. Novel function of bovine milk-derived lactoferrin on antinociception mediated by mu-opioid receptor in the rat spinal cord. *Brain Res.* 2003; 965: 239-245
- 30) Yamauchi K, Wakabayashi H, Hashimoto S, Teraguchi S, Hayasawa H, Yomita M. Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 443: 261-265
- 31) Kamemori N, Takeuchi T, Hayashida K, Harada E. Suppressing effects of milk-derived lactoferrin on psychological stress in adult rats. *Brain Res.* 2004; 1029: 34-40
- 32) Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr.* 1995; 15: 93-110
- 33) 日本食品添加物協会技術委員会編. 食品添加物表示ポケットブック. 日本食品添加物協会. 東京. 1997: 76, 134
- 34) Nagasawa T, Kiyosawa I, Takase M. Lactoferrin and serum albumin of human casein in colostrum and milk. *J Dairy Sci.* 1974; 57: 1159-1163
- 35) Troost FJ, Steijns J, Saris WH, Brummer RJ. Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults. *J Nutr.* 2001; 131: 2101-2104

- 36) Nojima Y, Suzuki Y, Yoshida K, Abe F, Shiga T, Takeuchi T, Sugiyama A, Shimizu H, Sato A. Lactoferrin conjugated with 40-kDa branched poly (ethylene glycol) has an improved circulating half-life. *Pharm Res.* 2009; 26: 2125-2132
- 37) Roseanu A, Florian PE, Moisei M, Sima LE, Evans RW, Trif M. Liposomalization of lactoferrin enhanced its anti-tumoral effects on melanoma cells. *Biometals.* 2010; 23: 485-492
- 38) Ishikado A, Imanaka H, Kotani M, Fujita A, Mitsuishi Y, Kanemitsu T, Tamura Y, Makino T. Liposomal lactoferrin induced significant increase of the interferon-alpha (IFN-alpha) producibility in healthy volunteers. *Biofactors.* 2004; 21: 69-72
- 39) Israel A. The IKK Complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B? *Trends Cell Biol.* 2000; 10: 129-133
- 40) Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001; 410: 1099-1103
- 41) Buchholz BM, Bauer AJ. Membrane TLR signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis. *Neurogastroenterol Motil.* 2010; 22: 232-245
- 42) Patial S, Luo J, Porter KJ, Benovic JL, Parameswaran N. G-protein-coupled-receptor kinases mediate TNF alpha-induced NF-kappaB signaling via direct interaction with and phosphorylation of IkappaBalpha. *Biochem J.* 2009; 425: 169-178
- 43) 山内恒治, 若林裕之. 母乳に含まれる感染防御因子. 産婦人科の実際. 2007; 56: 327-332
- 44) Masson PL, Heremans JF. Lactoferrin in milk from different species. *Comp Biochem Physiol.* 1971; 39B: 119-129

- 45) Iwasa M, Kaito M, Ikoma J, Takeo M, Imoto I, Adachi Y, Yamauchi K, Koizumi R, Teraguchi S. Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in chronic hepatitis C patients with high viral loads and HCV genotype 1b. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97: 766-777
- 46) Kozu T, Iinuma G, Ohashi Y, Saito Y, Akasu T, Saito D, Alexander DB, Iigo M, Kakizoe T, Tsuda H. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Cancer Prev Res.* 2009; 2: 975-983
- 47) Yamauchi K, Toida T, Nishimura S, Nagano E, Kusuoka O, Teraguchi S, Hayasawa H, Shimamura S, Tomita M. 13-week oral repeated administration toxicity study of bovine lactoferrin in rats. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38: 503-512
- 48) Yamauchi K, Toida T, Kawai A, Nishimura S, Teraguchi S, Hayasawa H. Mutagenicity of bovine lactoferrin in reverse mutation test. *J Toxicol Sci.* 2000; 25: 63-66
- 49) Childer NK, Zhang SS, Harokopakis E, Harmon CC, Michalek SM. Properties of practical oral liposome-*Streptococcus mutans* glucosyltransferase vaccines for effective induction of caries protection. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11: 172-180
- 50) Pol O, Planas E, Puig MM. Effects of morphine and liposomal morphine in a model of intestinal inflammation in mice. *Pharmacology.* 1996; 53: 180-189
- 51) 菰田衛. レシチン—その基礎と応用. 幸書房. 東京. 1991: 3-16
- 52) 山野栄三, 宮内睦美, 田中栄二, 石角篤, 今中宏真, 水道裕久, 牧野武利, 丹根一夫, 高田隆. リポソーム化ラクトフェリンの抗炎症作用 II. LPS 誘導菌周組織破壊モデルにおけるリポソーム化ラクトフェリンの抑制効果. ラクトフェリン 2007. 日本医学館. 東京. 2007: 129-133

- 53) Evans M, Njike VY, Hoxley M, Pearson M, Katz DL. Effect of soy isoflavone protein and soy lecithin on endothelial function in healthy postmenopausal women. *Menopause*. 2007; 14: 141-149
- 54) Son Y, Lee JH, Kim NH, Surh NY, Kim EC, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Dilinoleoylphosphatidylcholine induces the expression of the anti-inflammatory heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages. *Biofactors*. 2010; 36: 210-215
- 55) Matsuzaki H, Kobayashi H, Yagyu T, Wakahara K, Kondo T, Kurita N, Sekino H, Inagaki K, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Bikunin inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha induction in macrophages. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004; 11: 1140-1147
- 56) Sfakianakis A, Barr CE, Kreutzer DL. Mechanisms of *Actinobacillus actinomycetemcomitance* – induced expression of interleukin-8 in gingival epithelial cells. *J Periodontol*. 2001; 72: 1413-1419
- 57) Dersot JM. Plaque control, a key element of successful orthodontics. *Ortho Fr*. 2010; 81: 33-39
- 58) Quock RL, Warren-Morris DP. Fluoride varnish: the top choice for professionally applied fluoride. *Tex Dent J*. 2010; 127: 749-759
- 59) 可児靖夫, 可児徳子, 飯野新太郎, 磯崎篤則, 高橋美次. フッ素含有洗口液による齲蝕予防法. 口衛学誌. 1980; 30: 98-103
- 60) Atassi F, Awartani F. Oral hygiene status among orthodontic patients. *J Contemp Dent Pract*. 2010; 11: 25-32
- 61) King GJ, Keeling SD, McCoy EA, Ward TH. Measuring dental drift and orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1991; 99: 456-465

- 62) Gonzales C, Hotokezaka H, Yoshimatsu M, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N. Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod.* 2008; 78: 502-509
- 63) Xie R, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Inflammatory responses in two commonly used rat models for experimental tooth movement: Comparison with ligature-induced periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2010; 2441: 9-17
- 64) Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 1. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993; 103: 62-66
- 65) Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 2. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993; 103: 138-146
- 66) Sanuki R, Shionome C, Kuwabara A, Mitsui N, Koyama Y, Suzuki N, Ahang F, Shimizu N, Maeno M. Compressive force induces osteoclast differentiation via prostaglandin E(2) production in MC3T3-E1 cells. *Connect Tissue Res.* 2010; 51: 150-158
- 67) Grieve WG III, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994; 105: 369-374
- 68) Kim JW, Lee KS, Nahm JH, Kang TG. Effects of compressive stress on the expression of M-CSF, IL-1 β , RANKL and OPG mRNA in periodontal ligament cells. *Korean J Orthod.* 2009; 39: 248-256
- 69) Nakao K, Goto T, Gunjigaku K, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K. Neuropeptides modulate RANKL and OPG expression in human periodontal ligament cells. *Orthodontic Waves.* 2007; 66: 33-40

- 70) Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A, Sakai H. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *J Periodont Res.* 2004; 39: 42-49
- 71) Yamaguchi M, Ozawa Y, Mishima H, Aihara N, Kojima T, Kasai K. Substance P increases production of proinflammatory cytokines and formation of osteoclasts in dental pulp fibroblasts in patients with severe orthodontic root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008; 133: 690-698
- 72) Zhang D, Goetz W, Braumann B, Bourauel C, Jaeger A. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. *J Periodont Res.* 2003; 38: 324-332
- 73) Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 588-593
- 74) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998; 282: 2085-2088
- 75) Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999; 189: 1777-1782
- 76) Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell.* 2003; 11: 293-302
- 77) Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 816-825
- 78) Chen Z, Hagler J, Palombella J V, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1995; 9: 1586-1597

- 79) DiDonato A J, Mercurio F, Karin M. Phosphorylation of I kappa B alpha precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 1302-1311
- 80) Rushe M, Silvan L, Bixler S, Chen LL, Cheung A, Bowes S, Cuervo H, Berkowitz S, Zheng T, Guckian K, Pellegrini M, Lugovskoy A. Structure of a NEMO/IKK-associating domain reveals architecture of the interaction site. *Structure.* 2008; 16: 798-808
- 81) Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, Rudolph B, Nallainathan D, Potter J, Elia AJ, Mak TW. Severe liver degeneration and lack of *NF-κB* activation in *NEMO/IKKγ* deficient mice. *Genes Dev.* 2000; 14: 854-862
- 82) Mbalaviele G, Sommers CD, Bonar SL, Mathialagan S, Schindler JF, Guzova JA, Shaffer AF, Melton MA, Chrestine LJ, Tripp CS, Chiang PC, Thompson DC, Hu Y, Kishore N. A novel, highly selective, tight binding IkappaB kinase-2 (IKK-2) inhibitor: a tool to correlate IKK-2 activity to the fate and functions of the components of the nuclear factor-kappaB pathway in arthritis-relevant cells and animal models. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329: 14-25
- 83) Baima ET, Guzova JA, Mathialagan S, Nagiec EE, Hardy MM, Song LR, Bonar SL, Weinberg RA, Selness SR, WoodardSS, Chrencik J, Hood WF, Schindler JF, Kishore N, Mbalaviele G. Novel insights into the cellular mechanisms of the anti-inflammatory effects of NF-kappaB essential modulator binding domain peptides. *J Biol Chem.* 2010; 30: 3498-3506
- 84) Gautheron J, Courtois G. Without Ub. I am nothing: NEMO as a multifunctional player in ubiquitin-mediated control of NF-kappaB activation. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67: 3101-3113
- 85) Suzuki YA, Lopez V, Lonnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 2560-2575

- 86) Stolina M, Schett G, Dwyer D, Vonderfecht S, Middleton S, Duryea D, Pacheco E, Van G, Bolon B, Feige U, Zack D, Kostenuik P. RANKL inhibition by osteoprotegerin prevents bone loss without affecting local or systemic inflammation parameters in two rat arthritis models: comparison with anti-TNF alpha or anti-IL-1 therapies. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11: 1186-1201
- 87) Schwarz EM, Ritchlin CT. Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9: 1186-1192
- 88) Ando K, Hasegawa K, Shindo K, Furusawa T, Fujino T, Kikugawa K, Nakano H, Takeuchi O, Akira S, Akiyama T, Gohda J, Inoue J, Hayakawa M. Human lactoferrin activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling. *FEBS J.* 2010; 277: 2051-2066
- 89) Curran CS, Demick KP, Mansfield JM. Lactoferrin activates macrophages via TLR4-dependent and -independent signaling pathways. *Cell Immunol.* 2006; 242: 23-30

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導，御鞭撻ならびに御支援を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）丹根一夫教授に謹んで感謝の意を表します。また，本研究の計画，遂行において貴重な御助言を頂き，論文作成にあたっては御助言，御校閲を賜りました同研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座（口腔顎顔面病理病態学）高田 隆教授ならびに本論文作成にあたって御助言，御校閲を賜りました同研究科創生医科学専攻探索医科学講座（口腔細胞生物学）内田 隆教授，同研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（小児歯科学）香西克之教授，同研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（健康増進歯学）西村英紀教授，同研究科展開医科学専攻病態制御医科学講座（口腔成長・発達生物学）吉子裕二准教授に深く感謝いたします。

本研究の計画，遂行において貴重な御助言を頂くと共に，直接御指導を賜りました先進医療開発科学講座（口腔顎顔面病理病態学）宮内睦美准教授，先進医療開発科学講座（口腔顎顔面病理病態学）犬伏俊博助教，徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部顎口腔再建医科学講座（口腔顎顔面矯正学）田中栄二教授に深謝いたします。

また、本研究を遂行するにあたり御協力を頂きました顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）ならびに先進医療開発科学講座（口腔顎顔面病理病態学）の皆様方に厚くお礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えるとともに、常に私を支えてくれた、父 和幸と母 登代子に心から感謝いたします。

皆様、本当にありがとうございました。