

令和元年6月7日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11828

研究課題名(和文) 非神経性コリン作動系を介した微小循環改善薬による歯周組織再生治療への応用

研究課題名(英文) Application to periodontal tissue regeneration therapy by microcirculatory improvement medicine through non-neuronal cholinergic system

研究代表者

三木 康史 (MIKI, KOJI)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：10598395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コリン作動薬である塩化カルプロニウムが骨代謝に及ぼす影響を検討した。また歯周組織に発現するコリン作動系構成要素を探索およびアセチルコリンが歯周組織構成細胞における炎症反応の制御に及ぼす影響を検討した。その結果塩化カルプロニウムには有意に骨新生作用があるとの結果を得た。また歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞にコリン作動系構成要素がmRNA、タンパクレベルで発現していることが明らかとなった。また歯肉上皮細胞においてアセチルコリンは炎症性サイトカイン(IL-8)を抑制する作用があるとの結果を得た。これは歯周組織でコリン作動系が骨代謝や炎症反応の制御に関与していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織構成細胞にコリン作動系構成要素が発現していること、血管および神経系に作用するコリン作動薬である塩化カルプロニウムに骨新生作用がある可能性があること、アセチルコリンが歯周組織における炎症反応の制御に関与している可能性があることが明らかとなった。これらの結果は歯周組織を構成する細胞、血管および神経にコリン作動系が作用し、歯周組織の恒常性維持に関与していることを示しており、歯周病の病態解明や新たな歯周組織再生療法の開発に寄与するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of carpronium chloride, a cholinergic agent, on bone metabolism. In addition, we searched for cholinergic components expressed in periodontal tissues and examined the effect of acetylcholine on inflammation in periodontal tissue cells. As a result, it was obtained that carpronium chloride has a bone regenerating effect significantly. In addition, it was revealed that cholinergic components are expressed at mRNA and protein levels in gingival epithelial cells and gingival fibroblasts. Acetylcholine also suppresses inflammatory cytokines (IL-8) in gingival epithelial cells. This suggests that the cholinergic system is involved in the control of bone metabolism and inflammatory response in periodontal tissue.

研究分野：歯周病学

キーワード：非神経性コリン作動系 アセチルコリン 塩化カルプロニウム ムスカリン受容体 歯周組織再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、細菌バイオフィームによって歯周組織が破壊される慢性炎症疾患である。歯周病の発症、進行のリスク因子である外傷性咬合や喫煙は、それぞれ歯周組織の過度の圧迫とニコチンによる血管収縮により歯周組織局所における微小血液循環不全を引き起こす。そのため歯周組織への酸素の栄養供給が阻害され、歯周治療に対する奏功不全や創傷治癒遅延が生じるものと考えられる。また、歯科矯正治療時には、牽引側の歯根膜における血流亢進が歯周組織のリモデリングに重要な役割を果たしていることが示唆されている。すなわち歯根膜の血流変化が、歯周組織構成細胞の機能に影響を及ぼし、歯周病の病態形成、歯周組織の創傷治癒・再生過程に深く関与しているものと推察される。また歯根膜は脈管のみならず感覚神経や自律神経など豊富な神経支配を受けている。これまでに神経系の骨代謝に関しては、骨への感覚神経の進入がないと骨の形成不全が生じ、骨量も減少すること (Fukuda T, et al. Nature. 2013)、自律神経が骨量を調整していることが明らかとなっている (Takeda S, et al. Cell. 2002)。また骨に対する神経分泌物の作用としては、自律神経では acetylcholine 神経ペプチドである vasoactive intestinal peptide(VIP)など、感覚神経では C 線維の自由神経終末から放出される CGRP や substance P がある。それら神経関連分子が骨芽細胞、破骨細胞に作用し、局所において骨代謝の役割の一端を担っていると報告されている。すなわち全身的にも、局所的にも神経系が骨代謝に関わっていると報告されており、またアセチルコリンに関してはさまざまな非神経性の細胞においてコリン作動系構成要素が発現しており、それらが局所において骨代謝や炎症制御を行っている可能性が報告されている。

申請者は歯根膜における血管系および神経系を介した歯周組織の恒常性維持機構の解明を目指し、強い血管拡張作用のあるコリン作動薬である塩化カルプロニウムに着目した。これまでコリン作動薬である塩化カルプロニウムが、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進する作用があること、また血管新生する作用があることを報告してきた。またラット頭蓋骨骨欠損モデルを構築し骨新生作用を検討したところ、0.1%塩化カルプロニウムが骨新生の促進を示唆する結果を得た。また歯根膜細胞においてアセチルコリン受容体をはじめ神経系で発現がみられるアセチルコリンを生成するための酵素である ChAT (choline acetyl transferase)、分解する酵素である AChE (acetylcholine esterase)、貯蔵するのに必要な VAcHT (vesicular acetylcholine transporter) が mRNA、タンパクレベルで発現が認められるとの結果を得た。これは歯根膜細胞が神経系と同様神経伝達物質として知られるアセチルコリンの生成、分解、貯蔵を行い、生物学的機能を発揮していることを示唆している(平成 26 年度 若手研究(B) 課題番号 26861811)。

近年、血管内皮細胞のみならず、さまざまな種類の硬組織形成細胞にムスカリン受容体が存在するとの報告があり、これらの知見はアセチルコリン-ムスカリン受容体カスケードで作動する副交感神経系が、骨芽細胞の制御を介して骨の微小動態を調節していることを示唆している。しかしながらアセチルコリン誘導体である塩化カルプロニウムがどのように関係しているかは不明である。また非神経性アセチルコリンは、限局された微小環境に存在するアセチルコリン受容体に、オートクラインあるいはパラクライン的に作用して、細胞増殖、細胞間接着、遊走、分化、あるいはアポトーシスなどの微細な調節に関与していることが明らかになってきた。しかしながら歯周組織構成細胞におけるそれらの発現、機能に関しては不明であり未だ検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、コリン作動薬である塩化カルプロニウムが歯周組織の治癒・再生過程に重要な骨代謝に及ぼす影響、歯周組織構成細胞に発現するコリン作動系構成要素の探索およびアセチルコリンが同細胞における炎症に及ぼす影響を検討し、歯周組織におけるコリン作動系の骨代謝や炎症反応の制御へ関与を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) ラット頭蓋骨欠損モデルを作製し塩化カルプロニウム局所投与による治癒・再生過程の検索
実験動物として 12 週齢の SD 系ラット (12 匹) を用いた。全身麻酔下にて頭蓋骨にトレフィンバーにて 3.8mm 径の骨欠損を作製する。基材としてコラーゲンスポンジを用い、実験群 (6 匹) に 0.1%塩化カルプロニウム/PBS、対照群 (6 匹) として PBS を塗布し、皮膚の縫合を行った。2 週後ラットを灌流固定し、頭蓋骨を摘出し、CT 撮影を行い、新生骨量を測定した。

2) 歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞におけるコリン作動系構成要素の発現の検索

歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞におけるコリン作動系構成要素の発現を検討することを目的として、申請者の研究室で樹立したヒト歯肉上皮不死化細胞株 epi4 およびヒト歯肉線維芽細胞 (Lonza 社) を培養し mRNA を抽出した。ChAT、VAcHT、AChE、mAChE 特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法を行った。また ChAT、VAcHT、AChE、mAChE 抗体を用いて、細胞免疫染色を行った。

3) 歯根膜細胞における M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR3) の発現の検索

ヒト歯根膜細胞 (Lonza 社) における mAChR3 の発現をフローサイトメトリー法 (FACS) にて検討した。

4) 歯根膜細胞におけるコリン作動系構成要素の局在の検索

アセチルコリンを生成するための酵素である ChAT の局在を知るため、免疫電子顕微鏡法を用い、検索を行った。

5) 歯肉上皮細胞におけるアセチルコリンによる炎症制御の可能性の検討

培養したヒト歯肉上皮細胞 (epi4) に様々な濃度のアセチルコリン存在下で歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* のリポポリサッカライド (Pg-LPS) 刺激により誘導される IL6、IL-8 の発現をサイトカイン特異的 ELISA 法を用いて検討した。

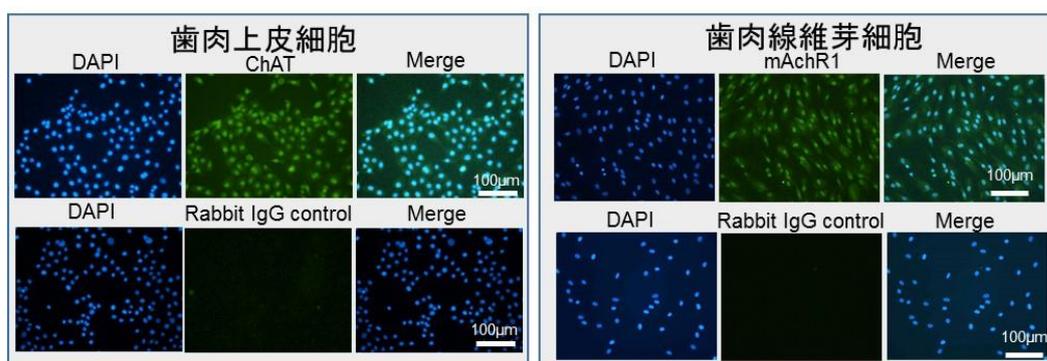
4. 研究成果

1) ラット頭蓋骨欠損モデルを作製し塩化カルプロニウム局所投与による治癒・再生過程の検索

12 匹のラットを用いて実験を行った結果 0.1%塩化カルプロニウムはラット頭蓋骨欠損モデルにおいて骨新生を有意に促進することを示す結果を得た。

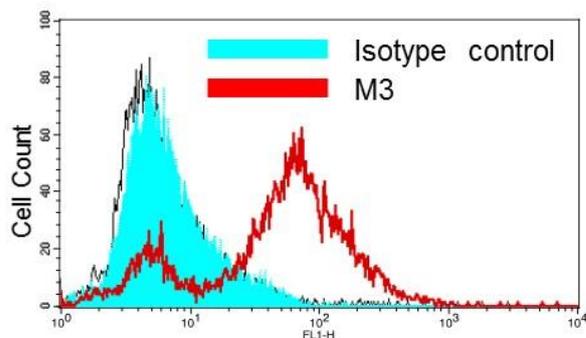
2) 歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞におけるコリン作動系構成要素の発現の検索

歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞ともに、ChAT、VACHT、AChE、mAChE が RT-PCR 法、細胞免疫染色でそれらが発現していることが明らかとなった。



3) 歯根膜細胞におけるムスカリン 3 受容体 (mAChR3) の発現の検索

ヒト歯根膜細胞における mAChR3 の発現をフローサイトメトリー法 (FACS) にて検討した結果、mAChR3 の発現が明らかとなった。



4) 歯根膜細胞におけるコリン作動系構成要素の局在の検索

歯根膜細胞におけるコリン作動系構成要素の局在を検索するため免疫電子顕微鏡法を用い、対象とする蛋白質が組織細胞のどの部位にどの位蓄積しているのかの検索を行ったが、これまでのところ局在は明らかとなっていない。

5) 歯肉上皮細胞におけるアセチルコリンによる炎症制御の可能性の検討

培養したヒト歯肉上皮細胞 (epi4) に様々な濃度のアセチルコリン存在下で歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* のリポポリサッカライド (LPS) 刺激により産生される IL-8 を ELISA 法を用いて検討した。のたところ、低濃度アセチルコリンは炎症性サイトカイン (IL-8) を抑制する結果となった。これはアセチルコリンが歯周組織局所の炎症を制御している可能性があることを示唆していると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

① 三木康史、山下元三、北村正博、村上伸也

歯肉線維芽細胞における非神経性コリン作動系の発現

日本歯科保存学会 平成 30 年度秋季大会 (第 149 回) 平成 30 年 11 月 1-2 日
京都市勧業館みやこめっせ 京都

② 三木康史、山下元三、北村正博、村上伸也
ヒト歯肉上皮細胞における非神経性コリン作動系の発現
日本歯周病学会 60 周年記念京都大会 平成 29 年 12 月 16-17 日 国立京都国際会館 京都

③ 三木康史、山下元三、柳田学、北村正博、村上伸也
歯根膜細胞における非神経性コリン作動系の発現
日本歯科保存学会 平成 28 年度秋季大会 (第 145 回) 平成 28 年 10 月 27-28 日
キッセイ文化ホール 松本

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：北村 正博
ローマ字氏名：(KITAMURA, Masahiro)
所属研究機関名：大阪大学
部局名：歯学研究科
職名：准教授
研究者番号 (8 桁)：10243247

研究分担者氏名：竹立 匡秀
ローマ字氏名：(TAKEDACHI, Masahide)
所属研究機関名：大阪大学
部局名：歯学部附属病院
職名：講師
研究者番号 (8 桁)：60452447

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：