

令和元年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11831

研究課題名(和文) マクロファージを標的とした脳由来神経栄養因子による歯周炎治療の基礎研究

研究課題名(英文) Effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on macrophage activation for periodontal therapy

研究代表者

武田 克浩 (Takeda, Katsuhiko)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教

研究者番号：10452591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子(BDNF)は非外科的歯周治療と併用することで、過度の炎症を抑制し、セメント質や歯周靭帯、歯槽骨などの歯周組織の再生を促進することが示唆された。また、in vivoで認められた炎症制御の機序の一端として、BDNFがマクロファージの活性に及ぼす作用が考えられた。すなわち、BDNFはマクロファージの貪食能を亢進させることで創傷治癒の初期に起炎物質の排除を促進し、歯周組織再生の促進に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軽度歯周組織破壊は進行した歯周炎と比較すると、重症化の危険性がある、完全再生の可能性がある、罹患患者が多いという特徴がある。BDNFによって軽度歯周組織破壊を非外科的に再生させることができれば、患者によるセルフケアが容易になり、歯周炎再発・重症化のリスクが軽減する。また、歯周炎は全身疾患と関連していることから、歯周炎を早期に治療することは全身的な疾患リスクの低減につながる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of scaling and root planning (SRP) with local application of BDNF/Hyaluronic acid(HMW-HA) complex on the changes in clinical parameters and histology of periodontal tissue in dogs with ligature-induced periodontitis. The BDNF/HMW-HA group showed significant improvement of clinical parameters compared to those of the other groups in dogs. Histological analysis on the BDNF/HMW-HA group indicated suppression of apical migration of epithelial tissue and milder infiltration of inflammatory cells than it was observed in the other three groups. Furthermore, new cementum and alveolar bone were regenerated and collagen fibers were inserted into them in the BDNF/HMW-HA group.

研究分野：歯周病学

キーワード：脳由来神経栄養因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は糖尿病や心疾患、関節リウマチなど多くの全身疾患との関連が報告されており、歯周炎治療は単に口腔内の問題解決でなく、全身の健康増進への貢献度も高い。しかし、重症化した歯周炎の治療は困難で、現在の歯周組織再生療法には、外科的侵襲が避けられないことや適応症が限られることなど、克服すべき問題が残っている。脳由来神経栄養因子(BDNF)の歯周組織再生における有用性が *in vitro* 及び *in vivo* の研究で明らかになってきた。さらに、BDNF は歯周組織再生を阻害する上皮細胞のアポトーシスを誘導し、血管内皮細胞において抗炎症作用を有することが示された。これら組織再生促進能、上皮増殖抑制能、炎症制御能は、軽度歯周炎における非外科的組織再生治療に有効であると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、小規模歯周組織欠損を想定したビーグル犬絹糸結紮歯周炎モデルを作製し、BDNF の非外科的歯周治療による歯周組織再生効果を検討することとした。さらに BDNF のマクロファージ細胞機能制御能を検討することとした。BDNF が歯周組織再生促進能に加えてマクロファージ細胞機能制御能を有することが明らかになれば、炎症制御・組織再生の両面からより多くの歯周炎患者にサイトカイン療法を展開することができる。例えば、歯周外科処置時のみならず、軽度歯周炎に対して BDNF を非外科的に歯周ポケットに局所投与することによって歯周組織が改善されれば、患者負担が少なく重症化を防ぐことができ、全身疾患の罹患リスクを低下させ、患者への貢献度も大きいと考えられる。

3. 研究の方法

1. ビーグル犬歯周炎モデルを用いた BDNF 抗炎症作用・組織再生能の検討

ビーグル犬の下顎第 2、第 3、第 4 前臼歯の歯頸部に絹糸を結紮することで軽度歯周炎モデルを作製し、モデル作製前後の臨床的指標と組織像を比較してその妥当性を検討した。

(1) 前処置

実験動物として、ビーグル犬(メス、12~20 ヶ月齢、体重 10~15 kg) 8 頭を用いた。動物実験は広島大学動物実験等規則に基づいて行った(承認番号:A16-140)。以下の各処置は、酒石酸ブトルファノール(ベトルファール®)(Meiji Seika ファルマ、東京)0.1 mg/kg、ミダゾラム(ミダゾラム注「サンド」)(サンド、山形)0.3 mg/kg、塩酸メドミジン(ドミツール®)(日本全薬工業、福島)20 µg/kg の 3 種混合麻酔による鎮静下で行った。前処置として、絹糸結紮の 1 週間前に超音波スケーラー(Guilin Woodpecker Medical Instrument、桂林、中国)を用いて全顎の歯肉縁上スケーリングを行い、ブラッシングによって良好な口腔衛生状態を保った。

(2) 歯周組織検査と絹糸結紮

前述のとおり鎮静を施し、絹糸結紮前に下顎第 2、第 3、第 4 前臼歯に一歯につき 4 点(頬側近心、頬側遠心、舌側近心、舌側遠心)でプロービングを行った。その際、咬合面にレボテック LC(ジーシー、東京)を棒状にして置き、プローブで溝を形成した状態で光重合させてプロービング用のインジケータとした。プロービングによって、probing pocket depth (PPD)、clinical attachment level (CAL)、bleeding on probing (BOP)、gingival index (GI) を記録した。プロービング後、下顎第 1 前臼歯から第 1 後臼歯部の歯肉に歯科用キシロカイン®カートリッジ(デンツプライ

シロナ、東京)で浸潤麻酔を行った。第1前臼歯遠心から第1後臼歯近心にかけて歯肉溝切開を加え、粘膜骨膜弁を剥離回転した。次に、第2、第3、第4前臼歯の歯頸部に3-0絹糸(Ethicon、Somerville、NJ)を五重に結紮し、粘膜骨膜弁を復位、4-0絹糸(Ethicon)で歯間乳頭部を縫合閉鎖した。絹糸結紮後は軟性食で飼育してプラークの付着を促した。5週間の経過観察後、結紮した絹糸をフラップを開くことなく無菌的に除去した。餌は固形食に戻した。1週間後、インジケーターを装着して再度プロービングを行い、術前と同様の項目を記録した。

(3) SRP と BDNF/HMW-HA 複合体ゲルの投与

前述の方法で作製した歯周炎モデルを用いて、片側の3歯を1ブロックとして、ブロックごとに異なる実験群を割り当てて処置を行った。1つの実験群に対し2ブロック(6歯)を供した。実験群は無処置のコントロール群、スケーリング・ルートプレーニング(SRP)を施す群(SRP群)、SRPを施した後の歯周ポケット内にHMW-HAゲルを注入する群(HMW-HA群)、SRPを施した後にBDNF/HMW-HA複合体ゲルを注入する群(BDNF/HMW-HA群)の4つを設定した。SRPにはグレーシーキュレット(Hu-Friedy、Chicago、IL)を用い、処置に熟達した歯周病専門医が行った。SRP後の処置にはRecombinant human BDNF(R&D Systems)(500 µg/mL)とその担体として高分子ヒアルロン酸(HMW-HA)(DENKA、東京)を用いた。HMW-HA群とBDNF/HMW-HA群には、SRPを施した後にHMW-HAゲルもしくはBDNF/HMW-HA複合体ゲルを1歯あたり50 µLずつ、ミニシリンジ(ネオ製薬工業、東京)を用いて歯周ポケット内に非外科的に注入した。処置後の経過観察期間は2週間とした。

(4) 灌流固定と組織標本の作製

処置後2週間後のプロービングを終えた個体をネンブタール®(大日本住友製薬、大阪)の腹腔内注射で全身麻酔下におき、4%パラホルムアルデヒド(PFA)(富士フィルム和光純薬、大阪)で灌流固定を行った。下顎骨を摘出し、引き続き4%PFAに24時間浸漬した。その後、歯周組織を含めて歯1本ずつに分割し、10%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)(ナカライテスク、京都)に浸漬して脱灰した。12~16週間浸漬した後、通法に従ってパラフィンに包埋し、頬舌側方向に歯軸と並行に5 µmの厚さに薄切した。パラフィン切片はキシレン(富士フィルム和光純薬)で脱パラフィンし、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、アザン染色、免疫組織化学染色を施した。

2. BDNFのマクロファージにおける抗炎症作用の検討

炎症性サイトカイン発現という観点からBDNFの抗炎症作用をin vitroで検討する。さらにその作用メカニズムを解析する。

(1) RAW264.7の培養

細胞はマウスマクロファージ様細胞株であるRAW264.7をRIKEN(埼玉)から購入して使用した。培養はDulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)(Sigma-Aldrich、Steinheim、Germany)に10% fetal bovine serum(FBS)(Thermo Fisher Scientific)、100 Units/mL penicillin(Sigma-Aldrich)、100 µg/mL streptomycin(Sigma-Aldrich)を添加したもの(培地A)を使用し、37 °C、5%CO₂気相下で行った。

(2) リアルタイムPCR

RAW264.7をサブコンフルエントになるまで培地Aで培養した。DMEMで3回洗浄した後、FBSを含まない培地A(培地B)に変更し、BDNF(R&D Systems)最終濃度50 ng/mL)

を0~24時間作用させた。培養終了後、PBSで洗浄し、RNA iso plus(タカラバイオ、滋賀)でtotal RNAを抽出した。RNA濃度は吸光度(260 nm、280 nm)を測定し算出した。ReverTra Ace®(東洋紡、大阪)を用いて、精製したtotal RNA 1.0 µgを逆転写した。得られたcDNAをテンプレートとして、PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA)とStepOnePlus™ (Applied Biosystems)を用いてリアルタイムでモニタリングし、mRNA発現を定量的に解析した。

3 . BDNFのマクロファージ貪食能に及ぼす影響

RAW264.7をBioCoat™ Collagen-I Coated Culture Slide (Corning)でおよそ60%コンフルエントになるまで培地Aで培養した。DMEMで3回洗浄した後、培地Bに変更し、BDNF (R&D Systems)を50 ng/mLとなるように作用させた。培養終了30分前にLatex Beads-Rabbit IgG-FITC Complex (Phagocytosis Assay Kit) (Cayman Chemical、Ann Arbor、MI)を培地中に加えて細胞に貪食させた。培養終了後はPBS(日水製薬)で洗浄し、DAPI solution(同仁化学研究所) 1:250で細胞核を染色してFluoromount-G (SouthernBiotech)で封入した。観察は正立蛍光顕微鏡イメージングシステム (ECLIPSE E1000) (ニコンインテック、東京)で行い、CellInsight™ CX5 (Thermo Fisher Scientific)で解析した。また、上記のBDNF単独作用のほかに、TrkB阻害剤であるK252a (Enzo Life Sciences、Farmingdale、NY) (最終濃度50 nM)もしくはRac1阻害剤(富士フイルム和光純薬) (最終濃度100 µM)をBDNF作用の30分前に培地中に添加した阻害実験も行った。さらに阻害剤のみ作用させてBDNFを加えない阻害剤単独の実験も行った。Rac1の活性はRac1 Activation Assay Kit (abcam)を用いて調べた。

4 . 研究成果

BDNFによる非外科的な歯周組織再生治療の可能性について、ビーグル犬に作製した軽度歯周炎モデルを用いて実験を行った。歯周組織の臨床的指標と組織学的所見を総合して解析し、以下の結果を得た。

- (1) BDNF投与2週間後に臨床的指標が他群と比較して最も改善した。
- (2) BDNF投与2週間後に炎症性細胞浸潤の減少と上皮の増殖抑制を認めた。
- (3) BDNF投与2週間後にコラーゲン線維の埋入を伴う新生セメント質と新生骨が観察され、その周囲の細胞にオステオポンチンとTrkBの陽性反応が認められた。
- (4) BDNF投与6週間後では新生セメント質と新生歯槽骨が投与2週間後と比較してより顕著に認められた。

さらに、BDNFがマクロファージの活性に与える作用をin vitroの実験で調べ、以下の結果を得た。

- (1) BDNFで刺激するとRAW264.7の貪食能が亢進し、TrkB阻害剤およびRac1阻害剤の添加で抑制された。
- (2) BDNFはRAW264.7のGTP結合型(活性型)Rac1およびSerine-リン酸化Rac1の発現を促進した。
- (3) BDNFで刺激するとIL-6、IL-1β、TNF-αのmRNA発現がわずかに上昇し、TrkB阻害剤の添加で抑制された。
- (4) IL-1βはRAW264.7の貪食能を亢進した。

以上の結果から、BDNF は非外科的歯周治療と併用することで、過度の炎症を抑制し、セメント質や歯周靭帯、歯槽骨などの歯周組織の再生を促進することが示唆された。また、in vivo で認められた炎症制御の機序の一端として、BDNF がマクロファージの活性に及ぼす作用が考えられた。すなわち、BDNF はマクロファージの貪食能を亢進させることで創傷治癒の初期に起炎物質の排除を促進し、歯周組織再生の促進に寄与している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Sasaki S, Takeda K, Takewaki M, Ouhara K, Kajiya M, Mizuno N, Fujita T and Kurihara H: BDNF/HMW-HA complex as an adjunct to nonsurgical periodontal treatment of ligature-induced periodontitis in dogs. J Periodontol., 2019 Jan;90(1):98-109. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1 . 佐々木慎也, 武田克浩, 應原一久, 本池総太, 加治屋幹人, 松田真司, 水野智仁, 藤田 剛, 栗原英見: 脳由来神経栄養因子 (BDNF) がマクロファージ活性化に及ぼす影響. 第 61 回春季日本歯周病学会学術大会, 東京, 2018.

2 . Sasaki S, Takeda K, Takewaki M, Kajiya M, Matsuda S, Mizuno N, Fujita T and Kurihara H: Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as an adjunct to non-surgical periodontal treatment on ligature-induced periodontitis in dogs. 12th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Seoul, 2017.

3 . 佐々木慎也, 武田克浩, 竹脇 学, 應原一久, 加治屋幹人, 松田真司, 水野智仁, 藤田剛, 栗原英見: 脳由来神経栄養因子 (BDNF) を用いた非外科的歯周治療に関する組織学的研究. 日本歯周病学会 60 周年記念京都大会, 京都, 2017.

4 . 佐々木慎也, 武田克浩, 竹脇 学, 間 悠介, 加治屋幹人, 松田真司, 水野智仁, 藤田剛, 栗原英見: 脳由来神経栄養因子 (BDNF) を用いた非外科的歯周治療の基礎研究. 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 新潟, 2016.

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐々木慎也

ローマ字氏名：Sasaki Shinya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。