

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09952

研究課題名（和文）免疫・骨代謝の賦活化による治癒促進を狙った新しい根管治療パラダイムの構築

研究課題名（英文）The establishment of novel root canal therapy by activation of immune response and bone metabolism

研究代表者

伊藤 祥作（Itoh, Shousaku）

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：90360495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：炭酸リチウム貼薬群では、コントロール群と比較して根尖病変の治癒促進が認められた。炭酸リチウムの根管貼薬による根尖病変治癒促進のメカニズムは、まず、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路が活性化することがきっかけとなる。これに引き続き、M1 マクロファージの分化抑制、M2 マクロファージの分化促進、制御性 T 細胞の分化誘導が起こり、免疫系の制御が行われる。これらの機序が働くことで、根尖病変内の炎症状態が早期に収束し、抗炎症状態へ移行、治癒に適した環境が整えられたと考えられる。そして、骨芽細胞の分化が誘導されることにより、硬組織の形成がすすみ、根尖病変体積の縮小が促進されたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの根管貼薬剤は、主に起炎細菌の殺菌・静菌を目的に開発されてきたのに対し、本研究は、宿主細胞内シグナル伝達経路を活性化して、病変の治癒を賦活化する根管貼薬剤を開発するというものである。研究の結果、炭酸リチウムはWnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を活性化し、M1 マクロファージの分化抑制、M2 マクロファージの分化促進、制御性 T 細胞の分化誘導が起こり、治癒に適した環境が整えられた。そして、硬組織の形成も誘導された結果、根尖病変体積が縮小した。本研究結果により、歯根端切除術を回避できる症例が増えることが予測され、超高齢社会において、大きなメリットをもたらすと考えている。

研究成果の概要（英文）：The application of Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> into root canals showed the healing ability for apical periodontitis. The application of Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> into root canal induced the appearance of CD68/CD206-double positive cells and Foxp3-positive cells in the rats' periapical lesions at an early stage of inflammation. After 24 h of Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> application, Axin2-positive cells were observed in the periapical lesions. Our findings demonstrated that Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> activates the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and immediately induces the healing process. From our results, we propose that Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> could be used as an effective novel root canal medicament for apical periodontitis.

研究分野：保存治療系歯学関連

キーワード：根管貼薬剤 Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路 炭酸リチウム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトにより、ヒトの全ゲノム配列が明らかになっていくうちに、個々のヒト遺伝子配列は異なることがわかってきた(1000塩基に1つの割合)。さらにその配列の違い(一塩基多型: single nucleotide polymorphism, SNP と呼ばれる)は、さまざまな慢性疾患(糖尿病や歯周病など)の発症と関連性があることが判明してきている。根尖性歯周炎については、欧米系や南米系の人種における関連遺伝子についての報告がある(Morsani JM *et al.*, *JOE*, 2011, Mnezes-Silva R *et al.*, *JOE*, 2012)。しかしながら、アジア系人種における報告はなかった。そこで、日本人における関連遺伝子を検索したところ、Wnt シグナル伝達経路に属する LRP5 遺伝子上の SNP が、根尖病変の形成と関連性があることを明らかにした。ところで、Wnt シグナル伝達経路は、Wnt と LRP5 が結合すると細胞内経路が活性化され核内に信号(シグナル)が伝わり、免疫応答や骨代謝を誘導する。そして、Li イオンは、強制的に Wnt シグナル伝達経路を活性化することがわかっており、古典的に塩化リチウムが活性化する薬剤として用いられている。そこで、Wnt シグナル伝達経路を強制的に活性化する塩化リチウムの根尖病変形成への関与について、実験動物をもちいた *in vivo* 実験系にて解析したところ、塩化リチウムには根尖病変の治癒を促進する働きがあることを突き止めた。そこで、すでに抗うつ剤として処方され、安全性が担保されている炭酸リチウムを Li イオンをリリースする根管貼薬剤として用いた場合、根尖病変を同様に治癒へと導くことができるかどうかを検索することにした。

### 2. 研究の目的

これまでの根管治療は、根管清掃や水酸化カルシウム貼薬などにより起炎細菌の除去に焦点が当てられており、大きな根尖病変への対応には限界があり、歯根端切除術に代表される外科的歯内療法の適応となっている。それに対し、本研究は、宿主細胞内シグナル伝達経路(Wnt シグナル伝達経路)をターゲットにしたバイオアクティブな根管貼薬剤により、免疫・骨代謝(病変の治癒)を賦活化し、根尖病変の治癒を誘導する新たな根管治療システムを提案するものである。この新システムを構築できれば、侵襲性の高い外科的処置を回避できる症例が増えるため、超高齢社会において、増え続ける全身疾患を抱える高齢者に対し、非常に大きなメリットをもたらすと考えている。先行研究により、根尖性歯周炎モデルマウスに塩化リチウムを根管貼薬剤として用いたところ、根尖病変の治癒を促進するという結果が得られている。そこで、すでに抗うつ剤として処方され、安全性が担保されている炭酸リチウムを根管貼薬剤として用いた場合、塩化リチウムと同等の効果を有するのかが検証したい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 炭酸リチウム根管貼薬の有効濃度の検索

本研究における動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会承認のもと、大阪大学動物実験規定に則って実施した(承認番号: 動歯-26-011-0)。実験的根尖病変の形成は、Kawahara らおよび Kuremoto らの方法に則っておこなった。10 週齢雄の Wistar 系ラット(日本クレア、東京)に対し、ドミトール®(0.15 mg/kg; 日本全薬工業、福島)、ドルミカム®(2 mg/kg; アステラス製薬、東京)、ベトルファール®(2.5 mg/kg; Meiji Seika ファルマ、東京)の3種混合麻酔薬の腹腔内投与にて全身麻酔をおこなった。下顎両側第一臼歯を #1/2 ラウンドバー(Dentsply, Ballaigues, Switzerland)と電気エンジン(VIVAMATE G5®; NSK, 栃木)を用いて咬合面近心窩から露髄させ、#8 K ファイル(Dentsply)にて近心根を穿通した。そして被験歯を4週間開放状態で放置することにより、実験的に根尖性歯周炎を惹起させた。

ラットに対する感染根管治療は、Yoneda らおよび Matsui らの方法に則っておこなった。露髄4週間後、ラット用にオーダーメイドしたラバーダムクランプ(YDM, 東京)とラバーダムシート(Heraeus Kulzer, Hanau, Germany)で被験歯にラバーダム防湿を施して、以下に示す感染根管治療をおこなった。なお、以下の処置はすべてマイクロスコープ(Stemi DV4 SPOT®; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)下で拡大視野にておこなった。まず、#1/2 ラウンドバーにて髓腔開拓後、下顎第一臼歯近心根を #8 K ファイルにて穿通し、電氣的根管長測定器(Root ZX®; モリタ、大阪)で 0.5 値を測定して作業長とした。最終拡大号数は #20 とし、2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液にて根管洗浄後、滅菌ペーパーポイントにて根管乾燥を行い、各種貼薬剤を根管内に填入した。炭酸リチウム貼薬群には 0.001%、0.01%、0.1%、1% 炭酸リチウム配合根管貼薬剤を、対照群には水酸化カルシウム製剤(カルシペックス®; 日本歯科薬品、山口)もしくはブランク(貼薬剤ペーストの基材のみ)をそれぞれ根管貼薬し、ボンディング材(クリアフィル®ユニバーサルボンド Quick; クラレノリタケデンタル、東京)にて接着処理後、コンポジットレジン(MI フロー®; GC, 東京)にて歯髄腔を封鎖した。最後に、被験歯の破折防止のため、上顎両側第一臼歯を抜去した。各群 n = 4 とし、以下の解析をおこなった。

上記の実験に供したラットは、感染根管治療前および処置後 1 週、2 週、3 週、4 週の時点で、下顎第一臼歯およびその周囲のマイクロ CT (R\_mCT2; RIGAKU, 東京)撮影をおこなった。撮影条件は管電圧 90 kV、管電流 160  $\mu$ A、スライス幅 10  $\mu$ m とした。得られた画像は画像解析

ソフトウェア (TRI3D-BON; RATOK, 東京) を用いて解析し, 根尖部透過像の体積を根尖病変体積として Yoneda らおよび Kalatzis-Sousa らの方法に準じて根尖病変体積を測定した。病変体積の統計学的有意差検定には, one-way ANOVA および Tukey-Kramer 法を用いた。

#### (2) 炭酸リチウム根管貼薬の安全性についての検証

10 週齢雄の Wistar 系ラット (日本クレア) に対し, 前項までと同様の方法により下顎両側第一臼歯を露髄させ, 4 週間口腔内に曝露した。4 週間経過した後, ラットを炭酸リチウム根管貼薬群と全身投与群の 2 群に分け (各群  $n=4$ ), 根管貼薬群には 12% 炭酸リチウム配合根管貼薬剤を貼薬し, 全身投与群には 74mg/kg (2mEq/kg) の濃度となるよう, 炭酸リチウムを生理食塩水に溶解して腹腔内に投与した。上記処置を施したラットから, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間の時点で鎖骨下静脈より血液を採取した。採取した血液は室温にて 20 分間静置し, 4, 1000  $\times$  g にて 20 分間遠心分離を行い, 血清成分を得た。リチウムイオン濃度は, リチウム測定キット: メタロアッセイ™ リチウム測定 LS (LI01M; Metallogenics, 千葉) を用い, マイクロプレートリーダー (Wallac 1420 ARVO MX; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) にて主波長 550nm における吸光度を測定することにより算出した。

#### (3) 炭酸リチウム根管貼薬による根尖病変治癒メカニズムの組織学的検索

貼薬処置後 24 時間, 1 週, 2 週, 3 週, 4 週の時点で, Periodate Lysine Paraformaldehyde (PLP) 固定液 (富士フィルム和光純薬) にて灌流固定後, 下顎骨を摘出し, さらに同固定液にて 24 時間浸漬固定をおこなった。その後, 脱灰液にて 4 週で 4 時間脱灰処理を施し, 0.C.T コンパウンド (サクラファインテック, 東京) に包埋し, クライオスタット (CM3050S; Leica) にて厚さ 14  $\mu$ m の薄切切片を作製した。得られた切片は, 10% ヤギ正常血清にて室温で 60 分間ブロッキングをおこなった後, 各一次抗体を 4 週で一晩反応させた。使用した抗体の希釈倍率はそれぞれ, 1 : 500 ; Axin2 (ab32197; abcam, Cambridge, UK), 1 : 1000 ; Foxp3 (NB100-39002; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), 1 : 500 ; CD86 (bs-1035R; Bioss, Boston, MA, USA) とした。一次抗体との反応後, TBST にて洗浄し, VECTASTAIN® Elite® ABC Kit (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, USA), DAB (ImmPACT® DAB; VECTOR LABORATORIES) を用いてシグナルの検出をおこなった。対比染色として Mayer ヘマトキシリン液にて核染色をおこなったのち, 光学顕微鏡にて観察した。

また, 蛍光免疫染色に際しては, 同上のブロッキング操作後, 希釈倍率 1 : 500 にて CD68 (ab125212; abcam) に対する一次抗体を 4 週で一晩反応させた。TBST による洗浄後, ビオチン化二次抗体を付加し, APC-streptavidin (405207; BioLegend, San Diego, CA, USA) を室温で 15 分間反応させた。さらに MRC1 (bs-4727R-FITC; Bioss) に対する FITC 標識抗体を希釈倍率 1 : 200 にて室温で 60 分反応させ, 二重染色をおこなった。染色後の切片は蛍光顕微鏡 (BZ-X800; KEYENCE) にて観察をおこなった。

### 4. 研究成果

#### (1) 炭酸リチウム根管貼薬の有効濃度の検索

炭酸リチウムを根管貼薬後 1 週の時点では, どの群間にも根尖病変体積に有意差は認められなかったが, 根管貼薬後 2 週および 3 週の時点では, すべての濃度の炭酸リチウム群はプラック群と比較して, 有意差をもって根尖病変体積が縮小していた (図 1)。また, 根管貼薬後 4 週においては, プラック群とすべての炭酸リチウム群との間に有意差が認められたが, 0.001% 炭酸リチウム群は 0.01% 以上の濃度の炭酸リチウム群と比較して, 有意差をもって病変体積が大きかった (図 1)。これらの結果から, 炭酸リチウム濃度が 0.01% 以上では根管貼薬剤はほぼ同等の効果を示すが, 0.001% 以下ではその効果が減弱することがわかった。

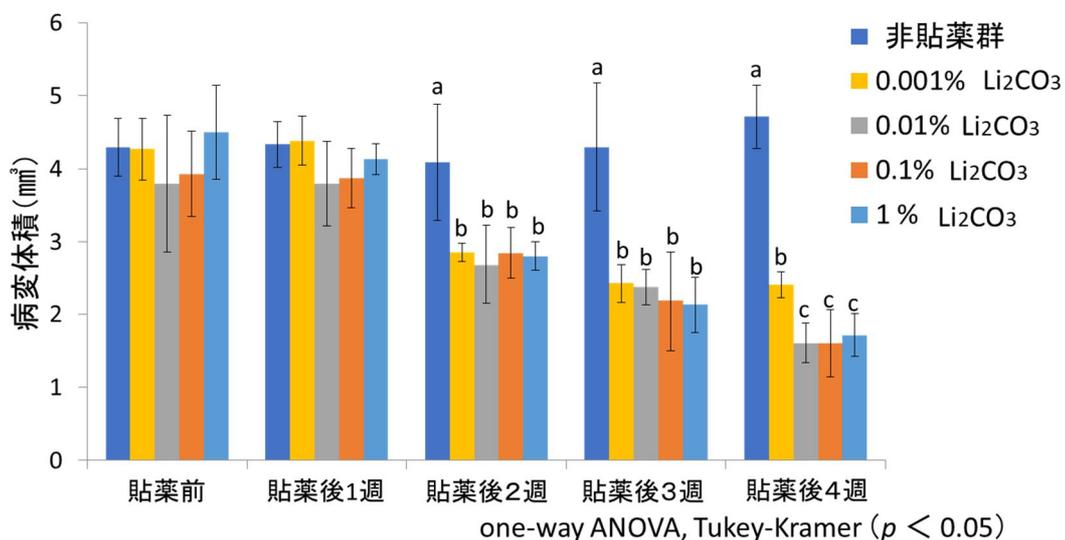


図 1 炭酸リチウム根管貼薬の有効濃度の検索結果

(2) 炭酸リチウム根管貼薬の安全性についての検証

血中リチウムイオン濃度を経時的に計測した結果,炭酸リチウムの腹腔内投与群では,投与後1時間で血中リチウムイオン濃度の一過性の上昇を認めたが,その後は徐々に濃度が低下し,72時間まで低下し続けた(図2)。一方,根管貼薬群では,貼薬後1時間から72時間まで,血中リチウムイオン濃度は検出試薬の検出限界濃度以下であった(図2)。

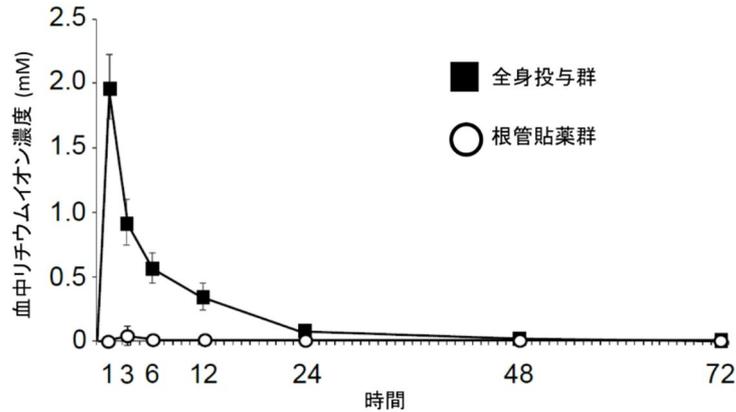


図2 炭酸リチウム根管貼薬の安全性についての検証結果

(3) 炭酸リチウム根管貼薬による根尖病変治癒メカニズムの組織学的検索

根管貼薬後24時間の試料において,Wnt-cateninシグナルのターゲット遺伝子であるAxin2陽性細胞が,炭酸リチウム群ではブランク群と比較して根尖病変内に多く認められた(図3)。本結果から,炭酸リチウムの根管貼薬は,Wnt/cateninシグナル伝達経路を活性化し,免疫応答や骨代謝に関わる因子に影響を与え,治癒を促していることが示唆された。

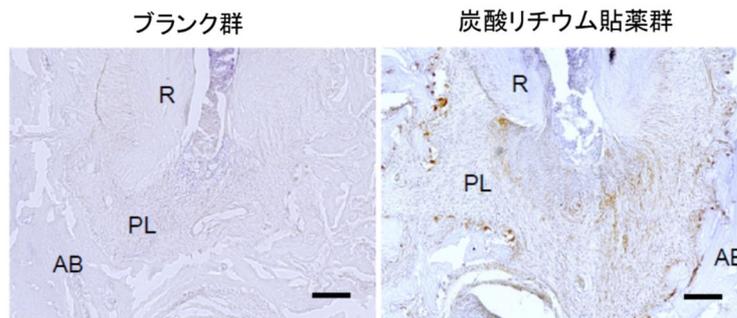


図3 根管貼薬後24時間におけるAxin2に対する免疫組織化学染色像

A:歯槽骨,PL:根尖病変,R:下顎第一臼歯近心根

また,根管貼薬後1,2,3週の試料において,M1マクロファージのマーカ分子であるCD86陽性細胞が,ブランク群では根尖病変内に多く認められたが,炭酸リチウム群ではほとんど認められなかった(図4)。根管貼薬後4週の試料においては,いずれの群でも病変内にCD86陽性細胞は認められなかった(図4)。

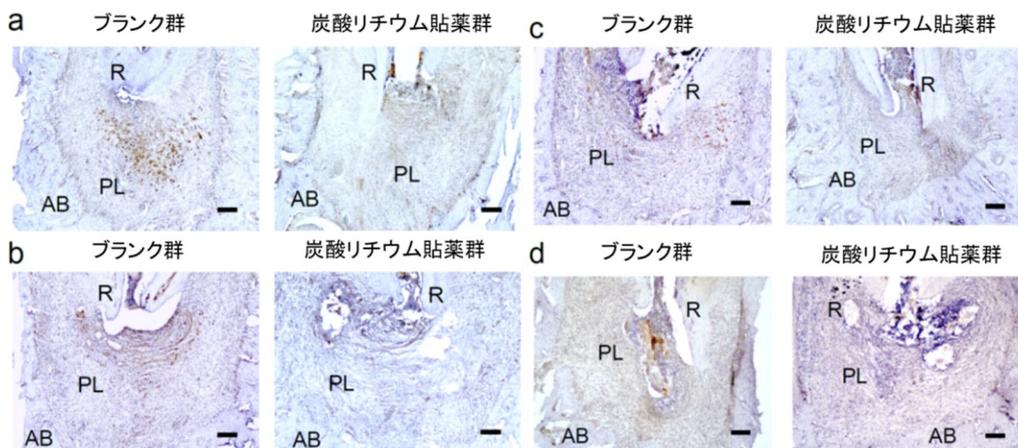
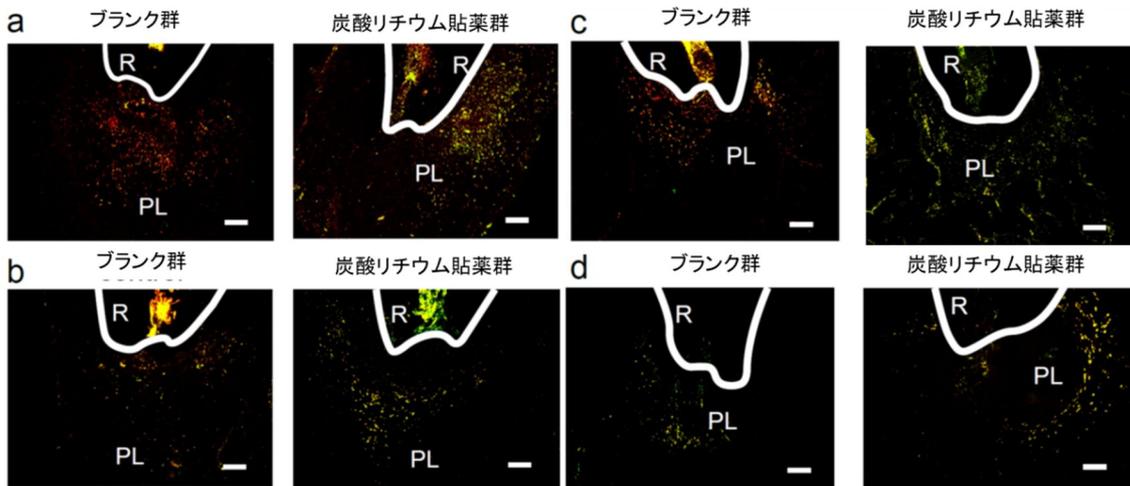


図4 根管貼薬後1週から4週におけるCD86に対する免疫組織化学染色像

A:歯槽骨,PL:根尖病変,R:下顎第一臼歯近心根

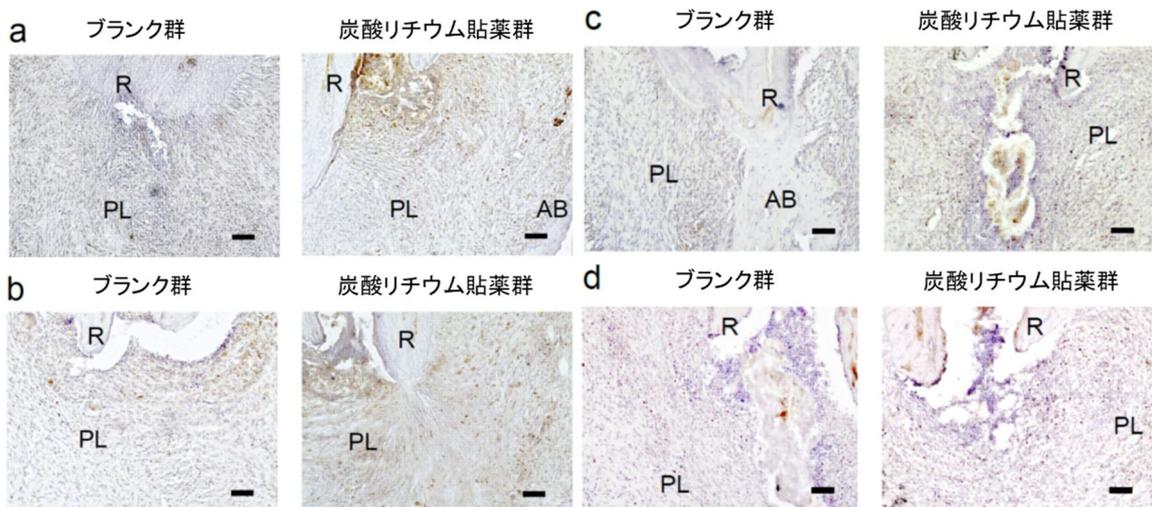
一方で、根管貼薬後 1 週から 4 週にかけて、CD68, CD206 がダブルポジティブである M2 マクロファージが、炭酸リチウム群ではブランク群と比較して、根尖病変内により多く認められた (図 5)。



**図5 根管貼薬後1週から4週における CD68 (赤色), CD206 (緑色) に対する免疫組織化学染色像**

PL:根尖病変, R:下顎第一臼歯近心根

また、根管貼薬後 1, 2, 3 週の試料において、制御性 T 細胞のマスター転写因子でありマーカー分子である Foxp3 陽性細胞が、炭酸リチウム群では根尖病変内に認められたが、ブランク群ではほとんど認められなかった。根管貼薬後 4 週の試料においては、いずれの群でも病変内に Foxp3 陽性細胞が認められるようになった (図 6)。



**図6 根管貼薬後1週から4週における Foxp3 に対する免疫組織化学染色像**

A:歯槽骨, PL:根尖病変, R:下顎第一臼歯近心根

以上のことから、炭酸リチウムの根管貼薬による根尖病変治癒促進のメカニズムは、まず、Wnt/  $\beta$ -catenin シグナル伝達経路が活性化することがきっかけとなる。これに引き続き、M1 マクロファージの分化抑制、M2 マクロファージの分化促進、制御性 T 細胞の分化誘導が起こり、免疫系の制御が行われる。これらの機序が働くことで、根尖病変内の炎症状態が早期に収束し、抗炎症状態へ移行、治癒に適した環境が整えられたと考えられる。そして、骨芽細胞の分化が誘導されることにより、硬組織の形成が引き起こされ根尖病変体積の縮小が促進されたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Itoh Yuki, Itoh Shousaku, Naruse Haruna, Kagioka Takumi, Hue Mai Thi, Abe Makoto, Hayashi Mikako  | 4. 巻<br>122                   |
| 2. 論文標題<br>Intracellular density is a novel indicator of differentiation stages of murine osteoblast lineage cells  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cellular Biochemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>1805 ~ 1816     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/jcb.30135   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>YAGI Kyoko, UEMURA Reo, YAMAMOTO Hiroko, ISHIMOTO Takuya, NAITO Katsuaki, ITOH Shousaku, MATSUDA Yasuhiro, OKUYAMA Katsushi, NAKANO Takayoshi, HAYASHI Mikako           | 4. 巻<br>40                    |
| 2. 論文標題<br>In-air micro-proton-induced X-ray/gamma-ray emission analysis of the acid resistance of root dentin after applying fluoride-containing materials incorporating calcium | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Dental Materials Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>1142 ~ 1150     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4012/dmj.2020-273  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Naruse Haruna, Itoh Shousaku, Itoh Yuki, Kagioka Takumi, Abe Makoto, Hayashi Mikako   | 4. 巻<br>11                    |
| 2. 論文標題<br>The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway has a healing ability for periapical periodontitis   | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>19673           |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-021-99231-x  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Saeki Naoya, Inui-Yamamoto Chizuko, Kuraki Moe, Itoh Shousaku, Inubushi Toshihiro, Okamoto Motoki, Akiyama Shigehisa, Wakisaka Satoshi, Abe Makoto                      | 4. 巻<br>128                   |
| 2. 論文標題<br>Senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice exhibit reduced entoconid in the lower second molar  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Archives of Oral Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>105172 ~ 105172 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.archoralbio.2021.105172   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takeuchi Y, Tatsuta S, Kito A, Fujikawa J, Itoh S, Itoh Y, Akiyama S, Yamashiro T, Wakisaka S, Abe M              | 4. 巻<br>282(2)        |
| 2. 論文標題<br>Kruppel-like factor 4 upregulates matrix metalloproteinase 13 expression in chondrocytes via mRNA stabilization. | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Cell and Tissue Research  | 6. 最初と最後の頁<br>307-319 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s00441-020-03228-3.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鍵岡琢実、伊藤祥作、成瀬陽菜、伊藤勇紀、林美加子      |
| 2. 発表標題<br>炭酸リチウム根管貼薬による根尖病変治癒促進メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名<br>日本歯科保存学会                      |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kagioka T, Itoh S, Naruse H, Itoh Y, Hayashi M.                    |
| 2. 発表標題<br>Effect of Lithium Carbonate on the Healing of Apical Periodontitis |
| 3. 学会等名<br>第68回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会                                      |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                   | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 阿部 真土<br><br>(Abe Makoto)<br><br>(40448105) | 大阪大学・大学院歯学研究科・講師<br><br><br><br>(14401) |    |

6. 研究組織（つづき）

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                      | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 成瀬 陽菜<br><br>(Haruna Naruse)<br><br>(60823515) | 大阪大学・歯学部附属病院・医員<br><br><br><br><br>(14401) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |