

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09970

研究課題名（和文）炎症性腸疾患併発下で難治化する根尖性歯周炎の分子病態解析と新規治療標的の検索

研究課題名（英文）Molecular characterization and identification of novel therapeutic targets for the therapy-resistant apical periodontitis associated with inflammatory bowel disease.

研究代表者

八幡 祥生 (Yahata, Yoshio)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：30549944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年口腔と全身の関係について多くの因果関係が明らかにされており、特に炎症性腸疾患は腸のみならず全身の免疫機構の低下を招き、歯科領域においても根尖性歯周炎など口腔内炎症性疾患のハイリスクになる。そこで本研究は炎症性腸疾患モデルマウスに根尖性歯周炎を併発させ、炎症動態の解析を行った。本研究結果より、炎症性腸疾患の合併症として引き起こされる顎骨破壊の増悪化がTh17細胞を中心とする獲得免疫の活性化で引き起こされていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、対応が口腔内局所の炎症制御に終止している、口腔内炎症性疾患に対して、全身との関連による炎症の増悪化を解明した本研究は意義深く、今後の治療戦略として、腸疾患、口腔疾患がそれぞれ独立して介入するのではなく、学際的なアプローチの重要性を説く研究の一端となる。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease, in particular, causes a decrease in the immune system not only in the intestine but also in the whole body, and this puts patients at high risk for oral inflammation diseases such as apical periodontitis in the field of dentistry. In this study, we analyzed the inflammatory dynamics of inflammatory bowel disease in a mouse model of inflammatory bowel disease that also suffered from apical periodontitis. The results of this study revealed that the exacerbation of jaw bone destruction caused as a complication of inflammatory bowel disease is caused by the activation of acquired immunity, mainly by Th17 cells.

研究分野：歯内療法学

キーワード：炎症性腸疾患 根尖性歯周炎 治療抵抗性顎骨破壊 口腔内炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

近年口腔と全身の関係について多くの因果関係が明らかにされており、口腔内で持続的に産生される炎症性サイトカインや炎症細胞が全身を循環することで、循環器疾患、自己免疫疾患、内分泌疾患などの全身疾患の増悪化や遷延化に影響を与えることが指摘されている。炎症性腸疾患 (IBD) は腸管に炎症が発生し腹痛、下痢、体重減少などを主症状とする原因不明の消化器疾患である。近年の研究で口腔内細菌感染により活性化された Th17 細胞が腸へ移動して粘膜炎を引き起こすことが明らかにされるなど、口腔との相互関係が注目されている。IBD 患者の 6~47% では、アフタ性口内炎、虹彩炎、ぶどう膜炎、壊疽性膿皮症、強直性脊椎炎、関節炎など腸管以外の臓器に炎症性の合併症が発生することが知られている。歯科領域においても歯周病、根尖性歯周炎 (AP) の罹患率が高まることが明らかにされており、中でも IBD 患者が AP を発症すると顎骨破壊の範囲が増大し、標準治療に対して治療抵抗性を獲得することが報告されている。近年これらの腸管外合併症の管理についてコンセンサスガイドラインが提供されるなど、臨床的な関心が高まっているが、歯科領域の疾患との相互関係については不明な点が多い。つまり他臓器の疾患による口腔内疾患への影響と相互関係について理解することは、IBD による顎骨破壊増悪化機構の解明および潜在的な治療標的を特定する手がかりとなりうる。

IBD から口腔が受ける影響として、AP などの感染が存在しない場合でも顎骨内の炎症反応が誘導されることが示唆されている。AP による顎骨破壊は根管を経路とした口腔内細菌の感染に起因する宿主免疫の活性化によって誘導されることが知られており、健康人では顎骨内で自然免疫により産生された CXCL9,10 によってマクロファージが根尖病変に動員され、破骨細胞が活性化することで顎骨破壊が進展する。この顎骨破壊に対する標準治療は起因となる根管内の細菌感染の除去であり、健康人においては多くのケースで治癒に至る。しかし IBD 患者ではインターロイキン (IL) -1, 2, 6, 8, 17, 23, 腫瘍壊死因子 (TNF)-alpha など様々な炎症性サイトカインとケモカインが血清中で上昇し、血管内皮の透過性が上昇することで腸以外の臓器においても免疫活性化の閾値が低下する。また骨髄内においては造血機能の調節不全により好中球の増加とリンパ球の減少が起こるなど、顎骨を含む全身の免疫応答が活性化することが知られている。IBD によって骨機能が影響をうける例として、骨破壊を伴う骨粗鬆症、関節炎などの骨系統疾患の合併症が知られている。現在これらの合併症は腸炎の寛解を目的とした抗 TNF-alpha 薬などの生物製剤を使用した抗炎症治療が奏功すると改善することが示されており、腸炎の影響により骨内で炎症が誘発されている可能性が示唆されている。これらの骨系統疾患と同様に、抗 TNF-alpha 生物製剤による治療を受けている IBD 患者において AP の標準治療により顎骨破壊が改善されたことが報告されている。これらの背景より、治療抵抗性 AP の顎骨破壊を治療する方法として既存の標準治療である根管感染源の除去に加え、IBD により顎骨内で活性化される炎症反応を抑制する抗炎症薬あるいはサイトカインに対する分子標的薬などを併用し、宿主の顎骨内の免疫応答を抑制するアプローチが有効と考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究は IBD マウスモデルに AP を誘発した IBD+AP モデルを作製し、これを用いて顎骨破壊増悪化を誘導する病因・病態を明らかにし、顎骨破壊を抑制する新規治療戦略を確立するための情報基盤構築を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

すべての動物実験は、「東北大学における動物実験および関連活動の規則」に準拠し、国立大学法人東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会によって承認され実施された (承認番号: 2019 歯動-062) (承認番号: 2020 歯動-032)。まず、IBD+AP モデルマウスを確立するため、8 週齢のオスのマウスに 2% の Dextran sulfate sodium (DSS) (MP Bio-medicals, OH, USA) 水溶液を飲水させることで IBD を導入し、下顎両側第一臼歯を露髄、感染させることで AP を導入した。次に、AP による顎骨破壊領域の定量解析を行うため、 μ CT 撮像を行い、得られた三次元画像を元に TRI / 3D-BON software (Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) を使用して根尖部エックス線透過領域の体積を計測した。

次に、IBD+AP による顎骨破壊の増悪化機構を解明するため根尖部顎骨破壊領域を含む顎骨を試料に、RNA-seq 解析および、フローサイトメトリー解析を行った。

4. 研究成果

顎骨のマикро CT 解析で得られたエックス線画像は IBD+AP 群ではすべての個体において AP 群よりも根尖部透過領域が拡大したことを示した。エックス線画像を元に作製した三次元構築像では AP 群および IBD+AP 群に根尖周囲を取り囲む透過像を認め、根尖病変による顎骨破壊が誘

導されたことを示し、骨定量解析の結果は IBD+AP 群の顎骨破壊の範囲は AP 群と比較して有意に増大したことを示した (図 1)。

RNA-seq 解析の結果から、AP 群、IBD 群および IBD+AP 群をそれぞれ NT 群と比較して発現量の増加した遺伝子群を抽出し、エンリッチメント解析を実施したところ、IBD+AP > IBD > AP の順番で総遺伝子発現上昇数 (Total up regulated genes) および炎症反応に分類される遺伝子群 (inflammatory Response) が上昇した。そこで IBD+AP 群と AP 群で発現量の差異が認められた遺伝子群を調べると、IBD+AP 群は AP 群と比較して、炎症関連遺伝子の中でも defense

response to bacterium に分類される immunoglobulin 関連遺伝子が高発現した。また好中球の脱顆粒に関わる CathepsinG, CXCR1, MMP8、炎症反応に関わる Nos2, CXCL9, CXCL11, IL6, CXCL10, CCL5、炎症防御反応に関わる IL22ra2 が高発現した。また、顎骨より細胞を単離して実施したフローサイトメトリーにおいては、T cell receptor-beta (TCR) 陽性かつ CD4 陽性の細胞を分離し、その後 Foxp3 陰性、ROR γ t 陽性の Th17 細胞を解析した。顎骨内における Foxp3 陰性、ROR γ t 陽性 Th17 細胞の動態を dot plot で解析すると、IBD+AP 群は他の群と比べて明らかに割合が増加しており、CD4 陽性 T 細胞における割合も IBD+AP 群は AP 群と比較して増加することを明らかにした。

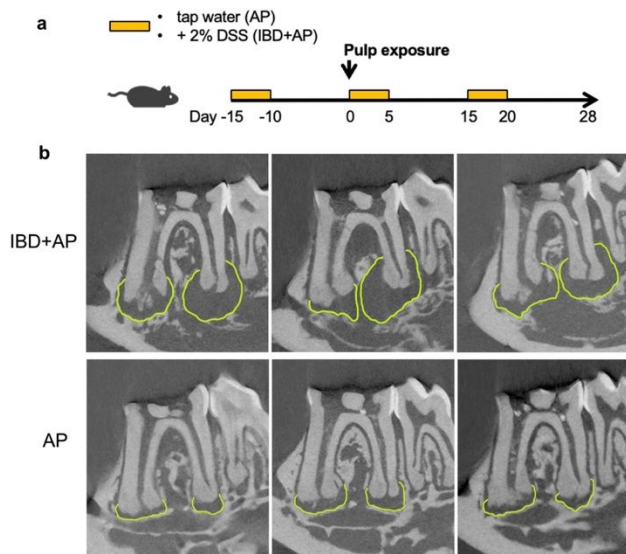


図 1 . IBD+AP モデルは根尖部顎骨破壊領域が拡大する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagahashi Taiji, Yahata Yoshio, Handa Keisuke, Nakano Masato, Suzuki Shigeto, Kakiuchi Yusuke, Tanaka Toshinori, Kanehira Masafumi, Suresh Venkataiah Venkata, Saito Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Er:YAG laser-induced cavitation can activate irrigation for the removal of intraradicular biofilm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08963-x	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Venkataiah Venkata Suresh, Yahata Yoshio, Kitagawa Akira, Inagaki Masahiko, Kakiuchi Yusuke, Nakano Masato, Suzuki Shigeto, Handa Keisuke, Saito Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical Applications of Cell-Scaffold Constructs for Bone Regeneration Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2687 ~ 2687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10102687	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Hasegawa Tatsuya, Venkata Suresh V., Yahata Yoshio, Nakano Masato, Suzuki Shigeto, Suzuki Shigeki, Yamada Satoru, Kitaura Hideki, Mizoguchi Itaru, Noiri Yuichiro, Handa Keisuke, Saito Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of the CXCL9-CXCR3 axis suppresses the progression of experimental apical periodontitis by blocking macrophage migration and activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82167-7	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 長谷川 達也、中野 将人、鈴木 重人、半田 慶介、八幡 祥生、佐藤 暢也、齋藤 正寛	4. 巻 41
2. 論文標題 根尖性歯周炎の免疫学と治療抵抗性に対する新規歯内療法開発への課題	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 8 ~ 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20817/jeajournal.41.1_8	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yahata Yoshio
2. 発表標題 Development of novel treatment device for oral inflammatory diseases through the elucidation of their therapy-resistant mechanism
3. 学会等名 The 16th International workshop on biomaterials in interface science (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Soyama Hitoshi, Yahata Yoshio, Saito Masahiro
2. 発表標題 Aspect of bubbles in narrow tube imitating root canal induced by Er:YAG laser
3. 学会等名 11th International symposium on cavitation (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡祥生
2. 発表標題 自己血製剤を用いた歯根端切除術の多施設共同臨床研究
3. 学会等名 第19回日本再生歯科医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長橋泰次、半田慶介、兼平正史、八幡祥生、田中利典、齋藤正寛
2. 発表標題 in vivo 感染根管モデルを用いたEr:YAGレーザーの洗浄効果
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会 春季学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡祥生
2. 発表標題 自己血製剤を併用した歯根端切除術の多施設臨床共同研究
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会春季学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 液体薬剤輸送装置、液体薬剤輸送システム、液体薬剤輸送方法、及び液体薬剤	発明者 八幡祥生、齋藤正 寛、祖山均	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-49927	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 正寛 (Saito Masahiro) (40215562)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	山田 聡 (Yamada Satoshi) (40359849)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	半田 慶介 (Handa Keisuke) (40433429)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授 (32703)	
研究分担者	野杣 由一郎 (Noiri Yuichiro) (50218286)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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
---------	---------