

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18581

研究課題名（和文）低出力超音波の歯周治療への有効性

研究課題名（英文）Effect of low-intensity pulsed ultrasound for periodontal treatment

研究代表者

間中 総一郎 (MANAKA, Soichiro)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：00754954

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：LIPUSは骨組織中の複数の細胞外マトリックスタンパクの遺伝子とタンパク発現を有意に増加させる。また、LIPUSがATP関連のP2X7受容体を介し、骨形成に影響を与える可能性を示唆した。そして、歯周病に罹患した歯槽骨を想定し、骨芽細胞に歯周病原細菌由来のLPSを添加したLIPUSの影響は、炎症性サイトカインであるIL-1・IL-6・RANKLの遺伝子とタンパク発現を抑制した。また、LIPUSが骨芽細胞のAT1-PLCを介し、LPS誘導性の核内移行を減少させ、サイトカインを抑制する可能性を示唆した。従って、LIPUSが歯周病罹患局所における炎症を鎮静化し、骨吸収を抑制する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病を想定し、骨芽細胞に誘導したLPSおよびLIPUSにおける炎症性サイトカインの影響を検討した論文や研究発表は国内外に問わず見当たらない。そのため、世界レベルで増加傾向にある歯周病の炎症を軽減させるのに、保険適応が認められているLIPUSの影響を検討する本研究は、歯科および内科の両領域においてのLIPUS使用についてEBMの確立の一端を担うと考えられる。さらに、骨折・炎症性骨疾患により惹起された骨吸収およびインプラント治療後の骨結合（オッセオインテグレーション: osseointegration）の確保など、他分野におけるLIPUSの使用の可能性拡大が期待され、大きな意義があると言える。

研究成果の概要（英文）：LIPUS significantly increases gene and protein expression of multiple extracellular matrix proteins in bone tissue. We also suggested that LIPUS might affect osteogenesis through ATP-related P2X7 receptors. Assuming periodontal disease-affected alveolar bone, the effects of LIPUS, in which LPS derived from periodontal pathogenic bacteria was added to osteoblasts, were suppressed the gene and protein of inflammatory cytokines IL-1, IL-6, and RANKL. We also suggested that LIPUS might reduce LPS-induced nuclear translocation and suppress cytokines through AT1-PLC in osteoblasts. Therefore, LIPUS may calm inflammation in the affected area of periodontal disease and suppress bone resorption.

研究分野：歯周病学

キーワード：低出力超音波: LIPUS 歯周病 LPS

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病の影響が報告された疾患群で、2型糖尿病、動脈硬化などの血管障害、慢性腎不全などは『メタボリックシンドローム』として総括できる。歯周病がこのメタボリックシンドロームの各コンポーネントを悪化させるメカニズムは炎症性サイトカインの産生異常が考えられる。また、糖尿病はインスリン作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする代謝性疾患で、先天性の1型糖尿病と過食・運動不足・加齢(老化)などが加わり発症する2型糖尿病に分類される。さらに、歯周病は口腔内細菌(LPS)が原因で発症する炎症性疾患で、糖尿病と歯周病は相互に関連する事が多く示されている。しかし、細胞・分子生物学的に明確な相関を示した報告は少なく、未だ完全な糖尿病と歯周病増悪のEBMの確立には至っていない。

AGEsは糖尿病の様な糖代謝異常状態の過剰な糖とタンパクのメイラード反応で生成される老化産物の一つである。その中でもグルコースとフルクトースの代謝産物であるグリセルアルデヒド由来の終末糖化産物であるToxic AGEs (TAGE)はRAGEを介して様々な生理活性を示し、糖尿病の診断に用いるHbA1cはAGEsの中間産物として知られ、糖尿病患者における血中AGEs量は非糖尿病患者に比べて高い。近年、過剰な糖だけではなく、加齢によってAGEsが増加する事も報告されている。さらに、AGEsは糖尿病合併症の発症・進行を促進する事も示されている。この二つの報告より歯周病のリスクファクターである糖尿病との因果関係にAGEsが関与しているのではないかと考える。

低出力超音波(LIPUS)は超音波出力が100mW/cm<sup>2</sup>未満のものを示し、非侵襲的に骨の治癒を促進させる事が知られている。LIPUSを使用した骨折治療は保険適応治療で臨床応用され、最近では3Dプリンターで使ったギブスにLIPUSを取り込み、毎日20-30分間のLIPUS刺激を行う事で骨折の治癒を促進する製品も開発されている。LIPUSの詳細な作用機序は不明な点が多いが、音響放射力および音響直進力の様な直接的かつ間接的効果による機械的刺激が主に作用すると考えられている。そして、*in vitro*において、LIPUS刺激が骨芽細胞によるアデノシン三リン酸(ATP)の細胞外産生を誘発し、ATPの受容体であるチャンネル型受容体であるP2X7受容体を活性化する事で骨形成を促進する事を報告した。また、歯周病を仮定した、つまり骨芽細胞にLPSを暴露した状態ではLIPUSは骨芽細胞のLPS誘導の炎症性サイトカインを抑制させる事を報告した。以上の学術的背景より、本研究はAGEsで増悪した歯周病に対する、LIPUSの骨芽細胞への抗炎症および骨形成に及ぼす影響の詳細な作用機序を明らかにする事で、LIPUSが加齢とともに罹患率の高くなる糖尿病と歯周病におけるLIPUSの骨への影響、高齢者の骨の再生治療でのLIPUSの歯科医療機器としての有用性を示すものであると考えられる。

## 2. 研究の目的

メカニカルストレスとしてのLIPUS刺激がLPSおよびAGEs存在下での骨芽細胞への影響およびその際の詳細な作用機序を明らかにする為に、本研究では*in vitro*において、LPSおよびAGEs存在下での骨芽細胞の炎症性サイトカインの働きと、その際のLIPUSが及ぼす影響を細胞生物学的かつ分子生物学的に解明する事を目的として、本研究を企図した。

そして、LIPUSは医科および歯科領域で広く臨床応用され、使用方法も周知された既存の医療機器である。加えて、上記で示した様に骨芽細胞への継続的なLIPUS刺激はAT1-PLC経路を経由したNK- $\kappa$ Bの核内移行の抑制を介して、LPS刺激による炎症性サイトカインを抑える為、その際のAGEsとの関わりを検討する事で歯周病および糖尿病の相互関係におけるLIPUSの影響と、LIPUSの歯科への臨床応用、具体的には加齢や糖尿病患者に対して罹患率が增大する歯周病および骨の再生への可能性を学術的に解明するものである。

これは従来研究とは異なり、加齢および糖尿病の原因因子の一つと考えられるAGEsに着目し、AGEsおよび骨芽細胞の関係を明らかにするだけでなく、AGEsに対するLIPUSの歯科医療機器としての可能性を調べる本研究は学術的独自性および新規性を有した研究計画であると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) LPSおよびAGEsが骨芽細胞の炎症性サイトカインに及ぼす影響

骨芽細胞であるMC3T3-E1細胞を6well plate内に $1 \times 10^4$  cellsで播種し、24時間静置後、歯周病原細菌由来のLPSおよびAGEsを加え、3、7および14日間培養する。培養後、サンプルとして細胞および培養上清をそれぞれ回収する。そして、そのサンプル中の炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、6、RANKLおよびTNF- $\alpha$ )をreal-time PCR法およびELISA法で遺伝子およびタンパク発現を定量し、LPSおよびAGEs存在下で影響した骨芽細胞の炎症性サイトカインの分子制御機構を分子生物学的かつ細胞生物学的手法で検討する。さらに、シグナル伝達に関わるNF- $\kappa$ Bを免疫蛍光染色またはwestern blotting法によるリン酸化で、それらを制御するpathwayも解明する。

### 【培養条件】

#### 1. 無刺激群(control群)

2. LPS 群 (LPS 単独群) - 歯周病
3. AGEs 群 (AGEs 単独群) - 糖尿病
4. LPS + AGEs 群 (LPS + AGEs 併用群) - 歯周病/糖尿病

(2) LIPUS 刺激が LPS および AGEs 存在下による骨芽細胞の炎症性サイトカインに及ぼす影響 (1) に加えて、1 日 30 分間の LIPUS 刺激 (発振周波数 3.0MHz・超音波出力 30mW/cm<sup>2</sup>) を継続的に毎日与え、3、7 および 14 日間培養する。LIPUS 刺激後、サンプルとして細胞および培養上清をそれぞれ回収する。そして、そのサンプル中の炎症性サイトカイン (IL-1、6、RANKL および TNF- $\alpha$ ) を real-time PCR 法および ELISA 法で遺伝子およびタンパク発現を定量し、LPS および AGEs 存在下で影響した骨芽細胞の炎症性サイトカインの分子制御機構を分子生物学的かつ細胞生物学的手法で検討する。さらに、シグナル伝達に関わる NF- $\kappa$ B を免疫蛍光染色または western blotting 法によるリン酸化で、それらを制御する pathway も解明する。

【培養条件】

1. LIPUS 刺激群 -LIPUS 刺激群
2. LPS + LIPUS 刺激群 -歯周病 + LIPUS 刺激群
3. AGEs 群 + LIPUS 刺激群 -糖尿病 + LIPUS 刺激群
4. LPS + AGEs + LIPUS 刺激群 -歯周病/糖尿病 + LIPUS 刺激群

(3) LIPUS 刺激が炎症性サイトカインに及ぼすシグナル伝達因子の検討

シグナル伝達に関わる関連因子である PLC- $\gamma$  および wnt/PCP-catenin など免疫蛍光染色または western blotting 法によるリン酸化で、それらを制御する pathway も解明する。また、それらの阻害剤を用いて、シグナル伝達因子の詳細な作用機序も検討する。

#### 4. 研究成果

LIPUS 刺激は骨組織中の Col-1、BSP、OPN および OCN などの複数の細胞外マトリックスタンパク (ECMP) の遺伝子およびタンパク発現を有意に認めた。また、ATP 関連受容体である P2X7 受容体のアンタゴニストおよびノックダウン細胞を用いた実験レベルでも、同様の有意な結果を認めた。以上より、低出力超音波による骨組織への刺激は歯周治療に有効性が認められる事を示唆した。

そして、歯周病の罹患した歯槽骨を想定し、MC3T3-E1 細胞に歯周病原細菌由来の LPS を添加した実験レベルでは、炎症性サイトカインである IL-1、IL-6 および破骨細胞分化促進因子である RANKL の発現に及ぼす LIPUS の影響を調べた。その結果、LIPUS 刺激は LPS 添加によって有意に増加したこれらの遺伝子およびタンパク発現を無刺激群の発現レベルまで抑制した。さらに、LIPUS 刺激がこれらの炎症性サイトカインを抑制する分子メカニズムを検索し、LIPUS は骨芽細胞の AT1-PLC を介して、LPS 誘導性の NF- $\kappa$ B の核内移行を減少させる事で、IL-1 産生を抑制する可能性を示唆した。これらの知見から、LIPUS が歯周病罹患局所における炎症を鎮静化し、歯槽骨吸収を抑制する可能性を示唆した。

以上より、低出力超音波は骨折治療だけではなく、歯科領域においても歯周病で喪失した歯槽骨の再生および歯周病による歯槽骨の炎症を緩和させる事に有用である可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Soichiro Manaka, Natsuko Tanabe, Keiko Tomita, Yoshitomo Moriya, Eiji Goke, Naoto Suzuki, Shuichi Sato
2. 発表標題 LIPUS stimulation promotes collagen synthesis via P2X7 receptor.
3. 学会等名 106th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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