

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：32404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23091

研究課題名（和文）Piezo1に着目した外傷性咬合を伴う歯周炎の歯槽骨吸収メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of alveolar bone resorption mechanism in periodontitis associated with traumatic occlusion focusing on Piezo1

研究代表者

竹谷 佳将 (TAKETANI, Yoshimasa)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：90875379

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：歯周炎の存在下で外傷性咬合が加わると、歯槽骨吸収が急速に進行することが知られているが、その分子メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では骨芽細胞に発現するカルシウムイオンチャネルPiezo1の働きに注目した。MC3T3-E1細胞をP.g由来LPS存在下で培養後、メカニカルストレスを負荷するとPiezo1 mRNA発現量の有意な変化はみられなかったが、RANKL/OPG比は両者の共存下で有意に上昇した。Piezo1の機能を阻害すると、このRANKL/OPG比の上昇は抑制された。以上より、Piezo1はLPSとメカニカルストレスによるRANKL/OPG比の上昇に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症とメカニカルストレスによって生じる歯槽骨吸収にカルシウムイオンチャネルPiezo1が関与している可能性が示唆される結果を得た。歯周病の進行には歯周病原細菌がもたらす炎症と外傷性咬合によるメカニカルストレスの両者の関与が明らかであるが、ブラッシングなどの炎症のコントロール方法はある程度確立されている一方で、咬合調整などの咬合のコントロールについてはエビデンスが不足しているのが現状である。今回得られた結果により、将来メカニカルストレスによる歯槽骨吸収が薬物療法によりコントロール可能になれば、歯周病罹患率の低下をもたらし、QOLの向上に寄与することができるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Excessive occlusal force with periodontitis results in rapid alveolar bone resorption. However, the molecular mechanism has yet not to be completely elucidated. This study focused on Piezo1, which is a mechanosensitive ion channel expressed on osteoblasts. To investigate the involvement of P.g-LPS and mechanical stress on Piezo1 expression and the RANKL/OPG ratio, MC3T3-E1 cells were cultured with P.g-LPS. Then, mechanical stress was applied to the MC3T3-E1 cells. In cells with P.g-LPS, there was no significant change in the Piezo1 mRNA expression level, whereas the RANKL/OPG ratio was significantly increased by additional application of mechanical stress. Subsequently, Piezo1 function was inhibited by the addition of the antagonist or by knockdown via Piezo1 siRNA transfection. After loading, the increase in the RANKL/OPG ratio was suppressed. These results suggest that Piezo1 is involved in the mechanical stress-induced increase of the RANKL/OPG ratio with P.g-LPS.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 メカニカルストレス 骨芽細胞 カルシウムイオンチャネル

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) に代表される歯周病原細菌により引き起こされる炎症であり、歯周組織破壊が生じる疾患である。臨床的観察から歯周炎において、歯と歯周組織にメカニカルストレスである外傷性咬合が加わると、歯槽骨吸収の進行がみられる。歯槽骨吸収によって生じる歯の動揺や喪失は、咀嚼能率や審美性を低下させ、QOL や ADL の低下を招く。本研究では、炎症とメカニカルストレスとが共存した場合に引き起こされる歯槽骨吸収のメカニズムを解明することで、歯周炎の新たな治療法確立への足掛かりとし、ひいては患者の QOL や ADL の向上ならびに健康増進の一助となることを目的とする。炎症やメカニカルストレスと歯槽骨吸収との関連については、これまでラットやビーグル犬を用いた動物実験により報告されてきた。歯周炎を伴う外傷性咬合は、歯槽骨吸収を進行させることが示されており (Glickman et al. J Periodontal 1965)、さらに組織学的評価では、歯周炎存在下に外傷性咬合を負荷すると根分岐部において RANKL 陽性細胞数が有意に上昇したとの報告がある (Yoshinaga et al. J Periodont Res 2007)。一方で、外傷性咬合のみでは歯槽骨の吸収が生じないことが報告されている (Ericsson et al. J Clin Periodontol 1977, 1982)。これらの結果は、炎症とメカニカルストレスが共存した場合に、歯槽骨吸収が進行することを示唆するが、その分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

現在、臨床的知見や動物実験から外傷性咬合は歯周炎における歯槽骨吸収を促進する原因の一つであると考えられているが、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究ではその分子メカニズム解明を目的として Piezo1 に着目した。Piezo1 はメカニカルストレスにより開孔し、カルシウムイオン透過性を有するチャネルであり、骨においては骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞および軟骨細胞に発現している。マウス骨芽細胞において Piezo1 を欠失させると骨量の減少が生じたことから、Piezo1 はメカニカルストレスによる骨量維持に寄与しているものと考えられている (Li et al. eLife 2019)。

一方で、Piezo1 と炎症との関連も報告されている。マウス由来のアストロサイトにおいて *Escherichia coli* 由来 LPS により、Piezo1 の発現が上昇し、さらに Piezo1 選択的アゴニスト Yoda1 を作用させると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が促進されたことが示されている (Velasco-Estevez M et al. Glia 2020)。すなわち、LPS による炎症存在下では Piezo1 の作用が増強されることが推察されている。

本研究では、骨芽細胞に発現する Piezo1 に着目し研究を行うことで、歯周炎存在下での外傷性咬合によって進行する歯槽骨吸収の分子メカニズムを解明し、歯周炎の新たな治療法確立の足掛かりとする。

3. 研究の方法

上記の背景とこれまでの研究成果をもとに、次のような作業仮説を立案した。

1. *P.g* 由来 LPS により骨芽細胞の Piezo1 の発現上昇または活性化が生じる。
2. 発現上昇または活性化した Piezo1 に対してメカニカルストレスが負荷されることにより Piezo1 が開孔し、細胞内カルシウム濃度上昇が生じる。
3. 細胞内カルシウム濃度上昇により、RANKL の発現が亢進する。
4. RANKL/OPG 比の上昇により、破骨細胞分化が促進され、歯槽骨吸収が生じる。

これまでに歯周炎存在下での外傷性咬合によって生じる歯槽骨吸収における Piezo1 の役割についての報告はなく、本研究は Piezo1 を指標とした新たな歯周炎治療法確立の基盤研究として意義があるものと考えた。

上記の作業仮説に基づいて、下記のとおり研究計画を立案し、遂行した。

- ① 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を 12 well plate に播種し、*P.g* 由来 LPS 存在下で骨芽細胞分化培地にて 3 日間培養後、小型卓上振とう機による旋回振とう応力をメカニカルストレスとして負荷した。負荷条件は回転数 200rpm、負荷時間を 1 サイクルあたり 20 分間とし、サイクル間の静置時間を 10 分として 3~5 サイクル実施した。メカニカルストレス負荷後の細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により Piezo1, RANKL, OPG の mRNA 発現量を測定した。*P.g* 由来 LPS ならびにメカニカルストレスによるそれぞれの mRNA 発現量ならびに RANKL/OPG 比に対する影響について検討した。
- ② ①における RANKL/OPG 比の変化に対する Piezo1 の関与を検討するため、Piezo1 アンタゴニストである GsMTx4 を添加する実験を行った。同様の条件で MC3T3-E1 細胞を培養し、3 日目に 12 時間のスターベーションを実施した上で培地に GsMTx4 を添加した。その後、上記の条件でメカニカルストレスを負荷し、負荷後の細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR

- により RANKL、OPG の mRNA 発現量を測定、RANKL/OPG 比を算出した。
- ③ さらに①における RANKL/OPG 比の変化に対する Piezo1 の関与を詳細に検討するため、RNA 干渉として short interfering RNA (siRNA) を用いて Piezo1 のノックダウンを実施した。MC3T3-E1 細胞を 12 well plate に播種し、プロトコルに従い、siRNA をトランスフェクションした。72 時間後に 12 時間のスターベーションを実施した上で、上記の条件でメカニカルストレスを負荷した。負荷後の細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により RANKL、OPG の mRNA 発現量を測定、RANKL/OPG 比を算出した。

4. 研究成果

P.g 由来 LPS 存在下で培養した MC3T3-E1 細胞に対してメカニカルストレスを負荷した際の Piezo1 mRNA 発現量、RANKL/OPG 比を検討したところ、*P.g* 由来 LPS 添加、メカニカルストレス負荷に関わらず、Piezo1 mRNA 発現量に有意な変化は生じなかった。RANKL mRNA 発現量は、*P.g* 由来 LPS 添加、メカニカルストレス負荷により有意に上昇した。OPG mRNA 発現量は減少傾向がみられるが、有意な変化は生じなかった。この結果を基に算出した RANKL/OPG 比は、*P.g* 由来 LPS 添加により有意に上昇し、さらにメカニカルストレスを負荷することで *P.g* 由来 LPS 添加のみと比較して有意に上昇した。

P.g 由来 LPS とメカニカルストレスの共存下における RANKL/OPG 比の有意な上昇に対する Piezo1 の関与を検討するため、*P.g* 由来 LPS 存在下で培養した MC3T3-E1 細胞に Piezo1 アンタゴニストである GsMTx4 を添加した上で、メカニカルストレスを負荷した際の RANKL/OPG 比を検討した。GsMTx4 添加により *P.g* 由来 LPS とメカニカルストレスの共存下で上昇した RANKL mRNA 発現量は 71.1% の抑制率を示した。一方で OPG mRNA 発現量の有意な変化は生じなかった。この結果を基に算出した RANKL/OPG 比は、GsMTx4 添加により 76.4% の抑制率を示した。

Piezo1 アンタゴニスト添加実験に加えて、RANKL/OPG 比の上昇に対する Piezo1 の関与を検討するために Piezo1 siRNA を導入し、Piezo1 をノックダウンした細胞に対してメカニカルストレスを負荷した際の RANKL/OPG 比を検討した。Piezo1 mRNA 発現量は、Piezo1 siRNA 導入後 58.1% の抑制率を示した。その細胞にメカニカルストレスを負荷したところ、*P.g* 由来 LPS とメカニカルストレスの共存下で上昇した RANKL mRNA 発現量は 69.5% の抑制率を示した。一方で OPG mRNA 発現量の有意な変化は生じなかった。この結果を基に算出した RANKL/OPG 比は、Piezo1 siRNA 導入により 63.4% の抑制率を示した。Piezo1 をノックダウンさせた場合と比較して、Piezo1 アンタゴニストを添加した場合の方が RANKL/OPG 比の高い抑制率を示した。Piezo1 アンタゴニストとして使用した GsMTx4 は Piezo1 非特異性阻害剤のため、Piezo1 以外のカルシウムイオンチャネルを阻害している可能性がある。GsMTx4 は Piezo1 の他に、メカニカルストレスを感知して血管収縮に関与している transient receptor potential cation channel subfamily C member (TRPC) 1 や TRPC6 といったイオンチャネルに対してもアンタゴニストとして作用することが知られている。

本研究では、*P.g* 由来 LPS 存在下で骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞にメカニカルストレスを負荷すると、Piezo1 mRNA 発現量に有意な変化は生じなかったが、RANKL/OPG 比の有意な上昇を認めた。これは歯周炎単独で歯槽骨吸収が生じるだけでなく、歯周炎に外傷性咬合の両方が加わることで歯槽骨吸収がより亢進する臨床所見と一致する。さらに Piezo1 アンタゴニスト添加または Piezo1 siRNA 導入による Piezo1 ノックダウンを行った細胞にメカニカルストレスを負荷すると、*P.g* 由来 LPS とメカニカルストレスの共存下で上昇した RANKL/OPG 比が有意に抑制された。

これまでに、マウス的大腿骨の骨芽細胞および骨細胞にメカニカルストレスとして流体せん断応力を負荷したところ、骨量が増加した一方で、Piezo1 をノックダウンさせるとメカニカルストレスによる骨形成速度が低下することが明らかとなっている。また、Piezo1 は細胞骨格のリモデリングを調節することが報告されていることから、本研究の結果と併せて骨芽細胞や骨細胞に存在する Piezo1 が骨代謝において重要な役割を持つことが示唆された。さらに、OPG mRNA 発現量は Piezo1 アンタゴニスト添加、Piezo1 ノックダウン時ともに有意な変化は生じなかったものの、RANKL mRNA 発現量は Piezo1 アンタゴニスト添加、Piezo1 ノックダウン時ともに有意に抑制された。これまでに、Piezo1 アンタゴニストを添加したヒト歯根膜細胞に静的圧縮力を負荷すると RANKL mRNA 発現量は有意に抑制されたのに対して、OPG mRNA 発現量に有意な変化は生じなかったことが報告されており、今回生じた RANKL/OPG 比の変化においても、Piezo1 は主に RANKL 発現に関与することで、破骨細胞活性を制御しているものと考えられる。

本研究では MC3T3-E1 細胞における *P.g* 由来 LPS とメカニカルストレスによる RANKL/OPG 比の上昇に Piezo1 が関与していることが示唆された。しかしながら、本研究では mRNA 発現量のみを評価しており、*P.g* 由来 LPS によって Piezo1 の開孔機能の亢進やタンパク質の発現上昇が生じたことにより RANKL/OPG 比が上昇した可能性も否定できない。今後、Piezo1 が骨吸収に関与しているより詳細なメカニズムを解明するために、ウェスタンブロット法による Piezo1 タンパク質の解析や、蛍光プローブを用いた画像解析等による Piezo1 の開孔機能を検討していく必要があると考えられる。歯周炎と咬合性外傷による骨吸収メカニズムをより一層明らかにするために、TRPV4 等の他のイオンチャネルとの関連性を含め、in vivo における Piezo1 欠損マウスを用いた実験や、ヒトの生体内での歯周組織における Piezo1 の関与を検討する臨床的研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 竹谷佳将、中島明敏、竹ノ谷淳、脇田有貴、大竹和樹、長谷川陽子、鈴木允文、申基喆	4. 巻 50
2. 論文標題 遊離歯肉移植術後の口腔関連QOLと疼痛の評価	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 明海歯科医学	6. 最初と最後の頁 117-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 —

1. 著者名 竹谷佳将、鈴木允文、齋藤大嵩、山村加奈子、内沼真吹、吉川佳織、林丈一朗、申基喆	4. 巻 49
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis LPSで誘導される骨芽細胞のRANKL発現はtransient receptor potential vanilloid 4 ion channelを介するメカニカルストレスによって増幅する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 明海歯科医学	6. 最初と最後の頁 49-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 —

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹谷 佳将、鈴木 允文、竹ノ谷 淳、内沼 真吹、上田 隼也、石井 麻紀子、申 基喆
2. 発表標題 遊離歯肉移植術後の口腔関連QOLと疼痛の評価
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshimasa Taketani, Takafumi Suzuki, Jun Takenoya, Yusuke Yamane, Haruki Kodama, Hideharu Otsuka, Joichiro Hayashi, Kitetsu Shin
2. 発表標題 Evaluation of oral health-related quality of life following free gingival graft procedure
3. 学会等名 American Academy of Periodontology 108th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mabuki Uchinuma, Yoshimasa Taketani, Yuichiro Sugiyama, Junya Ueda, Makiko Ishii, Kitetsu Shin
2. 発表標題 Role of Piezo1 in mechanical stress-mediated bone resorption with periodontitis
3. 学会等名 American Academy of Periodontology 108th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内沼真吹、竹谷佳将、脇田有貴、上田隼也、石井麻紀子、林丈一郎、申基喆
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis由来LPS存在下でのメカニカルストレスを介した骨吸収におけるPiezo1の関与についての検討
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 夏堀壮一郎、大塚秀春、山根佑介、脇田有貴、小玉治樹、竹谷佳将、市村光、林丈一郎、申基喆
2. 発表標題 歯槽堤保存術における吸収性遮蔽膜を用いたOpen Membrane Techniqueに関する基礎的検討 第2報
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田隼也、辰巳順一、小玉治樹、竹谷佳将、大塚秀春、市村光、林丈一郎、申基喆
2. 発表標題 繰り返し荷重負荷がインプラント-アバットメント接合部封鎖性に与える影響
3. 学会等名 令和3年度埼玉県歯科医学大会
4. 発表年 2022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
---------	---------