

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10237

研究課題名（和文）歯周組織の再生と修復におけるマクロファージに対するアスピリンの効果

研究課題名（英文）Effect of aspirin on macrophages in periodontal tissue regeneration and repair

研究代表者

田口 千恵子（TAGUCHI, Chieko）

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：80434091

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）：本研究では、マクロファージ細胞株を用いて、マクロファージのM1/M2極性化に対するアスピリンの効果を観察し、鍵となるシグナル伝達分子を同定することである。

結果、アスピリンはLPSによって誘導されるマクロファージの活性化を抑制し、組織修復におけるマクロファージのM1/M2極性化に影響を与えることが明らかになった。アスピリンの至適濃度は200 µg/mlで、マクロファージのアポトーシスやM2マーカーの発現に影響を与えることなく、LPS誘発iNOSの発現を効果的に阻害した。アスピリン投与はまた、骨髄間葉系幹細胞の遊走、創傷治癒、骨形成に関する分化を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病に関する研究では、歯周組織再生が広く行われており、歯周組織再生能力がある程度改善されている。しかし、長期の慢性炎症に対する歯周組織の生理的構造と機能の回復には至っていない。そこで、低分子の非ステロイド性抗炎症化合物であり、広く供給され、薬理作用が明確で、安価で、低副作用、容易に投与できるアスピリンに着目した。結果、アスピリンが、歯槽骨欠損の修復を促進する局所適用の可能性を示したことから、重要な科学的証拠を提供するとともに、歯周組織の修復および再生を促進する薬剤の新たな臨床応用を提供した。

研究成果の概要（英文）：This study aims to observe the effects of aspirin on the M1/M2 polarization of macrophages using a macrophage cell line, and to identify the key signaling molecules. The research findings indicate that aspirin can inhibit the activation of macrophages induced by LPS and influence the M1/M2 polarization of macrophages in tissue repair. The optimal concentration of aspirin was 200 µg/ml, which effectively blocked the expression of LPS-induced iNOS without affecting the apoptosis or expression of M2 markers in macrophages. Aspirin treatment also enhanced the migration, wound healing, and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. This study verified the feasibility of local application of aspirin to promote alveolar bone defect repair, provided important scientific evidence, and offered new clinical applications for drugs that promote periodontal tissue repair and regeneration.

研究分野：予防歯科学

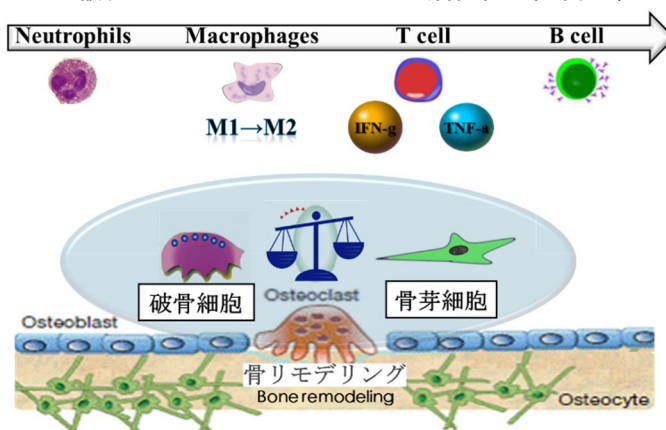
キーワード：アスピリン 歯周病 マクロファージ 欠損治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アスピリン(アセチルサリチル酸)は低分子の非ステロイド性抗炎症化合物であり、幅広い供給、明確な薬理効果、低価格、低副作用、容易に投与できるという利点がある。Xiaoyan Li (研究協力者)らの予備調査では、アスピリンの局所応用により炎症性因子の濃度減少を確認している。骨欠損修復の初期段階では、Th1 細胞による宿主免疫応答が優勢となり、MSC を介した骨の再生に重要な役割を果たしている。インターフェロン- γ (IFN- γ) と腫瘍壊死因子- α (TNF- α) は、宿主の免疫を負に調節する主要なサイトカインである。IFN- γ が局所組織にのみ存在する場合、高濃度の IFN- γ は、MSC の Smad 7 の高発現をアップレギュレートし、BMP 経路を阻害することにより骨の減形成をもたらす。同時に、IFN- γ は、MSC 細胞死受容体 Fas の発現を濃度依存的にアップレギュレートすることもできる。TNF- α と連動すると、NF- κ B を介した抗アポトーシス経路を阻害できる。高度に発現された Fas の内在化は、細胞死経路を開始し、カスパーゼ 8 の影響下で MSC のアポトーシスを促進する。抗炎症薬の局所適用は、局所エフェクター T 細胞の機能を効果的に阻害し、局所組織の免疫応答とエフェクターサイトカインの量を減少させ、MSC を介した組織の再生と修復を促進する。非ステロイド性抗炎症薬であるアスピリンは、理想的な局所抗免疫応答を有すると考えられる。

マクロファージは損傷修復の初期段階でも重要な役割を果たしており、活性化の様式により、M1 型と M2 型に分類される。M1 型マクロファージは、炎症誘発性サイトカインとケモカインを分泌し、抗原を提示し、免疫応答に参加し、免疫監視の機能を持っている。M2 型マクロファージは、抗原提示能力は弱い、宿主の免疫応答を抑制、創傷治癒および組織リモデリングの促進、組織内の代謝と内分泌シグナル伝達を改善する増殖因子および抗炎症性サイトカインの産生を担っている。in vitro 培養条件下では、M1 型のマクロファージは IFN- γ およびリポ多糖 (LPS) を介して誘導され、M2 型のマクロファージは Th2 タイプのサイトカイン (IL-4, IL-13 など) を介して誘導される。現在、マクロファージに対するアスピリンの研究は主に M1 型マクロファージに焦点が当てられ、アスピリンが LPS によって誘発されるマクロファージの活性化を阻害し、RANK の発現を低下させ、破骨細胞活性を阻害し、骨芽細胞を促進できることが報告されている。また、アスピリンの全身作用により、ミエロペルオキシダーゼの増加、内皮成長因子の分泌抑制、M1 型マクロファージの減少、雌マウスの皮膚創傷治癒能力に影響を与えることも示されている。しかし、アスピリンが損傷修復におけるマクロファージの M1 / M2 分極の影響については報告されていない。



本研究は、マクロファージ細胞株を使用し、マクロファージの M1 / M2 分極に対する主要なシグナル分子とメカニズムを特定し、アスピリンの効果を確認する。これは、歯周組織の微小生態学と免疫機構に基づいた歯周組織再生への合理的な介入であり、幹細胞を介した歯周組織修復・再生効果を目的とする。結果は、臨床的に重要となる科学的根拠を提供し、トランスレーショナル・リサーチ (橋渡し研究) となり、歯周組織再生研究の新しい方向性を開くことを可能と

する。

2 . 研究の目的

本研究は、マクロファージの M1 / M2 分極に対する *in vitro* でのアスピリンの効果を観察するためにマクロファージ細胞株を使用し、主要なシグナル分子とメカニズムを特定する。歯槽骨欠損修復を促進するためのアスピリンの局所適用の実現可能性を検証し、重要な科学的根拠を提供し、歯周組織の修復と再生を促進する薬物の局所適用の新しい臨床応用方法を提供する。

3 . 研究の方法

(1) マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 の培養

RAW264.7 細胞の培養と継代：80U / ml アンピシリンと 100U / ml ストレプトマイシンを加えた 10% ウシ胎児血清を含むハイグルコース DMEM 培地での RAW264.7 細胞培養 (37°C の恒温インキュベーターで静置) を行う。細胞の状態を観察し、24 時間から 48 時間ごとに培地を交換する。必要に応じて、1 : 2 または 1 : 3 の比率で培地を流して、良好な細胞増殖を維持する。

(2) マウスマクロファージ細胞株の M1 / M2 サブタイプの誘導

M1 / M2 サブタイプの刺激：介入の 12 時間前に、細胞を 12 ウェルプレートに 105 細胞/ml の密度でプレーティングし、完全培地で培養する。細胞が完全に付着し、成長状態が良好であることを確認後、異なる濃度の刺激因子を添加する。IFN- γ 濃度 ; 25 ng / ml, 2.5 ng / ml, 1 ng / ml. LPS 濃度 ; 400 ng / ml, 200 ng / ml, 100 ng / ml. 12 時間後、細胞を観察して収集し、リアルタイム PCR にて解析する。免疫組織化学染色法により、M1 / M2 サブタイプの比率を観察し、介入に最適な濃度を模索する。M1 サブタイプマクロファージマーカー ; 誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、CD86 / MR (CD206) と M2 サブタイプマクロファージマーカー ; タイプ I アルギナーゼを用いる。

(3) マクロファージ細胞株 M1 / M2 の分極に対するアスピリンの影響

アスピリン濃度は 3 種 (50、100、200、500 μ g / ml) とする。M1 / M2 サブタイプの比率を介入 (添加) 前後に観察する。実験に最適な刺激濃度を模索しメカニズム研究を実施する。

4 . 研究成果

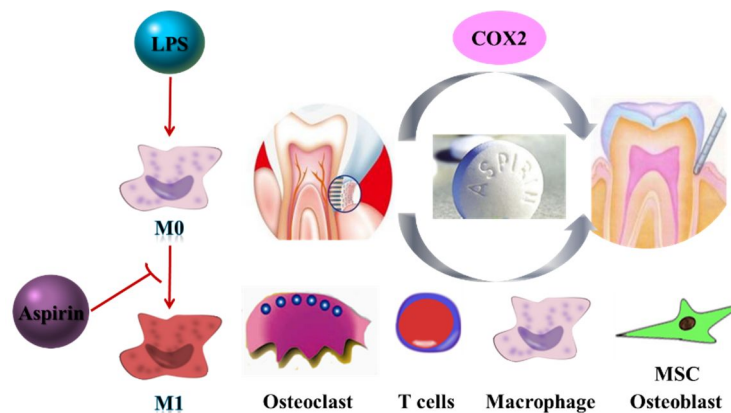
アスピリンの適切な濃度を決定するために、マクロファージ細胞をさまざまな用量のアスピリン (50、100、150、および 200 μ g / ml) で 12 時間前処理した。これらすべての用量のアスピリンは、LPS が誘導する iNOS の発現を有意に減少させた。iNOS のダウンレギュレーションは、200 μ g / ml アスピリンで最も顕著であり安定した結果となった。ウェスタンブロッティングでは、200 μ g / ml のアスピリンで前処理した後、LPS が誘導する iNOS の発現を効果的にブロックできることが確認された。免疫細胞染色において、LPS 誘導 iNOS 陽性マクロファージのパーセンテージが LPS 刺激後に有意に増加したことを示した。LPS 誘導をしないアスピリン処理が、マクロファージに与える影響を検討するために、細胞を 200 μ g / ml アスピリンで 36 時間処理した。フローサイトメトリーによる分析結果では、200 μ g / ml のアスピリンが RAW264.7 細胞のアポトーシスに影響を及ぼさないことを示した。さらに、ウェスタンプロットおよびリアルタイム PCR では、200 μ g / ml のアスピリン処理がマクロファージ細胞における arginase-1 (ARG1)、chitinase-like 3 (Chil3, YM-1)、Retnla (FIZZ) または TNF- α の発現に影響を及ぼさないことも確認された。

また、C57BL/6 マウス骨髄間葉幹細胞 (BMMSC) (Cyagen Biosciences) は、トリプシン処理に

よって単層培養物から 80%コンフルエンスで採取され、Ibidi 創傷治癒皿 (Ibidi) に播種され、無血清培地中でコンフルエントになるまで 24 時間増殖させた。Ibidi 創傷治癒ディッシュの挿入壁を 24 時間後に移動し、擦過領域への BMMSC の移動を観察し、12 時間および 24 時間で写真撮影した。未処理の BMMSC の遊走アッセイでは、200 μ g/ml のアスピリンで処理した BMMSC と比較して閉鎖の遅延 (遊走が少ない) が示された。12 時間および 24 時間の時点で、200 μ g/ml アスピリン処理 BMMSC は、未処理 BMMSC と比較して、有意に高い運動性および遊走性を示した。創傷治癒モデルの H-E 染色は、200 μ g/ml のアスピリン処理細胞における再生が対照細胞よりも迅速かつ十分であることを示した。したがって、定量的 RT-PCR 分析は、200 μ g/ml アスピリン処理細胞におけるフィブロネクチンおよびピメンチンの発現が未処理細胞よりも高いことを示した。BMMSC の骨形成分化に対する 200 μ g/ml のアスピリンの刺激効果は、骨誘導培地中で BMMSC を 28 日間培養することによって検証された。アリザリンレッド染色により、200 μ g/ml のアスピリンによる処理が BMMSC の石灰化能力を増強することが明らかになった。定量的 RT-PCR 分析は、Runx2 およびオステオカルシンの発現が、未処理の細胞と比較して、200 μ g/ml のアスピリンでの処理後の BMMSC において有意にアップレギュレートされたことを示した。

マクロファージは、M1 / M2 型に分極しており、創傷部位の炎症状態である (M1 型) また再生・修復状態である (M2 型) を

判断することを確認できた。加えて、アスピリンが、LPS によって誘発されるマクロファージの活性化を阻害し、RANK の発現を低下させ、破骨細胞活性を阻害し、骨芽細胞を促進すると思われる。さらに、アスピリンが損傷修復におけるマクロファージの M1 / M2 分極に影響を与え



ることが明らかになった。これらのことから、マクロファージの M1 / M2 分極に対するアスピリンの効果、臨床応用につなげるアスピリンの局所応用の可能性が期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Chieko Taguchi, Fuyuki Sato, Chen Wang, Shigeru Nakamura, Kosuke Oikawa, Ujjal Kumar Bhawal, Hiroyuki Okada, Kazumune Arikawa	4. 巻 46
2. 論文標題 Smad3 deficiency accelerates tongue wound healing via epithelial cell-extracellular matrix interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oral Biology Research	6. 最初と最後の頁 -
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 Chieko Taguchi, Reiri Takeuchi, Gen Yano, Hideaki Suzuki, Haruka Sakadume, Teruaki Nagashima, Masaru Mizuta, Shigeru Nakamura, Itaru Suzuki, Nobuhiro Taguchi, Kazumune Arikawa	4. 巻 21
2. 論文標題 Intervention Effect of Chewing Gum Mastication in Residents and Users of Elderly facility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 100-111
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 Megumi Fuse, Tomomi Hashizume-Takizawa, Arata Watanabe, Chieko Taguchi, Kou Fujita-Nakajima, Takao Kuwada-Kusunose, Hiroyuki Okada	4. 巻 21
2. 論文標題 Study of Bioactive Film: Fabrication of Poly (lactic acid) Film Immobilized the Tilapia Fish Collagen or Porcine Collagen and Behavior of MC3T3-E1Cells'	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1-9
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 Jun Motohashi, Chieko Taguchi, Wenqun Song, Kazuaki Kawamura, Hirohisa Arakawa, Motohisa Kawagoe, Akihisa Tsurumoto	4. 巻 64
2. 論文標題 Development of small-scale water fluoridation equipment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 283-285
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 Senpuku H, Fukumoto M, Uchiyama T, Taguchi C, Suzuki I, Arikawa K	4. 巻 9
2. 論文標題 Senpuku H, Fukumoto M, Uchiyama T, Taguchi C, Suzuki I, Arikawa K: Effects of extraoral suction on droplets and aerosols for infection control practices	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dent Journal	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dj9070080	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 Suzuki T, Suemitsu M, Nakayama M, Taguchi C, Ukigaya M, Nakamura C, Nakayama Y, Yamamoto H, Kuyama K	4. 巻 11
2. 論文標題 Suzuki T, Suemitsu M, Nakayama M, Taguchi C, Ukigaya M, Nakamura C, Nakayama Y, Yamamoto H, Kuyama K: Histopathological and immunohistochemical study of the distinction between oral lichen planus and oral lichenoid lesion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Journal of Stomatology	6. 最初と最後の頁 91-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/ojst.2021.112008	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 和田 康志, 田口 千恵子, 坂爪 陽香, 鈴木 到, 内田 貴之, 岡田 優一郎, 内山 敏一, 有川 量崇	4. 巻 56
2. 論文標題 直近10年の臼歯部の歯冠修復における全部金属冠およびCAD/CAM冠の算定状況について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本歯科医療管理学会雑誌	6. 最初と最後の頁 151-156
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 0件)

1. 発表者名 中村 茂人, パワール・ウジャール, 田口 千恵子, 水田 勝, 長島 輝明, 鈴木 到, 坂爪 陽香, 後藤田 宏也, 有川 量崇
2. 発表標題 単一細胞RNAシーケンスデータ分析による歯列矯正モデルの低酸素誘発歯周細胞特異的遺伝子の確立
3. 学会等名 第22回日本大学口腔科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 到, 坂爪 陽香, 田口 千恵子, 山田 孝, 中村 茂人, 水田 勝, 長島 輝明, 岡田 優一郎, 岡田 裕之, 有川 量崇
2. 発表標題 竹製歯ブラシに付着する口腔細菌の残存量に関するin vitroにおける検討
3. 学会等名 第63回日本歯科医療管理学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 到, 内山 敏一, 小倉 由希, 小嶋 康世, 田口 千恵子, 坂爪 陽香, 脇田 雅文, 平山 聡司, 泉福 英信, 深津 晶, 中村 茂人, 水田 勝, 有川 量崇
2. 発表標題 歯科治療に伴うエアロゾル発生抑制に対する口腔内パキュームの効果についての検討
3. 学会等名 第71回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口千恵子, 水田 勝, 中村茂人, 高原正明, 大河原伸浩, 早川琢郎, 大越 学, 水町裕義, 久保木由紀也, 小宮あゆみ, 砂川 稔, 有川 量崇
2. 発表標題 歯科による関わりが医科医療費に与える影響について, - 診療報酬請求書による分析 -
3. 学会等名 2021年度関東甲信越歯科医療管理学会総会・第27回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内麗理, 田口千恵子, 岡田優一郎, 中村 茂, 水田 勝, 山田 孝, 麻生 泰, 有川量崇, 平塚浩一
2. 発表標題 ラットによる口内炎の研究 舌への炎症誘発とインターロイキン発現
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakamura S, Mizuta M, Yamada T, Aso T, Taguchi C, Ujjal B, Arikawa K
2. 発表標題 MicroRNA-21 facilitates osteoblast activity
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	布施 恵 (長井恵) (FUSE Megumi) (30343578)	日本大学・松戸歯学部・准教授 (32665)	
研究分担者	有川 量崇 (ARIKAWA Kazumune) (50318325)	日本大学・松戸歯学部・教授 (32665)	
研究分担者	B h a w a l U j j a l (BHAWAL Ujjal) (50433339)	日本大学・松戸歯学部・講師 (32665)	
研究分担者	竹内 麗理 (TAKEUCHI Reiri) (60419778)	日本大学・松戸歯学部・准教授 (32665)	

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