

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16984

研究課題名(和文)メカニカルストレス存在下における歯根膜と骨構成細胞のクロストーク機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of crosstalk between periodontal ligament and bone lineage cells in the presence of mechanical stress.

研究代表者

土谷 洋輔 (Tsuchiya, Yosuke)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・特任助教

研究者番号：40882072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：咬合性外傷は歯周炎増悪の重要な修飾因子であるが、制御メカニズムは不明な点が多い。本研究では歯周炎モデル、咬合性外傷モデルを作成し、歯周組織の網羅解析を行うことで分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。Micro-CT解析から、Tra群では骨吸収は認めなかったが、LiTra群ではLi群に対し有意に骨吸収量が増加した。長期実験でもTra群では骨吸収は認められなかった。4群の歯肉と骨のRNA-seqを行い、特にLi群とLiTra群の骨のRNA-seqの結果、167の発現変動遺伝子($|\text{FC}| > 2, q < 0.1$)を認め、特に炎症に関連した遺伝子群の顕著な発現上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咬合性外傷は歯周炎を悪化させる重要な修飾因子として知られている一方で、分子生物学的なメカニズムの検討は乏しい状況であった。本研究は歯と骨を繋ぐ歯根膜細胞に着目し、同細胞がメカニカルストレスと骨の応答の架け橋となり、骨吸収を制御している可能性は高く、歯根膜由来の分子が骨芽細胞、破骨細胞、さらには骨細胞に働きかける制御機構の解明につながるかと考えている。さらには咬合性外傷により変化する遺伝子群が解明されることで歯周病進行リスクの評価につながることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：Occlusal trauma is an important risk factor for the exacerbation of periodontitis, however the regulatory mechanisms remain unclear. The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanisms by performing RNA-sequencing of periodontal tissues of periodontitis model and occlusal trauma model in mice. Micro-CT analysis showed no bone resorption in Tra, however, significantly increased bone resorption in LiTra compared to Li. No bone resorption was observed in Tra in long-term evaluation. Principal component analysis showed that gene expression patterns were different in each group, especially in bone. RNA-seq results for bone from Li and LiTra showed 167 differential expressed genes ($|\text{FC}| > 2, q < 0.1$), and marked increase in expression of genes related to inflammation.

研究分野：歯周病学

キーワード：咬合性外傷 RNAシーケンス解析 歯周炎 歯根膜細胞

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、歯と歯槽骨の結合を担うのみでなく、歯周組織の恒常性の維持において中心的な役割を担う最も重要な組織の一つである。近年では、歯根膜由来間葉系幹細胞の歯周組織再生療法への臨床応用が進み、歯周組織再生の分野において非常に注目されている組織である。その一方で、歯根膜は直接的に咬合力を受ける組織であり、咬合力の調節、矯正による歯の移動などメカニカルストレスを受容することにより口腔機能の制御・維持に寄与していることが知られている。咬合性外傷は、歯周炎の悪化に関わる重要な修飾因子であり、今までの動物における観察研究により「歯周炎の原因ではないこと」、「細菌存在下で歯周炎を増悪させること」が現在の歯周病学のコンセンサスとなっているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。矯正移動における力のコントロールという点で、メカニカルストレスと歯根膜細胞の関係については注目されている分野であり、歯根膜由来線維芽細胞に3次元培養を行い、マイクロアレイ解析を行った研究はいくつか報告されている。しかし、細菌性プラークを主体とした炎症性疾患である歯周炎に対し、メカニカルストレスがどのような細胞応答をきたすかについては不明な点が多く、詳細な分子メカニズムは確立されていない。

2. 研究の目的

細菌性プラークを主体とした炎症性疾患である歯周炎に対し、メカニカルストレスがどのような細胞応答をきたすかについては不明な点が多く、メカニカルストレス存在下における歯根膜細胞の網羅的な遺伝子発現の検討を行い、咬合性外傷のメカニズムについて報告した研究はない。咬合性外傷は細菌感染存在下における異常な咬合力で起こるとされているが、生物学的な検討は現在でも乏しく、歯根膜細胞において同様の状態を模倣し網羅的解析を行うことにより咬合性外傷の分子メカニズムに迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

LPS 刺激歯根膜細胞の伸展培養における遺伝子発現の網羅解析、骨系細胞との関連の解明

細菌由来の炎症存在下での歯根膜細胞におけるメカニカルストレスの影響を調べるために、伸展培養器 (シェルパプロ、Menicon) を用いて歯根膜由来線維芽細胞を培養する。その際、非伸展群をコントロールとし、破骨細胞分化に影響を与える遺伝子や骨芽細胞分化に影響を与える遺伝子、シグナルについて qRT-PCR、ウェスタンブロット法により調べる。さらに伸展培養を行なった歯根膜由来線維芽細胞との共存培養系を用いて破骨細胞分化能を評価する。また、メカニカルストレスに対する歯根膜細胞の応答を網羅的に解析するために RNA-seq を行い、骨構成細胞の分化に関連する遺伝子群の探索を行う。

令和4年度

歯周炎咬合性外傷併発モデルを用いた生体内におけるクロストーク因子の検討

9週齢の雄 C57BL/6J マウスについて絹糸結紮誘導歯周炎モデルと、コンボジットレジン (CR) を臼歯部咬合面に築成して作成した咬合性外傷モデルに絹糸を結紮した歯周炎咬合性外傷併発モデルを作成する。この2つの実験モデルを用いて、炎症状態における歯根膜、歯周組織の変化を比較検討する。まず、実験動物用マイクロX線CTで撮影し、歯槽骨吸収を評価する。次に、組織切片を作成し、HE, TRAP, Toluidine blue 染色にて歯根膜、骨構造の評価を行う。歯根膜細胞における遺伝子発現の変化を検討する。伸展培養した歯根膜細胞の網羅的解析から得られたクロストーク因子候補について、蛍光免疫染色や in situ hybridization を用いて、生体内での局在や発現量を明らかにする。

4. 研究成果

当初の研究計画においては、*In vitro* での LPS 刺激歯根膜細胞に対する伸展培養とその遺伝子発現の網羅解析を行う予定であったが、それに先立ち、実験動物モデルにおける歯周組織の網羅解析を詳細に行うこととした。週齢 C57BL/6J 雄マウスの上顎左側第2臼歯に絹糸を結紮した結紮誘導歯周炎モデル、コンボジットレジンで築造した咬合性外傷モデルを作出し、対照群 (Co)、歯周炎群 (Li)、咬合性外傷群 (Tra)、歯周炎 + 咬合性外傷群 (LiTra) の4群で検討を行った。処置後8日後のマイクロCT解析からは咬合性外傷単独の Tra 群では対照群と同様に骨吸収は認められなかったが、歯周炎咬合性外傷群 (LiTra 群) では歯周炎群 (Li 群) に対し著明な骨吸収とを認めた。また、組織学的評価において破骨細胞数の増加の傾向が認められた。

処置後3日後の早期において4群の上顎第2臼歯周囲の歯肉、骨組織を採取し、RNAシーケンス解析を行なった。4群の歯肉、骨組織において主成分分析を行ったところ各群において異なる遺伝子発現パターンを示した。特に骨組織においては各群の差は顕著であった。骨吸収に大きな変化が認められなかった Tra 群と Co 群の骨組織における比較において発現変動遺伝子 (DEGs, $|FC| > 2$, $q < 0.1$) は77であったが、Li 群と LiTra 群における RNAseq の結果からは167の DEGs ($|FC| > 2$, $q < 0.1$) を認め、特に炎症に関連する遺伝子群の発現が KEGG Pathway 解析から認められた。また、メカニカルストレスと骨代謝に関連の深い遺伝子の発現変動を認め、咬合性外

傷におけるメカニカルストレス関連遺伝子の関与が示唆される結果となった。今後、長期的な咬合性外傷を付与した系においてこれらの関連遺伝子の発現変化について検討するとともに、責任細胞種の同定を行うために、候補遺伝子についての各骨関連細胞における評価を行い、さらに詳細な分子メカニズム解明に迫る予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 3件）

1. 著者名 Lin Peiya, Liu Anhao, Tsuchiya Yosuke, Noritake Kanako, Ohsugi Yujin, Toyoshima Keita, Tsukahara Yuta, Shiba Takahiko, Nitta Hiroshi, Aoki Akira, Iwata Takanori, Katagiri Sayaka	4. 巻 59
2. 論文標題 Association between periodontal disease and chronic obstructive pulmonary disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 389 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2023.10.004	査読の有無 無
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 Toyoshima Keita, Ohsugi Yujin, Lin Peiya, Komatsu Keiji, Shiba Takahiko, Takeuchi Yasuo, Hirota Tomomitsu, Shimohira Tsuyoshi, Tsuchiya Yosuke, Katagiri Sayaka, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 41
2. 論文標題 Blue Light-Emitting Diode Irradiation Without a Photosensitizer Alters Oral Microbiome Composition of Ligature-Induced Periodontitis in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery	6. 最初と最後の頁 549 ~ 559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/photob.2023.0061	査読の有無 無
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 Ohsugi Yujin, Hatasa Masahiro, Katagiri Sayaka, Hirota Tomomitsu, Shimohira Tsuyoshi, Shiba Takahiko, Komatsu Keiji, Tsuchiya Yosuke, Fukuba Shunsuke, Lin Peiya, Toyoshima Keita, Maekawa Shogo, Niimi Hiromi, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 49
2. 論文標題 High frequency pulsed diode laser irradiation inhibits bone resorption in mice with ligature induced periodontitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 1275 ~ 1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcpe.13695	査読の有無 無
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 Shimohira Tsuyoshi, Niimi Hiromi, Ohsugi Yujin, Tsuchiya Yosuke, Morita Kazuki, Yoshida Sumiko, Hatasa Masahiro, Shiba Takahiko, Kadokura Hiroshi, Yokose Satoshi, Katagiri Sayaka, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 39
2. 論文標題 Low-Level Erbium-Doped Yttrium Aluminum Garnet Laser Irradiation Induced Alteration of Gene Expression in Osteogenic Cells from Rat Calvariae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery	6. 最初と最後の頁 566 ~ 577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/photob.2020.4958	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 Hatasa Masahiro, Ohsugi Yujin, Katagiri Sayaka, Yoshida Sumiko, Niimi Hiromi, Morita Kazuki, Tsuchiya Yosuke, Shimohira Tsuyoshi, Sasaki Naoki, Maekawa Shogo, Shiba Takahiko, Hirota Tomomitsu, Tohara Haruka, Takahashi Hirokazu, Nitta Hiroshi, Iwata Takanori	4. 巻 10
2. 論文標題 Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis Alters Endocrine Functions in Brown Adipose Tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.580577	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 Lin Peiya, Niimi Hiromi, Ohsugi Yujin, Tsuchiya Yosuke, Shimohira Tsuyoshi, Komatsu Keiji, Liu Anhao, Shiba Takahiko, Aoki Akira, Iwata Takanori, Katagiri Sayaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Application of Ligature-Induced Periodontitis in Mice to Explore the Molecular Mechanism of Periodontal Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8900 ~ 8900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168900	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 Yoshida S, Hatasa M, Ohsugi Y, Tsuchiya Y, Liu A, Niimi H, Morita K, Shimohira T, Sasaki N, Maekawa S, Shiba T, Hirota T, Okano T, Hirose A, Ibi R, Noritake K, Tomiga Y, Nitta H, Suzuki T, Takahashi H, Miyasaka N, Iwata T, Katagiri S	4. 巻 11
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Administration Induces Gestational Obesity, Alters Gene Expression in the Liver and Brown Adipose Tissue in Pregnant Mice, and Causes Underweight in Fetuses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.745117	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 下平剛, Peiya LIN, 大杉勇人, 片桐さやか, 芝 多佳彦, 土谷洋輔, 駒津匡二, 豊嶋啓汰, 今井千尋, 松村俊佑, 岩田隆紀, 青木 章
2. 発表標題 エネルギーを用いた薬剤関連性顎骨壊死の新規予防策の開発と分子機構の解明
3. 学会等名 第88回口腔病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 劉安豪、林幹人、土谷洋輔、岩田隆紀、中島友紀
2. 発表標題 新規マウス歯周炎モデルによる歯周炎発病の時空間解析
3. 学会等名 第7回日本骨免疫学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大杉勇人、畑佐将宏、下平剛、芝多佳彦、駒津匡二、土谷洋輔、福場駿介、新見ひろみ、森田和機、片桐さやか、岩田隆紀、青木章
2. 発表標題 結紮誘導歯周炎モデルマウスを用いたダイオードレーザー照射による歯周炎抑制効果
3. 学会等名 第65回日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大杉勇人、畑佐将宏、下平剛、芝多佳彦、駒津匡二、土谷洋輔、福場駿介、新見ひろみ、森田和機、片桐さやか、岩田隆紀、青木章
2. 発表標題 結紮誘導歯周炎モデルマウスを用いたダイオードレーザー照射による歯周炎抑制効果
3. 学会等名 第33回 日本レーザー歯学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田澄子、片桐さやか、畑佐将宏、大杉勇人、土谷洋輔、新見ひろみ、下平剛、劉安豪、森田和機、佐々木直樹、前川祥吾、芝多佳彦、新田浩、岩田隆紀
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisは妊娠中の母体の肥満と胎子の低体重を引き起こす
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 Shimohira T, Niimi H, Ohsugi Y, Tsuchiya Y, Morita K, Yoshida S, Hatasa M, Shiba T, Kadokura H, Yokose S, Katagiri S, Iwata T, Aoki A.
2. 発表標題 Low-Level Er:YAG laser irradiation induced alteration of gene expression in rat calvarial osteogenic cells.
3. 学会等名 Dental Laser Virtual Scientific Conference 2021
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
---------------------------	-----------------------	----

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