

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21083

研究課題名（和文）細胞内シグナル伝達経路をターゲットに治癒機転を賦活化する新規根管貼薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of novel intracanal medicament that target intracellular signaling pathways to activate the healing process

研究代表者

鍵岡 琢実 (Kagioka, Takumi)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10909500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：炭酸リチウムの根管貼薬は、根尖性歯周炎によって形成された根尖病変の治癒を促進する作用があり、低濃度でもその効果が認められた。また、炭酸リチウムを根管貼薬剤として安全に用いることができる可能性も示唆された。

炭酸リチウムの根管貼薬は、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナル伝達経路を介して、M1マクロファージへの分化を抑制、M2マクロファージへの分化を促進し、そして、制御性T細胞の分化を誘導することが明らかとなった。また、免疫系の制御に加え、骨芽細胞の分化を誘導することで根尖病変の治癒を促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、炭酸リチウムがWnt/ $\beta$ -cateninシグナル伝達経路の活性化を介し、根尖性歯周炎の治癒を促進することが明らかとなり、また、その作用メカニズムの一端が解明された。

将来的に、実際の臨床で感染根管治療に炭酸リチウム配合根管貼薬剤を用いれば、根管治療の成功率の向上に貢献できると考えている。また、外科的歯内療法への適応となるような難治性の症例に対して炭酸リチウム配合根管貼薬剤を用いれば、非外科的に根尖病変の治癒が可能になるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：The intracanal medication of lithium carbonate was found to promote healing of periapical lesions formed by apical periodontitis, and this effect was observed even at low concentrations. The results also suggested that lithium carbonate could be safely used as an intracanal medicament.

The intracanal medication of lithium carbonate inhibited the differentiation of M1 macrophages, promoted the differentiation of M2 macrophages, and induced the differentiation of regulatory T cells through activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. In addition to regulating the immune system, the induction of osteoblast differentiation was found to promote healing of periapical lesions.

研究分野：分子生物学

キーワード：炭酸リチウム 根管貼薬 根管治療 シグナル伝達経路

## 1. 研究開始当初の背景

根管貼薬剤として現在標準的に用いられる水酸化カルシウム製剤は、根管内の殺菌効果はあるものの治癒機転を賦活化する作用はなく、このような作用をもつ根管貼薬剤は未だ開発されていない。我々は以前より、免疫応答や骨代謝に関与する細胞内シグナル伝達経路をターゲットとし、治癒機転を賦活化する作用をもった根管貼薬剤の開発を目指してきた。そこで、ターゲットとなる細胞内シグナル伝達経路を探索する目的で、SNP 解析をおこなったところ、Wnt シグナル伝達経路に属する LRP5 遺伝子上の SNP が、根尖病変の形成と関連性があることがわかった。

ところで、リチウムイオンは、強制的に Wnt シグナル伝達経路を活性化し、免疫応答や骨代謝を誘導することがわかっており、古典的に塩化リチウムが作動薬として用いられている。そして、マウスを用いた先行研究によって、塩化リチウムは根尖病変の治癒を促進することが明らかになった。そこで我々は、将来的な臨床応用を見据え、塩化リチウムの代わりに双極性障害の治療薬として用いられている炭酸リチウムを根管貼薬剤として感染根管治療モデルラットに貼薬しても、同様の結果を得られるのではないかと考えた。また、先行研究ではリチウムイオンの濃度コントロールが不完全であり、詳細な作用メカニズムも未解明であった。

## 2. 研究の目的

我々が展開してきた先行研究の知見をもとに、炭酸リチウムの根管貼薬剤としての有効性を、感染根管治療モデルラットを用いて検証するとともに、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 炭酸リチウム根管貼薬の安全性についての検討

10 週齢の雄性 Wistar ラットの顎両側第一臼歯を露髄させ、実験的に根尖性歯周炎を惹起させた。感染根管治療はラバーダム防湿下で拡大視野にておこない、12%炭酸リチウム配合根管貼薬剤を貼薬した。これを根管貼薬群とし、炭酸リチウム溶液の腹腔内投与群を対照群として経時的採血をおこない、血中リチウムイオン濃度を測定した。

### (2) 炭酸リチウム根管貼薬がラット根尖性歯周炎の治癒に及ぼす影響

上記と同様に感染根管治療をおこない、1%、12%炭酸リチウム配合根管貼薬剤、水酸化カルシウム製剤、ブランク（貼薬剤の基材のみ）を貼薬し、処置後 1, 2, 3, 4 週にマイクロ CT 撮影をおこない、根尖病変体積の経時的变化を各群間で比較した。

### (3) 炭酸リチウム根管貼薬による病変治癒メカニズムの組織学的解析

12%炭酸リチウム貼薬群とブランク群のラットを貼薬後 1, 2, 3, 4 週に灌流固定し、近心根根尖を含む薄切切片を作製した。H-E 染色、免疫染色、*in situ* ハイブリダイゼーションをおこない、Wnt シグナル伝達経路の活性、そしてマクロファージや制御性 T 細胞などの免疫細胞や骨芽細胞の挙動を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 炭酸リチウム根管貼薬の安全性についての検討

血中リチウムイオン濃度を経時的に計測した結果、炭酸リチウムの腹腔内投与群では、投与後 1 時間で血中リチウムイオン濃度の一過性の上昇を認めしたが、その後は徐々に濃度が低下し続けた。一方、根管貼薬群では、貼薬後 1 時間から 72 時間まで、リチウムイオンは血中からほとんど検出されなかった。

## (2) 炭酸リチウム根管貼薬がラット根尖性歯周炎の治癒に及ぼす影響

マイクロ CT 撮影により、貼薬剤が緊密に充填されていることを確認した(図1)。

根管貼薬後 1 週において根尖病変体積に有意差は認められなかったが、根管貼薬後 2 週において、1% および 12% 炭酸リチウム群はブランク群と比較して、有意差をもって病変体積が縮小していた。さらに、12% 炭酸リチウム群は水酸化カルシウム群と比較して、有意差をもって病変体積が縮小していた。根管貼薬後 3 週および 4 週においては、12% 炭酸リチウム群はブランク群ならびに水酸化カルシウム群と比較して、有意差をもって病変体積が縮小していた。そして、1% 炭酸リチウム群はブランク群と比較して、有意差をもって病変体積が縮小していた。

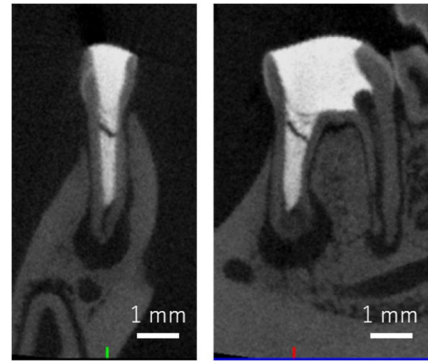


図1.炭酸リチウムの根管貼薬をおこなったラット下顎第一臼歯.貼薬剤は近心根に緊密に充填されている。

## (3) 炭酸リチウム根管貼薬による病変治癒メカニズムの組織学的解析

### H-E 染色

根管貼薬後 4 週の試料に H-E 染色をおこなった結果、炭酸リチウム群の根尖病変の大きさはブランク群と比較して小さかった。また、ブランク群では、近心根周囲に免疫担当細胞様細胞の集簇と肉芽組織の形成を認めた。炭酸リチウム群においても根尖病変内に肉芽組織の形成を認め、かつ免疫担当細胞様細胞を確認したが、その分布は限局的であった。また、ブランク群と同様、肉芽組織の形成も認めた。さらに、炭酸リチウム群の根尖病変周囲には、治癒によって形成されたと思われる幼若な骨組織が認められた。一方、ブランク群ではそうした硬組織の形成はほとんど認められなかった。

### 免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーション

根管貼薬後 1, 2, 3 週の試料において、M1 マクロファージのマーカー分子である CD86 陽性細胞が、ブランク群では根尖病変内に多く認められたが、炭酸リチウム群ではほとんど認められなかった。根管貼薬後 4 週の試料においては、いずれの群でも病変内に CD86 陽性細胞は認められなかった。一方で、根管貼薬後 1 週から 4 週にかけて、CD68, CD206 がダブルポジティブである M2 マクロファージが、炭酸リチウム群ではブランク群と比較して、根尖病変内により多く認められた。

また、根管貼薬後 1, 2, 3 週の試料において、制御性 T 細胞のマスター転写因子でありマーカー分子である Foxp3 陽性細胞が、炭酸リチウム群では根尖病変内に認められたが、ブランク群ではほとんど認められなかった。根管貼薬後 4 週の試料においては、いずれの群でも病変内に Foxp3 陽性細胞が認められるようになった。

さらに、骨芽細胞の分化マーカーである *Col1a1* 遺伝子に対する *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなったところ、根管貼薬後 1 週から 4 週にかけて、炭酸リチウム群ではブランク群と比較して、根尖病変内、特に歯槽骨表面において *Col1a1* の強い発現が認められた。

最後に、Wnt- catenin シグナル伝達経路の活性を調べるため、ターゲット遺伝子産物である Axin2 に対する免疫組織化学染色を行った結果、根管貼薬後 24 時間の試料において、Axin2 陽性細胞が、炭酸リチウム群ではブランク群と比較して根尖病変内に多く認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takumi Kagioka , Shousaku Itoh , Mai Hue , Makoto Abe , Mikako Hayashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Lithium carbonate accelerates the healing of periapical periodontitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.21203/rs.3.rs-1786792/v1	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0件

〔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
---------	---------