

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年 ～ 2011 年

課題番号：22791897

研究課題名（和文）メカノセルバイオロジーを用いた口腔粘膜再生療法の開発と臨床評価

研究課題名（英文）Development and clinical evaluation of soft tissue regeneration based on mechanobiology

研究代表者 正木千尋（CHIHIRO MASAKI）

九州歯科大学 歯学部 助教

研究者番号：60397940

研究成果の概要（和文）：

本研究では、株化歯肉上皮細胞 GE1 を用いて CCN2/CTGF が、軟組織の治癒促進に対する LIPUS の影響を明らかにすることを目的とした。GE1 細胞を周波数 3MHz、出力 40mW/cm² で 15 分間 LIPUS 照射を行い、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロッティング法を用いて CCN2/CTGF の mRNA 量およびタンパクレベルでの検討を行った。CCN2/CTGF mRNA 発現量は、LIPUS 照射直後、15 分後に有意な増加が認められ、タンパクレベルにおいても照射 60 分後に量の増加が認められた。MAPK に関しては、LIPUS 照射 30 分後に ERK、P-38 のリン酸化が認められた。以上より、LIPUS 照射により CCN2/CTGF の遺伝子発現を誘導しタンパク量を増加させることが明らかになり、そのメカニズムとしては ERK、P-38 のリン酸化が関与していることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We focused on the effects of LIPUS on GE1 cells in this study. GE1 were exposed to LIPUS for 15 min at 3 MHz frequency and 40 mW/cm² power. Total RNA was extracted after LIPUS exposure and analyzed by quantitative PCR to detect CCN2/CTGF, and total protein from each sample after LIPUS exposure was immunoblotted. CCN2/CTGF mRNA levels were significantly greater at 0 and 15 min after LIPUS exposure, compared with the control. Western blotting analysis showed intense staining of CCN2/CTGF for 60 min after LIPUS exposure. Phosphorylation of MAPK was up-regulated at 30 min after LIPUS exposure. Our findings demonstrated that LIPUS exposure increases CCN2/CTGF via the MAPK signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯学，メカノバイオロジー，再生医学，細胞・組織，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療は、その予知性の高さから欠損補綴治療の一つのオプションとして広く用いられているものの、インプラント埋入部位の顎骨は吸収されて複雑な形態となっている場合が多く、骨再生誘導法 (GBR) や様々な骨移植材の応用が行われることが多い。また硬組織だけでなく、軟組織に関しても遊離歯肉移植術や結合組織移植術を同時に行うことが多いものの、術後の感染が起こる可能性があるだけでなく、採取部位の疼痛が強いことから、軟組織に対してはより速やかな創傷治癒が強く望まれている。

軟組織の創傷治癒に関し、各種成長因子製剤や遺伝子治療の有効性が報告されているものの、一方で癌化の可能性を完全に拭いきれず、臨床の現場で普及していかない要因となっている。この状況を打破するブレークスルーとして物理療法などのメカノセルバイオロジーによる治癒促進が望まれている。整形外科領域では、難治性の骨折治療において低出力超音波パルス (low-intensity pulsed ultrasound: 以下 LIPUS と略す) 照射における著効が報告されており、本国でも保険医療として認可されている。

この LIPUS 治療がオッセオインテグレーションの早期獲得に応用できるのではないかと注目し、今回我々が行った pilot study では、下顎両側臼歯部インプラント埋入術を施行した症例に LIPUS の照射側と非照射側で治癒経過を比較したところ、オッセオインテグレーション獲得までのスピードに関してはほとんど差が見られなかったが、一方驚くべきことに、粘膜の治癒過程において照射側の切開創傷は、非照射側と比べて明らかに早期回復が認められるという我々が全く予想しない現象が起きた。これまで LIPUS と軟組織との関連についての報告はほとんどなく、唯一 LIPUS が膝関節内筋腱接合部の治癒を促進すると報告されている (Walsh W. et al) のみであり、口腔粘膜の創傷治癒に関する報告は世界中で見当たらない。さらに、血流測定装置により LIPUS 照射直後の血流変化を測定したところ、約 2.5 倍に血流が増加していることが示された。以上のことから、LIPUS が軟組織の創傷治癒過程を強力に促進する可能性があるとの着想に至った。

2. 研究の目的

歯肉上皮の創傷治癒における細胞接着、細胞増殖および血流変化に及ぼす LIPUS 刺激の影響を検討すること、また In vitro にてマウス正常歯肉上皮細胞に対し、LIPUS を様々な条件で照射することにより、歯肉上皮細胞に対する LIPUS の影響を遺伝子レベルやタンパ

クレベルで検討し、低出力超音波が粘膜の創傷治癒の促進効果を示すメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス正常歯肉上皮細胞 (GE1) 細胞を 6 穴の培養用プラスチックディッシュ上に SFM-101 培地中で培養後、周波数 3MHz、出力 40mW/cm² でプラスチックディッシュ下面より 15 分間 LIPUS 照射し、LIPUS 照射直後、15 分、30 分、1 時間、2 時間後に細胞を回収し、リアルタイム PCR 法を用いて、CCN2/CTGF の mRNA 量の検討を行った。統計学的分析として一元配置分散分析および Bonferroni 法を用いて多重解析を行った。

(2) GE1 細胞を 6 穴の培養用プラスチックディッシュ上に SFM-101 培地中で培養後、周波数 3MHz、出力 40mW/cm² でプラスチックディッシュ下面より 15 分間 LIPUS 照射し、LIPUS 照射直後、15 分、30 分、45 分、60 分後に細胞を回収し、Western blotting 法を用いて CCN2/CTGF のタンパク量の検討を行った。

(3) GE1 細胞を 6 穴の培養用プラスチックディッシュ上に SFM-101 培地中で培養後、周波数 3MHz、出力 40mW/cm² でプラスチックディッシュ下面より 15 分間 LIPUS 照射し、LIPUS 照射直後、15 分、30 分、45 分、60 分後に細胞を回収し、MAPK (ERK, p-38) の活性の検討を行った。

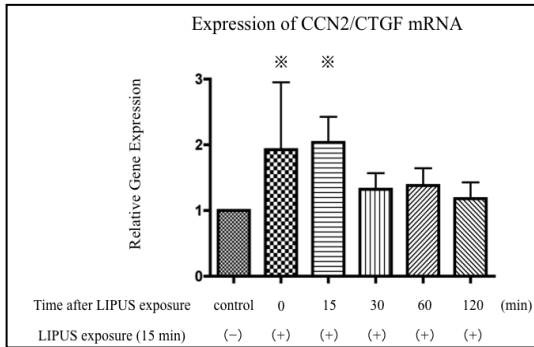
(4) 被検者の右側犬歯根尖側相当部に周波数 3MHz、出力 240mW で 15 分間 LIPUS 照射した。直後に 2 次元リアルタイムレーザースペックルフローグラフィを用いて照射野の組織内血流を計測した。

(5) インプラント埋入後の周囲軟組織に対する LIPUS 照射の臨床的検討を行った。下顎両側欠損の患者に対し、左右同一の術式で左右 2 本ずつインプラント埋入を行った。その後、プローブに間隙ゲルとしてラクリード社製オーラルバランスを塗布し作製した固定用ステントにプローブを入れ込み、口腔内へ装着した。片側を照射側、もう一方を非照射側とし、埋入翌日より周波数 3MHz、出力 240mW の LIPUS 照射を毎日 15 分ずつ一週間行った。埋入翌日および 8 日後にデンタル X 線撮影を行い、8 日後にはオステルメンターによる ISQ 値の測定を行った。また、毎回 LIPUS 照射時に口腔内写真撮影を行った。LIPUS 照射による粘膜の評価として 25 名の歯科医師により二重盲検試験を用いて軟組織の治癒の評価を行った。

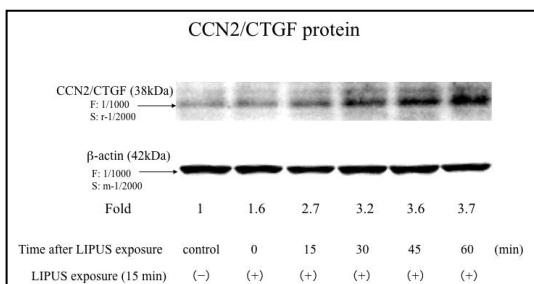
4. 研究成果

(1) リアルタイム PCR 法を用いて CCN2/CTGF mRNA 発現量を検討したところ、control と比較して LIPUS 照射直後、15 分後に有意な増加

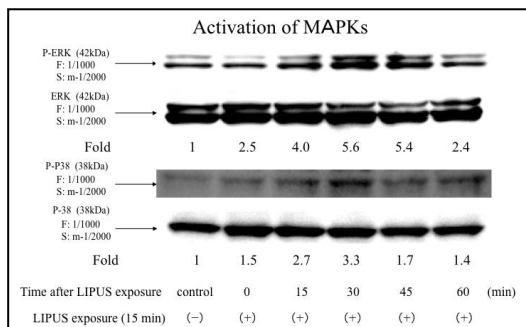
が認められた(P<0.05).



(2) Western blotting 法を用いてタンパクレベルにおける CCN2/CTGF の発現量を検討したところ、照射 30 分後、45 分後、60 分後に発現量の増加が認められた。



(3) MAPK に関しては、LIPUS 照射 30 分後、45 分後、60 分後に ERK, P-38 のリン酸化が認められた。以上より、LIPUS 照射により CCN2/CTGF の遺伝子発現を誘導しタンパク量を増加させることが明らかになり、そのメカニズムとしては ERK, P-38 のリン酸化が関与していることが示された。

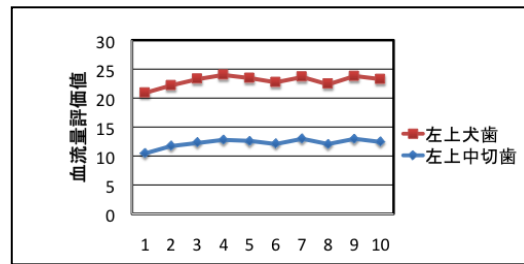


(1), (2), (3) の結果から、歯肉上皮細胞において、LIPUS 照射を行うことにより MAPK (ERK, P-38) のリン酸化を介する CCN2/CTGF 遺伝子発現が増加し、さらに CCN2/CTGF のタンパクレベルが増加している可能性が示唆された。

(4) LIPUS を照射していない上顎中切歯根尖相当部と LIPUS 照射を行った上顎犬歯根尖相当部の組織内血流量を比較したところ、約 2 倍の血流量の増加が認められた。

これにより、LIPUS 照射による軟組織の創傷治癒効果の要因として、組織内血流量の増加

が関与している可能性が示唆された。



(5) 照射前の口腔内写真では 25 名中 22 名の歯科医師がコントロール側の方が治癒良好と判断したのに対し、LIPUS 照射終了後においては 25 名中 24 名の歯科医師が照射側の方が治癒良好と判断した。また、ISQ 値は埋入 1 週間後で照射側の平均が 74.5、非照射側が 75.5 であったのに対し、埋入 4 週間後では照射側が 81.8、非照射側で平均 80.0 を示した。埋入直後から LIPUS 照射を行うことで、創傷治癒過程にあるインプラント周囲軟組織に炎症反応を生じる可能性が考えられたが、照射による炎症反応は認められなかった。創傷治癒の主観的評価試験において、LIPUS 照射によってインプラント周囲軟組織の術後早期の創傷治癒が促進する可能性が示唆された。

以上より、LIPUS 照射による CCN2/CTGF の遺伝子発現およびタンパクレベルの増加が、組織内血流量の増加とともに、軟組織の創傷治癒促進効果に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

R. Shiraishi, C. Masaki, A. Toshinaga, T. Okinaga, T. Nishihara, N. Yamanaka, T. Nakamoto, R. Hosokawa. The effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound Exposure on Gingival Cells, Journal of Periodontology, 82, 1498-503, 2011. (査読有) DOI: 10.1902

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正木千尋 (MASAKI CHIHIRO)
研究者番号：60397940

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：