

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792324

研究課題名(和文) 局所血流改善薬の歯周組織再生過程に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Effects of local blood flow improving agent on the periodontal tissue regeneration

研究代表者

三木 康史 (MIKI, KOJI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10598395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：局所血流改善薬である塩化カルプロニウムが歯根膜細胞および血管内皮細胞に及ぼす影響について検索した。マウス歯根膜細胞株MPDL22におけるムスカリン受容体の5種類のサブセットM1-5のmRNAの発現をRT-PCRにて確認した。塩化カルプロニウム刺激によりMPDL22のアルカリフォスファターゼ活性、石灰化関連遺伝子(Runx2, etc)の発現上昇が認められた。また塩化カルプロニウム刺激によりマトリゲル培養中のヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC) 管腔形成の有意な促進が認められた。

研究成果の概要(英文)：All of the mAChR family were expressed in MPDL22 at the mRNA level. Carpronium chloride treatment enhanced the ALP activity and expression of ossification related genes, such as Runx2, Osterix, ALP, Collagen type I, Osteocalcin, Osteopontin, and Osteonectin, in the period of long term ossification culture. Furthermore, Carpronium chloride promoted calcified nodule formation of MPDL22 cells. In addition, it was confirmed that carpronium chloride accelerated the tube formation of HUVECs on matrigel. These data suggest that application of carpronium chloride on periodontal disease could stimulate periodontal tissue regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周再生医学 歯周組織再生

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周病原性細菌感染によって歯周組織が破壊される慢性炎症疾患である。歯周病発症、重症化のリスク因子である外傷性咬合と喫煙は、それぞれ歯周組織の過度の圧迫とニコチンの血管収縮により歯周組織局所における微小血液循環不全を引き起こす。そのため歯周組織への酸素の栄養供給が阻害され、歯周処置の奏功不全、あるいは創傷治癒が遅延するものと考えられる。一方、歯科矯正治療時には、牽引側の歯根膜における血流亢進が歯周組織のリモデリングに重要な役割を果たしていることが示唆されている。このような局所的な血流の変化が、歯周組織構成細胞の細胞機能に影響を及ぼし、歯周病病態形成、創傷治癒、再生過程に強く関与しているものと推察される。

歯根膜には、咬合圧を知覚する神経組織や、歯根膜組織自体を維持するための栄養血管組織（血流）が存在し、歯根膜の機能を維持している。歯根膜血管の血流は、歯根膜構成細胞の増殖・分化・代謝活性等の恒常性維持に関与しているが、歯根膜は歯根と歯槽骨に挟まれたごく薄い軟組織であるため同部微小循環の詳細は未だ不明な点が多く残されている。

塩化カルプロニウムはアセチルコリン (Ach) の誘導体の局所血管拡張薬であり、医薬品として臨床応用されている。その血管拡張の作用機序に関する詳細は十分に解明されていないものの、血管内皮細胞に作用して内皮細胞弛緩物質である NO (一酸化窒素) の産生を促進することにより血管平滑筋を弛緩させ血流亢進する作用があるとされている。本研究では塩化カルプロニウムの局所血管拡張作用に着目し、歯周組織局所における血流亢進が、歯周組織の恒常性維持や組織修復治癒過程に果たす役割に関して検討を行う。

## 2. 研究の目的

塩化カルプロニウムはコリン作動薬であり、血管内皮細胞のムスカリン受容体を活性化

することで局所微小環境の血流を改善する。近年、血管内皮細胞のみならず、さまざまな種類の硬組織形成細胞にムスカリン受容体が発現していることが明らかとなった。これらの知見は、アセチルコリン-ムスカリン受容体カスケードで作動する副交感神経系が、骨芽細胞の制御を介して骨の微小動態を調節していることを示唆している。本研究では、塩化カルプロニウムが、歯根膜細胞並びに血管内皮細胞に及ぼす影響を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) マウス歯根膜細胞株 MPDL22 におけるムスカリン受容体の発現を RT-PCR 法を用いて検索した。

(2) 塩化カルプロニウムが MPDL22 に及ぼす影響

マウス歯根膜細胞株 (MPDL22) を以下の方法を用いて細胞分化誘導を行う。すなわち、24 時間前に播種しコンフルエント状態に達したマウス歯根膜細胞を、10 mM  $\beta$  グリセロリン酸および 50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸を添加した 10% FCS 含有  $\alpha$ -MEM 培地 (以下石灰化誘導培地と略す) に種々の濃度の塩化カルプロニウムを加え、3 日おきに石灰化誘導培地の交換および上記の試薬で刺激を行った。0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 日後にそれぞれの培養上清、RNA を回収しアルカリフォスファターゼ活性、石灰化関連遺伝子の発現を解析した。またアリザリン染色を行った。

(3) 塩化カルプロニウムが血管内皮細胞に及ぼす影響

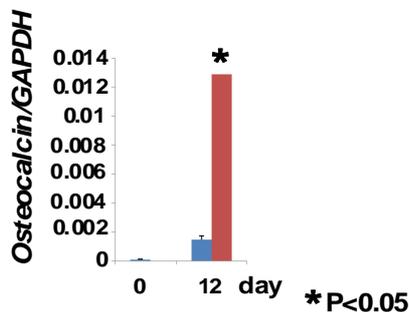
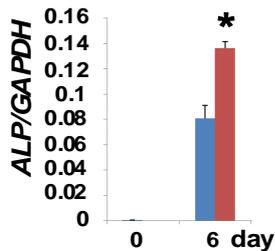
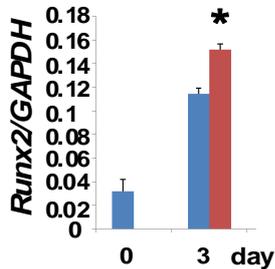
HUVEC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) を用い 3 次元培養による血管管腔形成能の解析を行った。細胞播種前日に Matrigel を 4 over night にて溶解させた。96 穴 well に分注し、5% CO<sub>2</sub>、37℃、湿度 95% の気相下で 30 分ゲル化させたものを 3 次元足場材とし

て使用した。HUVEC をゲル上に播種し、その際刺激群として塩化カルプロニウムの添加を行った。12 時間培養して管腔形成能に及ぼす影響を検討した。

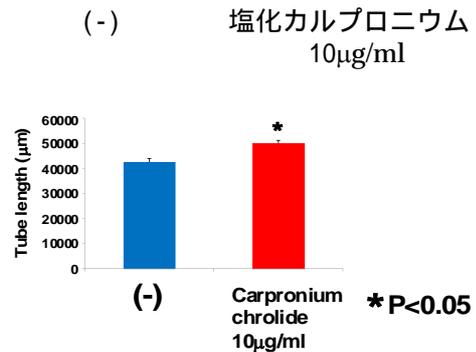
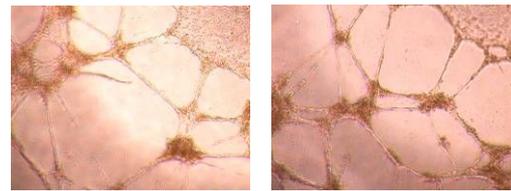
#### 4. 研究成果

(1) MPDL22 におけるムスカリン受容体の 5 種類のサブセット M1-5 の mRNA の発現を RT-PCR にて確認した。

(2) 塩化カルプロニウム刺激により MPDL22 のアルカリフォスファターゼ活性、石灰化関連遺伝子 (*Runx2*, etc) の発現上昇が認められた。



(3) 塩化カルプロニウム刺激によりマトリゲル培養中の HUVEC 管腔形成の有意な促進が認められた。



以上の結果より、塩化カルプロニウムはマウス歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進すること、また血管内皮細胞の管腔形成を促進することが明らかとなった。これらは歯周組織治癒・再生を促す可能性があることを示唆している。

#### 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)

〔学会発表〕(計 2 件)

三木康史, 柳田 学, 伊山舜吉, 森 健太, 久保田実木子, 山下元三, 山田 聡, 北村正博, 村上伸也.  
塩化カルプロニウムが歯根膜細胞および血管内皮細胞に及ぼす影響. 第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会 2013 年 9 月 22 日 前橋市 群馬

Koji MIKI, Manabu YANAGITA, Kenta MORI, Mikiko KUBOTA, Motozo YAMASHITA Satoru YAMADA, Masahiro KITAMURA and Shinya MURAKAMI  
Carpronium chloride promotes the

calcification of periodontal ligament cells.  
International Association of Dental  
Research-Asia Pacific Region (IADR-APR),  
August . 21-23, 2013, Bangkok, Thailand

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三木 康史 (MIKI KOJI)

大阪大学歯学部附属病院・医員

研究者番号 10598395