

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861806

研究課題名(和文)慢性歯周炎でのメカニカルストレスに対するTRPV4の役割の解明

研究課題名(英文) Investigation into the roles of TRPV4 via mechanical stress in chronic periodontitis

研究代表者

鈴木 允文 (SUZUKI, TAKAFUMI)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：60638518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性歯周炎でみられる咬合性外傷による歯槽骨吸収の分子メカニズムを解明する目的で骨芽細胞において慢性炎症下でのメカニカルストレスに対する作用をTRPV4に着目し検討した。TRPV4が骨芽細胞に発現し、骨芽細胞分化の過程で発現が上昇を示した。またTRPV4欠失骨芽細胞ではメカニカルストレス(せん断ストレス)により起こる周期的な細胞内カルシウム濃度上昇(カルシウムオシレーション)を抑制したことから、TRPV4は細胞内カルシウム濃度変化を制御することでメカニカルストレスにおける骨芽細胞分化に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of occlusal trauma-induced alveolar bone resorption in chronic periodontitis, we focus on the roles of TRPV4 on the mechanical stress under chronic inflammation in osteoblasts. TRPV4 expression levels were increased during osteoblast differentiation. TRPV4-deficient osteoblast significantly suppressed shear stress-induced calcium oscillation. These results suggest that TRPV4 is involved in osteoblast differentiation via regulating intracellular calcium concentration.

研究分野：歯周病学

キーワード：メカニカルストレス 歯周病 骨

1. 研究開始当初の背景

歯周病は *P. gingivalis* に代表される歯周病原細菌による歯周組織の炎症から歯槽骨吸収を伴う疾患であり、歯の動揺、脱落の原因となる。そのメカニズムは歯周病原細菌の菌体成分であるリポポリサッカライド (LPS) が骨芽細胞の Toll-like receptor 4 (TLR4) に結合し、プロスタグランジン E2 (PGE2) を介して Osteoprotegerin (OPG) の発現を抑制し、一方、プロテインキナーゼ C/MAP キナーゼ経路を介して Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) の発現を亢進する。破骨細胞分化因子 RANK の発現亢進と破骨細胞分化抑制因子 OPG の発現抑制 (RANKL/OPG 比の上昇) により破骨細胞形成が促進することで歯槽骨吸収が起きる。一方、一定のメカニカルストレスが骨芽細胞に負荷された場合、骨量の増加が起こるが、そのメカニズムは OPG の発現が上昇することによる RANKL/OPG 比の低下の結果、破骨細胞形成が抑制されることによる。临床上、歯周病において歯と歯周組織に過剰な咬合力が加わると急速な歯槽骨吸収がみられ、そのメカニカルストレスは咬合性外傷として呼ばれている。これまでラットやビーグル犬による動物実験モデルからも歯周病を伴う咬合性外傷は歯槽骨吸収進行の原因のひとつであると考えられてきたが (Glickman et al. J Periodontal 1965)、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

非選択性陽イオンチャネル transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4) はメカニカルストレスに反応して開孔し、主としてカルシウムイオンを透過することが知られている。細胞内カルシウムは細胞内セカンドメッセンジャーとして働き、骨芽細胞へのせん断ストレスにより起きる細胞内カルシウム濃度上昇は RANKL の発現を促進することが示唆されていることから (Takami M et al. Endocrinology 2000)、TRPV4 はメカニカルストレスと骨代謝の関わりに重要な役割を果たすものと考えられてきた (Masuyama R et al. Cell metabolism 2008, Mizuguchi F et al. J cell physiol 2008)。しかしながら炎症と TRPV4 の関係に関する報告は少なく、TNF- α の刺激により機能亢進することが示唆されている (Liping P Zhang et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2013, Kochukov MY et al. Mol Pain 2009)。これまで歯周病原細菌由来の炎症誘因因子、炎症性サイトカインによる急性炎症に対する細胞活性の報告と比較し、慢性炎症に対する細胞活性についての報告は少ない。また慢性炎症の状態にある細胞に対するメカニカルストレスへの応答性に関する分子メカニズムはほとんど報告がなされていない。そこで本研究では

慢性炎症におけるメカニカルストレスの影響として TRPV4 に着目し研究を行うことで、慢性歯周炎での咬合性外傷による歯槽骨吸収の分子メカニズムを解明し、新しい治療法の確立への足がかりとしていく。

3. 研究の方法

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、慢性歯周炎での咬合性外傷による歯槽骨吸収の分子メカニズムを解明するために骨芽細胞において慢性炎症下でのメカニカルストレスに対する作用を TRPV4 に着目し検討する。

骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞およびマウス頭蓋骨由来初代継代細胞を用い、骨芽細胞分化培地にて培養し、TRPV4 および骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 法で継続的に評価する。また慢性炎症条件として *P. gingivalis* 由来 LPS の添加下でも同様の実験を行う。

骨芽細胞分化誘導前後のマウス頭蓋骨由来初代継代細胞に対し、TRPV4 選択的アゴニスト (4 α -PDD) を添加することで TRPV4 の機能性を評価する。カルシウム蛍光プローブを細胞内に取り込ませたのちに蛍光顕微鏡下で 4 α -PDD 添加時の細胞内カルシウム濃度変化を記録し、評価する。また慢性炎症条件として *P. gingivalis* 由来 LPS の添加下でも同様の実験を行う。

骨芽細胞に対し、メカニカルストレスを負荷することで起きる細胞内カルシウム濃度変化を記録するため野生型および TRPV4 欠失型マウス頭蓋骨由来初代継代細胞を専用プレートに播種し、シリンジポンプによりプレート内に一定の流水を起こすことで発生するメカニカルストレス (せん断ストレス) を負荷する。前述と同様の方法で細胞内カルシウム濃度変化を記録し、評価する。また慢性炎症条件として *P. gingivalis* 由来 LPS の添加下でも同様の実験を行う。

骨芽細胞に対し、メカニカルストレスを負荷することで起きる細胞内カルシウム濃度変化に TRPV4 が与える影響を調べる目的で 12well プレートに野生型および TRPV4 欠失型マウス頭蓋骨由来初代継代細胞を播種し、旋回振とう台に設置して周期的に流水ストレスを負荷しながら分誘導培地での培養を行う。骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 法で継続的に評価する。また慢性炎症条件として *P. gingivalis* 由来 LPS の添加下でも同様の実験を行う。

4. 研究成果

TRPV4 は骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞およびマウス頭蓋骨由来の初代継代細胞において発現が認められた。また骨芽細胞分化誘導

によりともに発現レベル上昇を示した。骨芽細胞分化誘導を行う前後の初代継代細胞に対し TRPV4 選択的アゴニスト(4 β -PDD)を添加したところ分化誘導前の初代継代細胞と比較し、分化誘導後の初代継代細胞では細胞内カルシウム濃度の上昇回数の増加を認めた。このことから骨芽細胞分化誘導により発現上昇した TRPV4 は細胞膜上での機能性を有することが示された。つぎに TRPV4 欠失型マウスと野生型マウス頭蓋骨由来の初代継代細胞に対し、メカニカルストレスを負荷したところ、TRPV4 欠失型初代継代細胞ではメカニカルストレスにより起こる周期的な細胞内カルシウム濃度上昇(カルシウムオシレーション)の発生時間や発生頻度が抑制された。以上の結果から TRPV4 はメカニカルストレスによる骨芽細胞の細胞内カルシウム濃度変化を制御していることが示唆され、メカニカルストレスによる骨芽細胞分化に関与しているものと考えられる。

今後は慢性炎症条件として P. gingivalis 由来 LPS 存在下でのメカニカルストレスと骨代謝における詳細に関してさらなる検討を重ねていくことを予定している。

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)

[雑誌論文](計2件)

1. 寺西麻里奈, 谷田部一大, 天野 滋, 中島明敏, 権 海尚, 鈴木允文, 辰巳順一, 林 丈一朗, 申 基喆, 抗菌光線力学療法によるインプラント体表面に付着した歯周病原細菌に対する殺菌効果に対する invitro 研究. 明海歯学, 44(1), 50-61, 2015
2. 小野裕貴, 大西英知, 鈴木允文, 新家央康, 大塚秀春, 林 丈一朗, 申 基喆, 歯肉溝滲出液中の Tannerella forsythia Forsythia Detaching Factor に対する切断酵素活性の治療効果判定への応用. 明海歯学, 44(2), 217-227, 2015

[学会発表](計8件)

1. Hidetomo Onishi, Yuki Ono, Takafumi Suzuki, Noriyuki Kurihara, Akitoshi Nakajima, Hideharu Otsuka, Kitetsu Shin, LYSINE-SPECIFIC ACTIVITY IN GINGIVAL CREVICULAR FLUID AS A POTENTIAL ACTIVITY RESPONSIBLE FOR TANNERELLA FORSYTHIA FORSYTHIA DETACHING FACTOR MODIFICATION, The American Academy of Periodontology (AAP) 100th Anniversary Annual Meeting, San Francisco, USA, September 19-22 2014
2. Hidetomo Onishi, Joichiro Hayashi, Takafumi Suzuki, Kazuhiro Yatabe,

Hideharu Otsuka, Junichi Tatsumi, Kou Ichimura, Kitetsu Shin, "Periodontal biosensor": A pilot study, 141 回日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会, 山形テルサ, 山形県, 山形市, 2014 年 10 月 30-31 日

3. 大塚秀春, 市村 光, 中島明敏, 小野裕貴, 寺西麻里奈, 鈴木允文, 谷田部一大, 林 丈一朗, 申 基喆, 共振型音波歯ブラシの慢性歯周炎患者に対する治療効果 第2報 歯間鼓形空隙の大きさによるプラーク除去効果の評価, 第57回春季日本歯周病学会学術大会, 神戸国際展示場, 兵庫県, 神戸市, 2014 年 10 月 19 日
4. 大西英知, 安井絢子, 小野 裕貴, 鈴木允文, 谷田部一大, 林 丈一朗, 申 基喆, 歯周病検査用バイオセンサーの開発, 平成26年度埼玉歯科医学大会, ホテルプリランテ武蔵野, さいたま市, 埼玉県, 2015 年 2 月 22 日
5. 谷田部一大, 鈴木允文, 安井絢子, 辰巳順一, 申 基喆, 広汎型侵襲性歯周炎患者に対し包括的治療を行い 11 年経過した一症例, 第58回春季日本歯周病学会学術大会, 幕張メッセ, 美浜区, 千葉県, 2015 年 5 月 15-16 日
6. 鈴木允文, 申 基喆, 明海大学型少人数制グループ実習「Vertical Tier」における学生の意識変化と学習効果, 第34回日本歯科医学教育学会総会および学術大会, かごしま県民交流センター, 鹿児島市, 鹿児島県, 2015 年 7 月 10-11 日
7. 鈴木允文, 石井麻紀子, 田中麻衣, 中丸陽一, 渡邊寿邦, 小林之直, 大塚秀春, 谷田部 一大, 申 基喆, 歯周病学教育における明海大学型少人数制グループ実習「Vertical Tier」の効果, 第58回秋季日本歯周病学会学術大会, アクトシティ浜松, 静岡県, 浜松市, 2015 年 9 月 12-13 日
8. 鈴木允文, 小玉治樹, 安井絢子, 石井麻紀子, 谷田部一大, 申 基喆, 歯周病学をテーマとした明海大学型少人数制グループ実習「Vertical Tier」の教育効果, 平成27年度埼玉県歯科医学大会, 浦和ロイヤルパインズホテル, さいたま市, 2016 年 2 月 7 日

[図書](計2件)

1. 鈴木允文, 新田 浩, 月刊糖尿病 歯周病治療の血糖コントロールへの効果, 月刊糖尿病, 医学出版, 東京, 2014, 63, 47-52
2. 鈴木允文, 新田 浩, 月刊「デンタルハイジーン」別冊 Chapter4 ハンドスケーラーとパワー(超音波・エア)スケーラーを使い分けるための基本知識, デンタルハイジーン別冊, 医歯薬出版株式会社,

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

鈴木允文 (TAKAFUMI, Suzuki)

明海大学 歯学部

助教

研究者番号：606038518

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：