

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19587

研究課題名（和文）治療抵抗性口腔疾患に対する革新的抗炎症療法の確立

研究課題名（英文）Development of anti-inflammatory technology for treatment of therapy resistance oral inflammatory disease

研究代表者

齋藤 正寛（Saito, Masahiro）

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40215562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：腸管免疫の破綻により発症する炎症性腸疾患（IBD）は、合併症として根尖性歯周炎、歯周炎等の口腔内炎症性疾患のハイリスクになることが知られている。当該研究ではIBDに根尖性歯周炎（AP）を発症させるIBD-APモデルを用いて、腸炎による顎骨破壊増悪化機構の解析を実施した。その結果、IBDを発症することで顎骨内で既に白血球の浸潤が起きており、IBD-APはAP単独と比較して顎骨内で好中球数が増大し、病変による顎骨破壊が増悪化することが観察された。IBD-APによる骨破壊抑制を目的に、レーザーDDS法で免疫抑制剤を病変部に拡散させる新規抗炎症療法で根尖部の顎骨破壊は抑制できることがわ判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本格的な超高齢社会を迎えた我が国において、健康寿命の延伸を担うための顎口腔機能の維持管理が重要となる。本研究成果は、標準治療では治癒に導くことができない口腔内炎症疾患の治療、ひいては歯を保存するための治療技術確立を目指すものであり、口腔を介した患者のQuality of lifeの向上に寄与することができると考えられる。全身疾患による免疫力低下が歯周病や根尖性歯周炎といった口腔内炎症性疾患においても局所の獲得免疫の暴走が起こり慢性炎症を増悪化する病態機構の解明と、硬組織周囲の炎症に対する薬剤拡散技術を軸とした新規治療技術の開発は、治療抵抗性の獲得機構と治療技術の開発に貢献する。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease (IBD), caused by a breakdown of intestinal immunity, is known to increase the risk of oral inflammatory diseases such as periodontitis. In this study, we used an IBD-AP model, which associates IBD with apical periodontitis (AP), to analyze the mechanism by which enteritis exacerbates jaw bone destruction. The results showed that the IBD-AP model was associated with an increased number of neutrophils in the jawbone compared to AP alone, leading to more severe jawbone destruction. Additionally, we explored a novel anti-inflammatory therapy using laser DDS to diffuse immunosuppressive agents into the lesion. This approach was found to suppress IBD-AP-induced bone destruction effectively, particularly at the root apex.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：根尖性歯周炎 治療抵抗性 キャピテーション 破骨細胞 骨破壊 抗炎症療法 ドラッグデリバリーシステム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

歯周病、根尖性歯周炎に代表される口腔内炎症は、細菌感染に起因する持続的な炎症刺激が原因と捉えられてきた。この炎症が持続すると、歯の支持組織である顎骨の吸収が起こり、最終的には歯の喪失、咀嚼障害を引き起こす。口腔内炎症に対する治療法は、第一義には感染源の徹底的な除去であり、支持組織の崩壊が著しい場合には人工材料による再建が試みられてきたが、全身疾患で活性化されたリンパ球と口腔内炎症疾患の悪化機構に関する研究は行われてこなかった。これまでに、研究代表者はマウス実験の根尖性歯周炎モデルを確立し、口腔内炎症の進展における炎症関連分子の網羅的遺伝子解析およびFACS解析を行ってきた。その結果、根尖部での口腔内細菌の感染でCXCL9,10, CCL5,8の発現が上昇すること、同分子により集積した単球/マクロファージが破骨細胞を活性化することを見いだした。またCXCL9,10受容体のCXCR3のアンタゴニストを投与することにより顎骨の破壊を抑制できることを明らかにした。一方で口腔内に限局した炎症においては、所属リンパ節におけるThサブセットでは変化に乏しく、局所における自然免疫が炎症の主体であるという知見を得ている。一方で、IBD、心血管疾患、自己免疫疾患などの全身疾患を有する患者では、炎症性口腔内疾患の有病率が高く、標準治療による治療が奏効しない治療抵抗性を獲得することが報告されており、単なる細菌刺激に起因する炎症とは説明できない状況になってきている。実際にDDS誘導型大腸炎モデルマウスにて、顎骨内にTh17が蓄積していることを確認しており、根尖性歯周炎を発症させると根尖部の顎骨破壊が亢進されることを確認している。この結果より、定常時における口腔内炎症は主に自然免疫の活性化により生じるが、治療抵抗性の口腔内炎症では全身疾患で活性化された免疫系細胞が顎骨へ移動しており、口腔炎症巣に遊走して局所における単球/マクロファージの持続的な活性化が治療抵抗性の一因となると考えた。すなわち、治療抵抗性の口腔内炎症は、感染源の除去に加え、既に顎骨内に遊走されている免疫細胞の細胞遊走やサイトカイン産生を直接抑制する抗炎症療法の開発が必要になるという仮説である。

本課題で開発するパルスレーザー誘起キャビテーションを応用した抗炎症療法については、既にブタ実験モデルにてレーザー照射による薬剤の能動的移動および拡散が可能なことを明らかにしている。また根管モデルからキャビテーション発生機構も確認できている。これらの研究成果から、同技術により根管および歯肉溝経路で圧力波により薬剤を局所投与するDDS技術の開発計画を立案した。ここまでの研究成果で、本研究では、IBDで活性化された腸管由来T細胞の遊走機構および、口腔内炎症巣の炎症動態を解析することで、全身疾患に伴う口腔内炎症の治療抵抗性獲得の本態を明らかにし、治療標的を検索する。そして、顎骨病変内に分子標的薬の能動的輸送を可能とする革新的治療技術の確立を目指す。

2. 研究の目的

近年口腔と全身の関係について多くの因果関係が明らかにされており、循環器疾患、自己免疫疾患、内分泌疾患などの全身疾患により産生される炎症性サイトカインが炎症の遷延に關与していることが指摘されている。特にヒト最大の免疫組織である腸管免疫の破綻により発症する炎症性腸疾患 (IBD) は、腸のみならず全身の免疫機構の低下を招き、虹彩炎、ぶどう膜炎、強直性脊椎炎、関節炎など全身各所で炎症性病変の発症や増悪化が起こる。口腔内も例外ではなく、標準治療が奏効しない治療抵抗性の炎症となることや、口腔内炎症性疾患がリンパ管を介して腸管におけるTh17の活性化を引き起こすことなど、口腔と全身疾患を繋ぐ臓器間炎症ネットワークに注目が集まっている。我々はこれまでに、定常時における炎症性口腔内疾患における顎骨破壊の進展は、口腔内細菌刺激で活性化された自然免疫により産生されたCXCL9, 10によるマクロファージが病変に動員され、破骨細胞を活性化することにより進展することを明らかにしてきた。一方で、全身疾患によって活性化されたリンパ球が循環して口腔内の顎骨にまで移動するため、口腔内細菌により引き起こされる口腔内炎症疾患は、定常時とよりも獲得免疫を介した破骨細胞の活性化が起こりやすく、顎骨破壊の亢進する事が示唆されている。実際に、IBDモデルマウスに根尖性歯周炎を発症させると、健常マウスと比較して根尖病変による顎骨破壊が促進することを確認している。さらに近年、慢性炎症性疾患における疾患特異的マクロファージの存在に着目が集まり、関節リウマチでは著明な破骨細胞分化能を有するマクロファージサブセットの存在が明らかになるなど、これらが組織破壊を抑制する治療標的となる可能性が示唆されている。以上の状況から我々は、全身疾患を背景にした口腔内炎症疾患は定常時における炎症反応に加えて、全身疾患を背景にしたTh1/Th17の免疫応答の活性化や、治療抵抗性に特異的な疾患マクロファージの誘導・活性化が起こり、この現象が根尖性歯周炎および歯周炎の標準治療が奏効しない治療抵抗性の本態となると考えた。このような治療抵抗性の口腔内炎症性疾患の治療には、単に感染源を除去するだけでは炎症は終結せず、炎症を遷延化させる

細胞遊走やサイトカイン産生を積極的に抑制する抗炎症療法を導入する必要性がある。この仮説を検証するため、本研究ではIBDによる腸管免疫の破綻を背景にして、口腔内炎症疾患を誘導したモデルを使用し、腸管で活性化された免疫細胞のリンパ管を介した口腔内へのホーミングおよび疾患特異細胞集団の細胞遺伝学的検索を通して、口腔と全身を結ぶ臓器間炎症ネットワークの解明および、抗炎症療法のための候補分子標的薬の検索を行う。

3. 研究の方法

実験1 IBD-AP マウスモデルの確立

- (1) デキストラン硫酸ナトリウム水溶液(DSS)をマウスに経口投与することで誘導された大腸ならびに腸間膜リンパ由来のリンパ球をモニターする。DSS誘導大腸炎モデルについては5日投与後15日休薬を1サイクルとして継続して行う。
- (2) DSS誘導大腸炎マウスに実験的根尖性歯周炎、および辺縁性歯周炎を誘導する。根尖性歯周炎は下顎第一臼歯を抜髄、口腔内に開放することで、辺縁性歯周炎は上顎第二臼歯に5-0絹糸を結紮することで誘導する。歯周炎誘導1、3、7、14、21、28、56日後に炎症周囲の顎骨を摘出する。摘出時には、顎骨と合わせて顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓を回収する。
- (3) 摘出組織から、細胞を回収後FACS解析にて、口腔内炎症と顎下リンパ節への遊走の検証、および各Thサブセット(T-bet、GATA3、ROR γ t、Foxp3)の転写因子染色を行う。さらに、単球/マクロファージのサイトカイン染色を合わせて行い、定常時との細胞構成および成熟を比較する。

実験2 治療標的遺伝子の検索

単離した口腔炎症組織から好中球を単離する。RNA-seq解析により、得られた遺伝子プロファイリングより高発現しているサイトカイン、ケモカインを同定し、治療抵抗性口腔内炎症発症を担う、治療標的候補遺伝子のスクリーニングを行う。

実験3 好中球の炎症促進効果のin vitro解析

実験2で単離した好中球の機能解析を行う。好中球の炎症性サイトカイン産生亢進および細胞遊走活性の上昇に与える影響を調べるため、候補分子を腹腔由来マクロファージ細胞に作用させ、リアルタイムPCR(IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α)による炎症性サイトカインの発現の変化と、細胞遊走活性を確認する。

実験4 治療標的遺伝子アンタゴニストの局所応用における治療効果の検証

- (1) 候補治療標的候補遺伝子のアンタゴニストを使用し、口腔内炎症の抗炎症効果の検証を行うため、実験1と同様にDSS誘導大腸炎および根尖性歯周炎、辺縁性歯周炎を惹起する。
- (2) アンタゴニストを根管内または歯肉に注入した後、パルスレーザーを照射し、キャビテーションを応用した局所応用を行う。
- (3) 口腔内炎症に対する局所投与の治療効果の検証のため、マイクロCTによる骨破壊量の定量化、FACS解析による炎症細胞浸潤の構成、および組織学的検索として、HE染色、免疫組織染色を行う。実験4については、実験2の結果が得られた段階で実施を進める。また、パルスレーザーによる局所投与を前提に検討するが、照射条件の設定が困難な場合には、先にアンタゴニストの経口投与による口腔炎症の抑制効果を確認する。

4. 研究成果

近年口腔と全身の関係について多くの因果関係が明らかにされており、循環器疾患、自己免疫疾患、内分泌疾患などの全身疾患により産生される炎症性サイトカインが炎症の遷延に寄与していることが指摘されている。特にヒト最大の免疫組織である腸管免疫の破綻により発症する炎症性腸疾患(IBD)は、全身各所で炎症性病変の発症や増悪化が起こる。口腔内も例外ではなく、標準治療が奏効しない治療抵抗性の根尖性歯周炎となることや、口腔内炎症性疾患がリンパ管を介して腸管におけるTh17の活性化を引き起こすことなど、口腔と全身疾患を繋ぐ臓器間炎症ネットワークに注目が集まっている。このような治療抵抗性根尖性歯周炎の治療には、サイトカイン産生を積極的に抑制する抗炎症療法を導入する必要性がある。本研究ではIBDモデル動物を用いて治療抵抗性根尖性歯周炎モデルを確立し、根尖性歯周炎による顎骨破壊が増悪化することを確認し、この分子メカニズムを解析するためにFACS解析を行った。IBD-APではT-リンパ球、B-リンパ球および単球の増加は観察されず、好中球の増加が観察された。免疫染色で確認するとIBD-APの病変内にLy6G陽性の好中球が集積していることが判明し、一方APにはほぼ存在しなかった。この顎骨における好中球浸潤は興味深いことに、IBDによる腸炎を誘導すること顎骨内で好中球の浸潤が誘導されることが判明した。このことから腸炎による腸内免疫の破綻は、顎骨の好中球の浸潤を誘導し、この状態で根管経由から顎骨内に細菌感染を引き金に、継続的な顎骨破壊を

引き起こすことが判明した。

本課題で出来た IBD 誘導型の治療抵抗性根尖性歯周炎による顎骨破壊の持続的破壊に対する治療技術を社会実装するためには、破壊された顎骨内に分子標的薬を輸送した後に、外部エネルギーによる能動的拡散を必要不可欠とする。本課題ではレーザーを用いて根管内にキャビテーションを発生させる技術開発に成功しており、この技術を応用して根尖孔外に免疫抑制剤を輸送することで、持続的な顎骨破壊を抑制することが判明した。

今後は IBD に誘導される好中球の活性化機構と破骨細胞に及ぼす影響を解明する必要性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 Sato Akiko, Suzuki Shigeki, Yuan Hang, Fahreza Rahmad Rifqi, Wang Xiuting, Nemoto Eiji, Saito Masahiro, Yamada Satoru	4. 巻 24
2. 論文標題 Pharmacological Activation of YAP/TAZ by Targeting LATS1/2 Enhances Periodontal Tissue Regeneration in a Murine Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 970 ~ 970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24020970	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 Umezawa Kouta, Kajiwaru Takako, Ishii Kyoko, Hasegawa Tatsuya, Suzuki Shigeto, Nakano Masato, Sawaguchi Mayu, Venkataiah Venkata Suresh, Yahata Yoshio, Ito Koki, Saiki Yoshikatsu, Saito Masahiro	4. 巻 22
2. 論文標題 A case series describing the risk of periodontal disease in Marfan syndrome patients harboring a possible aortic aneurysm or dissection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	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) 10.1186/s12903-022-02361-5	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 Takedachi Masahide, Sawada Keigo, Sakura Kazuma, Morimoto Chiaki, Hirai Asae, Iwayama Tomoaki, Shimomura Junpei, Kawasaki Kohsuke, Fujihara Chiharu, Kashiwagi Yoichiro, Miyake Akimitsu, Yamada Tomomi, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Saito Masahiro, Kitamura Masahiro, Murakami Shinya	4. 巻 12
2. 論文標題 Periodontal tissue regeneration by transplantation of autologous adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells	5. 発行年 2022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) 10.1038/s41598-022-11986-z	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 Nagahashi Taiji, Yahata Yoshio, Handa Keisuke, Nakano Masato, Suzuki Shigeto, Kakiuchi Yusuke, Tanaka Toshinori, Kanehira Masafumi, Suresh Venkataiah Venkata, Saito Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Er:YAG laser-induced cavitation can activate irrigation for the removal of intraradicular biofilm	5. 発行年 2022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) 10.1038/s41598-022-08963-x	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 Suzuki Shigeto, Venkataiah Venkata Suresh, Yahata Yoshio, Kitagawa Akira, Inagaki Masahiko, Njuguna Mary M, Nozawa Risako, Kakiuchi Yusuke, Nakano Masato, Handa Keisuke, Yamada Masahiro, Egusa Hiroshi, Saito Masahiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Correction of large jawbone defect in the mouse using immature osteoblast-like cells and a 3D polylactic acid scaffold	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	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) 10.1093/pnasnexus/pgac151	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 Nagahashi Taiji, Yahata Yoshio, Handa Keisuke, Nakano Masato, Suzuki Shigeto, Kakiuchi Yusuke, Tanaka Toshinori, Kanehira Masafumi, Suresh Venkataiah Venkata, Saito Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Er:YAG laser-induced cavitation can activate irrigation for the removal of intraradicular biofilm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08963-x	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 Yahata Yoshio, Handa Keisuke, Ohkura Naoto, Okamoto Motoki, Ohshima Jun, Itoh Shusaku, Kawashima Nobuyuki, Tanaka Toshinori, Sato Nobuya, Noiri Yuichiro, Hayashi Mikako, Okiji Takashi, Saito Masahiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Autologous concentrated growth factor mediated accelerated bone healing in root-end microsurgery: A multicenter randomized clinical trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 377 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2023.08.006	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 Uematsu Takehiro, Yahata Yoshio, Ohnishi Koyuki, Suzuki Shigeto, Kanehira Masafumi, Tanaka Toshinori, Sudo Susumu, Suresh Venkata Venkataiah, Saito Masahiro	4. 巻 49
2. 論文標題 Irrigation with reduced sodium hypochlorite solution concentration using laser induced cavitation is effective and safe in rat intraradicular biofilm model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Australian Endodontic Journal	6. 最初と最後の頁 544 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aej.12783	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中野 将人, 齋藤 正寛, 八幡 祥生, Venkataiah Venkata Suresh, 原田 芙太巴
2. 発表標題 炎症性腸疾患による根尖性歯周炎の顎骨破壊増悪化機構の解析
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Saito
2. 発表標題 Exacerbation mechanism of alveolar bone destruction in apical periodontitis caused by inflammatory bowel disease.
3. 学会等名 JADR（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Masato Nakano, Yukinori Tanaka, V. Venkata Suresh, Risako Nozawa, Shigeto Suzuki, Yoshio Yahata & Masahiro Saito
2. 発表標題 Immunosuppressants DDS technology for Improving IBD induced Jawbone destruction
3. 学会等名 IADR2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 液体薬剤、液体薬剤輸送装置、及び液体薬剤輸送方法	発明者 八幡祥生、齋藤正寛、祖山均	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022- 49927	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	八幡 祥生 (Yahata Yoshio) (30549944)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	田中 志典 (Yukinori Tanaka) (60637958)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	祖山 均 (Soyama Hitoshi) (90211995)	東北大学・工学研究科・教授 (11301)	

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