

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11556

研究課題名(和文) 歯根端切除後の周囲組織の治癒を促す神経ペプチドの同定

研究課題名(英文) Examination of the distribution of nerve fibers within the periodontal tissue in induced rat apicoectomy.

研究代表者

橋口 勇 (Hashiguchi, Isamu)

九州大学・歯学研究院・准助教

研究者番号：10150476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの下顎右側第一臼歯の類側根根尖に骨窩洞を形成し歯根端切除を行った群においては、処置によって切断された神経線維は発芽伸長するが、その局在は骨窩洞周囲に限局しており骨窩洞内への伸展は見られなかった。一方、ラミニン陽性の血管と思われる筒状の構造物は骨窩洞内や幼若な新生骨の近傍に見られ、また骨の成熟後も骨の周囲に存在していた。これらの結果から、この実験系においては神経線維と骨形成の間に密接な関連は認められず、新生血管が深く修復に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性根尖性歯周炎の治療法の一つである歯根尖切除術後に生じる骨の形成添加等の治癒に、ペプチド含有神経線維が直接的関わっているという所見を得ることはできなかった。今回の系では、ラミニン陽性の血管が骨の形成添加時に骨窩洞内に認められたことから、骨修復には血管新生が重要な役割を担っていることが示唆された。このことから、歯根尖切除術の際にはVEGF (vascular endothelial growth factor) のような血管新生を促進する薬理作用を有する薬剤の応用がより速やかな治癒へとつながる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The central-buccal root apices of the right first molars of the rats were resected with a 0.7 mm dental fissure bur from the surface of the buccal alveolar bone. After the operation, sprouted calcitonine gene related peptide(CGRP)-immunoreactive(IR) nerve fibers were observed around, but not within, the bone cavity. In contrast, laminin-IR structures, which were tubular in shape, were observed within the bone cavity at 3days after the operation, and also were recognized near the newly formed bone at 1week after the operation. Taken these findings into consideration, vascularization may play important role in the tissue repair after the preparation of the bone cavity.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯根尖切除 神経線維 骨修復 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経ペプチドは伝達物質として作用するのみでなく、血管拡張や炎症性細胞の誘導などの生理活性を有していることが知られており、骨や骨周囲組織にも神経ペプチド含有神経が存在している。MC3T3E1細胞を用いた *in vitro* の系では、神経ペプチドによって破骨細胞形成因子である RANKL 発現が低下し、逆に破骨細胞抑制因子である OPG 発現の上昇がみられることが報告されている¹⁾。また、神経ペプチドは幹細胞の増殖や骨芽細胞への分化ならびに骨芽細胞の増殖を促進し、一方で、骨芽細胞のアポトーシスや破骨細胞の機能の抑制を行うことも報告されており^{2, 3)}、神経ペプチドと骨系細胞との間には密接な関連があることが明らかになってきている。

歯周組織にも神経ペプチド含有神経は多く存在しており、下歯槽神経を切断したラットに実験的歯槽骨欠損を惹起した系では、神経切断をしていない対照群に比べて歯周組織の神経ペプチドの発現量が減少し、同時に歯槽骨再生も低下していた⁴⁾。マウスにおける抜歯後の治癒経過を観察した研究でも、神経ペプチドが骨修復に関与していることが報告されている⁵⁾。また、ラットに実験的に惹起した根尖性歯周炎において、神経ペプチドが組織修復に深く関与していることが報告されている⁶⁾。これらのことから、歯周組織においても神経ペプチドが歯槽骨の再生に深く関与していることが示唆される。

しかしながら、当時渉猟した限り歯根端切除術後の組織修復過程における神経ペプチドの影響について明らかにした報告はなく、伸長・再生した神経線維から放出される神経ペプチドが損傷した骨組織の修復あるいは切断歯根と再生歯槽骨間に存在する歯根膜組織形成に関与しているのか不明なまま残されていた。

2. 研究の目的

歯根尖切除術によって損傷した神経ペプチド含有神経が発芽・伸長や再生を行うことで、損傷した骨組織の修復あるいは切断歯根と再生歯槽骨間に存在する歯根膜組織形成に関与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

ウィスター系ラットの右側下顎第一臼歯中央頰側根根尖相当部に骨窩洞を形成し、左側下顎第一臼歯は無処置のまま対照群とする。骨窩洞形成法の概略としては、右側下顎頰部の皮膚と筋肉に切開を加え剥離翻転後、骨膜弁上から下顎第一臼歯中央根根尖に向けてフィッシャーバーを注水下に約 1 mm の深さまで顎骨内に挿入し、骨窩洞を形成する。窩洞内を生理食塩水で洗浄後、剥離した皮膚・筋肉を復位し縫合する。骨窩洞形成後 3 日、1、2、4 週目に、PLP 固定液を用いた灌流固定後下顎第一臼歯を含む顎骨を採取し、続けて同液中で浸漬固定を行う。脱灰後、通法に従い約 5 μm の凍結ならびにパラフィン切片を作製し、免疫染色を行う。なお、一部の試料では厚さ約 30 μm の凍結切片を作成し、free floating 法で免疫染色および酵素組織学的検索を行う。一次抗体として、抗 CGRP 抗体、抗ラミニン抗体、抗 PCNA (増殖細胞核抗原) を用いて SABC 法にて免疫染色を行った。

4. 研究成果

無処置の対照群では CGRP 陽性の神経線維は歯槽骨から歯根膜中に入り一部は歯髄内に、また一部は歯根膜内に入り主として歯槽骨寄りに認められたが、歯槽骨吸収は認められなかった。ラットの下顎右側第一臼歯の頰側根根尖に骨窩洞を形成し歯根端切除を行った群においては、処置後 3 日では骨窩洞内に歯槽骨や象牙質削片周囲を取り囲むように肉芽組織が認められた。骨窩洞下方の残存歯根膜から神経線維の発芽伸長があったが骨窩洞内には到達していなかった。処置後 1 週では、骨窩洞内には幼弱な骨組織が形成されており、歯根断端との間に繊維成分の少ない結合組織が観察された。神経線維は新生骨を迂回するように伸長しており、新生骨周囲には認められなかった。処置後 2 週経過例では、骨窩洞に形成された骨組織は成熟していたが、神経線維はその数が減少しており、主として歯槽骨に近接した歯根膜中に観察された。これらの結果から、この実験系では神経線維と骨形成の間に明確な関係を示すことはできなかった。ラミニン陽性の筒状構造物は処置後 3 日では骨窩洞内に多く認められ、処置後 1 週経過例でも骨の添加形成とともに新生骨周囲へと局在が変化していた。また、処置後 2 週においても、ラミニン陽性の筒状構造物は新生結合組織と歯根断端周囲の既存の歯根膜組織では多いままであった。ラミニン陽性の筒状構造物は血管の基底膜と考えられることから、骨窩洞の骨添加や新生結合組織の形成には、血管の再生が重要であることが示唆された。骨窩洞形成時に血管を損傷することより骨窩洞内においては低酸素症が生じることが考えられる。低酸素症の環境下では骨形成が促進されるという報告があることから、循環障害が骨形成に影響を及ぼす可能性について検討を行ったが、低酸素誘導因子 1 の局在を確認することが出来なかった。本研究においては、骨窩洞形成時の修復形成に神経線維の直接的な関与を示すことはできなかった。

< 引用文献 >

- 1) Yoo Y.M., et al. Effects of Neuropeptides and Mechanical Loading on Bone Cell Resorption *in Vitro*. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 2014, 5874-5883.

- 2) Liang W., et al. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation and osteogenic differentiation of osteoporotic rat-derived bone mesenchymal stem cells. *Mol. Cell Biochem.*, 402, 2015, 101-110.
- 3) Mrak E., et al. Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Inhibits Apoptosis in Human Osteoblasts by b-Catenin Stabilization. *J.Cell. Physiol.*, 225, 2010, 701-708.
- 4) Yu X., et al. Expression of neuropeptides and bone remodeling-related factors during periodontal tissue regeneration in denervated rats. *J. Mol.Hist.*, 46, 2015, 195-203.
- 5) Pang P., et al. Expression pattern of sonic hedgehog signaling and calcitonin Gene related peptide in the socket healing process after tooth extraction. *Biochem Biophys Res Commun.*, 467, 2015, 21-26.
- 6) Toriya Y., et al. Immunohistochemical examination of the distribution of macrophages and CGRP-immunoreactive nerve fibers in induced rat periapical lesions. *Endod.Dent.Traumatol.*, 13, 1997, 6-12.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	前田 英史 (maeda hidefumi) (10284514)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	濱野 さゆり (hamano sayuri) (40757978)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	