

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02975

研究課題名(和文)メカノバイオロジー破綻による新規歯周組織破壊機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of novel tissue destruction mechanism induced by mechanobiology breakdown

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は機械的外力が結合組織疾患発症に及ぼす影響を調べるため、組織強度を調整する弾性線維の重合調節因子であるADAMTSL6欠損マウスを作製した。ADAMTSL6は弾性繊維形成の中心となるfibrillin-1の重合を促進する細胞外マトリックス因子である。ADAMTSL6はalphaとbetaの2つの型があり、alphaノックアウトは胎生致死でbetaノックアウトは成長することを確認した。ADAMTSL6betaの結合組織炎症の影響を調べるため根尖性歯周炎モデルを実施したところ、明らかに骨破壊を促進した。この結果より弾性線維の強度低下が結合組織疾患を引き起こす可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は機械的外力が病気の発症に係るかを調べた研究である。機械的外力の低下で発症する病気の代表例で解離性大動脈瘤が知られているが、歯科領域でも歯周病、根尖性歯周炎などの炎症性疾患の原因になりことが報告されてきた。しかし機械的外力がどのように体内で調整され、病気に関わるかは全く不明であった。本研究では人為的に機械的強度を弱めた実験モデルを用いて顎骨破壊が促進することを証明した。これらの成果により機械的強度の維持を目指した治療が病気予防に重要な働きをすることが示された。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the effect of mechanical force on the development of connective tissue disease, we generated ADAMTSL6-deficient mice, which are polymerization regulators of elastic fibers that play a critical role for regulating tissue strength. ADAMTSL6 is an extracellular matrix that promotes the polymerization of fibrillin-1 microfibril, which is essential to elastic fiber formation. ADAMTSL6 has two types, alpha and beta, and that alpha knockout mice is embryonic lethality and beta knockout mice able to survive. An apical periodontitis model was performed to investigate if ADAMTSL6 beta knockout mice the effects of connective tissue disease. Result indicated that ADAMTSL6 beta knockout mice clearly induced bone destruction in this model. From these result, reduction of elastic fibers strength may cause connective tissue disease.

研究分野：歯科

キーワード：細胞外マトリックス 結合組織 炎症 弾性線維

## 1. 研究開始当初の背景

近年、メカニカルストレスが幹細胞の運命決定を制御していることが報告され(Plusa et al, Nature, 2016)、幹細胞から骨芽細胞分化に関しては、Engler らによって 2006 年にメカニカルストレスが必須であることが報告された。このようにメカニカルストレスを考慮したメカノメディンに関して、再生医療にも応用されるようになったが、メカニカルストレスの破綻がアンジオテンシン経路の活性化を介して解離性大動脈瘤を引き起こすことが報告されている。弾性機能の低下により様々な結合組織が病的破壊による機能不全に陥ることから、機械的強度の中心的な役割を果たす細胞外マトリックスによるメカノバイオロジー機構の破綻が結合組織疾患の発症の本質的役割を果たしていることが考えられる。本研究では、機械的外力低下で活性化される細胞内シグナル機構と活性化される組織破壊因子を同定する。これらの研究成果を元に、これまで不明であったメカノバイオロジー破綻で発症する歯周炎と大動脈疾患の新たな病因論の構築が期待できる。

## 2. 研究の目的

歯周組織は常にメカニカルストレスにさらされており、適性な“外力”が恒常性維持及び創傷治癒において重要な役割を果たしている。細胞外マトリックス(ECM)がメカニカルストレスに対応する事は分かっているが、どのように“外力”が細胞応答に影響を及ぼすかは不明な点が多い。近年、生体に加わる力の役割を解明するメカノバイオロジーの理解が進み、ECM 形成不全による機械的強度の低下が、様々な結合組織疾患を引き起こす事が示された。中でも、マルファン症候群では弾性力を担う ECM の機能低下により、歯周炎、解離性大動脈瘤を含む様々な結合組織疾患を引き起こす。この事は ECM が制御するメカノバイオロジーの破綻が、歯周炎を含む結合組織疾患発症の原因になる事を示している。そこで本研究は、マルファン症候群をモデルにメカノバイオロジー破綻が引き起こす結合組織疾患発症機構を解明し、歯周炎と大動脈疾患において普遍的に働く新規疾患生物学の解明に挑む。

## 3. 研究の方法

現在メカノバイオロジーに関して、細胞外マトリックスが司る機械的強度を細胞がインテグリン受容体を介して細胞骨格であるアクチン線維が感知すると考えられている。全身の細胞外マトリックスの強度が低下すると、口腔、循環器、骨、呼吸器等の機械的外力の負担の大きい組織で破壊の活性化が起こる。本研究では機械的外力を調整する細胞外マトリックスである ADAMTSL6 のノックアウトマウスを用いて結合組織疾患発症に及ぼす影響を解析する実験計画を立案した。

### 1. ADAMTSL6KO マウスを用いた歯周組織破壊機構の解析

ADAMTSL6KO マウスを作製し、組織破壊が改善するかを確認する。具体的には結紮系を用いた根尖性歯周炎モデル実験をおこない歯周組織の創傷治癒遅延が改善されるかを検証する。

### 2. ADAMTSL6 による破壊シグナルの解析と抗体医療技術の開発

ADAMTSL6 をノックアウト(KO)することで組織破壊が促進した場合は、メカノバイオロジー破綻で活性化される破壊シグナル(アクチン-YAP/TAZ 経路)との関連性を解析する。また ADAMTSL6 の阻害抗体を開発し、根尖性歯周炎に対する予防効果を検証する。

## 4. 研究成果

ADAMTSL6alphaとbetaのノックアウトマウスの解析を行った。ADAMTSL6alpha<sup>-/-</sup>マウスは胎生致死、ADAMTSL6beta<sup>-/-</sup>は生まれることがわかった。そのためADAMTSL6alpha<sup>+/-</sup>およびbeta<sup>+/-</sup>を用いて、結合組織疾患に及ぼす影響を解析した。この目的にマウス根尖性歯周炎モデルを用いた。このモデルを用いて、根尖性歯周炎を発症させるとケモカインであるCXCL9の発現が上昇し、それに伴いマクロファージの浸潤と破骨細胞の活性化を引き起こしていることを事前に確認した。このモデルを用いてADAMTSL6alpha<sup>+/-</sup>およびbeta<sup>+/-</sup>における根尖部における骨破状況を解析した。その結果ADAMTSL6beta<sup>+/-</sup>において野生型マウスおよびADAMTSL6alpha<sup>+/-</sup>と比較して、有意に骨欠損を伴う病変が増大する事がわかった。マイクロCTによる画像解析により病変において骨吸収が促進していることを見出した。この骨破壊メカ

ニズムを調べるため、野生型マウスを用いて根尖性歯周炎を実施して、炎症性サイトカインの発現を解析したところ、骨破壊に関わるIL-1, CXCL-9が顕著に情報することが判明した。このときに根尖部で起こる炎症変化を観察したところ、最初にLy6Gを中心とするリンパ球の浸潤が起こり、しかし2週間後にはこれらの細胞はなくなりmac2を中心とするマクロファージの浸潤することが判明した。このマクロファージがCXCL9を発現することから、ケモカインを中心とした骨破壊機構の存在が示唆された。そこでCXCL9を中心とするケモカインの骨破壊機構を解析するため、その受容体であるCXCR3の阻害剤を用いて根尖性歯周炎による骨破壊を抑制できるかを解析した。その結果、対照群と比較して優位にCXCR3阻害剤は根尖部の骨破壊を抑制することが確認できた。この結果から、CXCL9による直接的な破骨細胞の活性化あるいはマクロファージ活性化を介した骨破壊の促進が骨破壊に間葉する可能性が示された。そこで、破骨細胞分化誘導実験およびマクロファージを用いた細胞遊走試験および活性化試験を行った結果、破骨細胞分化誘導には影響を及ぼさず、マクロファージの遊走と炎症性サイトカインの発現を上昇させて、破骨細胞を活性化させて骨破壊を促進させることがわかった。この結果より、ケモカインを標的とした治療技術の開発が根尖性歯周炎による骨破壊抑制に有効であることが判明した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 SATO Nobuya, HANDA Keisuke, VENKATAIAH Venkata Suresh, HASEGAWA Tatsuya, NJUGUNA Mary M., YAHATA Yoshio, SAITO Masahiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Comparison of the vertical bone defect healing abilities of carbonate apatite, $\beta$ -tricalcium phosphate, hydroxyapatite and bovine-derived heterogeneous bone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 309~318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2019-084	査読の有無 有
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 Venkataiah Venkata Suresh, Handa Keisuke, Njuguna Mary M., Hasegawa Tatsuya, Maruyama Kentaro, Nemoto Eiji, Yamada Satoru, Sugawara Shunji, Lu Lu, Takedachi Masahide, Murakami Shinya, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Saito Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose Tissue Derived Multi-Lineage Progenitor Stem Cells in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37528-0	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 Hasegawa Tatsuya, Venkata Suresh V., Yahata Yoshio, Nakano Masato, Suzuki Shigeto, Suzuki Shigeki, Yamada Satoru, Kitaura Hideki, Mizoguchi Itaru, Noiri Yuichiro, Handa Keisuke, Saito Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of the CXCL9-CXCR3 axis suppresses the progression of experimental apical periodontitis by blocking macrophage migration and activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82167-7	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 Handa Keisuke	4. 巻 28
2. 論文標題 Effect of Antiseptic Agents on the Surface Microhardness of Calcium Silicate-Based Materials	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Journal of Scientific & Technical Research	6. 最初と最後の頁 21350-21356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26717/BJSTR.2020.28.004610	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 Wang Zhuyu, Maruyama Kentarou, Sakisaka Yukihiro, Suzuki Shigeki, Tada Hiroyuki, Suto Mizuki, Saito Masahiro, Yamada Satoru, Nemoto Eiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Cyclic Stretch Force Induces Periodontal Ligament Cells to Secrete Exosomes That Suppress IL-1 Production Through the Inhibition of the NF- B Signaling Pathway in Macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01310	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 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 鈴木重人、Mary M Njuguna, Suresh V Vencata, 中野将人、八幡祥生、半田慶介、齋藤正寛
2. 発表標題 臨床応用を目指した歯槽骨由来未分化骨芽細胞の分離培養システム構築
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八幡祥生、鈴木重人、Mary M Njuguna, Suresh V Vencata、半田慶介、齋藤正寛
2. 発表標題 未分化骨芽細胞と3次元ポリ乳酸複合体を用いた歯槽骨再生医療の開発
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yahata Y, Tanaka T, Handa K, V. Venkataiah S, Kanehira M, Hasegawa T, Noiri Y, Saito M
2. 発表標題 Establishment of experimental intraradicular biofilm model for irrigation techniques evaluation in pigs.
3. 学会等名 European Society of Endodontology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Hasegawa T, Handa K, Yahata Y, Tanaka T, V.Venkataiah S, Njuguna M, Noiri Y, Saito M
2 . 発表標題 Global gene expression analysis of immunological responses during the development of apical periodontitis model in mice.
3 . 学会等名 European Society of Endodontology ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 V. VENKATA Suresh, Keisuke HANDA, Masahide TAKEDACHI, Shinya MURAKAMI, Hanayuki OKURA, Akifumi MATSUYAMA and Masahiro SAITO
2 . 発表標題 In vivo periodontal tissue regeneration by allogenic transplantation of adipose-tissue derived multi-lineage progenitor cells
3 . 学会等名 96th General session and exhibition of the IADR ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Venkata Suresh Venkatatiah , Keisuke HANDA , Masahide TAKEDACHI , Shinya MURAKAMI , Hanayuki OKURA , Akifumi MATSUYAMA , Masahiro SAITO
2 . 発表標題 Regeneration of Periodontal Tissue by Allogeneic Transplantation of Adipose tissue Derived Multi-lineage Progenitor Cells
3 . 学会等名 5th TERMIS world congress-2018 Kyoto ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Masahiro SAITO1, V. Venkata Suresh1, Keisuke HANDA, Masahide TAEKDACHI, Hanayuki OKURA, Akifumi MATSUYAMA and Shinya MURAKAMI
2 . 発表標題 Periodontal tissue regeneration ability of adipose tissue derived multilineage progenitor cells upon allogeneic transplantation
3 . 学会等名 5th TERMIS world congress-2018 Kyoto ( 招待講演 ) ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Mary Muthoni Njuguna , Venkata Suresh VENKATAIAH , Tatsuya HASEGAWA , Keisuke HANDA , Masahiro SAITO
2. 発表標題 Best fraction of isolated pig immature alveolar osteoblasts for use in periodontal bone defect regeneration therapy
3. 学会等名 5th TERMIS world congress-2018 Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川達也、半田慶介、田中利典、矢島健大、野杕由一郎、齋藤正寛
2. 発表標題 マウスモデルを用いた根尖性歯周炎発症過程の解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会 (第149回)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 村上伸也・網塚憲生・齋藤正寛・松本卓也	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 334
3. 書名 歯科再生医学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>むし歯による顎骨破壊の原因を解明 ―抗ケモカイン療法による顎骨破壊の抑制―  <a href="https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/02/press20210205-01-tooth.html">https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/02/press20210205-01-tooth.html</a>          虫歯菌の顎骨破壊 メカニズム解明  <a href="https://www.niigata-nippo.co.jp/news/national/20210315604204.html">https://www.niigata-nippo.co.jp/news/national/20210315604204.html</a>          東北大・新潟大・神奈川歯科大、むし歯による顎骨破壊の原因を解明  <a href="https://www.nikkei.com/article/DGXLRSP604670_V00C21A2000000/">https://www.nikkei.com/article/DGXLRSP604670_V00C21A2000000/</a></p>
--

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	吉田 恭子 (今中恭子)  (Yoshida Kyoko)  (00242967)	三重大学・医学系研究科・准教授    (14101)	
研究分担者	山田 聡  (Yamada Satoru)  (40359849)	東北大学・歯学研究科・教授    (11301)	
研究分担者	半田 慶介  (Handa Keisuke)  (40433429)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授    (32703)	

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