

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10127

研究課題名(和文) 神経関連分子を応用した歯周組織再生過程の活性化

研究課題名(英文) Activation of the regenerative process of periodontal tissue by elucidating the function of nerve-related molecules

研究代表者

三木 康史(MIKI, Koji)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：10598395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、CGRP刺激が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進することが明らかとなった。また、マウス絹糸結紮歯周炎モデルを用いた実験結果より、歯周組織の創傷治癒過程でCGRP発現が変動し、そのCGRPシグナルが歯槽骨の回復に重要であることが示唆された。よって、CGRPは歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促し、歯槽骨とセメント質のリモデリングに関与し、歯周組織における恒常性維持を担うとともに、炎症時には歯根膜においてその発現が上昇し、組織の修復に寄与している可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CGRPは歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促し、歯槽骨とセメント質のリモデリングに関与し、歯周組織における恒常性維持を担うとともに、炎症時には歯根膜においてその発現が上昇し、組織の修復に寄与している可能性が示唆される。本研究結果は、歯根膜における神経が従来知られてきた末梢における感覚受容のみならず、歯周組織の恒常性維持や組織修復に重要な機能を果たしていることを示唆するものである。本研究結果は、CGRPの制御に基づく新規の歯周組織再生療法の開発につながるものとして期待される。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that CGRP stimulation promotes the differentiation of periodontal ligament cells into hard tissue-forming cells. In addition, experiments using a mouse model of periodontitis with silk thread ligation suggested that CGRP expression fluctuates during wound healing of periodontal tissues and that the CGRP signal is important for alveolar bone recovery. Thus, CGRP promotes the differentiation of periodontal ligament cells into hard tissue-forming cells, is involved in the remodeling of alveolar bone and cementum, and plays a role in maintaining homeostasis in periodontal tissues.

研究分野：歯周治療学

キーワード：CGRP 歯根膜神経 RAMP-1 神経ペプチド 歯周組織再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、セメント質と歯槽骨間に介在するコラーゲン線維に富む非石灰化の結合組織であり、歯を支持・固定する役目を担っている。また、歯根膜は、多様な細胞成分を含み、歯槽骨、セメント質および結合組織のリモデリングを行い、歯周組織の恒常性維持を担っている。さらに、歯根膜中には多分化能を示す間葉系幹細胞の性質を保持した細胞が存在し、これらの細胞が歯周組織における創傷治癒や再生において重要だとされている。

一方で、歯根膜は、豊富な感覚神経支配を受け、咬合時の感覚受容器としても機能している。神経細胞は、感覚受容器で受け取った刺激を中枢神経に、中枢の指令を末梢に電気的な信号として伝える機能を持つが、そのみならず、神経細胞自身も神経ペプチドを産生・分泌し、その生理活性により、周囲の組織の活動を制御する機能も有している。従って、末梢神経終末から分泌される神経ペプチドは、歯周組織の炎症制御、組織の修復・再生に何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) は、カルシトニン遺伝子を選択的スプライシングして作られる 37 個のアミノ酸からなる神経ペプチドで、強力な血管拡張作用を示し、炎症時には同ペプチドの合成が促進されると考えられている。歯周組織における CGRP は三叉神経節で生成され末梢神経終末より分泌されることが知られているが、歯根膜には CGRP を含む神経が多く存在することや、実験的な歯の移動が CGRP を含む神経線維に影響を与えること、CGRP 欠損マウスでは骨折治癒が障害されるなどの興味深い報告がなされている。しかしながら、歯周組織における CGRP 依存性の骨代謝に関する報告は少ない。そこで本研究では、歯周組織における CGRP の機能を解明することを目的として、歯周組織再生の中心を担う歯根膜細胞に対する CGRP の機能を検討し、さらにマウス絹糸結紮歯周炎モデルを用いて歯周組織の創傷治癒過程における CGRP の機能を検討した。

3. 研究の方法

本研究では、当研究室で樹立した硬組織形成細胞への分化能を有するマウス歯根膜細胞株 MPDL22 を用いた。

(1) 歯根膜における CGRP 受容体の発現は以下の方法で検討した。CGRP 受容体の構成要素である RAMP1、CLR、RCP の MPDL22 における発現について、同細胞の RNA から作製した cDNA および全細胞画分を用いてそれぞれ RT-PCR および、Western Blotting を行った。また、RAMP1 のマウス歯根膜中での発現について、マウス上顎臼歯の脱灰・凍結切片を作製して、抗 RAMP1 抗体による免疫染色を行った。

(2) CGRP が歯根膜細胞の増殖に及ぼす影響は以下の方法で検討した。すなわち、MPDL22 を 6 穴細胞培養プレートに 1.0×10^5 個/well となるよう播種し 24 時間の通常培養をした後、48 時間のスタベーションを行い、CGRP ($0 \sim 10^{-8}$ M) 存在下で、さらに 10%FCS、1%FCS、0.1 ng/ml FGF-2 の有無という条件を追加した培地へ交換し、さらに 48 時間後に、トリパンブルー染色を用いて細胞数の計測を行った。

(3) MPDL22 の硬組織形成細胞への分化誘導時における CGRP の影響は以下の方法で検討した。すなわち、MPDL22 を播種しコンフルエントまで培養した後、石灰化誘導培地 (10%FCS、10mM -glycerophosphate、50 μ g/ml ascorbic acid 含有 -MEM) において同細胞を CGRP ($0 \sim 10^{-10}$ M) 存在下で培養し、0、3、6、9、12 日目に RNA を回収し、Real-time PCR により CGRP 受容体の遺伝子および石灰化関連遺伝子の発現の解析を、石灰化誘導 18 日目にアリザリンレッド染色にて石灰化ノジュール形成の評価を行った。

(4) 歯周組織の破壊・治癒過程における CGRP の発現動態は、マウス絹糸結紮歯周炎モデルを用いて検討した。すなわち、8 週齢 BALB/c 野生型 (WT) マウスの上顎第二臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、7 日間飼育した後に絹糸の除去を行い、除去後さらに 7 日間飼育し、0、3、7、10、14 日目に上顎骨の μ CT 撮影および組織の採取を行った (n=5)。得られた組織から脱灰・凍結切片を作製し、HE 染色と、抗 CGRP 抗体による免疫染色を行い組織学的に解析した。

(5) *Ramp1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの歯槽骨の破壊と治癒の比較は以下の方法で行った。すなわち、*Ramp1* 遺伝子欠損マウスを用いて上記と同様の実験を行い、得られた μ CT 画像を用いて WT マウスとの比較を行った。

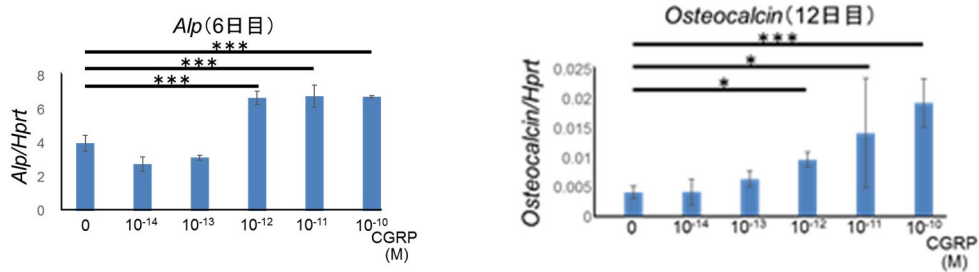
4. 研究成果

(1) MPDL22 およびマウス歯根膜において恒常的な CGRP 受容体の遺伝子およびタンパクの発現を認めた。

(2) MPDL22 の細胞増殖に対する CGRP の有意な影響は認めなかった。

(3) CGRP 非存在下で硬組織形成細胞へ分化誘導した MPDL22 において、3 日目に CGRP 受容体の発現が有意に上昇した。また、CGRP 刺激により MPDL22 において石灰化関連遺伝子 (オステリックス、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン) の有意な発現上昇を認めるとともに、

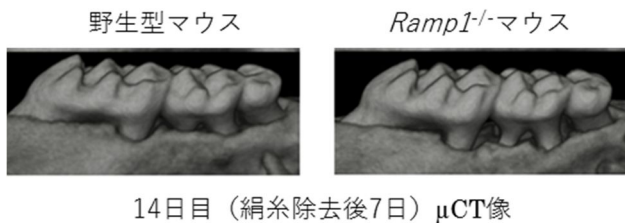
有意な石灰化ノジュールの形成促進を認めた。



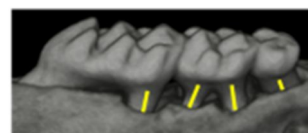
(4) マウス絹糸結紮歯周炎モデルにおいて、結紮3日目に急速な歯周組織破壊が誘導され、結紮部直下の歯根膜に顕著な炎症細胞浸潤および、CGRP陽性神経線維の消失を認めた。その後、結紮7日目には炎症部におけるCGRP陽性神経線維の顕著な増加・集積を認め、結紮10、14日目にかけて、歯周組織の治癒・再生が進むとともに、増加していたCGRP陽性神経線維は減少し、ほぼ生理的な分布へ戻った(図1)。

(5) マウス臼歯絹糸結紮歯周炎モデルにおいて、*Ramp1*遺伝子欠損マウスはWTマウスと比較し、絹糸除去後の歯槽骨の回復に遅延を認めた。

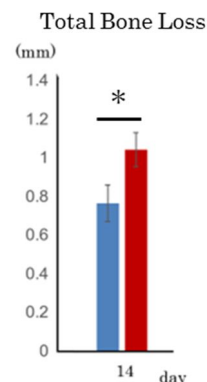
A. 結紮14日目の野生型マウス、*Ramp1*^{-/-}マウスのμCT像。



B. 黄色線で示したように、上顎第一臼歯の遠心根、上顎第二臼歯の近心根・遠心根、上顎第三臼歯の近心根の4根について、根中央部のセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの距離を計測し、その合計をTotal Bone Lossとして評価した。

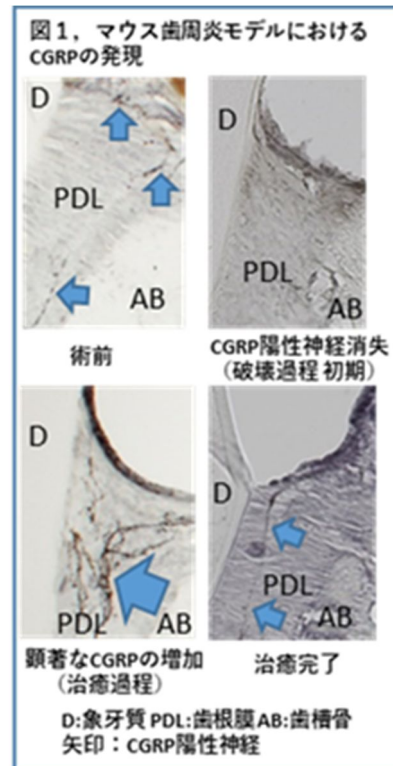


C. 14日目における野生型マウス、*Ramp1*^{-/-}マウスのTotal Bone Lossをグラフに示した(青:野生型マウス、赤:*Ramp1*^{-/-}マウス、n=5、*:P<0.001)。



本研究により、CGRP刺激が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進することが明らかとなった。また、マウス絹糸結紮歯周炎モデルを用いた実験結果より、歯周組織の創傷治癒過程でCGRP発現が変動し、そのCGRPシグナルが歯槽骨の回復に重要であることが示唆された。よって、CGRPは歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促し、歯槽骨とセメント質のリモデリングに関与し、歯周組織における恒常性維持を担うとともに、炎症時には歯根膜においてその発現が上昇し、組織の修復に寄与している可能性が示唆される。

本研究結果は、歯根膜における神経が従来知られてきた末梢における感覚受容のみならず、歯周組織の恒常性維持や組織修復に重要な機能を果たしていることを示唆するものである。本研究成果は、CGRPの制御に基づく新規の歯周組織再生療法の開発につながるものとして期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹下登、三木康史、山下元三、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 歯根膜細胞の分化過程におけるCGRPの機能解析
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹下登、三木康史、山下元三、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 歯周組織の破壊・治癒過程におけるCGRPの機能解析
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔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	北村 正博 (KITAMURA Masahiro) (10243247)	大阪大学・歯学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	柏木 陽一郎 (KASHIWAGI Yoichiro) (20598396)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	

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
---------	---------