

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10232

研究課題名（和文）メトホルミンは顎堤吸収を阻止する

研究課題名（英文）Can metformin prevent alveolar bone resorption?

研究代表者

金山 圭一（Kanayama, Keiichi）

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：20454275

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：先行研究から炎症性骨吸収や歯周治療に対して、歯肉へのメトホルミン(MT)局所投与の有効性が明らかになっている。本研究では、歯槽骨吸収の予防に歯肉へのMT局所投与が有効かどうか明らかにすることを目的とした。加齢マウス歯肉へのMTの局所投与は、歯肉結合組織のコラーゲン代謝に影響しコラーゲン線維量の維持に働くことが示された。絹糸結紮前のMT局所投与により、加齢マウス実験的歯周炎の発症過程で生じる炎症と骨吸収を抑制し、TRAP陽性細胞数も減少していた。以上の結果から、歯肉へのMT局所投与が高齢者の歯周炎の発症予防に有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、薬剤による顎堤吸収予防の基礎的な知見となる。メトホルミンの有効性が明らかになれば、メンテナンス来院時に、顎堤保全のため薬剤を予防投与するという制御医療のあり方を社会に提示できる。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have demonstrated the efficacy of topically administered metformin in the gingiva for inflammatory bone resorption and periodontal treatment. However, there have been no attempts to prevent the onset or progression of periodontitis with metformin. In this study, we aimed to clarify whether topical metformin administration to the gingiva is effective in preventing alveolar bone resorption. It was suggested that topical metformin administration in the gingival tissues may also suppress the underlying inflammation caused by aging. Topical metformin administration suppressed inflammation and bone resorption during the development of experimental periodontitis in aged mice, and also reduced the number of TRAP-positive cells. These results suggest that topical metformin administration to the gingiva may be effective in preventing the onset of periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：メトホルミン 加齢 骨吸収 歯周病 歯肉 局所投与

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの国で糖尿病治療の第一選択薬になっているメトホルミンは、血糖のコントロール以外にも有益な作用を持つ。メトホルミンの標的分子である AMP 活性化キナーゼ (AMPK) は、骨芽細胞を活性化し骨量維持に、また AMPK の活性を介して mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル経路を抑制することでメトホルミンは組織老化に抵抗するという報告もある。本研究では骨量維持、組織老化に抵抗するメトホルミンに着目した。

2. 研究の目的

48 週齢以降の老齢マウス (C57BL/6) を使って老化が顎堤吸収に及ぼす影響とそれに対するメトホルミンの効果を明らかにする。メトホルミンの投与で骨吸収面積、破骨細胞数、歯肉組織での老化関連遺伝子の発現に変化があるかを検証する。加齢は基礎的な炎症も活性化するので、歯肉組織の炎症性サイトカイン発現も比較する。

3. 研究の方法

実験 1 加齢および若齢マウス歯肉への Met 局所投与の比較

60~70 週齢 (Aged 群)、10 週齢 (Young 群) 雄性 B6J Aged マウス各 10 匹を実験に供した。Aged 群、Young 群ともに 1% MT 溶液を局所投与する実験群 (MT 群) と PBS を局所投与する対照群 (PBS 群) 5 匹ずつに振り分けた。局所投与は週 3 回を 4 週間、計 12 回行った。最終投与から 7 日後に屠殺し上顎と末梢静脈血を採取した。採取した上顎は、マイクロ CT 撮影後、組織切片 (HE 染色) を作製し組織像を観察した。Aged-MT 群、Aged-PBS 群各 2 匹のマウスから口蓋歯肉を採取した。歯肉からの全 RNA の分離は RNeasy Mini Kit (QIAGEN, CA) を用いて行った。全 RNA をもとに相補鎖 DNA (cDNA) を作成し、PROFILER™ PCR Array Mouse Wound Healing を用いて創傷治癒関連遺伝子発現の定量解析を行った。また、採取した末梢血は遠心分離にて血清を調整し、血清中サイトカインを Human Inflammation Antibody Array-Membrane を用いて検出した。

実験 2 Met 局所投与が加齢マウス実験的歯周炎発症過程に及ぼす影響

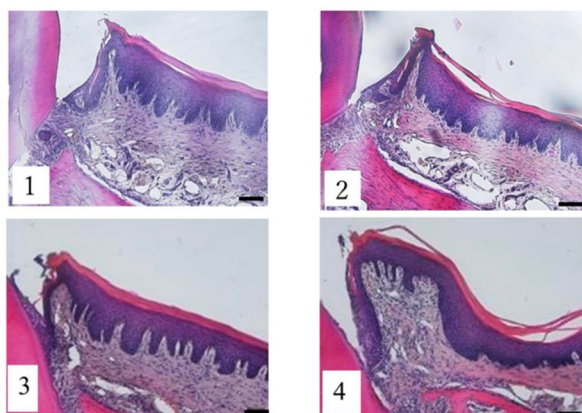
60~70 週齢雄性 B6J Aged マウス 12 匹を実験に供した。1% MT 溶液を局所投与する MT 群と PBS を局所投与する PBS 群各 6 匹ずつに振り分け、週 3 回 4 週間投与した。投与終了後各個体の上顎右側第二臼歯に 5-0 絹糸結紮を行なった。上顎左側第二臼歯は非結紮とすることで、同一個体内で結紮側と非結紮側を設定した。結紮 4 日後に屠殺し、上顎を採取しデジタル写真撮影 (NIKON D5500, 倍率 1/1.2) を行った。上顎組織は 10%ホルマリン固定後、マイクロ CT 撮影と組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色、アザン (AZAN) 染色を施し組織像を観察した。マイクロ CT 画像より歯槽骨吸収量、HE 染色から炎症細胞数の定量を行った。TRAP 染色切片で施した組織像においては歯槽骨表層における TRAP 陽性細胞の数を計測した。

4. 研究成果

実験 1

組織学的観察(HE 染色)

HE 染色組織像を図 1 に示す. Aged-MT 群の投与部位周囲の歯周組織像では, 炎症細胞の浸潤, 歯肉の付着破壊が Aged-PBS 群と比較して顕著でない (図 1).



1: Young-MT 群 2: Young-PBS 群 3: Aged-MT 群
4: Aged-PBS 群 スケールバー: 100 μ m

図 1

表 1

Genes Over-Expressed in MT vs. PBS	
Gene Symbol	Fold Change
Col1a1	2.25
Col4a3	2.55
EGF	2.74
TIMP-1	2.91
Genes Under-Expressed in MT vs. PBS	
Gene Symbol	Fold Change
Csf3	0.06
Cxcl3	0.07
Cxcl5	0.04
MMP7	0.31

n = 2

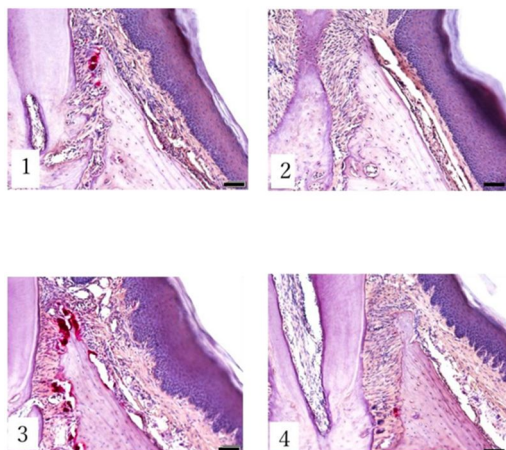
マウス歯肉における創傷治癒関連遺伝子発現のリアルタイム PCR 解析

各群マウス歯肉における創傷治癒関連遺伝子の発現検討を, リアルタイム PCR アレイを用いて行なった. 結果の例を表 1 に示す. Aged-MT 群で Aged-PBS 群に対して Cxcl3, Cxcl5, MMP7, Csf3 の発現が低下し, Col1 1, Col4 3, TIMP-1, EGF の発現上昇を認めた(表 1).

実験 2

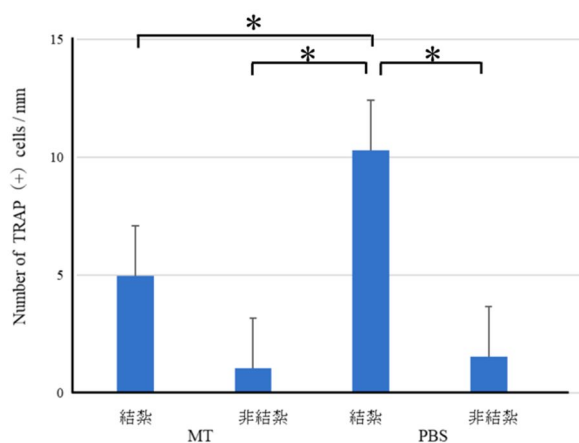
組織学的観察

TRAP 染色像を図 2 に示す. TRAP 陽性細胞は非結紮側に比べて結紮側で多く観察された. MT 群結紮側と PBS 群結紮側を比較すると, MT 群では観察できる TRAP 陽性細胞数は少なかった. 一方非結紮側では MT 群非結紮側, PBS 群非結紮群側ともに TRAP 陽性細胞はほとんど認められなかった(図 2).



1: MT 群結紮側 2: MT 群非結紮側
3: PBS 群結紮側 4: PBS 群非結紮側
スケールバー: 50 μ m
赤く濃染しているのが TRAP 陽性細胞

図 2



n = 6, mean \pm SD. * 有意差あり ($p < 0.05$)

図 3

TRAP 陽性細胞数の計測

歯槽骨表面の長さを測定して 1mm あたりの TRAP 陽性細胞数を算定した.MT 群結紮側は 4.96 ± 1.74 cells /mm , MT 群非結紮側は 1.06 ± 1.61 cells /mm , PBS 群結紮側は 10.28 ± 0.72 cells /mm , PBS 群非結紮側は 1.54 ± 0.72 cells /mm であった. PBS 群結紮側は PBS 群非結紮側 MT 群結紮側 MT 群非結紮側と比較して TRAP 陽性細胞数は有意 ($p < 0.05$) に増加していた(図 3).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 伊神 裕高, 金山 圭一, 清水 雄太, 佐藤 匠, 森永 啓嗣, 安田 忠司, 辰巳 順一	4. 巻 66
2. 論文標題 メトホルミン局所投与による高齢者歯周炎予防効果の検討	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 47-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shikahozon.66.47	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 Takeru Kondo, Keiichi Kanayama, Hiroshi Egusa, Ichiro Nishimura.	4. 巻 66
2. 論文標題 Current Perspectives of Residual Ridge Resorption: Pathological Activation of Oral Barrier Osteoclasts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Prothodontic Research	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) 10.2186/jpr.JPR_D_21_00333	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 該当する
1. 著者名 佐藤匠, 安田忠司, 森永啓嗣, 清水雄太, 伊神裕高, 長谷川徹, 金山圭一, 北後光信, 辰巳順一	4. 巻 65
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalisの口腔感染がコラーゲン誘発関節炎モデルマウスの脊椎に及ぼす影響	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 47-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shikahozon.65.47	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 Masashi Takagi, Keiichi Kanayama, Keisuke Mukai, Hirotsugu Morinaga, Atsushi Shibatsuji, Toshiaki Shibutani	4. 巻 29
2. 論文標題 Application of The bFGF and β -TCP Complex to Peri-Implant Bone Defects in Dogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 105-110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.29.105	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 該当する

1. 著者名 森永 啓嗣, 金山 圭一, 北後 光信, 安田 忠司 長谷川 徹, 佐藤 匠, 清水 雄太, 辰巳 順一	4. 巻 63
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis 由来 LPS 局所投与が加齢マウスの歯周組織に及ぼす影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 287-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Keiichi Kanayama, Akishige Hokugo, Shuting Sun, Kenzo Morinaga, Yujie Sun, QingQing Wu, Hodaka Sasaki, Hiroko Okawa, Courtney Evans, Frank H. Ebetino, Mark W. Lundy, Keivan Sadrerafi, Charles E. McKenna, Ichiro Nishimura	4. 巻 123
2. 論文標題 Rescue bisphosphonate treatment of alveolar bone improves extraction socket healing and reduces osteonecrosis in zoledronate-treated mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BONE	6. 最初と最後の頁 115-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

〔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 伊神 裕高, 金山 圭一, 清水 雄太, 佐藤 匠, 園田 愛実, 忌部 広, 安田 忠司, 辰巳 順一
2. 発表標題 メトホルミンによる歯周炎進行予防効果の検討 2. 実験的歯周炎へのメトホルミン投与の効果
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

1. 発表者名 伊神裕高、金山 圭一、北後 光信、安田 忠司、長谷川 徹、佐藤 匠、清水 雄太、辰巳 順一
2. 発表標題 メトホルミンによる歯周炎進行予防効果の検討 -1. 正常歯周組織へのメトホルミン投与の効果-
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

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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