

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19006

研究課題名(和文)咬合性外傷を伴う歯周炎の歯槽骨吸収に対する薬物療法の可能性を探る

研究課題名(英文) Possibility of drug therapy for alveolar bone resorption in periodontitis with occlusal trauma

研究代表者

鈴木 允文 (SUZUKI, Takafumi)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：60638518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎の存在下で外傷性咬合が加わると、歯槽骨吸収が急速に進行することが知られているが、その分子メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では骨芽細胞に発現するカルシウムイオンチャンネルTRPV4の働きに注目した。マウス頭頂骨由来骨芽細胞をP.g由来LPS存在下で培養後、メカニカルストレスを負荷するとTRPV4 mRNA発現量の有意な変化はみられなかったが、RANKL mRNA発現量は両者の共存下で有意に上昇した。TRPV4の機能を阻害すると、このRANKL mRNAの上昇は抑制された。以上より、TRPV4はLPSとメカニカルストレスによるRANKLの上昇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

炎症とメカニカルストレスによって生じる歯槽骨吸収にカルシウムイオンチャンネルTRPV4が関与している可能性が示唆される結果を得た。歯周病の進行には歯周病原細菌がもたらす炎症と外傷性咬合によるメカニカルストレスの両者の関与が明らかであるが、ブラッシングなどの炎症のコントロール方法はある程度確立されている一方で、咬合調整などの咬合のコントロールについてはエビデンスが不足しているのが現状である。今回得られた結果により、将来メカニカルストレスによる歯槽骨吸収が薬物療法によりコントロール可能になれば、歯周病罹患率の低下をもたらす、QOLの向上に寄与することができるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Excessive occlusal force with periodontitis results in rapid alveolar bone resorption. However, the molecular mechanism has yet not to be completely elucidated. This study focused on TRPV4, which is a mechanosensitive ion channel expressed on osteoblasts. To investigate the involvement of P.g-LPS and mechanical stress on TRPV4 and RANKL expression, osteoblasts from mouse calvariae were cultured with P.g-LPS. Then, mechanical stress was applied to the cells. In cells with P.g-LPS, there was no significant change in the TRPV4 mRNA expression level, whereas the RANKL mRNA expression was significantly increased by additional application of mechanical stress. Subsequently, TRPV4 function was inhibited by the addition of the antagonist or by knockdown via Piezo1 siRNA transfection. After loading, the increase in the RANKL expression was suppressed. These results suggest that TRPV4 is involved in the mechanical stress-induced increase of RANKL expression with P.g-LPS.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 メカニカルストレス 骨芽細胞 カルシウムイオンチャンネル 歯槽骨吸収

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は歯周病原細菌により引き起こされる感染症であり、炎症が慢性化することで歯槽骨破壊が起こる疾患である。病態の進行とともにみられる歯槽骨吸収は歯の動揺、脱落を引き起こし、歯の喪失の主な原因となっている。このような歯周炎で起こる歯槽骨破壊は破骨細胞の活性化の結果として起こるが、その原因のひとつに *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) に代表される歯周病原細菌の菌体成分であるリポポリサッカライド (LPS) がある。

LPS の存在によりマクロファージなどから IL-1 や TNF- α といった炎症性サイトカインが産生される。これらの炎症性サイトカインは骨芽細胞や骨細胞に作用し、破骨細胞分化因子 Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) を産生し、破骨細胞前駆細胞の受容体 RANK に結合することで破骨細胞の分化が亢進する。その結果として歯槽骨吸収が起こる。また LPS は骨芽細胞や破骨細胞前駆細胞に直接的に作用することで破骨細胞形成を促進することも報告されている。

歯周炎ではこのような「炎症による歯槽骨吸収のメカニズム」のほかに、骨芽細胞や骨細胞が咬合力を感受することで破骨細胞を活性化させる「メカニカルストレスによる歯槽骨吸収のメカニズム」が考えられている。特に臨床的観察から歯周炎において、歯と歯周組織に過剰な咬合力(メカニカルストレス)が加わると急速な歯槽骨吸収がみられ、そのようなメカニカルストレスが外傷性咬合を引き起こす。これまでラットやビーグル犬による動物実験モデルから歯周炎を伴う外傷性咬合は歯槽骨吸収をより増悪化させるが(Glickman et al. J Periodontol 1965)、外傷性咬合だけでは歯槽骨吸収が生じないことが示されてきた(Ericsson et al. J Clin Periodontol, 1977, 1982)。このように歯周炎でみられる歯槽骨吸収は、炎症とメカニカルストレスとが互いに絡み合って進行することが考えられている。しかし、両者をつなぐメカニズムには不明な点が多い。

これまでに、メカニカルストレスに応答して開孔し、主としてカルシウムイオンを透過する非選択性陽イオンチャネル TRPV4 が骨芽細胞に発現し、細胞分化の過程で発現が上昇すること、さらに、TRPV4 はメカニカルストレス(せん断ストレス)により起こる周期的な細胞内カルシウム濃度上昇(カルシウムオシレーション)の発生、制御に関わっていることを見出してきた(Suzuki T et al. Bone 2013)。細胞内カルシウムは細胞内セカンドメッセンジャーとして働き、骨芽細胞へのせん断ストレスにより起きる細胞内カルシウム濃度上昇は RANKL の発現を促進することが示唆されている(Takami M et al. Endocrinology 2000)。したがって、TRPV4 はメカニカルストレスと骨代謝の關係に重要な役割を果たすものと考えられる。さらに、炎症性骨破壊を伴う慢性関節リウマチ(RA)において、局所で産生される滑膜細胞が炎症性サイトカイン TNF- α によって TRPV4 の発現量や開孔機能を亢進することが示唆されている(Liping P Zhang et al. Am J Physiol 2013, Kochukov MY et al. Mol Pain 2009)。このように TRPV4 は炎症とメカニカルストレスを結びつける役割を持つことが考えられる。

2. 研究の目的

現在、臨床的知見や動物実験モデルから歯周炎を伴う外傷性咬合は歯槽骨吸収進行の原因のひとつであると考えられているが、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。

骨代謝と TRPV4 の關係については尾部懸垂モデル(非荷重モデル)により野生型(WT)マウスでみられる骨量の低下が TRPV4 欠失型(KO)マウスでは抑制されたことから、TRPV4 は骨におけるメカノセンサーとしての機能をもつ可能性が示唆されてきた(Mizoguchi et al. J Cell Physiol 2008)。

また炎症と TRPV4 に関しては、前述の様に、TNF- α の刺激により開孔機能亢進することが示唆されていることから、歯槽骨破壊における炎症とメカニカルストレスの相互作用について TRPV4 に着目した。本研究では歯槽骨吸収における炎症とメカニカルストレスの關係性について TRPV4 に着目し研究を行うことで、慢性歯周炎下での外傷性咬合によって増悪化される歯槽骨破壊の分子メカニズムを解明し、新しい治療法の確立への足がかりとしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

上記の背景とこれまでの研究成果をもとに、次のような作業仮説を立案した。

1. *P.g*由来 LPS により骨芽細胞の TRPV4 の発現上昇または活性化が生じる。
2. 発現上昇または活性化した TRPV4 に対してメカニカルストレスが負荷されることにより TRPV4 が開孔し、細胞内カルシウム濃度上昇が生じる。
3. 細胞内カルシウム濃度上昇により、RANKL の発現が亢進する。
4. RANKL/OPG 比の上昇により、破骨細胞分化が促進され、歯槽骨吸収が生じる。

これまでに歯周炎存在下での外傷性咬合によって生じる歯槽骨吸収における TRPV4 の役割についての報告は少なく、本研究は TRPV4 を指標とした新たな歯周炎治療法確立の基盤研究とし

て意義があるものと考えた。

上記の作業仮説に基づいて、下記のとおり研究計画を立案し、遂行した。

マウス頭頂骨由来骨芽細胞を 12 well plate に播種し、*P.g* 由来 LPS 存在下で骨芽細胞分化培地にて 3 日間培養後、小型卓上振とう機による巡回振とう応力をメカニカルストレスとして負荷した。負荷条件は回転数 200rpm、負荷時間を 1 サイクルあたり 20 分間とし、サイクル間の静置時間を 10 分として 3~5 サイクル実施した。メカニカルストレス負荷後の細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により TRPV4、RANKL の mRNA 発現量を測定した。*P.g* 由来 LPS ならびにメカニカルストレスによるそれぞれの mRNA 発現量に対する影響について検討した。

における RANKL mRNA の変化に対する TRPV4 の関与を検討するため、TRPV4 アンタゴニストである Ruthenium Red (RR) を添加する実験を行った。同様の条件で骨芽細胞を培養し、3 日目に 12 時間のスターベーションを実施した上で培地に RR を添加した。その後、上記の条件でメカニカルストレスを負荷し、負荷後の細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により RANKL mRNA 発現量を測定した。

さらに における RANKL mRNA の変化に対する TRPV4 の関与を詳細に検討するため、RNA 干渉として short interfering RNA (siRNA) を用いて TRPV4 のノックダウンを実施した。骨芽細胞を 12 well plate に播種し、プロトコルに従い、siRNA をトランスフェクションした。72 時間後に 12 時間のスターベーションを実施した上で、上記の条件でメカニカルストレスを負荷した。負荷後の細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により RANKL mRNA 発現量を測定した。

4. 研究成果

本研究において、*P.g* 由来 LPS 存在下で培養した骨芽細胞にメカニカルストレス負荷を行うと RANKL の mRNA 発現の有意な上昇を認めた。さらに TRPV4 アンタゴニスト添加により TRPV4 のイオン透過活性を阻害した細胞、あるいは TRPV4 siRNA 導入による TRPV4 のノックダウンを行った細胞にメカニカルストレス負荷を行うと、この RANKL の mRNA 発現上昇は有意に抑制された。以上の結果から、TRPV4 は *P.g* 由来 LPS 存在下で培養した骨芽細胞においてメカニカルストレス負荷により生じる RANKL の発現上昇を制御しているものと考えられる。

本研究では、細胞に負荷するメカニカルストレスは、細胞培養プレート小型卓上振とう機上に設置して、巡回振とうさせることにより発生する流水せん断応力を採用した。骨にメカニカルストレスが負荷されると、骨細管内において細胞外液による流水せん断応力が生じることから、これまで骨細胞や骨芽細胞に対して様々な方法を用いて流水せん断応力を負荷する実験が行われている。本研究では骨芽細胞に 4.8 dyne/cm^2 の流水せん断応力を負荷した。1 サイクルあたり 4.8 dyne/cm^2 の流水せん断応力を 20 分間として、10 分間の静置時間を挿みながら、繰り返し負荷すると、サイクル数の増加に伴って Col1a1 と OCN の mRNA 発現量が上昇した。5 サイクル負荷したのちの骨芽細胞を培養すると、24 時間後には定常状態に対して Col1a1 の mRNA 発現量が有意な上昇を示した。これはメカニカルストレスにより骨芽細胞内のシグナル伝達に変化が生じたことを示すもので、この結果から、本研究でのメカニカルストレスの負荷は、20 分間の巡回振とう刺激を静置時間 10 分間隔で 5 サイクル負荷するという条件で行うこととした。本条件は細胞進展装置などの特殊機器を用いることなく、骨分化マーカーの上昇を誘導できるという点で、今後のメカニカルストレス負荷実験において活用しうる簡便かつ有意義なものであると考えられる。

一方で、本研究においてメカニカルストレスの負荷のみでは RANKL 発現に変化は生じなかった。つまり今回設定したメカニカルストレスの負荷条件はメカニカルストレス単独では骨吸収に影響を及ぼさない程度の負荷であることが推察される。また、より大きなメカニカルストレスを負荷することで RANKL 発現の上昇をもたらすことができるものと考えられるが、本実験系において用いた小型卓上振とう機による巡回振とう刺激では 200 rpm 以上に回転数を上昇させると、培養液がプレート外へ溢出することから検討ができなかった。今後は細胞伸展刺激など他のメカニカルストレスの負荷方法により、よりストレスの強度を上げた場合の検討を行っていく必要がある。

本研究において、炎症状態が TRPV4 に与える影響に関して、TRPV4 の mRNA 発現量は *P.g* 由来 LPS の存在による影響を受けなかった。この結果は慢性炎症によって TRPV4 の mRNA 発現が上昇したとするこれまでの報告とは異なる。一方で、*P.g* 由来 LPS 存在下で培養した細胞において TRPV4 の mRNA 発現量に変化がないにも関わらず、メカニカルストレスあるいは選択的アゴニスト添加により TRPV4 を活性化させると RANKL の発現上昇が生じた。さらに TRPV4 アンタゴニスト添加、あるいは TRPV4 siRNA 導入によって、この RANKL 発現上昇は抑制された。

本研究の結果から、*P.g* 由来 LPS は骨芽細胞における TRPV4 発現量を直接的には増加させないものの、その開孔機能を亢進させる可能性がある。この TRPV4 の開孔機能の向上は、*P.g* 由来 LPS の存在により TRPV4 自体が、それに付随する細胞骨格に構造変化が生じることで起きている可能性が考えられる。あるいは、本研究では TRPV4 の発現変化の検討は mRNA 発現量による評価のみで行ったため、*P.g* 由来 LPS の存在により TRPV4 タンパク発現の亢進や細胞膜上への局在の変化が生じている可能性も否定できない。今後は *P.g* 由来 LPS 存在下での TRPV4 の細胞内での局

在や細胞骨格の構造変化に対する検討についても行っていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 竹谷佳将、中島明敏、竹ノ谷淳、脇田有貴、大竹和樹、長谷川陽子、鈴木允文、申基喆	4. 巻 50
2. 論文標題 遊離歯肉移植術後の口腔関連QOLと疼痛の評価	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 明海歯科医学	6. 最初と最後の頁 117-125
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 -

1. 著者名 竹谷佳将、鈴木允文、齋藤大嵩、山村加奈子、内沼真吹、吉川佳織、林丈一朗、申基喆	4. 巻 49
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis LPSで誘導される骨芽細胞のRANKL発現はtransient receptor potential vanilloid 4 ion channelを介するメカニカルストレスによって増幅する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 明海歯科医学	6. 最初と最後の頁 49-58
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹谷 佳将, 鈴木 允文, 竹ノ谷 淳, 内沼 真吹, 上田 隼也, 石井 麻紀子, 申 基喆
2. 発表標題 遊離歯肉移植術後の口腔関連QOLと疼痛の評価
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshimasa Taketani, Takafumi Suzuki, Jun Takenoya, Yusuke Yamane, Haruki Kodama, Hideharu Otsuka, Joichiro Hayashi, Kitetsu Shin
2. 発表標題 Evaluation of oral health-related quality of life following free gingival graft procedure
3. 学会等名 American Academy of Periodontology 108th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹谷 佳将, 鈴木 允文, 内沼 真吹, 杉山 雄一郎, 上田 隼也, 林 丈一朗, 申 基喆
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis由来LPS存在下でのメカニカルストレスによる骨芽細胞のRANKL発現に対するTRPV4の関与
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019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