

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19270

研究課題名（和文）フラボノイド創薬による歯周組織代謝活性の解明と歯根吸収抑制治療への臨床応用

研究課題名（英文）Elucidation of periodontal tissue metabolic activity and its application to root resorption treatment by baicalin, flavonoid.

研究代表者

木村 綾 (Kimura, Aya)

広島大学・医系科学研究科（歯）・研究員

研究者番号：00823197

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）：本研究では、フラボノイド類化合物であるバイカリンに着目し、歯周組織における Wnt/ β -カテニンシグナル経路を介した代謝調節機構について明らかにするとともに、歯根吸収抑制効果について検証した。さらに、矯正歯科治療中に生ずる歯根吸収の発症を安定的に予防する新規治療法を確立することを最終的な目的とし、バイカリンの歯周組織構成細胞における影響およびそのシグナル伝達経路の検討、歯根吸収抑制効果について動物実験による検討を行った。その結果、バイカリンは歯根吸収抑制に効果的であ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

歯根吸収は矯正歯科治療における副作用のうち、最も高頻度に認められるにも関わらず、発症機序の詳細は解明されていない。歯根吸収のリスク因子は報告されているものの、現在のところ効果的な予防法は存在しない。そこに、健康補助食品としても注目され、広く応用されているフラボノイド化合物を用いる簡便性と安全性が本研究の特徴である。歯の移動におけるフラボノイド化合物の作用機序を解明することは、歯根吸収の発症機序の解明や、歯周組織構成細胞間の相互作用の解明に貢献するため、学術的に高い意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on baicalin, which is a flavonoid compound. First, we examined the effect of baicalin on periodontal tissue cells. We also verified the Wnt/ β -catenin signaling pathway in periodontal tissue. Lastly animal studies were conducted on the root resorption suppressing effect. As a result, it was suggested that baicalin is effective in suppressing root resorption.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：フラボノイド 歯根吸収

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療は、歯周組織の骨改造現象を利用して歯を移動させるが、副作用の一つとして歯根吸収が挙げられる。矯正歯科治療に伴う歯根吸収は、臨床症状を伴うことなく進行し、重症化した場合には治療の中断を余儀なくされたり、治療後の安定性に大きな影響を及ぼす。しかしながら、吸収された歯根を修復させる治療法は未だ確立されていない。歯根吸収の発症因子としては、過度な矯正力や治療の長期化に加え、不正咬合の状態、歯根の形態、骨代謝疾患などの全身的要因が挙げられる。矯正歯科治療中に、歯根吸収のリスクが高い歯に対して、選択的に予防処置を行うことができれば、より安全で安定した矯正歯科治療を行うことが可能となる。

近年、関節リウマチや歯周疾患で見られる炎症性骨破壊において、病的な状態で骨代謝に影響を及ぼす免疫系の関与が注目されている。骨代謝と免疫系は、骨髄の微小環境ならびに多くの制御因子を共有し、相互制御が行われている。矯正歯の移動においても、免疫応答により様々な炎症性サイトカインが誘導され、歯の移動に必須な歯槽骨吸収に関与している。歯の移動の圧迫側歯槽骨では、破歯細胞分化誘導因子である RANKL や OPG 等種々の炎症性サイトカインが産生され、その結果、免疫系因子と骨系細胞による破骨細胞形成のメカニズムが働き、活発な骨吸収が生じる。その中でも OPG は、RANKL のデコイレセプターとして働き、破歯細胞の分化誘導を阻害することにより注目されている。近年、ラットへの局所的 OPG 遺伝子導入により、歯根吸収が抑制されることが報告されている。また、局所的 OPG 遺伝子導入により、セメント質の新規骨添加が生じることも解明されている。以上の研究報告により、ラットのセメント質において、OPG 発現を促進させることで歯根吸収を抑制させる可能性が示唆されたが、歯科矯正臨床において遺伝子導入を併用することは、技術的および倫理的にも困難であり、安全で簡便な治療法の探索が急務である。

一方、フラボノイド類化合物の一種であるバイカリンは、生薬オウゴンの主成分であり、抗炎症作用および骨添加活性などの作用を有することが知られている。また、近年、フラボノイドはエストロゲン様作用を有することから、骨粗鬆症などの骨代謝疾患において、副作用の少ない安全な補助治療法として注目されている。しかしながら、バイカリンが歯周組織構成細胞および歯周組織の代謝に対してどのような影響を及ぼすのかは明らかにされていない。以上の背景より、バイカリンのエストロゲン様作用に着目し、歯周組織における代謝調節効果と作用機序を解明し、矯正歯科治療における歯根吸収を予防する新規治療法の確立を目指し本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

矯正歯科治療中に生じる医原性障害の一つとして歯根吸収が挙げられる。矯正歯科治療に伴う歯根吸収は、臨床症状を伴うことなく進行し、吸収した歯根を修復・再生させる治療法はこれまでのところ確立されていない。本研究では、フラボノイド類化合物であるバイカリンに着目し、歯周組織における Wnt/ β -カテニンシグナル経路を介した代謝調節機構について明らかにするとともに、歯根吸収抑制効果について検証する。さらに、矯正歯科治療中に生ずる歯根吸収の発症を安定的に予防する新規の治療法を確立することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

実験 1 フラボノイド類化合物が歯周組織構成細胞の増殖・基質代謝能に及ぼす影響

本研究ではヒト高分化セメント芽細胞株 (HCEM) を用いて以下の検討を行った。フラボノイド化合物は、0-1 μ M 濃度のバイカリンを用いた。

細胞増殖能への影響

培養細胞にバイカリンを添加した際の細胞増殖への影響について、細胞数の計測および ELISA BrdU assay を行った。

基質代謝能への影響

培養細胞にバイカリンを添加した際の骨代謝マーカーおよび骨吸収マーカーの発現レベルについて定量 PCR (Light cycler 480[®]) を用いた遺伝子解析および蛍光イメージングウエスタンブロット機器 Odyssey[®] (LI-COR Bioscience) と Western blot プロセッシング装置 (BenchPro[®] 4100, Invitrogen) および Western blot ゲル転写装置 (iBlot[®] 2Gel Transfer Device) を用いた定量 Western blot 解析を行った。さらに、ALP 活性定量およびアリザリンレッド染色法を用いた石灰可能な検討を行った。

実験 2 フラボノイド類化合物が歯周組織構成細胞におけるシグナル伝達経路に及ぼす影響

バイカリン添加が HCEM における GSK-3 のリン酸化に及ぼす影響

培養細胞にフラボノイドを添加し、GSK3 のリン酸化を定量 Western blot 解析を行った。

Wnt シグナル伝達経路阻害剤が GSK3 のリン酸化に及ぼす影響

受容体阻害剤である Dickkopf-1 (DKK-1) を用いて、バイカリン添加時の各細胞における影響について実験 1 と同様の検討を行った。

実験3 フラボノイド類化合物摂取が実験的歯の移動時の歯根吸収発現に及ぼす影響

ラットの上顎門歯と第一臼歯間にクローズドコイルを装着し、門歯を固定源として第一臼歯を近心に移動させるモデルを作製した。過度な矯正力 (50 gf) を負荷することで、牽引開始より数日後に上顎臼歯遠心根近心側に歯根吸収窩が形成される。歯の移動のみ行った群 (対照群)、バイカリン投与を行った群 (バイカリン投与群)、を設定し、比較・検討を行った。歯の移動後にラットを灌流固定し、組織学的検討では、摘出・脱灰した後パラフィン包埋し、H-E染色および骨代謝関連マーカーの免疫組織化学染色を用いて評価した。さらに、歯根吸収面積についても検討を行った。

4. 研究成果

1. フラボノイド類化合物バイカリンの添加がヒト高分化セメント芽細胞株 (HCEM) に対する影響

バイカリン添加が HCEM の増殖能に及ぼす影響

バイカリン添加群と非添加群との間に有意差は認められなかった。

バイカリン添加が基質代謝能へ及ぼす影響

ALP、RUNX2、OPG においてはバイカリン添加群で遺伝子発現量およびタンパク質発現が亢進し、RANKL においては抑制された。さらに、バイカリン添加群において石灰化能の有意な亢進が認められた。

2. バイカリン添加が HCEM における wnt/ カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響

バイカリン添加 5 分後に pGSK3 の亢進が認められ、その後経時的に抑制された。また、wnt/ カテニンシグナル伝達経路受容体阻害剤である Dickkopf-1 (DKK-1) を用いて、基質代謝能へ及ぼす影響を検討したところ、ALP、RUNX2、OPG においてバイカリン存在下で遺伝子発現およびタンパク質発現が抑制された。一方 RANKL 遺伝子発現およびタンパク質発現に関しては抑制される傾向が認められた。

3. フラボノイド類化合物摂取が実験的歯の移動時の歯根吸収発現に及ぼす影響

歯の移動距離の変化に関しては、実験的歯の移動 21 日後において、フラボノイド摂取群は対照群と比較して、第一臼歯移動量に有意な変化は認められなかった。組織学的検討では、装置装着 3 週間後における HE 染色像において、圧迫側でフラボノイド摂取群および対照群ともに、歯根膜腔の減少及び歯根膜線維の不規則化が観察された。また、歯の移動に伴い、歯根表面から象牙質層にかけて吸収窩が認められた。骨代謝関連マーカーの免疫組織化学染色においては、フラボノイド摂取群、対照群ともに、歯根膜、歯槽骨、および歯根表面に ALP、RUNX2、OPG、RANKL の発現が確認された。ALP、RUNX2、OPG に関しては、フラボノイド摂取群は対照群と比較して発現の亢進が認められたが、RANKL に関しては、フラボノイド摂取群において発現の抑制が認められた。歯根吸収面積の検討においては、フラボノイド摂取群では対照群と比較して、歯根吸収面積の有意な減少が認められた。

以上の結果より、ラットにおける実験的歯の移動時にフラボノイドを摂取させると骨形成マーカーの発現が亢進し、骨吸収マーカーの発現が抑制されることが明らかとなった。また、歯の移動距離に影響を及ぼすことなく、歯根吸収抑制に効果的であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kunimatsu R., Kimura A., Tsuka Y., Horie K., Yoshimi Y., Awada T., Gunji H., Abe T., Nakajima K., Sakata S., Nakatani A., Tanimoto K.	4. 巻 116
2. 論文標題 Baicalin inhibits root resorption during tooth movement in a rodent model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2020.104770	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村 綾
2. 発表標題 フラボノイド類化合物バイカリンはラットにおける実験的歯の移動中の歯根吸収を抑制する
3. 学会等名 第 78 回日本矯正歯科学会学術大会
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
---------	---------