

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23020

研究課題名（和文）骨細胞によるメカノセンシングに注目した咬合性外傷制御機構の解明

研究課題名（英文）The mechanisms of occlusal trauma focusing on mechanosensing by osteocyte

研究代表者

土谷 洋輔 (Tsuchiya, Yosuke)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40882072

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：8週齢オスのC57BL/6J系統マウスに対し、歯周炎モデル、咬合性外傷モデル、歯周炎咬合性外傷併発モデル、対照群の4群を作成し、マイクロCTにて歯槽骨吸収の程度を比較した。その結果、歯周炎群に対し、歯周炎咬合性外傷併発群において骨吸収量の増加が認められた。マウス実験においても、咬合性外傷が歯周炎の増悪因子になること、咬合性外傷が骨吸収に寄与することが示唆された。さらに、上記4群について各処置3日後のマウスより歯肉、歯槽骨を採取、RNAを抽出し、RNA-seqを用いて網羅解析を行ったところ、歯周炎群に対し歯周炎咬合性外傷併発群で多くの発現変動遺伝子を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咬合性外傷はかねてから歯周病の増悪に寄与する共同破壊因子として示されているものの、動物実験や臨床における症例観察研究、介入研究による根拠がほとんどでありその作用機序を分子生物学的に検討しようとした研究は乏しい。咬合性外傷がどのようなメカニズムで発生するか、その病因について解明することは臨床的な歯周病の治療戦略上有意義であり、歯周治療における咬合治療の必要性を裏付ける重要なエビデンスになりうる。今後さらなる解析を行いメカニズムの同定を目指す。

研究成果の概要（英文）：Mice were divided into the following four groups: periodontitis (Pe) group, occlusal trauma+periodontitis (Pe+OT) group, occlusal trauma (OT) group and a control (Co) group. Pe+OT group showed significantly more bone loss than that of the Pe group at 8days after treatment. In addition, OT group showed more bone loss than that of Co group at 8days after treatment. These data suggesting that occlusal trauma is an aggravating factor for periodontitis and that occlusal trauma contributes to bone resorption in the mouse experiment. In addition, gingiva and alveolar bone samples were collected from the above four groups 3 days after each treatment, and comprehensive analysis using RNA-seq revealed that many genes with altered expression were found in the Pe+OT groups compared to the Pe group.

研究分野：歯周病学

キーワード：咬合性外傷 骨細胞 歯根膜細胞 メカニカルストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、細菌性プラークを主体とした歯周病原細菌が原因であるが、様々な修飾因子が絡み合う多因子疾患であることが知られている。特に、強い咬合力や異常な力(外傷性咬合)により生じる咬合性外傷は、歯周炎の増悪に関与し、急速な歯周組織破壊をきたすことが知られている。咬合性外傷は、「歯周炎の原因ではないこと」、「細菌存在下で歯周炎を増悪させること」が現在の歯周病学のコンセンサスとなっているが、その根拠となる論文の多くが、1960年代から80年代にかけて行われたイヌやサルを対象とした動物実験結果を基にしたものである。生物学的な検討が十分なされていない時代の報告であり、無菌動物を用いて、咬合性外傷の進行を評価している研究はない。

また、歯周病、咬合性外傷の研究において歯根膜細胞の関与が注目されているが、矯正移動における骨のリモデリングにおいて骨細胞を司令塔とした骨恒常性制御が生じることが知られている。矯正移動と同様に、メカニカルストレスによる骨吸収をきたす咬合性外傷において骨細胞が中心的な役割を担う可能性は高いと考えられる。

2. 研究の目的

咬合性外傷は咬合力のみで起こらないとされているが、生物学的な検討は現在でも乏しく、無菌マウスでの検討は咬合性外傷の根幹をなすエビデンスになりうる。また、骨細胞は骨恒常性を保つための骨リモデリングを統率し、骨代謝を制御すると報告されている。咬合性外傷モデルにRNA-seqを用いて網羅的に変動遺伝子の解析を行い、責任遺伝子を同定する試みは報告がなく、咬合性外傷の病因、メカニズムの解明に繋がると考えられる。本研究では、無菌(Germ free)マウスと通常のマウス(WT)の咬合性外傷モデルの解析を通して、細菌非存在下で咬合性外傷による骨吸収が誘発されるかを検討する。さらに、咬合性外傷モデルの歯周組織における遺伝子発現を網羅的に解析し、咬合性外傷により特異的に変動する遺伝子を絞り込み、*in vitro*において該当遺伝子をCRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集にてノックアウト、ノックイン細胞を作成し、骨リモデリング制御遺伝子の同定を目的とする。

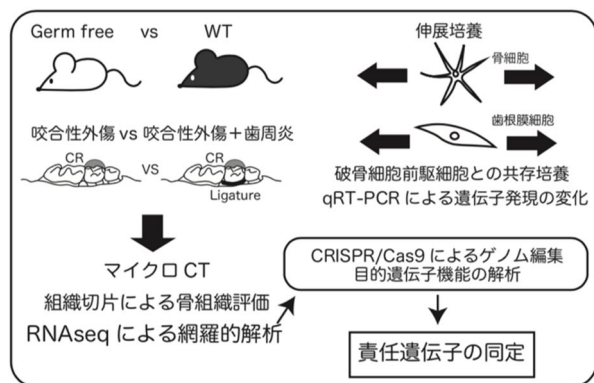
3. 研究の方法

令和2年度

8週齢オス C57BL/6J 系統マウスの上顎臼歯部咬合面にコンポジットレジンを作成し、咬合性外傷モデルとする。歯周炎存在下における咬合性外傷の影響に関して、絹糸結紮誘導歯周炎モデルと絹糸結紮誘導歯周炎、咬合性外傷併発モデルを用いた実験系で比較検討する。歯周組織を実験動物用マイクロX線CTにて撮影し、歯槽骨吸収を評価する。また、組織切片を作成し、TRAP染色、Toluidin Blue染色にて骨表面の骨関連細胞を評価する。さらに、歯槽骨からRNAを抽出し、RNAseqにて網羅的に解析し、著明な増減を示す遺伝子の抽出を行う。

令和3年度

歯周組織へのメカニカルストレスによる影響を調べるために、伸展培養器(シェルパプロ, Menicon)を用いてマウス骨細胞様細胞株 MLO-Y4 と歯根膜由来線維芽細胞を培養する。非伸展群と伸展群について、RANKL (*Tnfsf11*)、Osteoprotegrin (*Tnfrsf11b*)、*Sost* 等の骨制御遺伝子の発現をqRT-PCRにて評価する。さらに、破骨細胞前駆細胞に対する骨細胞の直接的な影響を評価するため、骨細胞、歯根膜細胞を伸展培養下で破骨細胞前駆細胞と共存培養、または、培養上清による破骨細胞分化誘導を行い、評価する。さらに、咬合性外傷モデルのRNA-seqで著明な発現変化が認められた遺伝子をCRISPR/Cas9によるゲノム編集を用いて、遺伝子のノックアウト、ノックインを行い、メカニズムの解明を試みる。



4. 研究成果

8週齢オスのC57BL/6J系統マウスに対し、歯周炎モデル、咬合性外傷モデル、歯周炎咬合性外傷併発モデル、対照群の4群を作成し、5,8日後にマイクロCTを撮影し歯槽骨吸収の程度を比較した。その結果、歯周炎群に対し、歯周炎咬合性外傷併発群において骨吸収量の増加が認められた。また、対照群に対し、咬合性外傷群においても骨吸収の増加が認められ、マウス実験に

においても、咬合性外傷が歯周炎の増悪因子になること、咬合性外傷が骨吸収に寄与することが示唆された。

さらに、上記 4 群について各処置 3 日後のマウスより歯肉、歯槽骨を採取、RNA を抽出し、RNA-seq を用いて網羅解析を行ったところ、歯周炎群に対し歯周炎咬合性外傷併発群で多くの発現変動遺伝子を認められた。特に炎症に関連したサイトカイン、ケモカイン、免疫系に関連する遺伝子群の発現上昇が認められた。また、対照群に対し、咬合性外傷群これらの結果を踏まえ、今後咬合性外傷による骨吸収の悪化に関連する責任遺伝子候補の絞り込みを行なっていく予定である。*In vitro* 実験においてそれら責任遺伝子候補の機能解析を行い、さらなるメカニズム解明に迫る予定である。

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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsuchiya Yosuke, Hayashi Mikihiro, Nagamatsu Katashi, Ono Takehito, Kamakura Masaki, Iwata Takanori, Nakashima Tomoki	4. 巻 295
2. 論文標題 The key royal jelly component 10-hydroxy-2-decenoic acid protects against bone loss by inhibiting NF- κ B signaling downstream of FFAR4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12224 ~ 12232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013821	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 Lin Peiya, Niimi Hiromi, Ohsugi Yujin, Tsuchiya Yosuke, Shimohira Tsuyoshi, Komatsu Keiji, Liu Anhao, Shiba Takahiko, Aoki Akira, Iwata Takanori, Katagiri Sayaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Application of Ligature-Induced Periodontitis in Mice to Explore the Molecular Mechanism of Periodontal Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8900 ~ 8900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168900	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 Yoshida S, Hatasa M, Ohsugi Y, Tsuchiya Y, Liu A, Niimi H, Morita K, Shimohira T, Sasaki N, Maekawa S, Shiba T, Hirota T, Okano T, Hirose A, Ibi R, Noritake K, Tomiga Y, Nitta H, Suzuki T, Takahashi H, Miyasaka N, Iwata T, Katagiri S	4. 巻 11
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Administration Induces Gestational Obesity, Alters Gene Expression in the Liver and Brown Adipose Tissue in Pregnant Mice, and Causes Underweight in Fetuses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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) 10.3389/fcimb.2021.745117	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 Shimohira Tsuyoshi, Niimi Hiromi, Ohsugi Yujin, Tsuchiya Yosuke, Morita Kazuki, Yoshida Sumiko, Hatasa Masahiro, Shiba Takahiko, Kadokura Hiroshi, Yokose Satoshi, Katagiri Sayaka, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 39
2. 論文標題 Low-Level Erbium-Doped Yttrium Aluminum Garnet Laser Irradiation Induced Alteration of Gene Expression in Osteogenic Cells from Rat Calvariae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery	6. 最初と最後の頁 566 ~ 577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/photob.2020.4958	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 Hatasa Masahiro, Ohsugi Yujin, Katagiri Sayaka, Yoshida Sumiko, Niimi Hiromi, Morita Kazuki, Tsuchiya Yosuke, Shimohira Tsuyoshi, Sasaki Naoki, Maekawa Shogo, Shiba Takahiko, Hirota Tomomitsu, Tohara Haruka, Takahashi Hirokazu, Nitta Hiroshi, Iwata Takanori	4. 巻 10
2. 論文標題 Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis Alters Endocrine Functions in Brown Adipose Tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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) 10.3389/fcimb.2020.580577	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 Niimi Hiromi, Ohsugi Yujin, Katagiri Sayaka, Watanabe Kazuki, Hatasa Masahiro, Shimohira Tsuyoshi, Tsuchiya Yosuke, Maekawa Shogo, Hirota Tomomitsu, Kadokura Hiroshi, Yokose Satoshi, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Proliferation and Calcification of Primary Osteoblast-Like Cells Isolated From Rat Calvaria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00459	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大杉勇人、畑佐将宏、下平剛、芝多佳彦、駒津匡二、土谷洋輔、福場駿介、新見ひろみ、森田和機、片桐さやか、岩田隆紀、青木章
2. 発表標題 結紮誘導歯周炎モデルマウスを用いたダイオードレーザー照射による歯周炎抑制効果
3. 学会等名 第33回 日本レーザー歯学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田澄子、片桐さやか、畑佐将宏、大杉勇人、土谷洋輔、新見ひろみ、下平剛、劉安豪、森田和機、佐々木直樹、前川祥吾、芝多佳彦、新田浩、岩田隆紀
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisは妊娠中の母体の肥満と胎子の低体重を引き起こす
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 Shimohira T, Niimi H, Ohsugi Y, Tsuchiya Y, Morita K, Yoshida S, Hatasa M, Shiba T, Kadokura H, Yokose S, Katagiri S, Iwata T, Aoki A.
2. 発表標題 Low-Level Er:YAG laser irradiation induced alteration of gene expression in rat calvarial osteogenic cells.
3. 学会等名 Dental Laser Virtual Scientific Conference 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新見ひろみ、大杉勇人、片桐さやか、土谷洋輔、畑佐将宏、下平剛、門倉弘志、横瀬敏志、岩田隆紀、青木章
2. 発表標題 Er:YAGレーザーによるラット頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞様細胞の増殖と石灰化に対する効果
3. 学会等名 第32回日本レーザー歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Niimi H, Ohsugi Y, Katagiri S, Watanabe K, Hatasa M, Shimohira T, Tsuchiya Y, Maekawa S, Hirota T, Kadokura H, Yokose S, Iwata T, Aoki A.
2. 発表標題 The effects of Er:YAG laser irradiation on primary osteoblast-like cells.
3. 学会等名 The AAP 106th Annual Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新見ひろみ、大杉勇人、片桐さやか、渡辺数基、畑佐将宏、下平剛、土谷洋輔、前川祥吾、廣田朝光、門倉弘志、横瀬敏志、岩田隆紀、青木章.
2. 発表標題 ラット頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞様細胞の増殖と石灰化に対するEr:YAGレーザーの効果.
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
---------	---------