

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861811

研究課題名(和文)局所血流改善薬の歯周組織再生治療への応用

研究課題名(英文) Application to periodontal tissue regeneration therapy of local blood flow improving agent

研究代表者

三木 康史(MIKI, KOJI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10598395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜細胞においてアセチルコリン受容体をはじめ神経系で発現が認められるアセチルコリンを生成するための酵素であるChAT(choline acetyl transferase)、分解する酵素であるAChE(acetylcholine esterase)、貯蔵するのに必要なVACHT(vesicular acetylcholine transporter)がmRNA、タンパクレベルで発現が認められるとの結果を得た。またラット頭蓋骨欠損モデルを構築し骨新生作用を検討したところ、0.1%塩化カルブリウムが骨新生を促進する可能性を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Methods: Expression of cholinergic component in human periodontal ligament cells (HPDL) was examined by RT-PCR and immunohistochemistry. And topical application of carpronium chloride on rat calvarial defect was observed whether to promote new bone formation. Results: All of the mAChR mRNA were expressed in HPDL. Choline acetyl transferase (ChAT), Vesicular acetylcholine transporter (VACHT), Acetylcholine esterase (AChE) and various nAChR mRNA were detected in HPDL. Expression of ChAT, VACHT and AChE in HPDL was detected in immunohistochemistry. And Topical application of carpronium chloride on rat calvarial defect promoted new bone formation. Conclusion: Periodontal ligament cells have various necessary cholinergic components such as ACh synthesis, reception, degradation. These results suggest that non-neuronal cholinergic system in periodontal ligament cells and carpronium chloride may be involved in the homeostasis, wound healing and regeneration of periodontal tissues.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周組織再生 歯周再生医学

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、細菌バイオフィームによって歯周組織が破壊される慢性炎症疾患である。歯周病の発症、進行のリスク因子である外傷性咬合や喫煙は、それぞれ歯周組織の過度の圧迫とニコチンによる血管収縮により歯周組織局所における微小血液循環不全を引き起こす。そのため歯周組織への酸素の栄養供給が阻害され、歯周治療に対する奏功不全や創傷治癒遅延が生じるものと考えられる。また、歯科矯正治療時には、牽引側の歯根膜における血流亢進が歯周組織のリモデリングに重要な役割を果たしていることが示唆されている。すなわち歯根膜の血流変化が、歯周組織構成細胞の機能に影響を及ぼし、歯周病の病態形成、歯周組織の創傷治癒・再生過程に深く関与しているものと推察される。

塩化カルプロニウムはアセチルコリン(Ach)誘導体の局所血管拡張薬であり、医薬品として既に臨床応用されている。塩化カルプロニウムはコリン作動薬であり、血管内皮細胞のムスカリン受容体を活性化することで内皮細胞弛緩物質であるNO(一酸化窒素)の産生を促進することにより血管平滑筋を弛緩させ血流亢進する作用があるとされている。効率的に組織再生を誘導するには幹細胞、足場、シグナル分子の3因子が重要であるが、それら因子を支える要素としても血流は必要不可欠である。塩化カルプロニウムの血流改善作用に着目し、同薬を歯周組織再生治療薬に応用できないかと考え、血管内皮細胞や種々の歯周組織構成細胞に及ぼす同薬の作用を検討した。その結果、塩化カルプロニウムは従来からの血流改善作用のみならず、*in vitro*において血管新生する作用があること、また歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進する作用があることを明らかにした(若手研究(B)課題番号24792324局所血流改善薬の歯周組織再生過程に及ぼす影響の解析)。これらの知見は、同薬が歯周組織再生を促進する作用がある可能性を示している。

血流改善薬である塩化カルプロニウムを歯周組織再生治療薬として応用する可能性を科学的に論証するためには同薬剤が歯周組織を構成するさまざまな細胞に及ぼす機能や、歯周組織再生を誘導する効果を発揮し得るか否か動物実験等を用いて検討する必要がある。近年、血管内皮細胞のみならず、さまざまな種類の硬組織形成細胞にムスカリン受容体が存在するとの報告があり、これらの知見はアセチルコリン-ムスカリン受容体カスケードで作動する副交感神経系が、骨芽細胞の制御を介して骨の微小動態を調節していることを示唆している。これまでの実験結果より歯根膜細胞にはムスカリン受容体が発現しており、その他のコリン作動系構成要素の存在の可能性が示唆される。歯根膜においてアセチルコリン構成要素が発現し、それが機能していれば、新たな歯周組織の恒

常性の維持機構の解明の一助なると思われる。

2. 研究の目的

歯根膜における血流は、歯根膜構成細胞の増殖・分化・代謝活性等の恒常性維持に関与しているのみならず、歯周組織の創傷治癒、再生過程においても極めて重要な役割を演じているものと考えられる。そこで本研究では、局所血流改善薬である塩化カルプロニウムを用い、同薬が歯周組織治癒、再生過程における血管新生、骨代謝、末梢神経ネットワークの再構築に及ぼす影響を*in vitro*、*in vivo*の系を用いて解析する。また歯根膜細胞におけるアセチルコリン構成要素の発現の検索を行い、歯周組織の恒常性維持機構の解明の一助となるよう検討を行う。そして得られた知見を基にして血流改善薬を応用した新規歯周組織再生治療薬の開発につながる基盤情報を構築する。

3. 研究の方法

1) ヒト歯根膜細胞(Lonza社)におけるアセチルコリン構成要素の発現の検索

RT-PCR法、細胞免疫染色、FACSを用いてmRNAレベル、タンパクレベルで歯根膜細胞におけるアセチルコリン構成要素の発現の検索を行った。

2) アセチルコリンがヒト歯根膜細胞の増殖に及ぼす影響の検索

ヒト歯根膜細胞(Lonza)を12wellのdishに 1×10^5 個/ml(α -Mem FCS10%)播種し、Ach(1μ M) Ach(10μ M) FGF50ng/mlのそれぞれで刺激し、48時間後にcell countを行い、無刺激群との比較を行った。

3) マウス歯根膜細胞(MPDL22)におけるムスカリン受容体発現の変化の検索

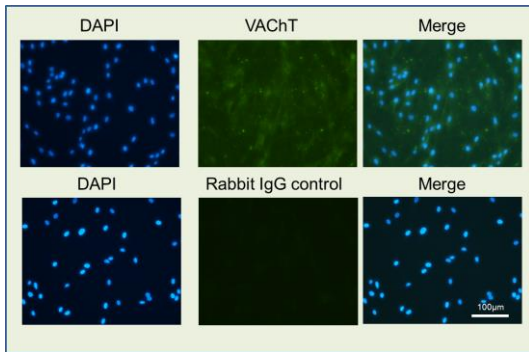
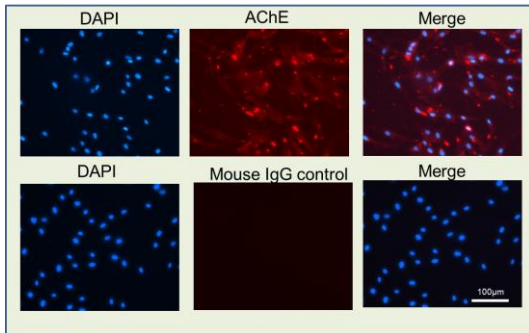
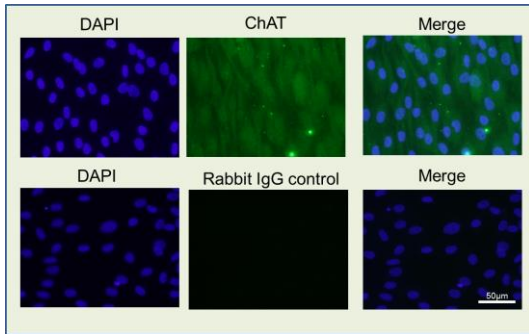
マウス歯根膜細胞株(MPDL22)を以下の方法を用いて細胞分化誘導を行う。すなわち、24時間前に播種しコンフルエント状態に達したMPDL22を、グリセロリン酸およびアスコルビン酸を添加した10%FCS含有 α -MEM培地(以下石灰化誘導培地と略す)にて、3日おきに石灰化誘導培地の交換を行った。0, 3, 6, 9日後にそれぞれRNAを回収し、ムスカリン受容体の遺伝子発現の変化の検索を行った

4) ラット頭蓋骨欠損モデルを作製し塩化カルプロニウム局所投与による治癒・再生過程の検索

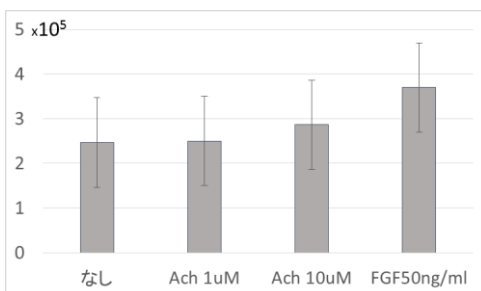
実験動物として12週齢のSD系ラットを用いた。全身麻酔下にて頭蓋骨にトレフィンバーにて3.8mm径の骨欠損を作製する。基材としてコラーゲンスポンジを用い、実験群に0.1%塩化カルプロニウム/PBS、対照群としてPBSを塗布し、皮膚の縫合を行った。2週間後ラットを灌流固定し、頭蓋骨を摘出し、CT撮影を行い、新生骨量を測定した。

4. 研究成果

1) ヒト歯根膜細胞においてアセチルコリン受容体をはじめ神経系で発現がみられるアセチルコリンを生成するための酵素である ChAT (choline acetyl transferase)、分解する酵素である AChE (acetylcholine esterase)、貯蔵するのに必要な VAcHT (vesicular acetylcholine transporter) が mRNA、タンパクレベルで発現が認められるとの結果を得た。

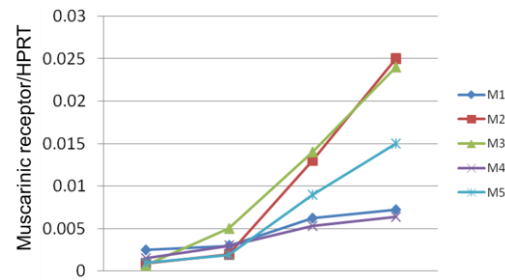


2) ヒト歯根膜細胞においてアセチルコリン (1µM 10µM) 刺激では有意な変化は認められなかった。

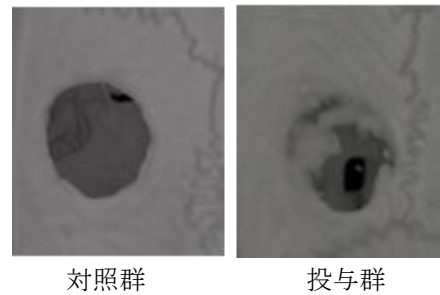


3) MPDL22 においてムスカリン受容体とりわ

けサブタイプ 2 および 3 は石灰化培地で培養すると経時的に発現の上昇が認められた。



3) 0.1%塩化カルプロニウムはラット頭蓋骨骨欠損モデルにおいて骨新生を促進する可能性があることが示唆された。



ラット頭蓋骨欠損 (3.8mm 径) へ 0.1%塩化カルプロニウムを投与 2 週後のマイクロ CT 像

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

K Miki, S Honma, S Ebara K Kumamoto, S Murakami, S Wakisaka: Changes in the Distribution of Periodontal Nerve Fibers during Dentition Transition in the Cat, PLoS One, 17;10(6):e0129826, 2015, 査読あり

Nagayasu-Tanaka T, Nozaki T, Miki K, Sawada K, Kitamura M, Murakami S: FGF-2 promotes initial osseointegration and enhances stability of implants with low primary stability, Clin Oral Implants Res. 2016 Feb 26. doi: 10.1111/clr.12797, 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

Koji MIKI, Motozo YAMASHITA, Manabu YANAGITA, Kenta MORI, Masahiro KITAMURA and Shinya MURAKAMI
Expression of non-neuronal cholinergic system in periodontal ligament cells
第 63 回 JADR 学術大会 2015 年 10 月 30 日、

31日 博多 福岡県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 康史 (MIKI KOJI)

大阪大学歯学部附属病院・医員

研究者番号 10598395