

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21592575

研究課題名（和文）

各種骨関連手術後の治癒期間短縮を目指したメラトニン療法の開発

研究課題名（英文）

Development of the melatonin treatment which aimed at shortening of the recovery period after operation related bone tissue.

研究代表者

里村 一人（Kazuhito Satomura）

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

研究成果の概要（和文）：

概日リズム調節ホルモンであるメラトニンが、骨芽細胞に作用することを利用し、本研究では、骨折後にメラトニンを投与するとその治癒期間が短縮されることを見出すとともに、チタン製インプラント埋入後にメラトニンを投与すると osseointegration が促進されることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

Melatonin, which is controlled by the light/dark cycle of the environment, promote growth and differentiation of osteoblasts. In this study, we elucidated that melatonin have the potential to promote the healing after bone fracture and osseointegration after dental implantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般、メラトニン、骨関連手術、治癒期間短縮

1. 研究開始当初の背景

主に松果体より分泌されるホルモンであるメラトニンは、1958年にLernerらによって、ウシ松果体より分離・精製された。その分泌は光刺激により調節されており、夜間には多く分泌され、日中にはほとんど分泌されない。現在までに報告されているメラトニンの主な生理作用としては、概日リズムの調節、抗性腺作用に起因するとされる季節繁殖動物の性周期の調節、また抗老化作用として老齡マウスの生存率を高める作用やリンパ球や単球に

作用してインターフェロントやインターロイキン-2, 4, 6などのサイトカインの産生を促す免疫賦活作用、さらにはMCF-7などの乳癌細胞の増殖を抑制するという抗腫瘍作用など多彩な生理作用が報告されている。また、メラトニンは視床下部に作用することにより下垂体より分泌される成長ホルモンや副腎皮質刺激ホルモンの分泌を調節していると報告されている。このことからわれわれは、メラトニンが様々な生理作用を発揮する中で骨格成長にも深く関与している可能性に注目していたが、メラトニンの骨組織に対する作用に

についてはほとんど報告がなかった。最近われわれはメラトニンがヒト骨芽細胞に作用し、その増殖を促進するとともに分化を濃度依存的に促進すること、さらには薬理的濃度のメラトニンがマウスの骨格成長を促進させることを明らかにした (J. Pineal Res. 42:231-239, 2007)。

この事実を踏まえ、われわれはメラトニンが単に骨格の成長に促進的に作用するばかりではなく、骨折の治癒や各種骨関連手術(骨移植術、顎変形症に対する骨切り術、骨延長術、インプラント手術など)後の治療期間を大幅に短縮できる可能性に着目した。この点を明らかにすることを目的に、本研究においては、マウスの肋骨骨折モデルを用いて、実際にin vivoにおいてメラトニンが骨組織の治癒促進作用を有し、骨折の治癒期間および各種骨関連手術後の治療期間の短縮効果を有しているか否かについて検討した。

さらに、最近われわれは免疫組織化学的手法を用いて、ヒトの下顎第3大臼歯歯胚およびマウスとラットの切歯歯胚におけるメラトニン受容体の発現について検討を行った。その結果、ヒト、マウス、ラットの歯胚においてもメラトニン受容体の一つであるMellaRが発現されていること、さらにはその発現様式が種を通して共通していることを確認した。MellaRは存在が確認されている数種類のメラトニン受容体のうちもっとも機能的なものである。この事実は、メラトニンが骨形成・骨格成長ばかりでなく、歯の形成・発育にも深く関与していることを強く示唆しているものと考えられる。一方、現在再生医学研究の一分野として歯の再生研究が盛んに行われてきており、遠くない将来歯の再生が実現する可能性は高いと考えられる。しかし、現時点においても未だin vivoにおける歯の再生には長期間を要しているのが現実であり、たとえ将来歯の再生技術が確立されたとしても生体内での組織構築に時間を要することが予想される。このことから、歯の再生を実際の医療技術として確立するためには、歯の再生方法そのものと同時に歯の形成を促進する何らかの手法を開発しておくことが重要と考えられる。このような観点から、本研究においては、歯の形成・発育に対するメラトニンの作用を明らかにするとともに、歯の再生医療実現におけるメラトニン利用の有用性につき併せて検討を行った。

2. 研究の目的

われわれが従来行ってきた研究により、

1) ヒト骨芽細胞が機能的なメラトニン受容体 (MellaR) を発現していること、2) メラトニンがヒト骨芽細胞の増殖を促進すること、3) メラトニンがヒト骨芽細胞の分化を促進すること、4) マウスの骨形成 (骨格成長) がメラトニン投与により促進されることが明らかとなっている (J. Pineal Res. 42:231-239, 2007)。この研究成果を踏まえ、本研究ではメラトニンの骨形成促進作用を利用した骨折の治癒期間や各種骨関連手術後の治癒期間の短縮を目指す。本研究においてはマウス肋骨骨折モデル、ウサギインプラント埋入術モデルを用いて、1) メラトニンが骨組織の治癒促進作用を有しているかどうか、2) 骨折の治癒期間短縮効果を有しているかどうか、3) 各種骨関連手術後の治療期間短縮効果を有しているかどうか、4) 想定した効果を得るために最適なメラトニンの投与方法は何か、5) その投与量はどれくらいか、6) 将来の臨床応用開始の障害となるような副作用はないかという点に関して明らかにしていくことを目的とした。さらに歯の再生医療の実現を目指す上でのメラトニンの有用性について検討するために、ヒト歯乳頭細胞、ヒト歯小囊細胞およびラット歯原性上皮細胞株 (HAT-7) の増殖・分化に対するメラトニンの作用についても分子細胞生物学的的手法により解明することを目的とした。このような目的を達成するため以下に示すような研究計画・方法により本研究を遂行した。

3. 研究の方法

このような従来の研究成果を踏まえ、本研究ではメラトニンの骨形成促進作用を利用した骨折の治癒期間や各種骨関連手術後の治療期間の短縮を目指した。マウスの肋骨骨折モデル等に薬理的濃度のメラトニンを投与し、1) 実際にin vivoにおいて骨組織の治癒促進作用がみられるかどうか、2) 臨床的に有用と考えられる程度の骨折の治癒期間および各種骨関連手術後の治療期間の短縮効果を有しているか否かについて検討した。さらに投与したメラトニンの血中動態モニタリングを含め全身的副作用の発現についても詳細に検討し、メラトニンの投与方法、投与量の適正化を図ることにより、臨床試験開始に向けた基礎データの収集を同時に行った。またわれわれが保有しているヒトの歯乳頭細胞や歯小囊細胞の増殖・分化に対するメラトニンの作用を分子細胞生物学的に明らかにすることにより、歯の再生医療実現のためのメラトニンの有用性について併せて検討した。具体的には、ICR マウスの右側第8肋骨を外科的に骨折させ、骨折後1日

目より4週間にわたり種々の濃度のメラトニンを腹腔内投与した、投与から1, 2, 3, 4週目に骨折部を含む肋骨を採取し、組織学的固定を行い、マイクロCTにて観察した。加えて、骨折部を中心に3mmの範囲の肋骨を摘出し、ホモジナイズし、total RNAを抽出し、半定量的RT-PCR法にて骨関連遺伝子のmRNA発現につき検討した。

さらに、歯の再生医療においてもメラトニンを応用できる可能性について検討するため、歯乳頭由来細胞および歯原性上皮細胞を用いて、メラトニン受容体の発現および増殖、分化に対するメラトニンの影響について検討した。

また、チタン製インプラント埋入後のosseointegrationに対する影響について、ラット脛骨にインプラントを埋入し、局所的にFGF-2を5日間投与するとともに、100mg/kg body weightのメラトニンを4週間連続腹腔内投与し、組織学的に骨形成やチタン製インプラント体とのosseointegrationについて検討した。

4. 研究成果

以上の検討の結果、まず、骨折部におけるマイクロCT画像より、コントロール群と比較してメラトニン投与群で骨折部の治癒が約1週間促進されている傾向が認められた。また、主要臓器においても明らかな異常所見は認められず、マウスの体重変化などの副作用も認められなかった。また、RT-PCR法により、メラトニン投与群では骨関連遺伝子のmRNAの発現がコントロール群と比較して早期に上昇する傾向が認められた。このことから、メラトニンは骨折の治癒期間を短縮する可能性が強く示唆された。

また、各種歯原性細胞に対しては、メラトニンはその増殖に明らかな影響を及ぼさなかった。また、分化に対しても明らかな影響は認められなかった。しかし、歯胚組織においては各種歯原性細胞にメラトニン受容体の発現が認められることから、メラトニンがこれらの歯原性細胞に何らかの影響を持つことが考えられるが、いまだ、明らかにできていない。

さらに、チタン製インプラント体埋入後にメラトニンおよびFGF-2を投与した群では、コントロールと比較して、インプラント体周囲に有意に骨形成が促進されており、メラトニンがチタン製インプラント体のosseointegrationを促進する可能性が強く示唆された。

これらの結果から、メラトニンを各種骨関連手術後の治癒期間短縮に応用できる可能性が強く示唆された、今後は他の骨関連手術

にも応用するとともに臨床応用を目指していく予定である。

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)

①Masashi Shimozuma, Kazuhito Satomura, et al. Expression and cellular localization of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. *Histochemistry and Cell Biology* 135:389-396, 2011.

②Shuku Kumasaka, Kazuhito Satomura, et al. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin la receptor in human and mouse tooth germs. *Histochemistry and Cell Biology* 133:577-584, 2010.

[学会発表] (計 8 件)

①下間雅史、里村一人、他 唾液腺におけるメラトニン合成酵素の発現とその経時的変化. 第56回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2011年10月21日. 大阪.

②下間雅史、里村一人、他 唾液腺におけるメラトニン合成酵素の発現とその局在. 第11回日本抗加齢医学会総会・学術大会. 2011年5月27日. 京都.

他

6. 研究組織

(1) 研究代表者

里村一人 (Kazuhito Satomura)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号: 80243715

(2) 研究分担者

舘原誠晃 (Seiko Tatehara)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号: 90380089

徳山麗子 (Reiko Tokuyama)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号: 20380090

山本英雄 (Yamamoto Hideo)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号: 10220493

服部淳彦 (Atsuhiko Hattori)
東京医科歯科大学・教養部・教授
研究者番号：70183910

橘 竜佑 (Ryusuke Tachibana)
鶴見大学・歯学部・臨床助手
研究者番号：80514926

(3) 連携研究者

なし