

Title	歯周組織の治癒過程におけるCGRPの機能解析
Author(s)	竹下, 登
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/87970">https://doi.org/10.18910/87970</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

学位論文

歯周組織の治癒過程における  
CGRP の機能解析

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻  
口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学

竹下 登

(指導教官：村上 伸也 教授)



## 緒言

歯根膜は、セメント質と歯槽骨間に介在するコラーゲン線維に富む非石灰化の結合組織であり、線維性付着により、歯を支持・固定する役目を担っている。また、歯根膜は、咬合力、矯正力といったメカニカルストレスに反応して、100～250 $\mu\text{m}$ の幅を保ちながら、歯槽骨、セメント質および結合組織のリモデリングを行い、歯周組織の恒常性維持を担っている<sup>1)</sup>。近年の研究において、歯根膜中には多分化能を示す間葉系幹細胞の性質を保持した細胞が存在し、これらの細胞が歯周組織における創傷治癒や再生において重要な役割を担っていると考えられている<sup>2-4)</sup>。さらに、歯根膜は、脈管のみならず豊富な感覚神経支配を受け、咬合時の感覚受容器としても機能している。一方、歯根膜には加齢に伴い歯根膜空隙の狭窄、細胞成分の減少が観察されるとともに、神経線維の変性が多くみられるようになる<sup>5-7)</sup>。また、歯周病のリスクファクターである糖尿病では末梢循環および神経に障害が生じ、歯根膜においても同様の障害が懸念される。すなわち、加齢や全身疾患に伴う歯周病の病態形成や、歯周組織の恒常性維持や創傷治癒過程において、神経関連分子が深く関与していると推察される。

神経細胞は、感覚器官で受け取った刺激を中枢神経に、中枢の指令を末梢に電気的な信号として伝える機能を持つが、そのみならず、神経細胞自身も神経ペプチドを産生・分泌し、その生理活性により、周囲の組織の活動を制御する機能も有している。従来までの組織学的検索により、歯根膜には機械受容器としてのルフィニ神経終末と、侵害受容器としての自由神経終末が存在することが明らかとなっている<sup>8)</sup>。さらに、神経ペプチドは、自由神経終末に数多く存在していることが明らかとなっている。歯周組織には様々な神経ペプチドが存在するが<sup>9)</sup>、これまでに骨代謝に関連する報告のある神経ペプチドとして **Calcitonin Gene-Related Peptide** (以下、**CGRP** と略す) がある。**CGRP** とは、カルシトニン遺伝子を選択的スプライシングして作られる、37 個のアミノ酸からなる神経ペプチドである。**CGRP** は血管周囲の神経<sup>10,11)</sup>に多く含まれ、強力な血管拡張作用を示し、炎症組織の支配神経では同ペプチドの合成が促進されることが考えられている<sup>12)</sup>。歯周組織における神経ペプチドは三叉神経節で生成され、末梢神経終末より分泌されることが知られているが、興味深いことに、歯根膜には **CGRP** を含む神経線維が多く存在すること<sup>13,14)</sup>や、実験的な歯の移動が **CGRP** を含む神経線維に影響を与えること<sup>15,16)</sup>が報告されている。

一方、最近の研究により、骨膜上に分布する神経を損傷した骨では、骨折の治癒が障害されること<sup>17)</sup>、骨折部に **CGRP** が多く分泌されると骨形成が促進されること<sup>17)</sup>、骨芽細胞や破骨細胞に **CGRP** 受容体が発現していること<sup>18,19)</sup>、**CGRP** アイソフォーム特異的欠損マウスでは骨折治癒が障害されること<sup>20)</sup>、また、ラ

ット骨髄間葉系幹細胞に **CGRP** を強制発現させると石灰化が促進されること<sup>21)</sup> など、**CGRP** と骨代謝の関連を示唆する様々な報告が蓄積されてきている。

このような背景から、歯根膜に分布する神経も、同組織中に **CGRP** を放出し、セメント質や歯槽骨の代謝に対して何らかの生理的機能を果たしている可能性が考えられる。しかしながら、歯周組織における **CGRP** 依存性の骨代謝に関する研究の報告は少ない。そこで本研究では、歯周組織の創傷治癒過程における **CGRP** の役割を解析することを目的として、歯周組織再生の中心を担う歯根膜細胞に対する **CGRP** の機能を検討し、さらにマウス絹糸結紮歯周炎モデルにおける **CGRP** の機能について検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 試薬

Recombinant mouse Calcitonin-Gene Related Peptide (CGRP ; Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA) を実験に供した。

### 2. 細胞培養

本研究では、マウス歯根膜細胞として、2.5 週齢の BALB/c マウス歯根表面より採取して得られた細胞を、FGF-2 存在下で限界希釈法にてクローニングすることにより樹立したクローンの中で、最も高いアルカリフォスファターゼ活性を示した細胞株 MPDL22<sup>22)</sup>の、継代 37 代から 40 代目までの細胞を実験に用いた。

MPDL22 は 10%ウシ胎仔血清 (Biowest, Nuaille, Pays De La Loire, France 以下、FBS と略す) と 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  カナマイシン (和光純薬工業、大阪、日本) を加えた  $\alpha$ -Modification of Eagle's Medium (和光純薬工業) 培地 (以下、培養培地と略す) にヒト型リコンビナント FGF-2 (科研製薬、東京、日本) を 100  $\text{ng}/\text{ml}$  加えて 5%CO<sub>2</sub>、37°C、湿度 95%の条件下で培養した。継代培養の際には 0.05% トリプシン、0.02%EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 添加のリン酸緩衝液 (和光純薬工業、以下、PBS と略す) で処理し、100 mm 培養ディッシュ (Corning, Corning, NY, USA) に播種した。

### 3. 生細胞数計測

生細胞数計測は、countess<sup>®</sup> 3 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。すなわち、細胞を培養したプレート を 1 ml PBS で洗浄し、0.05%トリプシン、0.02%EDTA (Thermo Fisher Scientific) 添加の PBS 1ml で処理した細胞懸濁液を、0.4w/v%トリパンブルー溶液 (和光純薬工業) で染色後、非染色細胞を計測した。

### 4. 分化誘導

MPDL22 の硬組織形成細胞への分化誘導は、同細胞を 12 穴細胞培養プレート (Corning) に  $1.0 \times 10^5$  個/well となるように播種し、10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸 (和光純薬工業)、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アスコルビン酸 (和光純薬工業) を添加した培養培地 (以下、石灰化誘導培地と略す) にて培養し、以後 3 日ごとに培地交換することにより行った。

## 5. 全 RNA の抽出

全 RNA の抽出は、核酸抽出試薬 RNA-Bee™ (TEL-TEST、 Friendswood、TX、USA) を用いて行った。すなわち、培養終了後に回収された細胞に RNA-Bee を加えて可溶化し、1/10 容量のクロロホルム (和光純薬工業) を添加後、12000 rpm、15 分間遠心分離した。分離された水層を回収し、イソプロパノール (和光純薬工業) の添加によって RNA を沈殿させ、75%エタノール (和光純薬工業) で洗浄した。その後、全 RNA 沈殿を 20 µl ジエチルピロカルボン酸処理水 (和光純薬工業、以下 DEPC 処理水と略す) に溶解し、全 RNA 量を NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて計測した。

## 6. 相補鎖 DNA (Complementary DNA、以下、cDNA と略す) の作製

全 RNA を鋳型として逆転写を行い cDNA を作製した。すなわち、65°C で熱処理された各 RNA サンプル 1 µg に、以下に示す最終濃度、20% 5× First Strand Buffer (Thermo Fisher Scientific)、1 mM Dithiothreitol (Life Technologies、Gaithersburg、MD、USA)、1.1 U/µl リボヌクレアーゼ阻害剤 (タカラバイオ、滋賀、日本)、0.5 mM dNTP 混合液 (タカラバイオ)、5 U/µl Moloney-Mouse leukemia Virus 逆転写酵素 (Life technologies)、55 ng/µl Random Hexamers (Pharmacia Biotech、Milwaukee、WI、USA) となるように各試薬を混合し、DEPC 処理水で全量 40µl の反応液を調合した。反応液を 37°C にて 60 分間保温後、99°C にて 5 分間処理し残留酵素を失活させることで cDNA を作製した。

## 7. Polymerase Chain Reaction (以下、PCR と略す) による cDNA の増幅および検出

CGRP 受容体は、カルシトニン受容体様受容体 (Calcitonin Receptor-like Receptor ; 以下、CLR と略す) と受容体活性調節タンパク 1 (Receptor Activity-Modifying Protein 1 ; 以下、RAMP1 と略す) からなる二量体で、これらが receptor component protein (以下、RCP と略す) と連動することで細胞内伝達系を駆動する<sup>23)</sup>。

MPDL22 における *Ramp1*、*Clr*、*Rcp* の発現解析は、合成された cDNA を鋳型として各遺伝子特異的なプライマーを使用し、PCR 法による増幅を行った。すなわち AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 12.5 µl、cDNA 溶液 1 µl に、表 1 に示す各遺伝子特異的なプライマー (ジーンデザイン、大阪、日本および FASMAC、神奈川、日本) を最終濃度 0.2 µM となるよう加え、DEPC 処理水で全量 25 µl の反応液を調合した。調合した反応液を 95°C 2 分間の熱処理した後、95°C 30 秒間の熱変性、56°C 3 秒間のアニーリング、72°C 1 分間の伸長反応を 1 サイクルとし、Mastercycler® nexus GX2 (Eppendorf、

Eppendorf, Hamburg, Germany) により 40 サイクルの cDNA 増幅を行った。これら PCR 産物を 1.5%アガロースゲル (和光純薬工業) にて電気泳動し、エチジウムブロマイド (和光純薬工業) にて可視化した。

表 1 PCR 解析に使用したプライマー

遺伝子		プライマー
<i>Mouse Gapdh</i>	F	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
	R	5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'
<i>Mouse Ramp1</i>	F	5'-CTGAGACACAGCCAAGTGGA-3'
	R	5'-AAGCCAACAGCTTCAAGGAA-3'
<i>Mouse Clr</i>	F	5'-CTCCGTTTTTCCTTCTGCTTG-3'
	R	5'-TCAGGAAAAAGCAAGCCACT-3'
<i>Mouse Rcp</i>	F	5'-TGCCTCTGCACCTCTGTATG-3'
	R	5'-GCACCCCTGCTCTATCTCTG-3'

## 8. 全細胞画分のタンパクの回収

培養細胞を PBS にて 2 回洗浄した後にプロテアーゼインヒビターカクテル錠 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)、1 mM フッ化ナトリウム (和光純薬工業)、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、を加えた RIPA Lysis Buffer (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を加え、セルリフター (Corning) を用いてディッシュより細胞剥離し、さらに遠心 (12000 rpm、4°C、10 分) 後に、上清を回収し全細胞画分を得た。いずれのサンプルも Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA) を反応させ、BioPhotometer plus (Eppendorf,) で蛍光測定し、Pre-Diluted Protein Assay Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set (Thermo Fisher Scientific) を基準としてタンパク量を算出した後、濃度を同値に調整した。(Bradford 法)

## 9. Western Blotting

Ramp1 および Clr の発現の解析には MPDL22 から得られた全細胞画分を用い、 $\beta$ -actin をコントロールとした。

得られた全細胞画分を 2-メルカプトエタノール (和光純薬工業) 含有 Laemmli の 5x サンプルバッファーを用いて 98°C 10 分間熱処理することにより還元し、Mini-PROTEAN® TGX Precast Gel (Bio-Rad Laboratory) と、Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad Laboratory) を用いて電気泳動を行い、タンパク溶解画分を展開した。その後、Trans-Brot® Turbo (Bio-Rad Laboratory)



と PowerPac™ (Bio-Rad Laboratory) を用いて、メンブレンに転写した (室温、100V、3 時間)。メンブレンは Bullet Blocking One for Western Blotting (Nacalai tesque、京都、日本) を用いてブロッキングを行った (室温、5 分)。一次抗体にはウサギ抗 Ramp1 抗体 (1: 1000; Abcam、東京、日本)、ウサギ抗 Clr 抗体 (1: 300; Bioss、Woburn、MA、USA)、マウス抗  $\beta$ -actin 抗体 (1: 5000; Sigma-Aldrich)、を用いて、二次抗体に HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1: 5000 ; GE Healthcare、Chicago、IL、USA)、あるいは HRP 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体 (1: 10000 ; GE Healthcare) をそれぞれ反応させ、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いて発光シグナルを増幅した後、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) にてバンドを検出した。

## 10. Real-time PCR

Real-time PCR による解析は、cDNA を鋳型として、表 2 に示す各遺伝子特異的な Real-time PCR 用プライマー (ジーンデザインおよび FASMAC) を用いて行った。PCR 反応は Fast SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) を用いて、Step One Plus Real-time PCR System® (Applied Biosystems) にて行った。なお、各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子の一つである *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Hprt)* を内在性コントロール遺伝子として同遺伝子の発現量に対する相対量として算出した。

表 2 Real-time PCR に使用したプライマーの一覧

遺伝子		プライマー
<i>Mouse Hprt</i>	F	5'-TTGTTGTTGGATATGCCCTTGA-3'
	R	5'-AGGCAGATGGCCACAGGACTA-3'
<i>Mouse Alpl</i>	F	5'-ACACCTTGACTGTGGTTACTGCTGA-3'
	R	5'-CCTTGTAGCCAGGCCGTTA-3'
<i>Mouse Bglap1</i>	F	5'-AGCAGCTTGGCCCAGACCTA-3'
	R	5'-AGCGCCGGAGTCTGTTCACCTA-3'
<i>Mouse Sp7</i>	F	5'-CGCATCTGAAAGCCCACTTG-3'
	R	5'-CAGCTCGTCAGAGCGAGTGAA-3'
<i>Mouse Ramp1</i>	F	5'-GGCATTTCAGTTGGGATCAGCTA-3'
	R	5'-TGTCGCCTGCCAATGTCAGTA-3'
<i>Mouse Clr</i>	F	5'-CTCCGTTTTCTTCTGCTTG-3'
	R	5'-TCAGGAAAAGCAAGCCACT-3'

## 11. アリザリン染色による石灰化ノジュール形成能の検討

石灰化ノジュール形成能は、アリザリンレッド染色により検討した。すなわち、MPDL22 を硬組織形成細胞へと 18 日間分化誘導した後、培養上清を除去、細胞層を PBS にて 2 回洗浄し、100%エチルアルコール（和光純薬工業）にて固定（4℃、10 分間）した。1%アリザリンレッド S（和光純薬工業）、0.1%水酸化アンモニウム（和光純薬工業）水溶液（pH 6.4）にて染色（室温、5 分間）した後、蒸留水にて洗浄した。染色像は、カラーイメージスキャナ GT-X970（エプソン、東京、日本）にて読み込むことで、画像を取得した。その後、画像解析ソフトウェア WinRoof（三谷商事、福井、日本）にて解析を行い、染色部面積率および色濃度を数値化し、その積を石灰化ノジュールの形成度として算出した。

## 12. 実験動物

本研究におけるすべての実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の定める動物実験ガイドラインに従って行った（大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会 受付番号:動歯 R-01-019-0、遺伝子組み換え承認番号:04484）。

野生型マウスは日本 SLC 株式会社（静岡、日本）から購入した。*Ramp1* 遺伝子欠損マウス<sup>24)</sup>は、理化学研究所 BRC から入手した *Ramp1*<sup>+/−</sup>マウスで繁殖させ、ジェノタイピングを行い、*Ramp1*<sup>+/−</sup>マウスを選別した。

マウスジェノタイピングは、後肢より採取した足指を proteinase K（Nacal tesque）にて処理し、抽出したゲノム DNA を鋳型として、表 3 に示す野生型 *Ramp1* 遺伝子と変異型 *Ramp1* 遺伝子を識別するプライマーを用いたゲノム PCR 法にて行った。94℃3 分間の熱処理後、94℃30 秒間の熱変性、60℃30 秒間のアニーリング、72℃30 秒間の伸長反応を 1 サイクルとし、Mastercycler® nexus GX2（Eppendorf）を用いて 30 サイクルの PCR 反応を行った。

表 3 ジェノタイピングに使用したプライマー

	プライマー
F	5'-CAGAATGGAGAAACTGAGTAGAGC-3'
R1	5'-AGGAAGGAACGTAACACAGGTGG-3'
R2	5'-GCTGTGCGTGGTGATGGAGG-3'

*Ramp1*<sup>+/−</sup>マウスは正常に生まれ、*Ramp1*<sup>+/−</sup>マウスどうしでの繁殖、系統維持が可能であった。また、現在、8 ヶ月齢まで飼育しているが、外見上の異常は認めない。実験には 8 週齢の BALB/c 野生型マウスおよび BALB/c *Ramp1*<sup>+/−</sup>マウスそれぞれ 15 匹を用いた。

### 13. マウス絹糸結紮歯周炎モデル

麻酔には、ドミトール（日本全薬工業、東京、日本）、ミダゾラム（サンド、東京、日本）、ベトルファール（明治製菓ファルマ、東京、日本）、生理食塩水（大塚製薬、東京、日本）を用いて調整した 3 種混合麻酔薬（メドトミジン塩酸塩 75 µg/ml、ミダゾラム 400 µg/ml、酒石酸ブトルファノール 500µg/ml）を使用した。麻酔からの覚醒には、アンチセダン（日本全薬工業）、生理食塩水（大塚製薬）を用いて調整した麻酔拮抗薬（アチバメゾール塩酸塩 75µg/ml）を使用した。絹糸の結紮、および除去は 3 種混合麻酔薬 10 µl/g の腹腔内投与による深麻酔下で行い、それぞれの処置後は、麻酔拮抗薬 10 µl/g の腹腔内投与により覚醒を行った。絹糸結紮は Abe<sup>25)</sup>らの方法に準じて行った。絹糸は 5-0 PERMA-HAND SILK BLACK BRAIDED（Ethicon、Raritan、NJ、USA）を用い、双眼実体顕微鏡下で上顎両側第二臼歯に結紮した。

### 14. micro Computed Tomography（以下 µCT と略す）

検体に対し、R-mCT2（Rigaku、東京、日本）を用いて被験歯の断層撮影を管電圧 90 kV、管電流 160 µA、スライス幅 5 µm の条件で行い、µCT 画像を得た。撮影により得られたデータを三次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON（ラトックシステムエンジニアリング、東京、日本）で処理し、上顎左右の臼歯の輪郭の X 座標、Y 座標が重なるよう Z 軸を設定して二次元画像を取得した。二次元画像を画像解析ソフトウェア WinRoof（三谷商事）に取り込み、上顎第一臼歯の遠心根、上顎第二臼歯の近心根・遠心根、上顎第三臼歯の近心根の 4 根について、根中央部のセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの距離を計測し、その合計を Total Bone Loss として評価した。

### 15. 組織切片の作製

CO<sub>2</sub> ガスを用いて安楽死させた 8 週齢マウスの心臓内にカテーテルを挿入し、PBS で瀉血後、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液（和光純薬工業）で灌流固定し、上顎骨を取り出した。4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液にて 3 日間浸漬固定後、モールス液（和光純薬工業）にて 3 日間脱灰処理を行い、20%スクロース含有 PBS に一晩浸漬し OCT compound（サクラ精機、東京、日本）に包埋、ライカ CM3050 S（Leica、Nussloch、Germany）で厚さ 20µm の凍結切片を作製した。

## 16. ヘマトキシリン-エオシン染色（以下、HE染色と略す）

HE染色は、マイヤー・ヘマトキシリン（武藤化学、東京、日本）および1%エオシン Y 溶液（武藤化学）を用いて行った。組織標本は、ProLong™ Glass Antifade Mountant（Thermo Fisher Scientific）にて封入し光学顕微鏡で観察した。

## 17. 免疫染色

ABC法を用いて歯根膜神経線維の形態を観察した。切片をPBSで洗浄後0.3%過酸化水素水（和光純薬工業）を含むメタノール（和光純薬工業）で30分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。PBSで洗浄後、ウサギ抗CGRP抗体（1:5000；Sigma-Aldrich）、ウサギ抗Ramp1抗体（1:5000；Abcam）を用いて16~18時間反応させた。その後PBSで洗浄し、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体（1:500；Dako、Copenhagen、Denmark）を90分間反応させ、PBSで洗浄後ABC complex（Vector Laboratories、Burlingame、CA、USA）を90分間反応させた。その後 horseradish peroxidase を 0.04% 3,3-diaminobenzidine（DAB）（Sigma-Aldrich）と 0.003%過酸化水素水を含む 0.05M トリス塩酸緩衝食塩水液（Tris-HCl buffered saline, pH7.6）で可視化し、0.1%硫酸ニッケルアンモニウム（和光純薬工業）で増感した。すべての反応は室温下で行った。組織標本は、反応後、風乾し、上昇エタノール系列で脱水、G-NOX（ジェノスタッフ、東京、日本）にて透徹後、Multi Mount 480（松浪硝子工業、大阪、日本）にて封入し光学顕微鏡で観察した。

## 18. 統計

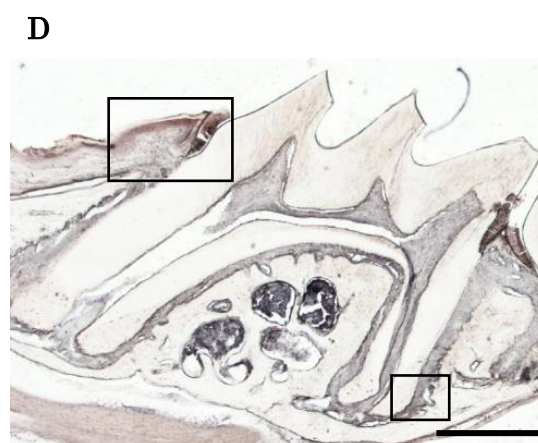
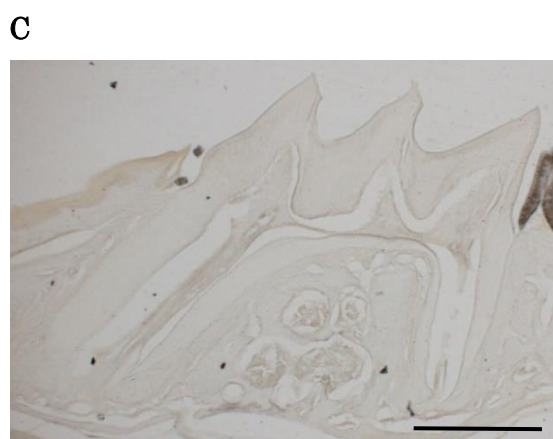
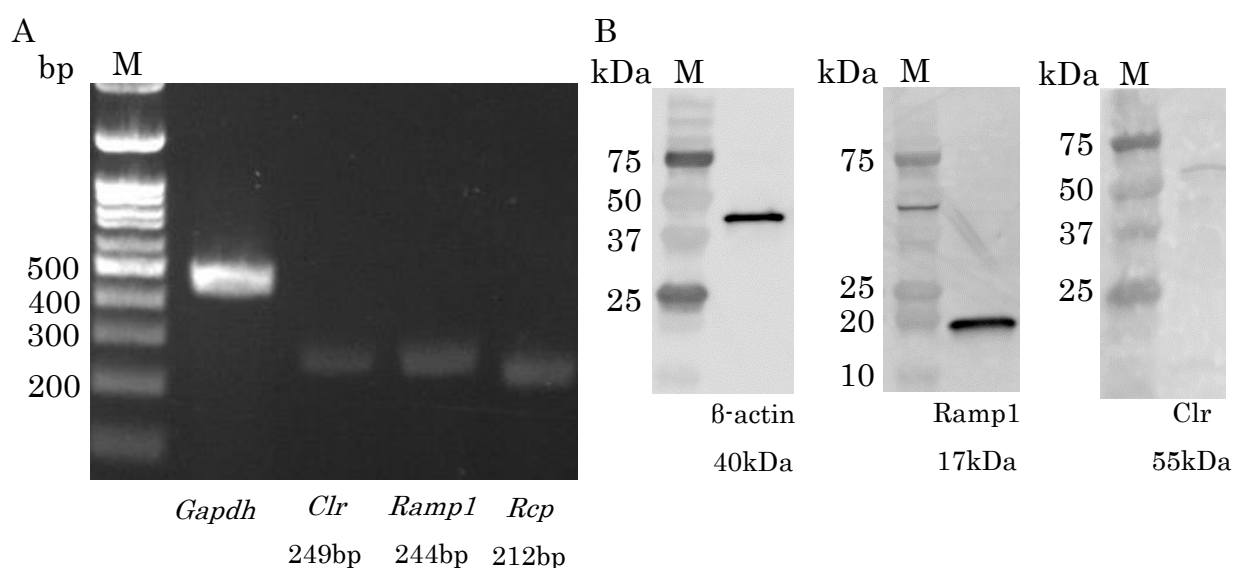
実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、二群比較はStudent's-t検定を、多群比較は分散分析（ANOVA）を行った後にpost-hocとしてTukey検定を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差があるものとした。

## 結果

### 1. マウス歯根膜における CGRP 受容体発現

CGRP の歯根膜細胞における機能を検討するにあたり、まずマウス歯周組織および歯根膜細胞株 MPDL22 における CGRP 受容体の発現を検討した。

まず MPDL22 を通常培養し、全 RNA の抽出と cDNA の作製、およびタンパクの回収を行った。その後、PCR 法により、MPDL22 における CGRP 受容体構成要素の mRNA 発現を検討した。その結果、MPDL22 において *Ramp1*、*Clr*、*Rcp* の発現を認めた (図 1A)。さらに、Western Blotting 法により、MPDL22 における受容体構成要素の発現をタンパクレベルで検討した。その結果、MPDL22 において *Ramp1*、*Clr* の発現を認めた (図 1B)。また、BALB/c マウス上顎臼歯の組織切片を作製し、抗 *Ramp1* 抗体による免疫組織化学染色を行ったところ、角質層を除く歯肉と歯根膜全域に *Ramp1* 陽性反応を認めた (図 1C、D、E、F)。



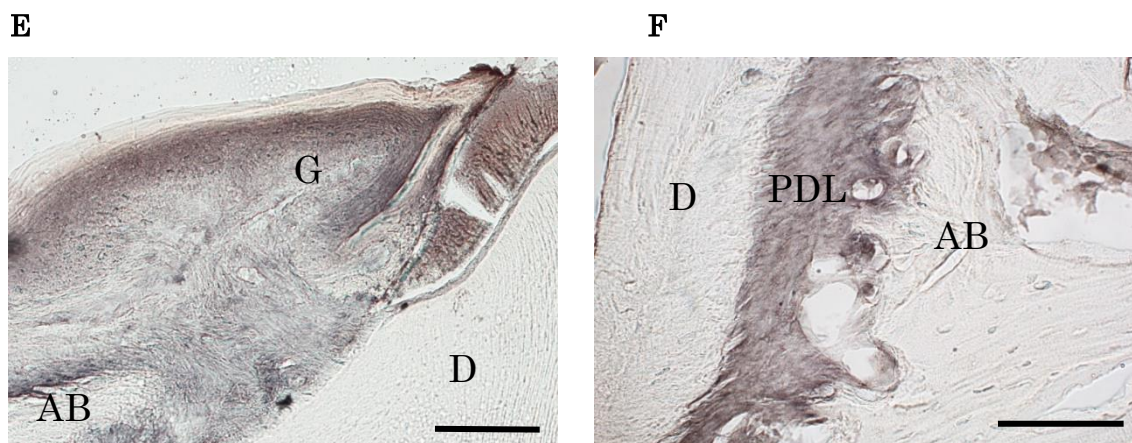


図 1. マウス歯根膜における CGRP 受容体の発現

- A. MPDL22 における *Ramp1*、*Clr*、*Rcp* 発現について PCR 法を用いて解析を行った。
- B. MPDL22 の全細胞画分を回収し、*Ramp1*、*Clr* の特異抗体にて Western Blotting を行った。
- C. マウス上顎第一臼歯の、一次抗体不使用での免疫染色像 (control)
- D. マウス上顎第一臼歯の抗 *Ramp1* 抗体による免疫染色像 (弱拡像)
- E. 図 1D 左上口部の拡大像。  
マウス上顎第一臼歯の角質層を除く歯肉に *Ramp1* 陽性反応を認めた。
- F. 図 1D 右下口部の拡大像。  
マウス上顎第一臼歯の歯根膜全域に *Ramp1* 陽性反応を認めた。
- AB : 歯槽骨、D : 象牙質、G : 歯肉、PDL : 歯根膜、  
スケールバー : 500 $\mu$ m (C、D)、100 $\mu$ m (E)、50 $\mu$ m (F)

## 2. CGRP が歯根膜細胞の増殖におよぼす影響の評価

MPDL22 における CGRP 受容体の発現が認められたため、CGRP が歯根膜細胞の増殖に及ぼす影響の評価を行った。MPDL22 を 6 穴細胞培養プレート (Corning) に  $1.0 \times 10^5$  個/well となるよう播種し、24 時間培養培地で培養後、FBS 非添加の培養培地で 48 時間のスタベーションを行った。その後、0、 $10^{-14}$ 、 $10^{-12}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-8}$ M の CGRP 存在下で、さらに、10%FBS、1%FBS、0.1 ng/ml FGF-2 の有無という条件を追加した培地 (図 2A) へと交換し、さらに 48 時間後に生細胞数計測を行った。

その結果、10%FBS、1%FBS、0.1 ng/ml FGF-2 の有無のいずれの条件下においても、MPDL22 の細胞増殖に対する CGRP の有意な影響は認めなかった (図 2B)。

A

カナマイシン 60 $\mu$ g/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBS 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CGRP	-	10 <sup>-14</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-10</sup> M	10 <sup>-8</sup> M	-	10 <sup>-14</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-10</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
FGF-2 0.1ng/ml	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
カナマイシン 60 $\mu$ g/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBS 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CGRP	-	10 <sup>-14</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-10</sup> M	10 <sup>-8</sup> M	-	10 <sup>-14</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-10</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
FGF-2 0.1ng/ml	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

B

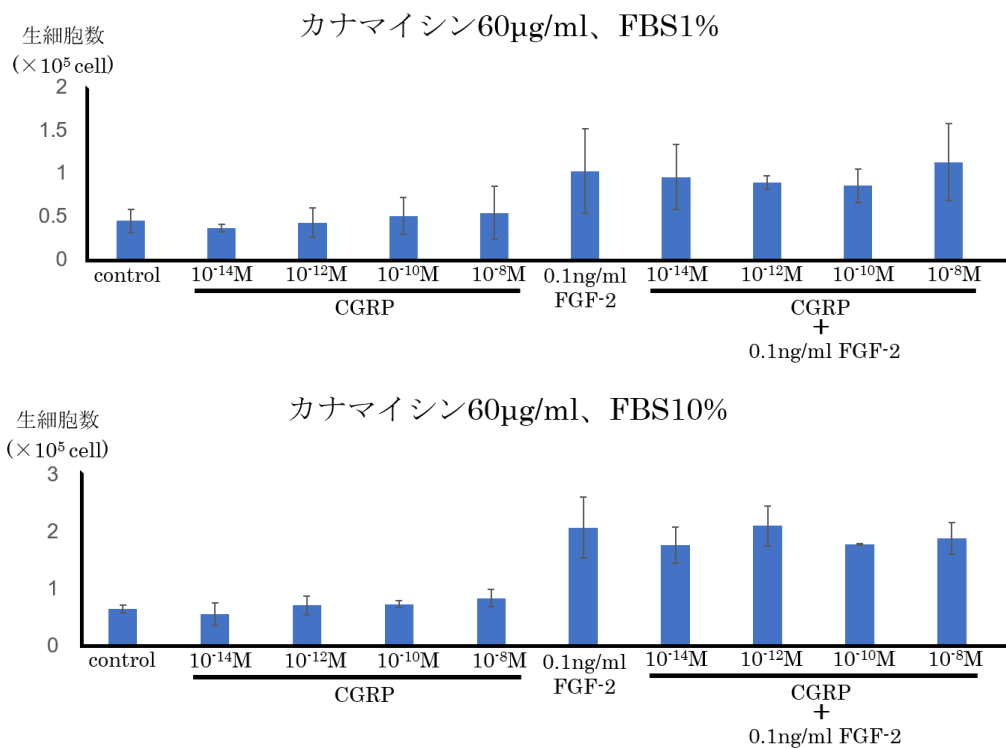


図 2. CGRP が歯根膜細胞の増殖におよぼす影響

A. MPDL22 の細胞増殖は、表記の培養条件下で評価した。

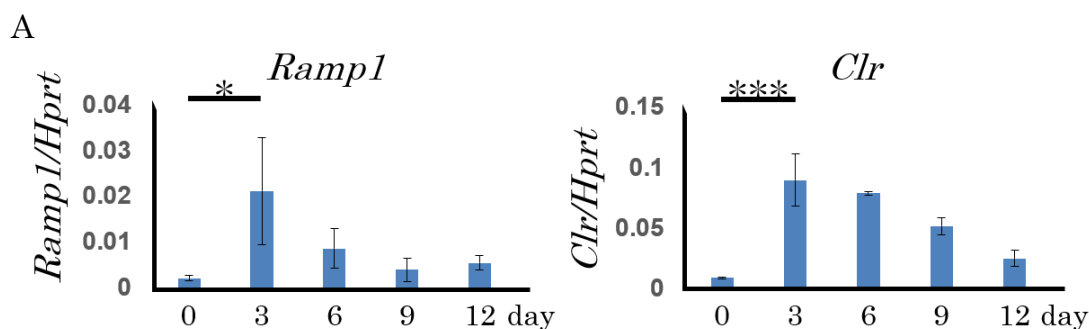
B. A の条件下での MPDL22 の培養後に生細胞数を計測した結果を示す。(n=3)

### 3. MPDL22 の硬組織形成細胞への分化誘導時における CGRP の影響

CGRP 非存在下の石灰化誘導培地で MPDL22 を長期培養し、硬組織形成細胞への分化誘導を行った。分化誘導 0、3、6、9、12 日目に全 RNA の抽出と cDNA の作製、およびタンパクの回収を行った。次に、MPDL22 の分化過程における CGRP 受容体の発現動態の検討を行った。*Ramp1*、*Clr* の発現については Real-time PCR を、*Ramp1* の発現については、Western Blotting を行った。その結果、分化誘導 3 日目に *Ramp1*、*Clr* の有意な発現上昇を認め (図 3A)、その後それらの発現は減少した。また、*Ramp1* は、恒常的に発現していることが確認された (図 3B)。さらに、CGRP 非存在下での MPDL22 の分化過程における石灰化関連遺伝子の発現についても、Real-time PCR にて検討した。その結果、MPDL22 の *Osterix*、*Alp*、*Osteocalcin* の発現は、それぞれ 3、6、12 日目にピークとなった (図 3C)。

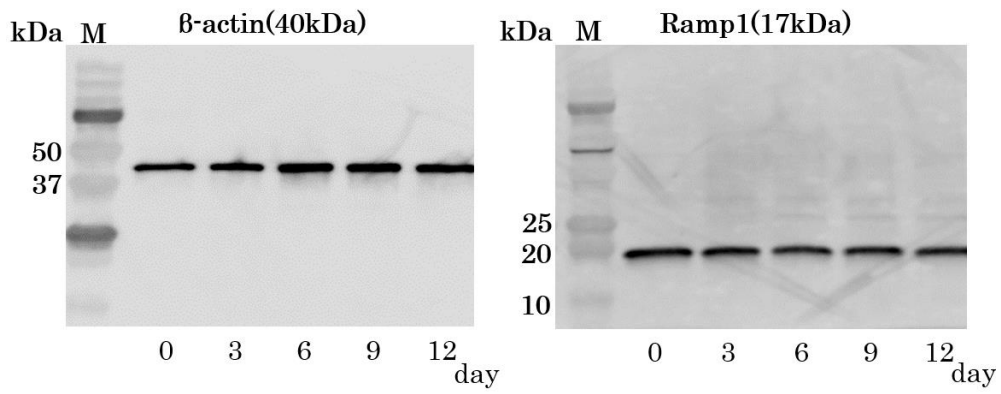
次に、 $10^{-14}\text{M}$ 、 $10^{-13}\text{M}$ 、 $10^{-12}\text{M}$ 、 $10^{-11}\text{M}$ 、 $10^{-10}\text{M}$  の CGRP 存在下で MPDL22 の分化誘導を行い、分化誘導 0、3、6、9、12 日目に全 RNA の抽出と cDNA の作製を行った。その後、石灰化関連遺伝子の発現を Real-time PCR にて解析したところ、3 日目の *Osterix*、6 日目の *Alp*、12 日目の *Osteocalcin* の発現は、 $10^{-12}\text{M}$  以上の CGRP 存在下で培養することにより、有意に発現上昇することを認めた (図 3D)。

さらに  $10^{-12}\text{M}$  CGRP 存在下で 18 日目まで分化誘導を行い、アリザリン染色にて石灰化ノジュールを解析した結果、control に対し、 $10^{-12}\text{M}$  CGRP 刺激群において有意な染色性の上昇を認めた (図 3E)。

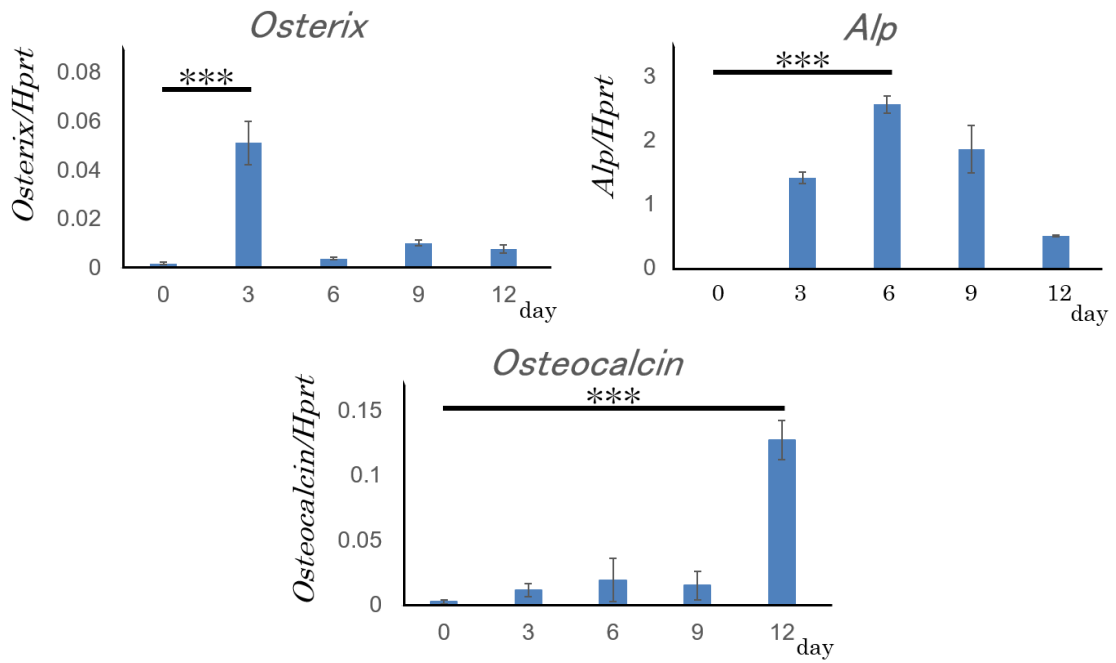




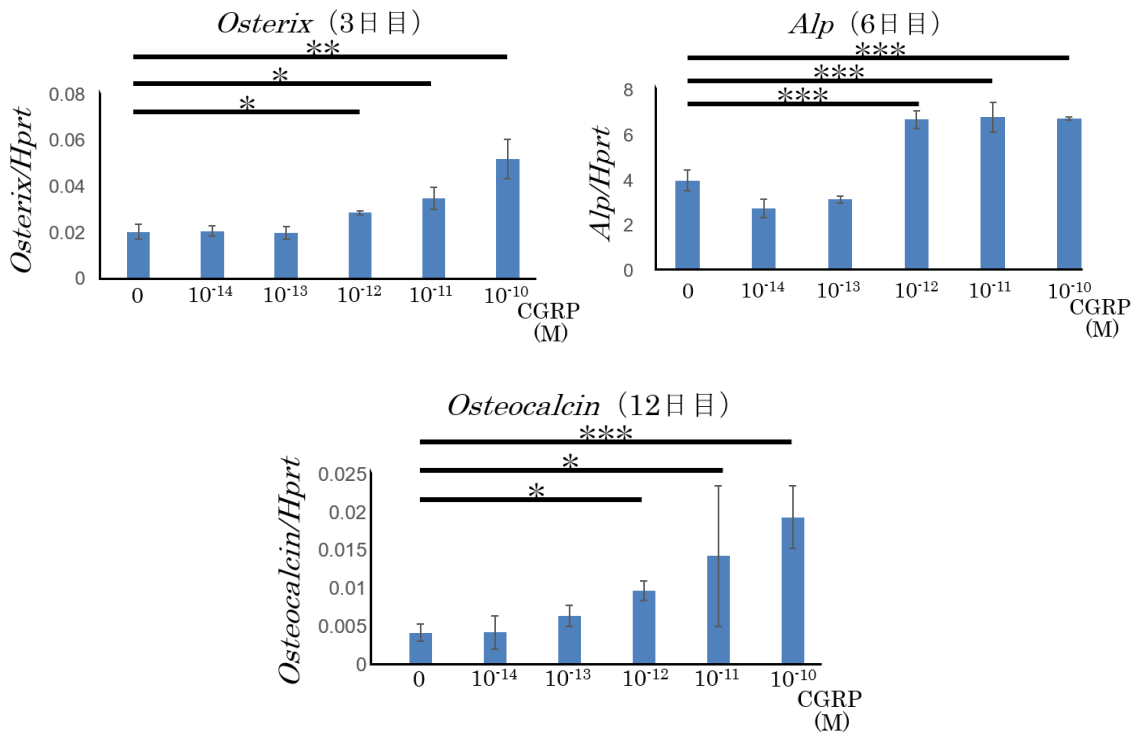
B



C



D



E

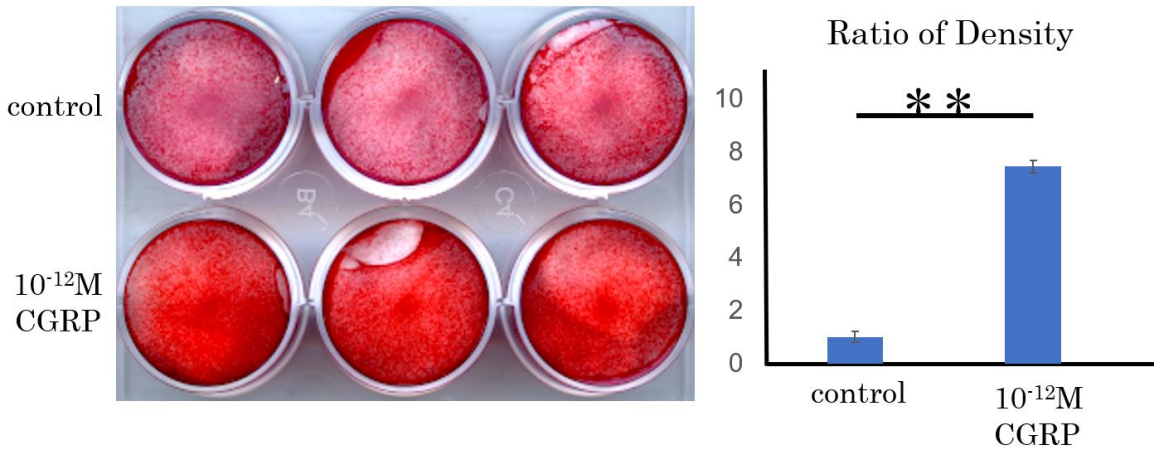


図 3. MPDL22 の硬組織形成細胞への分化誘導と、同過程における CGRP の影響

- CGRP 非存在下で分化誘導し、分化過程における *Ramp1*、*Clr* について Real-time PCR を行った。(n=3)
- CGRP 非存在下で分化誘導し、分化過程における *Ramp1* の発現について Western Blotting を行った。
- CGRP 非存在下で分化誘導し、分化過程における石灰化関連遺伝子発現について Real-time PCR を行った。その結果、*Osterix* は 3 日目、*Alp* は 6 日目、*Osteocalcin* は 12 日目で他のどのタイムポイントと比較しても有意に高い発現を示した (n=3)。

- D.  $10^{-14}\text{M}$ 、 $10^{-13}\text{M}$ 、 $10^{-12}\text{M}$ 、 $10^{-11}\text{M}$ 、 $10^{-10}\text{M}$  の CGRP 存在下で分化誘導し、3 日目の *Osterix*、6 日目の *Alp*、12 日目の *Osteocalcin* について Real-time PCR を行った。(n=3)
- E.  $10^{-12}\text{M}$  の CGRP 存在下で分化誘導し、18 日目にアリザリン染色を行った。右に、アリザリン染色後の石灰化ノジュールの染色性を数値化して比較したグラフを示す。(n=3)
- \* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$

#### 4. マウス絹糸結紮歯周炎モデルにおける CGRP 陽性神経の動態の検討

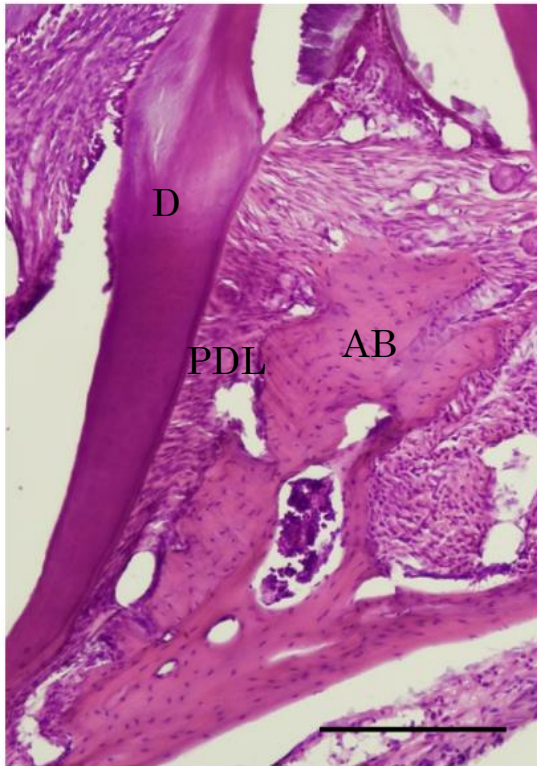
以上の *in vitro* でのデータを踏まえ、生体内の歯周組織における CGRP の働きを検討するため、マウスを用いた検討を行った。歯周組織の破壊と、治癒の過程について、それぞれ 1 週間で観察が可能であるため、マウス絹糸結紮歯周炎モデルを実験に採用した。

まず、15 匹の 8 週齢マウスを準備し、うち 12 匹の上顎両側第二臼歯に 5-0 絹糸を結紮した。絹糸結紮を行わなかった 3 匹は安楽死させ、 $\mu\text{CT}$  撮影と組織の採取を行って実験 0 日目のサンプルとした。絹糸の結紮後、3 日目と 7 日目にそれぞれ 3 匹ずつ安楽死させ、同様に  $\mu\text{CT}$  撮影と組織の採取を行った。残り 6 匹のマウスは 7 日目に絹糸の除去を行い、実験 10 日目（絹糸除去 3 日目）と実験 14 日目（絹糸除去 7 日目）に  $\mu\text{CT}$  撮影と組織の採取を行った。その後、得られた組織から切片を作製し、細胞および組織構造の把握のために HE 染色を、CGRP 陽性神経の動態の検討のために抗 CGRP 抗体による免疫組織化学染色を行った。

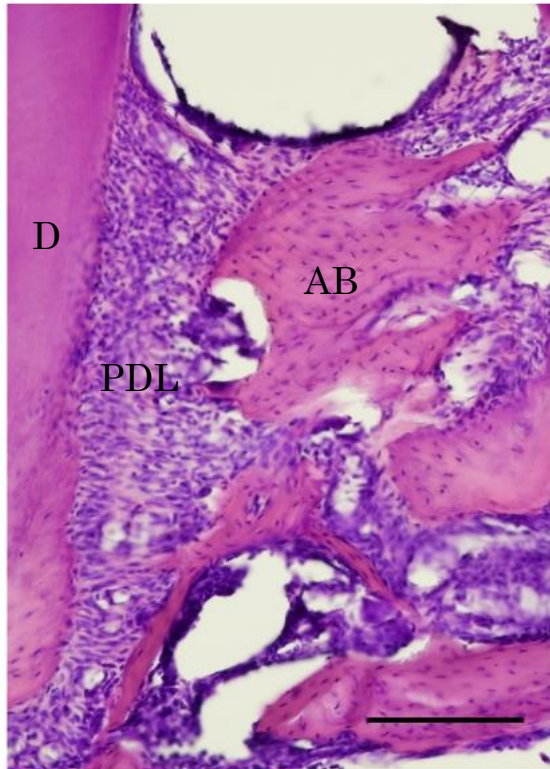
HE 染色像より、絹糸結紮中の 0 日目~7 日目で骨破壊の進行が、絹糸除去後の 7 日目~14 日目で骨組織の修復が確認された（図 4A~E）。また、3 日目~10 日目には歯根膜組織内に強い炎症細胞浸潤が認められた（図 4B~D）が、14 日目には、その浸潤は軽度となっていた（図 4E）。

免疫染色像より、結紮前の CGRP 陽性神経は、歯根膜全域に分布していた（図 5A）。結紮 3 日目の CGRP 陽性神経は、結紮部直下の歯根膜において消失していた（図 5B）。結紮 7 日目の CGRP 陽性神経は、結紮部直下の歯根膜において、増加していた（図 5C）。10 日目（絹糸除去後 3 日目）の CGRP 陽性神経は、7 日目と比較して、減少した（図 5D）。14 日目（絹糸除去後 7 日目）の CGRP 陽性神経は、結紮前と同様の分布に戻った（図 5E）。

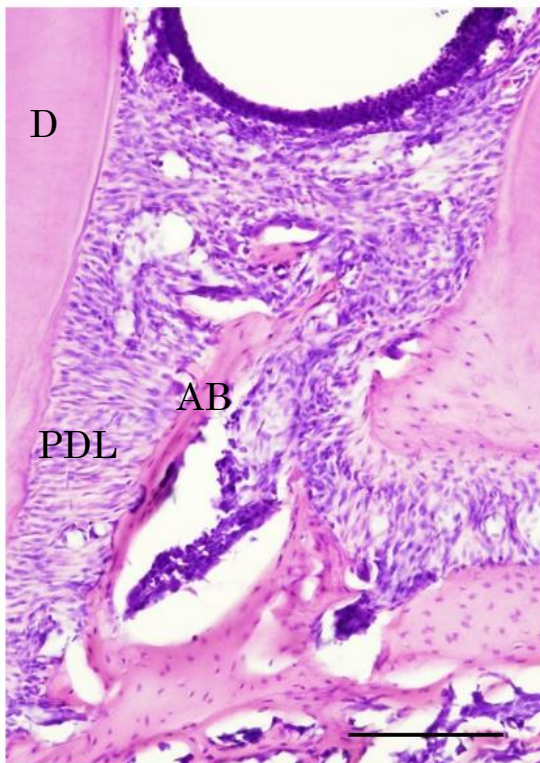
A.



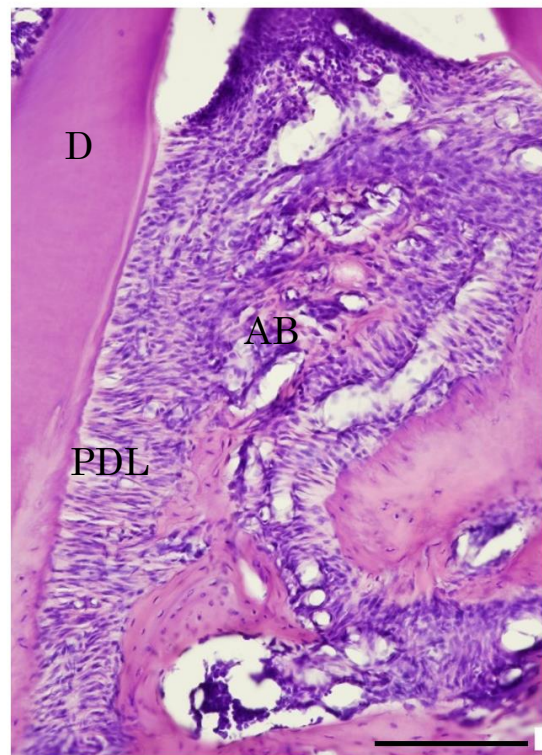
B.



C.



D.



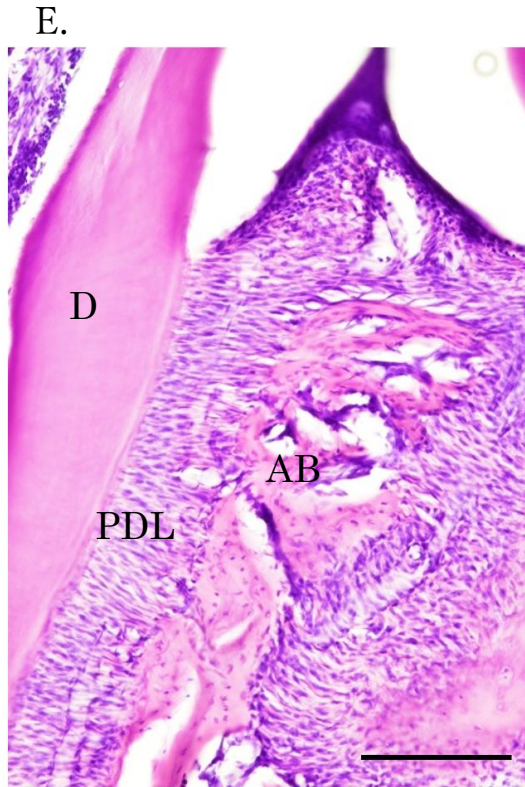


図4. マウス絹糸結紮歯周炎モデル0、3、7、10、14日目のHE染色像

A：0日目のHE染色像

B：3日目のHE染色像

C：7日目のHE染色像

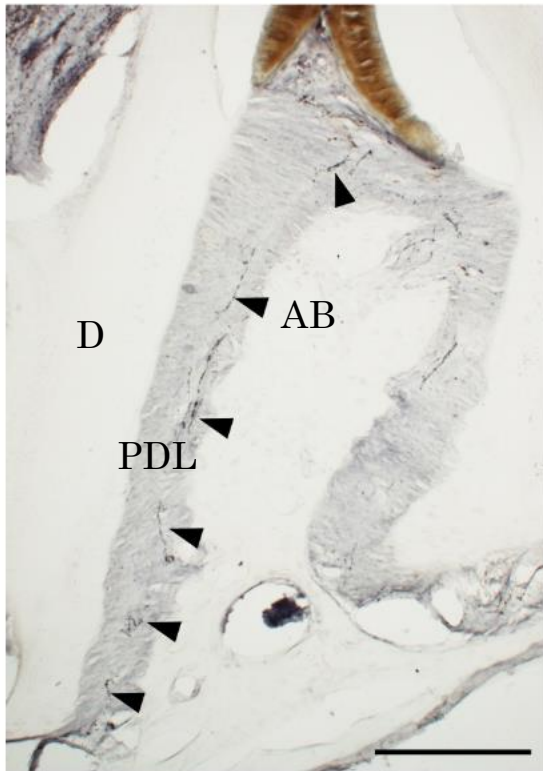
D：10日目（絹糸除去後3日目）のHE染色像

E：14日目（絹糸除去後7日目）のHE染色像

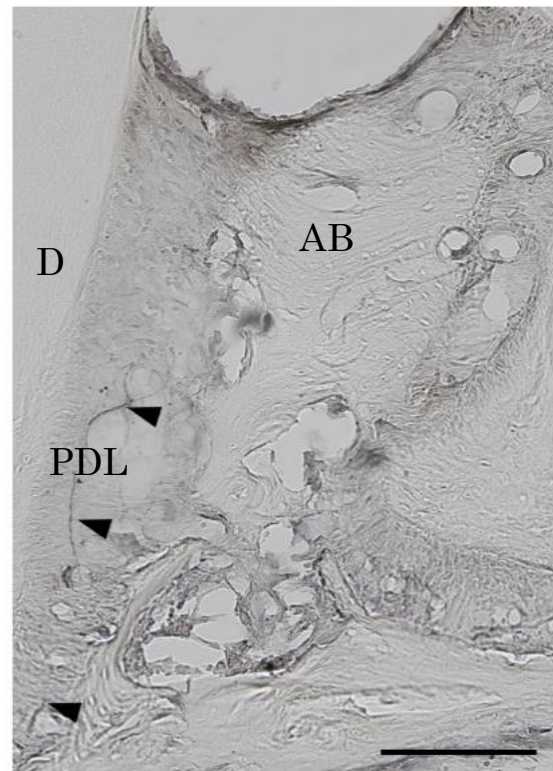
絹糸結紮中の0日目~7日目で骨破壊の進行が、絹糸除去後の7日目~14日目で骨組織の修復が認められた。また、3日目~10日目には歯根膜組織内に強い炎症細胞浸潤が認められたが、14日目にはその浸潤は軽度となっていた。

AB：歯槽骨、D：象牙質、PDL：歯根膜、スケールバー：100 $\mu$ m（A~E）

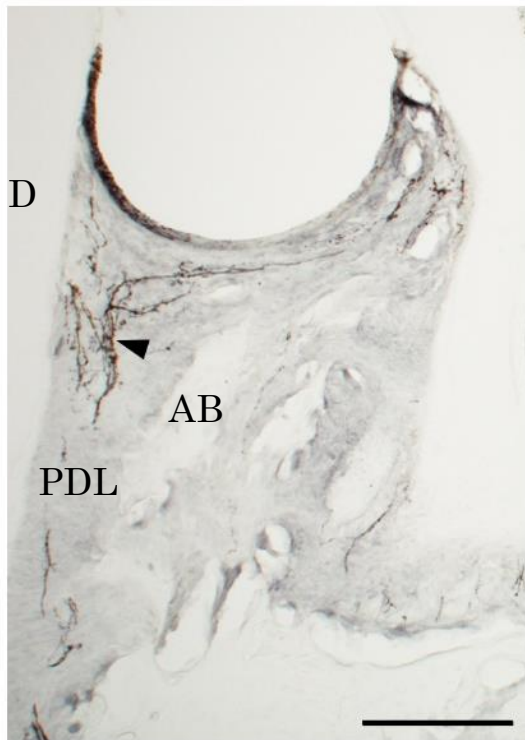
A.



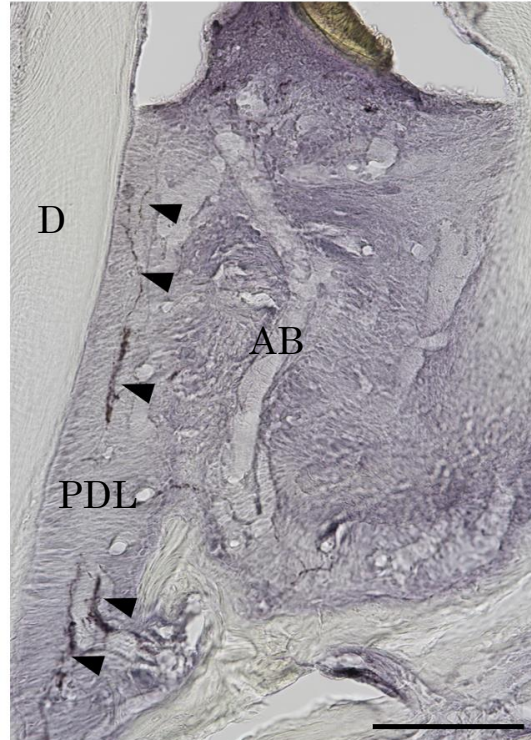
B.



C.



D.



E.

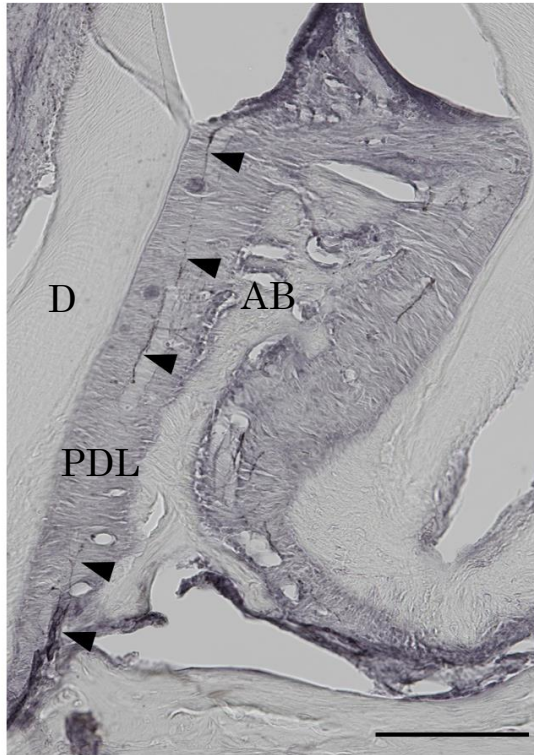


図 5. マウス絹糸結紮歯周炎モデル 0、3、7、10、14 日目の抗 CGRP 抗体による免疫染色像

A. 0 日目の抗 CGRP 抗体による免疫染色像。

CGRP 陽性神経は歯根膜組織中に均等に分布していた。

B. 3 日目の抗 CGRP 抗体による免疫染色像。

CGRP 陽性神経は結紮部直下の歯根膜で消失した。

C. 7 日目の抗 CGRP 抗体による免疫染色像。

CGRP 陽性神経は結紮部直下の歯根膜で増加を示した。

D. 10 日目（絹糸除去後 3 日目）の抗 CGRP 抗体による免疫染色像。

CGRP 陽性神経は 7 日目と比較して、減少した。

E. 14 日目（絹糸除去後 7 日目）の抗 CGRP 抗体による免疫染色像。

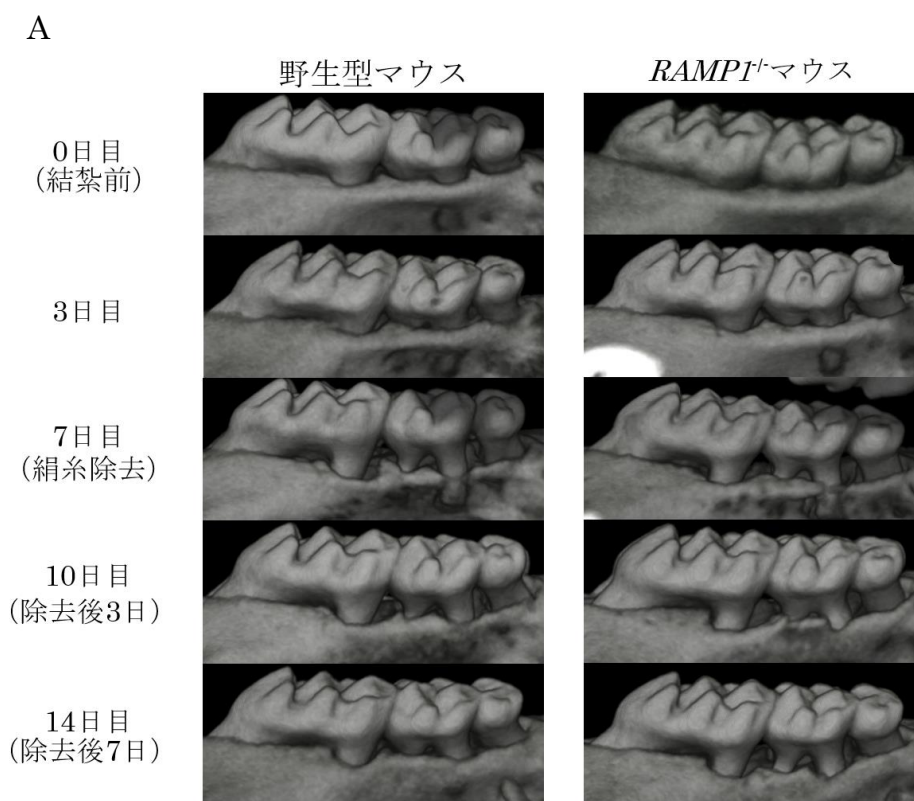
CGRP 陽性神経は結紮前と同様の分布に戻った。

矢頭は、いずれも CGRP 陽性神経を示す。

AB：歯槽骨、D：象牙質、PDL：歯根膜、スケールバー：100 $\mu$ m（A～E）

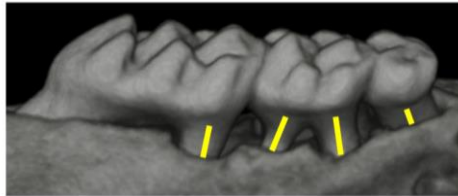
## 5. *Ramp1*<sup>+/+</sup>マウスを用いた絹糸結紮歯周炎モデルにおける歯槽骨の破壊と治癒の検討

*Ramp1*<sup>+/+</sup>マウスにおいても上記と同様の絹糸結紮歯周炎モデルの実験を行った。その後、得られた  $\mu$ CT 画像 (図 6A) を用いて、歯槽骨の破壊と治癒について、野生型マウスと *Ramp1*<sup>+/+</sup>マウスの比較を行った。その結果、10、14 日目で野生型マウスと *Ramp1*<sup>+/+</sup>マウスの歯槽骨の破壊量に有意差が認められた。すなわち、治癒過程において歯槽骨の回復量に差があると考察される (図 6C)。





B



C

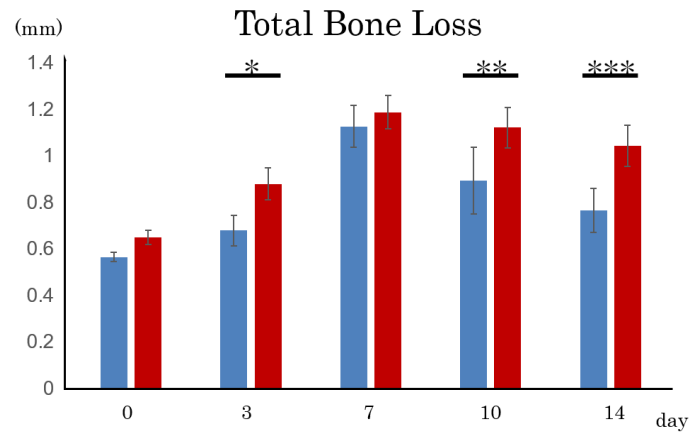


図 6.  $\mu$ CT 画像を用いた野生型マウスと *Ramp1*<sup>-/-</sup>マウスの歯槽骨の破壊と治癒の検討

- A. 結紮 0、3、7、10、14 日目の野生型マウス、*Ramp1*<sup>-/-</sup>マウスの  $\mu$ CT 像。
- B. 黄色線で示したように、上顎第一臼歯の遠心根、上顎第二臼歯の近心根・遠心根、上顎第三臼歯の近心根の 4 根について、根中央部のセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの距離を計測し、その合計を Total Bone Loss として評価した。
- C. 0~14 日目における野生型マウス、*Ramp1*<sup>-/-</sup>マウスの Total Bone Loss をグラフに示した (青:野生型マウス、赤:*Ramp1*<sup>-/-</sup>マウス、n=5、\*:P<0.05、\*\*:P<0.01、\*\*\*:P<0.001)。

## 考察

本研究では、歯周組織における CGRP の機能を解明するため、歯周組織における硬組織形成に注目して歯根膜細胞に同分子が果たす役割の検討を行った。また、マウス歯周炎モデルを用いて、主に歯槽骨の修復過程における CGRP の病態生理学的役割についての検討を行った。

これまでに、CGRP が骨芽細胞<sup>26,27)</sup>、骨髄間葉系幹細胞<sup>27,28)</sup>、骨膜由来幹細胞<sup>17)</sup>などの種々の細胞の骨形成を促進するという報告があり、CGRP と骨代謝との関連性が示唆されている。しかしながら、歯周組織の再生、創傷治癒を含めた恒常性維持に重要な役割を果たす歯根膜細胞の機能に対する CGRP の意義に関しての報告はいまだなされていない。本研究においては、マウス歯根膜細胞株 MPDL22 を硬組織形成細胞へと分化誘導した際に、CGRP による刺激が同細胞の分化過程を活性化することが明らかとなった。

本研究で、CGRP 刺激により MPDL22 における石灰化関連遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった (図 3D) が、その作用機序については十分に解明されていない。CGRP が特異的な受容体に結合すると、環状アデノシンリン酸 (cAMP) と cAMP 応答要素結合タンパク (CREB) が関与する様々な細胞内シグナルカスケードが誘発される<sup>29)</sup>。CREB は細胞の増殖や分化に関係し、骨形成に重要な転写因子である。また、その下流標的である *Runx2* や *SP7* を活性化すると報告されている<sup>30-33)</sup>。また CREB の制御経路である BMP2 や Wnt/ $\beta$ -catenin を活性化するという報告もなされている<sup>34,35)</sup>。したがって、CGRP による歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化促進においても CREB の活性化が関与しているものと推察されるが、その機序も含め今後さらなる検討が期待される。

本研究で、MPDL22 の硬組織形成細胞への分化促進には  $10^{-12}$ M 以上の CGRP が必要であった (図 3D)。先行研究の結果から、CGRP の平均血清濃度は  $36.3 \text{ pmol/l} \pm 6.2 \text{ (SD)}$  であり<sup>36)</sup>、今回の実験で使用した  $10^{-12}$  M の濃度は、生体内で生理的に存在し得る濃度にあたる。また、CGRP は現在知られている中で最も強力な微小血管拡張剤であるともいわれており<sup>37)</sup>、フェムトモル量の CGRP を注射すると、皮膚の微小循環の血流が増加し、発赤が惹起される<sup>37)</sup>など、低濃度の CGRP において生理的機能を発揮することが報告されている<sup>38)</sup>。以上のことから、*in vitro* 条件下においても CGRP は歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御している可能性が示唆される。また、加齢により、歯周組織において CGRP 陽性神経の発現が低下することや、加齢感覚神経細胞において CGRP の産生が低下することが明らかとなっている<sup>7,39)</sup>。従って、加齢による歯周病に対する疾患感受性の上昇には、加齢に伴う CGRP を介した歯根膜細胞の

硬組織代謝の低下が関与していると考えられる。

本研究により歯根膜細胞の硬組織形成細胞の分化過程で、CGRP 受容体の遺伝子発現が変化することが明らかとなった。石灰化誘導培地を用いて MPDL22 の分化誘導を行った結果、硬組織形成細胞への分化初期にあたる分化誘導 3 日目に *Ramp1*、*Clr* の遺伝子発現がピークを迎えることが明らかとなった (図 3A)。このことから、歯根膜細胞は、分化初期に CGRP の影響をうけ、骨芽細胞、セメント芽細胞への分化が促進される可能性が示唆される。これまでに Goto<sup>40)</sup> は、骨形成制御に関連のある交感神経系の B2 アドレナリン受容体と感覚神経系の CGRP 受容体が未分化な骨芽細胞に最も強く発現しており、同じく骨形成制御に関連のある感覚神経由来のサブスタンス P の受容体である NK1 受容体は未分化な細胞では発現せず、骨芽細胞の分化に伴い発現が上昇し、成熟骨芽細胞でピークを示したと報告している。歯根膜は、豊富な神経支配をうけており、歯根膜細胞には、CGRP のみならず様々な神経分泌物質に対する受容体が発現していると想定される。末梢神経終末から放出される神経ペプチドは、歯根膜細胞の分化段階に応じ、歯根膜の代謝に関与する様々なサイトカインと協調して、巧妙にその恒常性の維持を図っているものと考えられる。

本研究で、CGRP 受容体に特異的な構成タンパクである RAMP1 の遺伝子欠損マウス<sup>24,41)</sup>を用いて、マウス絹糸結紮歯周炎モデルで歯周組織の創傷治癒過程を検討したところ、野生型マウスと比較して歯槽骨の修復が遅延することが明らかとなった (図 6C)。生体における CGRP の骨代謝との関与については、これまでに数多く報告されており、CGRP の骨代謝における重要性が指摘されている<sup>17,18,42-45)</sup>。しかしながら歯周組織においては、組織の改造とともに CGRP の発現が変化するとの報告はあるもの<sup>15,16,46,47)</sup>の、CGRP が歯周組織の修復や再生に関与することを示唆する報告はほとんどなされていない<sup>48)</sup>。本研究結果は、歯周組織の治癒過程において RAMP1 受容体を介した CGRP シグナルが歯槽骨の再生に重要な役割を担っていることを示唆していると考えられる。本研究におけるマウス絹糸結紮歯周炎モデルを用いた実験での CGRP 陽性神経の動態についてであるが、絹糸結紮直後は、結紮部直下の歯根膜の CGRP 陽性神経線維は一旦消失する (図 5B) が、その後、歯周組織の破壊が進むにつれ同神経線維は、顕著に増加することが観察された (図 5C)。その後、歯槽骨の再生が進むにつれ、その発現は減少していき (図 5D)、生理的な分布状態に戻る (図 5E) ことが明らかとなった。CGRP の発現が上昇することで骨形成が促進され、修復とともに生理的な発現に戻ることは、これまでに様々な報告がなされている<sup>17,49)</sup>。本研究で、炎症時における CGRP の発現上昇は、歯根膜における組織幹細胞の硬組織形成細胞への分化を促進し、歯周組織の修復に向けて骨芽細胞、セメント芽細胞の供給を促している可能性があることが示唆される。

本研究では、絹糸結紮直後に CGRP 陽性神経線維の消失が認められた(図 5B)が、同神経線維以外の神経線維も消失したか否かについては不明である。歯周組織にはルフィニ神経終末を持つ A $\beta$  線維など、CGRP を含まない神経線維が存在する<sup>8)</sup>。歯根膜においては、主に侵害受容器にあたる A $\delta$  線維と C 線維が歯根膜全域に分布し、機械受容器である A $\beta$  線維にあたるルフィニ神経終末は、主に根尖部 3 分の 1 に発現している。これまでにラット下歯槽神経の切断後の歯根膜神経線維の動態<sup>50)</sup>や歯の窩洞形成後の歯髄神経線維の動態<sup>51)</sup>を調べた研究では、一時的に神経線維が変性・消失することが報告されている。本研究においても絹糸結紮による著しい組織障害により CGRP 陽性神経線維のみならず、ペプチドを含まない神経線維も同時に変性、消失した可能性が高いと思われる。すなわち歯周組織の創傷治癒過程における CGRP 陽性神経線維の発現動態は、神経線維全体の発現動態を反映している可能性が高いと考えられる。神経線維の発現動態と組織の構築との関係については、これまでに末梢組織の発生において末梢神経網と血管網が密接なコミュニケーションをとりながら組織の構築がなされることが報告されている<sup>52)</sup>。歯周組織の治癒過程における神経線維も血管網と密接に相互作用をしながら、同組織の治癒・再生を促進していくものと考えられる。

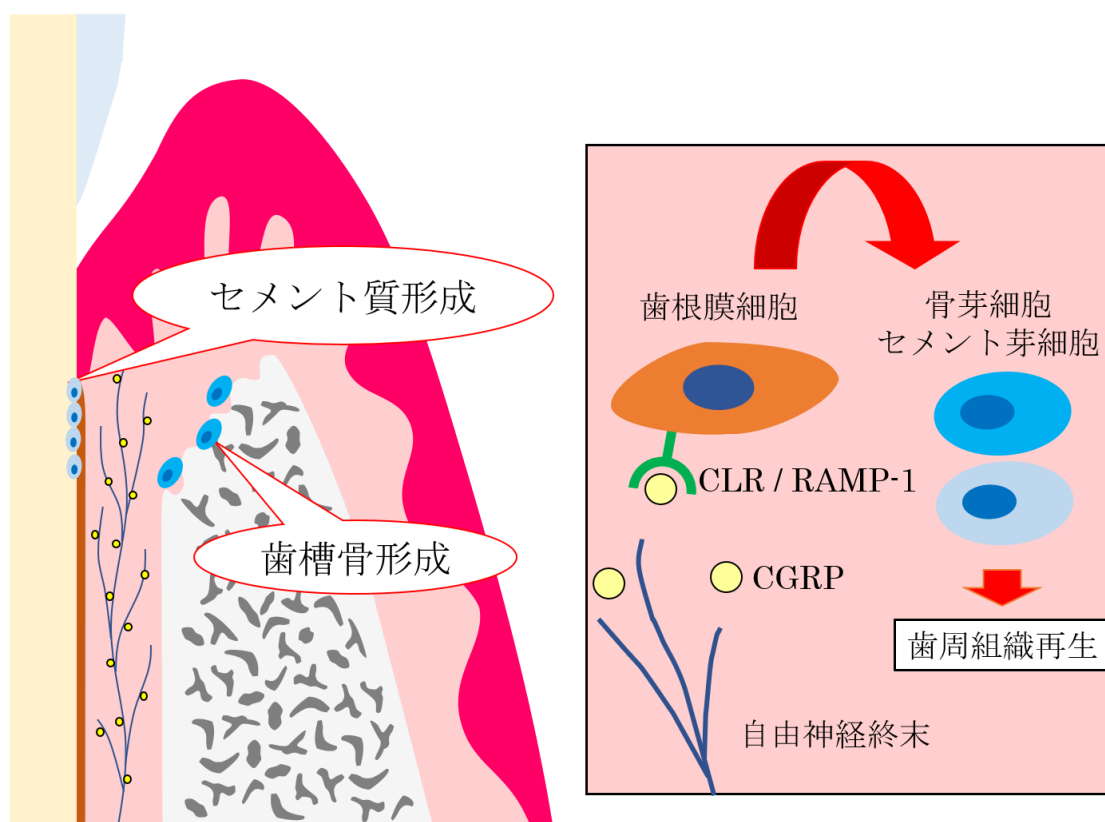
CGRP は、軟組織の組織修復や創傷治癒を促進する作用があるとの様々な研究がなされている<sup>53-57)</sup>。加えて、CGRP には、血管新生を促進する作用があることも報告されている<sup>53,57)</sup>。我々の研究室で開発した歯周組織再生剤リグロス<sup>®</sup>の有効成分である FGF-2 にも、強力な血管新生作用があり、歯周組織欠損部に血管網というライフラインを確立することで歯周組織再生にふさわしい局所環境を創出することが明らかとなっている<sup>58-60)</sup>。同様に CGRP による血管新生作用も、歯周組織の治癒・再生の活性化に重要な役割を果たしている可能性があり、今後の検討が望まれる。

CGRP を用いた骨再生への臨床応用についてであるが、CGRP は血漿中で複数の経路を経て急速に分解されるため<sup>61,62)</sup>、外因性 CGRP の骨再生への有効性は限定されると考えられる。そこで、内在的に CGRP の合成、分泌を促進することで、骨の再生を促進することが報告されている。一つは、低強度パルス超音波 (LIPUS)<sup>63,64)</sup>により、CGRP の合成を促進することが報告されている<sup>65)</sup>。非常に微弱な超音波を照射する LIPUS は、骨修復作用があり<sup>66)</sup>、すでに難治性骨折治療において保険適用されている。また CGRP の分泌は脊髄神経節の電気刺激によって引き起こされることが多くの研究で示されている<sup>55,67-69)</sup>。そのため、電気刺激による CGRP の分泌亢進が、骨形成を促進することが期待されている<sup>63)</sup>。

興味深いことに、マグネシウムが、CGRP の生成、分泌を促進することが報

告されており<sup>17,70,71</sup>、生分解作用のあるマグネシウムはすぐれた骨形成促進作用を有することが知られており、既に整形外科分野で大きな注目を集めている<sup>72-75</sup>。

今後、歯周組織における CGRP の機能の全貌、およびそのメカニズムを明らかにし、内在的に CGRP の生成を促進する方法を開発することにより、新しい歯周組織再生療法の確立が期待できるものと考えている。



〈歯周組織における CGRP の機能〉

CGRP は歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促し、歯槽骨とセメント質のリモデリングに関与し、歯周組織における恒常性維持を担うとともに、炎症時に歯根膜でその発現が上昇し、組織の修復に寄与していると考えられる。

## 結論

本研究の結果より、以下の結論を得た。

1. マウス歯根膜組織、および歯根膜細胞に CGRP 受容体が発現していることが明らかとなった。
2. CGRP がマウス歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進することが明らかとなった。
3. マウス絹糸結紮歯周炎モデルにおいて、急速な歯周組織破壊とともに CGRP 陽性神経は一旦消失するが、その後歯根膜における CGRP の発現は著しく上昇し、同組織の治癒の完了とともに通常の分布に戻る事が明らかとなった。
4. マウス絹糸結紮歯周炎モデルにおいて、*Ramp1* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較し、絹糸除去後の歯槽骨の回復が遅延することが明らかとなった。

以上のことから、歯周組織の破壊を受けて歯根膜で発現が上昇する CGRP は、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促し、その後の歯周組織の治癒・再生の促進に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の進行にあたり、直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科、三木康史助教に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文献

1. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontology 2000*. 1997; 13: 20-40.
2. Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004; 364(9429): 149-155.
3. Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec*. 1996; 245(2): 327-341.
4. Lekic PC, Rajshankar D, Chen H, et al. Transplantation of labeled periodontal ligament cells promotes regeneration of alveolar bone. *Anat Rec*. 2001; 262(2): 193-202.
5. Grant D, Bernick S. The periodontium of aging humans. *J Periodontol*. 1972; 43(11): 660-667.
6. Severson JA, Moffett BC, Kokich V, et al. A histologic study of age changes in the adult human periodontal joint (ligament). *J Periodontol*. 1978; 49: 189-200.
7. Jung H, Horiuchi M, Soma K. Changes in the distribution of nerve fibers immunoreactive to calcitonin gene-related peptide according to growth and aging in rat molar periodontal ligament. *Angle Orthod*. 2010; 80(2): 309-315.
8. Maeda T, Ochi K, Nakakura-Ohshima K, et al. The Ruffini ending as the primary mechanoreceptor in the periodontal ligament: its morphology, cytochemical features, regeneration, and development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(3): 307-327.
9. Kato J, Wakisaka S, Kurisu K. Immunohistochemical changes in the distribution of nerve fibers in the periodontal ligament during an experimental tooth movement of the rat molar. *Acta Anat (Basel)*. 1996; 157(1): 53-62.
10. Maggi CA. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol*. 1995; 45(1): 1-98.
11. . Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via

- tissue-specific RNA processing. *Nature*. 1983; 304(5922):129-135.
12. Donnerer J, Stein C. Evidence for an increase in the release of CGRP from sensory nerves during inflammation. *Ann NY Acad Sci*. 1992; 657: 505-506.
  13. Kato J, Tanne K, Ichikawa H, et al. Distribution of calcitonin gene-related peptide and substance P-immunoreactive nerve fibers and their correlation in the periodontal ligament of the mouse incisor. *Acta Anat (Basel)*. 1992; 145(2): 101-105.
  14. Kato J, Ichikawa H, Wakisaka S, et al. The distribution of vasoactive intestinal polypeptides and calcitonin gene-related peptide in the periodontal ligament of mouse molar teeth. *Arch Oral Biol*. 1990; 35(1): 63-66.
  15. Kvinnsland I, Kvinnsland S. Changes in CGRP-immunoreactive nerve fibres during experimental tooth movement in rats. *Eur J Orthod*. 1990; 12(3): 320-329.
  16. Norevall LI, Forsgren S, Matsson L. Expression of neuropeptides (CGRP, substance P) during and after orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod*. 1995; 17(4): 311-325.
  17. Zhang Y, Xu J, Ruan YC, et al. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nat Med*. 2016; 22(10): 1160-1169.
  18. Naot D, Cornish J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone*. 2008; 43(5): 813-818.
  19. Uzan B, de Vernejoul MC, Cressent M. RAMPs and CRLR expressions in osteoblastic cells after dexamethasone treatment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 321(4): 802-808.
  20. Appelt J, Baranowsky A, Jahn D, et al. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide alpha is essential for bone healing. *EBioMedicine*. 2020; 59: 102970.
  21. Yu X, Liu S, Chen H, et al. CGRP gene-modified rBMSCs show better osteogenic differentiation capacity in vitro. *J Mol Histol*. 2018; 49(4): 357-367.
  22. Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, et al. PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem*. 2007; 282(32): 23070-23080.



23. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998; 393(6683): 333-339.
24. Tsujikawa K, Yayama K, Hayashi T, et al. Hypertension and dysregulated proinflammatory cytokine production in receptor activity-modifying protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(42): 16702-16707.
25. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013; 394(1-2): 49-54.
26. He H, Chai J, Zhang S, et al. CGRP may regulate bone metabolism through stimulating osteoblast differentiation and inhibiting osteoclast formation. *Mol Med Rep*. 2016; 13(5): 3977-3984.
27. Wang L, Shi X, Zhao R, et al. Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption. *Bone*. 2010; 46(5): 1369-1379.
28. Zhou R, Yuan Z, Liu J, et al. Calcitonin gene-related peptide promotes the expression of osteoblastic genes and activates the WNT signal transduction pathway in bone marrow stromal stem cells. *Mol Med Rep*. 2016; 13(6): 4689-4696.
29. Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, et al. CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem*. 2000; 275(40): 31438-31443.
30. Nishio Y, Dong Y, Paris M, et al. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene*. 2006; 372: 62-70.
31. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat. Med*. 2005; 11(8): 880-885.
32. Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J. Cell. Biochem*. 2011 Mar; 112(3): 750-755.
33. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(8): 599-609.
34. Tian G, Zhang G, Tan YH. Calcitonin gene-related peptide stimulates BMP-2 expression and the differentiation of human osteoblast-like cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34(11): 1467-1474.

35. Mrak E, Guidobono F, Moro G, et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) inhibits apoptosis in human osteoblasts by  $\beta$ -catenin stabilization. *J Cell Physiol.* 2010; 225(3): 701-708.
36. Schifter S. Circulating concentrations of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in normal man determined with a new, highly sensitive radioimmunoassay. *Peptides.* 1991; 12(2): 365-369.
37. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, et al. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature.* 1985; 313(5997): 54-56.
38. Brain SD, Tippins JR, Morris HR, et al. Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. *J Invest Dermatol.* 1986; 87(4): 533-536.
39. Jiang ZG, Smith RA. Regulation by nerve growth factor of neuropeptide phenotypes in primary cultured sensory neurons prepared from aged as well as adult mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995; 90(1-2): 190-193.
40. Nagao S, Goto T, Kataoka S, et al. Expression of neuropeptide receptor mRNA during osteoblastic differentiation of mouse iPS cells. *Neuropeptides.* 2014; 48(6): 399-406.
41. Tsuru S, Ito Y, Matsuda H, et al. RAMP1 signaling in immune cells regulates inflammation-associated lymphangiogenesis. *Lab Invest.* 2020; 100(5): 738-750.
42. Schinke T, Liese S, Priemel M, et al. Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(12): 2049-2056.
43. Ballica R, Valentijn K, Khachatryan A, et al. Targeted expression of calcitonin gene-related peptide to osteoblasts increases bone density in mice. *J Bone Miner Res.* 1999; 14(7): 1067-1074.
44. Liu X, Liu H, Xiong Y, et al. Postmenopausal osteoporosis is associated with the regulation of SP, CGRP, VIP, and NPY. *Biomed Pharmacother.* 2018; 104: 742-750.
45. Valentini A, Petraglia F, de Vita D, et al. Changes of plasma calcitonin gene-related peptide levels in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175(3 Pt 1): 638-642.
46. Vandevska-Radunovic V, Kvinnsland S, Kvinnsland IH. Effect of experimental tooth movement on nerve fibres immunoreactive to calcitonin gene-related peptide, protein gene product 9.5, and blood

- vessel density and distribution in rats. *Eur J Orthod.* 1997; 19(5): 517-529.
47. Nagayama T, Seiryu M, Deguchi T, et al. Increase of CGRP-containing nerve fibers in the rat periodontal ligament after luxation. *Cell Mol Neurobiol.* 2012; 32(3): 391-397.
  48. Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, et al. Neuronal TRPV1 activation regulates alveolar bone resorption by suppressing osteoclastogenesis via CGRP. *Sci Rep.* 2016; 6: 29294.
  49. Sample SJ, Hao Z, Wilson AP, et al. Role of calcitonin gene-related peptide in bone repair after cyclic fatigue loading. *PLoS One.* 2011; 6(6): e20386.
  50. Wakisaka S, Atsumi Y, Youn SH, et al. Morphological and cytochemical characteristics of periodontal Ruffini ending under normal and regeneration processes. *Arch Histol Cytol.* 2000; 63(2): 91-113.
  51. Sato O. Responses of pulpal nerves to cavity preparation in rat molars: an immunohistochemical study using neurofilament protein (NFP) antiserum. *Arch Histol Cytol.* 1989; 52(4): 433-446.
  52. Mukoyama YS, Shin D, Britsch S, et al. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell.* 2002; 109(6): 693-705.
  53. Khalil Z, Helme R. Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1996; 51(5): B354-B361.
  54. Brain SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology.* 1997; 37(2-3): 133-152.
  55. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 2004; 84(3): 903-934.
  56. Toda M, Suzuki T, Hosono K, et al. Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. *Biomed Pharmacother.* 2008; 62(6): 352-359.
  57. Mishima T, Ito Y, Hosono K, et al. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300(2): H431-H439.
  58. Nagayasu-Tanaka T, Anzai J, Takaki S, et al. Action Mechanism of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) in the Promotion of Periodontal

- Regeneration in Beagle Dogs. *PLoS One*. 2015;10(6): e0131870.
59. Murakami S. Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol 2000*. 2011; 56(1): 188-208.
  60. Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, et al. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. *J Dent Res*. 2014; 93(1): 89-95.
  61. Walsh DA, Mapp PI, Kelly S. Calcitonin gene-related peptide in the joint: contributions to pain and inflammation. *Br J Clin Pharmacol*. 2015; 80(5): 965-978.
  62. Miranda LP, Holder JR, Shi L, et al. Identification of potent, selective, and metabolically stable peptide antagonists to the calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor. *J Med Chem*. 2008; 51(24): 7889-7897.
  63. Khan Y, Laurencin CT. Fracture repair with ultrasound: clinical and cell-based evaluation. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(Suppl 1):138-144.
  64. Zhang N, Chow SKH, Leung KS, et al. Ultrasound as a stimulus for musculoskeletal disorders. *J Orthop Translat*. 2017; 9: 52-59.
  65. Wang XY, Guo X, Cheng JCY, et al. Involvement of calcitonin gene-related peptide innervation in the promoting effect of low-intensity pulsed ultrasound on spinal fusion without decortication. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010; 35(26): E1539-E1545.
  66. Lam WL, Guo X, Leung KS, et al. The role of the sensory nerve response in ultrasound accelerated fracture repair. *J Bone Joint Surg Br*. 2012; 94(10): 1433-1438.
  67. Ding L, Song T, Yi C, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) improves the diabetic cytopathy (DCP) via up-regulation of CGRP and cAMP. *PLoS One*. 2013; 8(2): e57477.
  68. Deer TR, Grigsby E, Weiner RL, et al. A prospective study of dorsal root ganglion stimulation for the relief of chronic pain. *Neuromodulation*. 2013; 16(1): 67-71; discussion 71-72.
  69. Seagrove LC, Suzuki R, Dickenson AH. Electrophysiological characterisations of rat lamina I dorsal horn neurones and the involvement of excitatory amino acid receptors. *Pain*. 2004; 108(1-2): 76-87.
  70. Ariza AC, Bobadilla N, Diaz L, et al. Placental gene expression of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide synthases in

- preeclampsia: effects of magnesium sulfate. *Magnes Res.* 2009; 22(1): 44-49.
71. de Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev.* 2015; 95(1): 1-46.
  72. Zhao D, Witte F, Lu F, et al. Current status on clinical applications of magnesium-based orthopaedic implants: A review from clinical translational perspective. *Biomaterials.* 2017; 112: 287-302.
  73. Lin X, Ge J, Wei D, et al. Surface degradation-enabled osseointegrative, angiogenic and antiinfective properties of magnesium-modified acrylic bone cement. *J Orthop Translat.* 2019; 17: 121-132.
  74. Song B, Li W, Chen Z, et al. Biomechanical comparison of pure magnesium interference screw and polylactic acid polymer interference screw in anterior cruciate ligament reconstruction—a cadaveric experimental study. *J Orthop Translat.* 2016; 8: 32-39.
  75. Chaya A, Yoshizawa S, Verdelis K, et al. In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing. *Acta Biomater.* 2015; 18: 262-269.