

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20415

研究課題名(和文) 難治性根尖性歯周炎の治療薬の開発 - 歯根肉芽腫中でのFoxo3aの機能的役割 -

研究課題名(英文) The Expression and function of Forkhead Transcription Factor of the class O3a (Foxo3a)

研究代表者

羽鳥 啓介 (HATORI, Keisuke)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30632583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酵素抗体法および蛍光抗体法による免疫組織化学的検索から歯根肉芽腫中の好中球、T-リンパ球およびB-リンパ球からFoxo3aの発現を認めた。さらに歯根肉芽腫中でFoxo3aとFas-Lの共発現を認め、Foxo3a陽性細胞数はFas-Lと比較して有意に高かった。リアルタイムRT-PCR法において、歯根肉芽腫中でのFoxo3aおよびFas-L遺伝子発現は健常歯肉中と比較して有意に高かった。培養細胞において、培養後72時間でFoxo3a遺伝子発現がピークになり、コントロールと比較して有意に高かった。以上により、Foxo3aは歯根肉芽腫の発症と治癒に関係する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Two-color immunofluorescence image analysis indicate that co-expression of Foxo3a and Fas-L in human periapical granulomas. Neutrophils, lymphocytes, and plasma cells in periapical granulomas expressed Foxo3a but not those in healthy gingival tissues. Quantitative analysis of immunofluorescence signals indicated significantly greater numbers of Foxo3a-expressing than FasL-expressing cells. Foxo3a and FasL messenger RNA expression levels in periapical granulomas were significantly higher than those in healthy gingival tissues. In addition, the Foxo3a messenger RNA expression in stimulated human T-cell line(Molt-4) for 72 hours was significantly higher than negative control. Our results indicated the possibility that Foxo3a and FasL are involved in the development and healing of periapical granulomas.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯根肉芽腫 Foxo3a Fas-ligand

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科医療の発展により、国民の歯の喪失は戦後と比較して、減少している。しかし、現在でも歯を喪失する患者は多く、その原因の1つに根尖性歯周炎が挙げられ、根尖性歯周炎の発生病序の解明は国民のQ.O.Lを向上させると考えられる。根尖性歯周炎は、感染根管に起因した炎症性疾患であり、その病態解明を目的として様々な研究が行われてきたが、その詳細は未だに明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では Forkhead Transcription Factor of the class O3a(Foxo3a)に着目し、難治性根尖性歯周炎である歯根肉芽腫中で好中球を含む炎症性のアポトーシスを調節することによって、炎症の治癒に与する可能性を着想した。Foxo3a は骨吸収を伴う慢性炎症である関節リウマチ中で発現し、炎症性細胞の好中球とリンパ球のアポトーシスを引き起こす Fas-ligand(Fas-L)と Fas の伝達機構を阻害することによって、慢性炎症の遷延を抑制していることが報告されている。しかし、Foxo3a の口腔内の慢性炎症である根尖性歯周炎での関与は全く報告されていない。

そこで申請者は、根尖性歯周炎発症過程で Foxo3a が Fas-Fas-L 伝達機構を阻害し、好中球およびリンパ球のアポトーシスを抑制することによって、根尖性歯周炎の治癒に与すると仮定し、その解明を目的とした。

3. 研究の方法

歯根肉芽腫中での Foxo3a の発現の解析にはマウス抗ヒト Foxo3a モノクローナル抗体を用いて酵素抗体法による免疫組織化学的検索を行う。加えて、歯根肉芽腫サンプルから RNA を抽出し、相補的 DNA 作製後、リアルタイム RT-PCR 法により Foxo3a 遺伝子の解析を行う。さらに、歯根肉芽腫サンプルのネガティブコントロールとして、健常歯肉サンプルを採取し、歯根肉芽腫と同様の検索を行う。

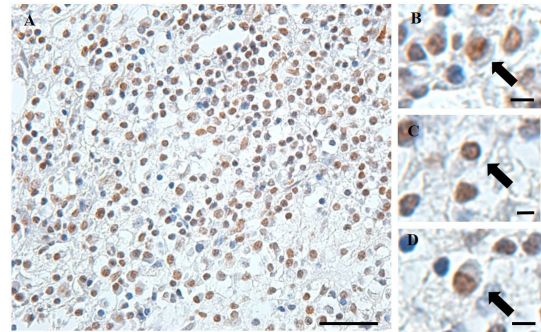
また、歯根肉芽腫中の Foxo3a の機能を検索する目的で Foxo3a と Fas-L の共発現をマウス抗ヒト Foxo3a モノクローナル抗体およびヤギ抗ヒト Fas-L ポリクローナル抗体を用いた蛍光二重免疫染色を行う。加えて、Fas-L 遺伝子発現もリアルタイム RT-PCR 法で解析を行う。

供試細胞を刺激するためのサイトカインには TNF- α および IFN- γ を用いる。供試細胞にはヒト白血球の cell line である Daudi(B cell line)、Molt-4(T cell line) および HL-60(neutrophil like cell line) とし、RPMI1640 培地にて 10% ウシ胎児血清を添加したものをを用いて培養する。供試細胞に炎症性サイトカインによる刺激を行い、Foxo3a および Fas-L 遺伝子とタンパクの発現の解析

を行う。その後、アポトーシス細胞の測定を行う。

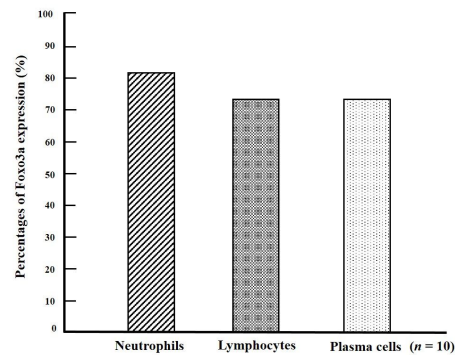
4. 研究成果

(1) 免疫組織学的検索から歯根肉芽腫中の炎症性細胞において、Foxo3a の発現が認められた。



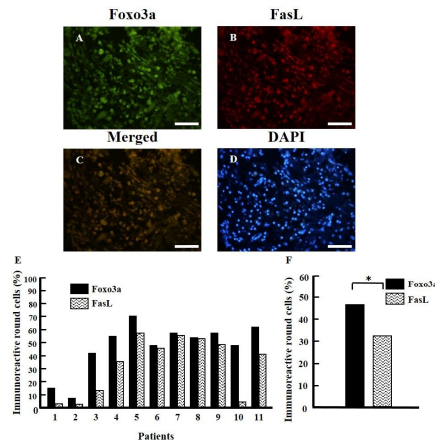
Immunohistochemical analysis of periapical granulomas with human Foxo3a antibodies: (A) many inflammatory cells expressed Foxo3a. Foxo3a producing (bars = 100µm) (B) neutrophils, (C) lymphocytes, and (D) plasma cells (bars = 10µm, B-D).

(2) 作製された染色標本を光学顕微鏡下にて観察し、Foxo3a 陽性細胞を同定するとともに細胞数の計測後、陽性細胞率の算出を行った。



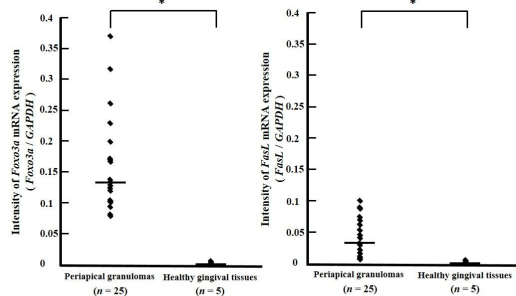
The percentages of Foxo3a producing neutrophils, lymphocytes, and plasma cells in human periapical granulomas. The number of Foxo3a expressing cells was divided by the total number of cells. A significant difference was not shown among each inflammatory cell at $P < 0.05$ (the Kruskal-Wallis test followed by the Steel-Dwass test).

(3) 蛍光二重免疫染色から歯根肉芽腫中の炎症性細胞から Foxo3a および Fas-L の共発現を認めた。さらに Foxo3a の発現は Fas-L の発現と比較して、有意に高かった。



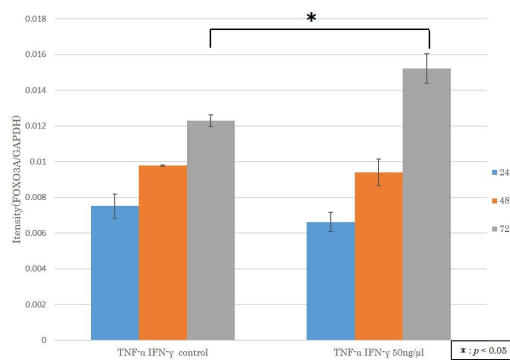
Dual-color immunofluorescence image analysis of periapical granulomas: (A) Anti human mouse Foxo3a monoclonal antibody. (B) Anti human goat FasL polyclonal antibody (C) Merged images (D) Nuclear counterstains with 4,6-diamine-2-phenylindole. (bars = 100µm). Quantitative analysis of two-color immunofluorescence image analysis of periapical granulomas. The number of immunoreactive round cells for Foxo3a or FasL antibodies was divided by the number of 4,6-diamine-2-phenylindole-positive round cells: (E) Foxo3a- and FasL-positive round cells in each sample. (F) Mean percentages of Foxo3a- or FasL-positive round cells. An asterisk shows a significant difference at $P < 0.05$ (Brunner-Munzel test)

(4)リアルタイム RT-PCR 解析から歯根肉芽腫中での Foxo3a および Fas-L 遺伝子発現は健常歯肉中と比較して、有意に高かった。



Real-time PCR analysis for *Foxo3a* and *FasL* messenger RNA expression in periapical granulomas and healthy gingival tissues. The intensity of *Foxo3a* and *FasL* messenger RNA expression was divided by that of *GAPDH* messenger RNA expression. An asterisk shows a significant difference at $P < 0.01$ (Mann-Whitney *U* test)

(5) 培養した細胞を TNF- α および IFN- γ を用いて、刺激し、その RNA を抽出後リアルタイム RT-PCR 法にて、経時的に Foxo3a 遺伝子の発現を検索した。Molt-4 の培養において Foxo3a 遺伝子は経時的に上昇し、その発現は 72 時間後がピークであり、コントロールと比較して有意に高かった。



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)

Watase T, Shimzu K, Ohara K, Komiya H, Kanno K, Hatori K, Noma N, Honda K, Tsuboi Y, Katagiri A, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K. Role of medullary astroglial glutamine synthesis in tooth pulp hypersensitivity associated with frequent masseter muscle contraction. *Mol Pain*, 査読有り, doi: 10.1177/1774480618763270, 2018

Kudo H, Takeichi O, Hatori K, Himi K, Ogiso B. A potential role for the silencing information regulator 2 homologue (SIRT1) in periapical periodontitis. *Int Endod J*, 査読有り, doi: 10.1111/iej.12894, 2018

〔学会発表〕(計9件)

工藤洋、武市収、羽鳥啓介、牧野公亮、氷見一馬、小木曾文内、歯根肉芽腫の創傷治癒における SIRT1 の関与(2017)、第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会

石井佳笑、羽鳥啓介、武市収、牧野公亮、小木曾文内、歯根肉芽腫中の炎症性細胞における FOXO3A の発現(第二報)(2017)、第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会

Ishii K, Hatori K, Takeichi O, Ogiso B, The Expression of FOXO3A in Human Periapical Granulomas(2017)., 95th General Session and Exhibition of the International Association For Dental Research

Kudo H, Takeichi O, Hatori K, Makino K, Ogiso B, Possible Roles of Sirtuin 1 in Human (2017)., 95th General Session and Exhibition of the International Association For Dental Research

石井佳笑、羽鳥啓介、武市収、牧野公亮、安川拓也、小木曾文内、歯根肉芽腫中の炎症性細胞における FOXO3A の発現(2016)、第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会

工藤洋、武市収、羽鳥啓介、牧野公亮、勝呂尚、小木曾文内、歯根肉芽腫における SIRT1 遺伝子の発現(2016)、第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会

工藤洋、武市収、羽鳥啓介、牧野公亮、勝呂尚、小木曾文内、歯根肉芽腫における SIRT1 遺伝子の発現(2015)、第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会

石井佳笑、羽鳥啓介、武市収、牧野公亮、小木曾文内、歯根肉芽腫における FOXO3A の発現(2015)、第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会

牧野公亮、武市収、羽鳥啓介、勝呂尚、工藤洋、今井健一、落合邦康、小木曾文内、Porphyromonas endodontalis は Epstein-Barr virus を再活性化する(2015)、第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会

〔図書〕(計1件)

興地隆史、新井恭子、小木曾文内、佐藤勸哉、大島勇人、松浦信幸、泉英之、北村和夫、澁川義幸、長谷川誠実、阿部修、吉川剛正、田崎雅和、清水康平、加藤広之、田中利典、村松敬、羽鳥啓介、澤田則宏、石井宏、五十嵐勝、大原絹代、佐藤暢也、清水花織、北島佳代子、篠田雅路、岩波洋一、抜髄 Initial Treatment 治癒に導くための歯髄への臨床アプローチ、HYORON、139-150、2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

羽鳥 啓介 (HATORI, Keisuke)

日本大学・歯学部・助教
研究者番号：30632583

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()