

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15847

研究課題名(和文) 歯肉溝滲出液における好中球細胞外トラップと歯周組織の炎症との関わりへの解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of protein in gingival crevicular fluids and its association with neutrophil extracellular trap

研究代表者

山本 松男 (YAMAMOTO, MATSUO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50332896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉溝で口腔細菌の侵入を防ぐ為、好中球は貪食だけではなく、細胞外トラップにより侵入を阻止していると考えられている。しかし歯肉溝におけるNETosisの制御機構について不明な点が多い。歯肉溝浸出液中のタンパク質成分をSDS-PAGE法、質量分析法などにより解析したところ、NETosisの誘導分子として知られているラクトフェリン、セロトランスフェリン、S100A8、9、IL-1、補体等が検出された。一方で、細菌LPSでin vitro系において好中球及び好中球様細胞を刺激すると、NETosisが誘導された。歯肉溝において細菌因子による刺激で好中球にNETosisが生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is thought that neutrophils inhibit not only phagocytosis but also invasion of periodontal pathogenic bacteria by extracellular traps in order to prevent invasion of oral bacteria into the soft tissue in the gingival sulcus. However, there remains unclear about the control mechanism of NETosis in the gingival sulcus. The protein components contained in the gingival crevicular fluid were analyzed by SDS-PAGE method and mass spectrometry. They show that GCF includes lactoferrin, serotransferrin, S100A8, 9, IL-1beta and complement which are known as a trigger molecule induced by neutrophil NETosis. On the other hand, NETosis was induced in neutrophils and neutrophil-like cell HL-60 when they were stimulated by Porphyromonas gingivalis LPS. Taken together, it is suggested that NETosis may occur in neutrophils by stimulation of bacterial factors and GCF components in the gingival sulcus.

研究分野：歯周病態・診断学

キーワード：歯肉溝滲出液 細胞外トラップ 質量分析 好中球 LPS

1. 研究開始当初の背景

口腔は消化器の入り口であり、摂食の機能を果たすためには、外界からあらゆる形態の食物を取り込む機能が要求される。ものを切り取り飲み込めるように粉碎するために、歯が重要な機能を果たしているが、硬組織である歯は口腔粘膜を貫通する形で顎骨に支持されながら口腔内部にその一部を暴露しつつ存在している。

消化管は上部から下部にわたり、その役割を異にしながら独特の環境を維持している。また、その部位の環境に適した常在菌叢の存在が知られている。口腔では食物の消化を始める場所でもあるために、多量の唾液が分泌され、湿潤な環境である。口腔内常在菌叢を構成する菌の研究が積み上げられてきたが、最新の解析結果によれば、培養不可能なものを含めると700種から1000種類の存在が示唆されている。口腔常在菌は多種類の菌が集合し、高度な機能分担のもと互いに生存しやすいマイクロ環境を構築しており、歯面や口腔粘膜面に付着し生存し続けている。歯の生えざわである歯肉溝は、唾液が滞在しやすく、口腔常在菌の集合体も歯垢＝デンタルプラークとして付着する頻度が高くなる。歯肉上皮は最表層で錯角化（一部角化）して外来物の透過を妨げたり、機械的な刺激から組織を保護するように機能しているが、歯の生えざわにおいて非角化となりエナメル質をはじめ硬組織である歯面に上皮性の付着をしている。この部位における生体防御機構として歯周組織から歯肉溝浸出液の存在が知られており、ディフェンシンや補体、抗体などの抗菌物質や、好中球やマクロファージなども歯肉溝に滲出することが知られている。

硬組織の上皮の付着部位を接合上皮と呼ぶが、好中球は歯周組織の毛細血管から遊走した後に、侵入してくる異物を貪食しながら接合上皮に到達し、最終的に歯肉溝へと排泄されていく。貪食した異物はファゴソームの中で酸化を受けて不活化されると考えられている。好中球の活性化については、活性酸素産生量を増大させ生体防御を高めるプライミングと、活性酸素産生を惹起するトリガリングに分けて考えられている。NADPH オキシダーゼによって産生される活性酸素はミエロペルオキシダーゼ（MPO）によって酸化力の強いHOClに変換され殺菌力を高める。また、ヒューマンの歯周組織標本観察では、歯肉溝やさらに深さが深くなった歯周ポケットの底部においては、デンタルプラークと接合上皮の間に好中球が層状に並ぶような所見がしばしば観察され、何らかの防御機構がある可能性が提案されている。しかし、その防御機構については未知のままであった。

近年歯肉溝浸出液より採取された好中球においてNETosisが進行していることを示す報告が散見されるようになり、歯周組織の生体防御機構は、異物侵入を防ぐ新たな機構が存在することが判明した。

一方で、歯肉溝浸出液に含まれる成分の研究は長い歴史を持ち、炎症性サイトカインだけではなく、細菌体成分、宿主上皮細胞に関連した成分、好中球をはじめとした細胞成分、血球成分、および血漿成分など多岐にわたる。しかし、歯肉溝における好中球のNETosisがどのように制御されているのかについてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

歯肉溝浸出液に含まれる炎症関連因子とNETosisの生じる関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

【歯肉溝浸出液中のNETosis関連因子の検出】

[1] 被験者の選定

昭和大学歯科病院歯周病科に受診する成人、小児歯科外来の受診患児のうち研究協力に同意の得られたもの、および昭和大学歯周病学講座に在籍する歯科医師のうち研究協力に同意の得られたものより、歯肉溝浸出液の資料提供を受けた。本研究は昭和大学歯学部医の倫理委員会により承認された。

[2] GCF サンプルの採取と解析

協力者の健康な歯周組織部位より、滅菌ペーパーポイントにより歯肉溝浸出液を採取した。採取後はサンプルバッファーに浸漬し、4℃保存とした。

(1) GCF サンプルのタンパク定量

BCA法にてタンパク定量を行い、各サンプルが均等になるように分注し保存した。

(2) SDS-PAGE法、LC-MS/MS解析およびiTRAQ法

タンパク質のSDSによる変性およびTCEP還元

MMTSによるシステイン残基のアルキル化

各サンプルのトリプシン消化

iTRAQ®試薬によるN末端およびリシン残

基のラベルとラベルサンプルの混合

陽イオン交換カラムによる精製

有機溶媒の除去と脱塩処理

LC/MS解析*：得られたスペクトルは

Protein pilotにてデータ解析を行った。

[3] GCF サンプル中炎症性サイトカインの測定

フローサイトメーターを用いたビーズアッセイ法によるサイトカインの同時測定

IL-1 β 、TNF α 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70に対する6種類の抗体を傾向強度の異なるビーズに結合させ、少量のサンプルに含まれるサイトカインの定量解析を行った。

[4] Western Blot法によるシトルリン化ヒストンH3の検出

NETs に必須のシトルリン化ヒストン H3 に関しては Western Blot 法による検出を行った。

【ヒト好中球及び好中球様細胞株 HL-60 における NETosis 誘導】

[5] 好中球様に分化誘導の可能なヒト前骨髄球細胞株 HL-60

好中球様に分化誘導の可能なヒト前骨髄球細胞株 HL-60 と、血液より採取したヒト好中球を用いて *in vitro* 実験評価系を構築した。

[6] NETosis 誘導条件の検討

レチノイン酸誘導体により好中球様に分化させた HL-60 細胞株においてツニカマイシンで、ヒト好中球では PMA、LDL、酸化 LDL による刺激した。

歯周組織で好中球 NETs が生じるトリガーは口腔細菌で、とりわけ歯周病の進行により増加するグラム陰性菌との関係を検索した。好中球様に分化誘導の可能なヒト前骨髄球細胞株 HL-60 と、血液より採取したヒト好中球を用いて、NETs 誘導の条件を検討した。HL-60 は All-Trans Retinoic Acid により好中球様に分化を誘導した。

[7] NETosis の検出

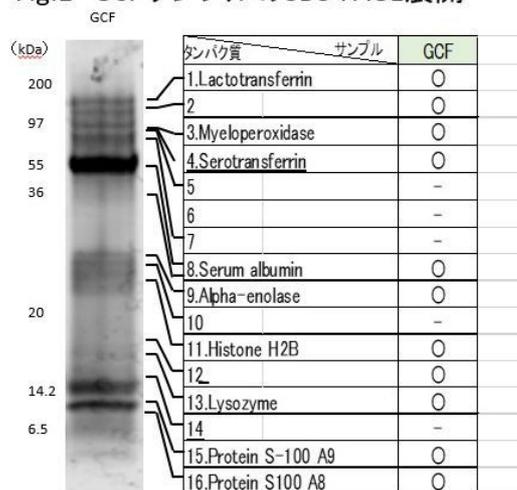
核酸物質の核外や細胞質外への逸出を SYTO Green により確認する。シトルリン化ヒストン H3 に対する免疫染色を行った。

4. 研究成果

[1] GCF サンプルの解析

SDS-PAGE 法および LC-MS/MS 解析

Fig.1 GCF サンプルの SDS-PAGE 展開



上に示すように、歯肉溝浸出液に含まれるタンパク質成分を SDS-PAGE 法で展開し、それぞれのバンドに含まれるタンパク質を質量分析法により同定したところ、NETosis のトリガーになり得ると報告されているラクトフェリン、トランスフェリン、S100A8,9 等のタンパク質を検出した。その他好中球に含まれることが知られている酵素類も検出さ

れ、歯肉溝浸出液中では NETosis が起こりえる NETosis 関連分子が存在することが明らかになった。

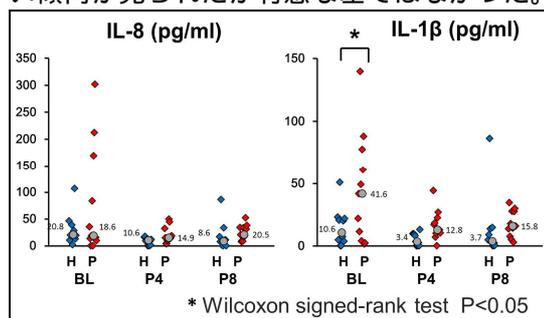
iTRAQ 法

同一個体において臼歯部ではデンタルプラークが付着し、前歯に比較して大臼歯部で歯肉炎症の程度は強くなる。このことより、程度により NETosis 誘導因子の存在比を検討したが、炎症の程度による傾向は認められなかった。

中切歯 / 第一大臼歯	被験者 #1	被験者 #2	被験者 #3	被験者 #4
serotransferrin	0.809	1.096	1.600	1.328
protein S100 A9	4.571	0.402	1.820	1.286
complement C3	0.319	1.888	0.667	1.232

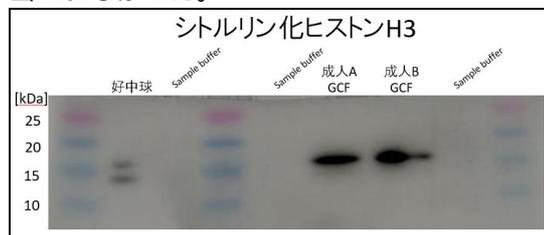
[2] GCF サンプル中炎症性サイトカインの測定

歯肉組織において臨床的に健康な部位に比較して炎症のある部位では、炎症性サイトカイン IL-1 が有意に高かった。IL-8 では高い傾向が見られたが有意な差ではなかった。



[3] Western Blot 法によるシトルリン化ヒストン H3 の検出

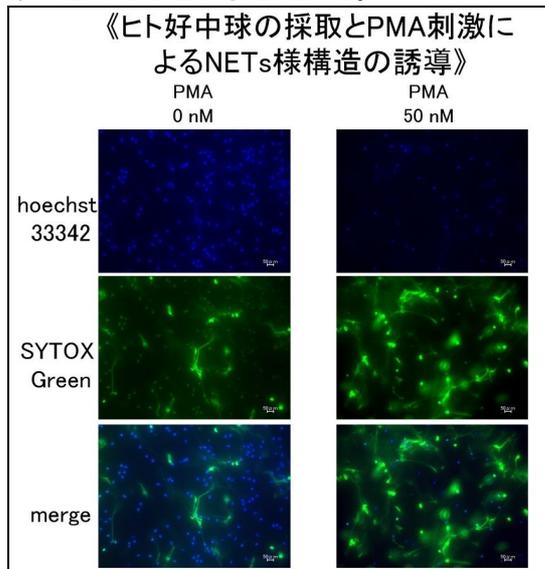
臨床的に健康な歯肉から採取した歯肉溝浸出液中のシトルリン化 H3 の検出を試みたが、培養好中球を薬剤刺激した場合に認められるシトルリン化 H3 は歯肉溝浸出液中には検出されなかった。



[4] 好中球様に分化誘導の可能なヒト前骨髄球細胞株 HL-60 における NETosis 誘導条件の検討

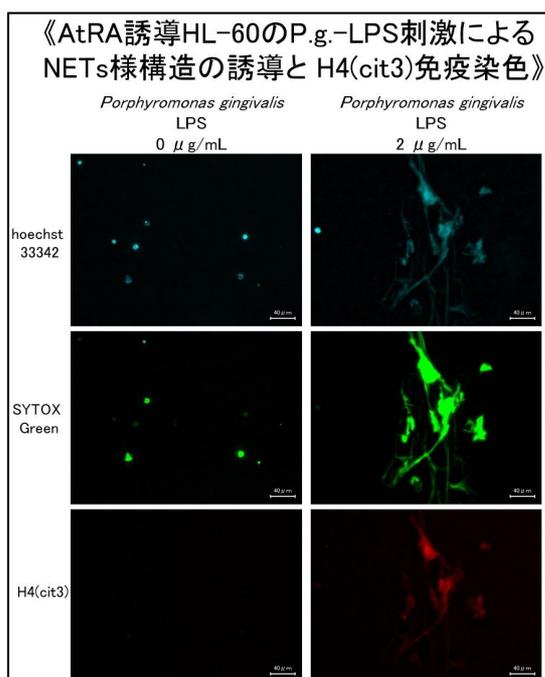
血液より採取したヒト好中球を採取し *in vitro* 実験評価系を構築した。

ヒト好中球では PMA、LDL、酸化 LDL による刺激で、NETosis をおこさせることができた。下図は、核酸が NETosis により細胞外に放出された状態を核酸染色物質 SYTOGreen により染色されてことを示したい。



[5]NETosis の検出

レチノイン酸誘導体により好中球様に分化させた HL-60 細胞株においてツニカマイシンで NETosis をおこさせることができた。*Porphyromonas gingivalis* LPS により刺激により NETosis を誘導できた。シトルリン化ヒストン H4 に対する免疫染色を行った。



HL-60 ではツニカマイシンで濃度依存的(0, 5, 10, 20 μg/ml)に、ヒト好中球では PMA で濃度依存的(0, 10, 20, 50nM)に NETs が誘導された。さらに、HL-60 では歯周病原菌の一つであるグラム陰性桿菌 *Porphyromonas*

gingivalis の LPS (0, 1, 2, 5 μg/ml) により NETs が誘導された。しかし、LPS による刺激では濃度依存性は確認されなかった。一方で、NETosis 誘導率(発生率)の算定法に改善の余地がある。NETosis による網状構造が広がり細胞数の測定が容易でないためである。今後はシトルリン化酵素(PAD4)の活性化や抗シトルリン化ペプチドの測定による NETosis 形成の定量化を進める。

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 3 件)

Seki T, Aizawa R, Tanaka J, Yajima-Himuro S, Kato M, Tanaka K, Mishima K, Yamamoto M Establishment of mouse gingival junctional epithelial cell line using a bioengineered tooth system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Feb 26;497(1):167-172 査読有

Yumi Moriya, Takashi Obama, Toshihiro Aiuchi, Tomomi Sugiyama, Yumiko Endo, Yoko Koide, Emiko Noguchi, Motonori Ishizuka, Mitsuko Inoue, Hiroyuki Itabe and Matsuo Yamamoto Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluids from deciduous and permanent teeth *J Clin Periodontol*. 2017 Apr;44(4):353-362. 査読有

Ishizuka M, Kato R, Moriya Y, Noguchi E, Koide Y, Inoue S, Itabe H, Yamamoto M. Changes in apolipoprotein B and oxidized low-density lipoprotein levels in gingival crevicular fluids as a result of periodontal tissue conditions. *J Periodontal Res*. 2017 Jun;52(3):594-602 査読有

[学会発表](計 4 件)

小田中 響, 菅野真莉加, 小濱孝士, 板部洋之, 山本松男, ペリクル・歯肉溝浸出液(GCF)・唾液のタンパク質パターンの検討, 第 64 回昭和大学学士会総会 2017/11/25

山本松男 歯肉溝における細菌と宿主の攻防と接合上皮の役割 シンポジウム 一生噛み続けるために歯周組織を科学する SY15-2 第 17 回日本抗加齢医学会(東京) 2017/06/03

守屋佑美、小浜孝士、杉山智美、遠藤由

美子、小出容子、竹丸真以、井上美津子、板部洋之、山本松男 乳歯と永久歯の歯肉溝滲出液における好中球機能の検討
第 330 回 昭和大学 学 士 会 例 会
2016/06/25

守屋佑美、小浜孝士、小出容子、野口江美子、石塚元規、竹丸真以、板部洋之、山本松男 乳歯と永久歯の歯肉溝滲出液中に含まれるタンパク質の網羅的解析 (第 2 報) 第 59 回 春季日本歯周病学会学術大会(鹿児島) 2016/05/20

(4)小出 容子 (KOIDE, Yoko)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：40407466

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 松男 (YAMAMOTO, Matsuo)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50332896

(2)研究分担者

板部 洋之 (ITABE Hiroyuki)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：30203079

(3)美島 健二 (MISHIMA, Kenji)

昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50275343