

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006 ~ 2009

課題番号：18791599

研究課題名（和文）：炎症増悪における血管内皮細胞増殖因子の機能とその意義

研究課題名（英文）：Function of Vascular Endothelial Growth Factor in inflammatory exacerbation

研究代表者

志野 久美子 (SHINO KUMIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：50325792

研究成果の概要（和文）：ヒト歯肉線維芽細胞において VEGF-A₁₂₁ は、pro-MMP-9、pro-MMP-2、active-MMP-2 の活性を濃度依存的に亢進していることが確認された。一方、VEGF-A₁₆₅ では pro-MMP-9、pro-MMP-2、active-MMP-2 いずれの活性にも影響を及ぼすことはなかった。以上の所見から、炎症の増悪には VEGF-A₁₂₁ が関与している可能性が示唆された。本研究では、VEGF の uPA 活性の亢進は認められなかった。よって歯周炎においては VEGF-A₁₂₁ が、プラスミノゲンを介さず MMP-2、MMP-9 を産生することにより炎症増悪に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：VEGF-A₁₂₁ induced activations of pro-MMP-9, pro-MMP-2, active-MMP-2 dose dependently in Human gingival fibroblast. The other side, VEGF-A₁₆₅ has no activation of them. From these results, VEGF-A₁₂₁ may relate to periodontal inflammatory exacerbation. But in this study, VEGF doesn't show uPA up-regulation. Therefore, it suggested that activations of pro-MMP-9, pro-MMP-2, active-MMP-2 by VEGF-A₁₂₁ relate to periodontal inflammatory exacerbation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度	0	0	0
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病・シグナル伝達・生体分子

1. 研究開始当初の背景

歯周病は慢性炎症の病態を呈し、炎症の増悪に血管新生が深く関わっている。そこで血管新生に深く関与する血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor ; 以下 VEGF) に注目し、申請者は歯肉溝滲出液中の VEGF 濃度を測定し、これらが歯周炎の病態と相関を示すことを明らかにしてきた。また、歯周治療前後における歯肉溝滲出液中の VEGF 濃度の変化や短期における SRP 治療前後の歯肉溝滲出液中 VEGF 濃度の変化についても明らかにした。これらの結果から、VEGF が歯周病の増悪因子として働くことが示唆された。しかしながら、その詳細な機序は明らかではない。そこで申請者は VEGF の増悪因子としての機序のひとつとして、VEGF が線溶系を介し増悪に働いている可能性に着目した。VEGF は内皮細胞で線溶系の uPA の活性を up-regulate することが報告された。uPA はプラスミノゲンをプラスミンに変える活性化因子であり、このプラスミンは pro-MMPs を活性化することが知られている。MMPs が歯周病における歯周組織破壊に関与している酵素の中で最も重要であることはよく知られている。

歯周炎の炎症増悪には血管新生は必須であり、VEGF は何らかの関与はしていると考えられており、生態内でその役割については慢性関節リウマチで数多く報告されている。しかしながら歯周炎の増悪因子として VEGF が線溶系に働くという報告はないこと、さらに PA/plasmin system との関連、inhibitor を

用いて立証した報告はほとんどない。以上より本研究では、歯周炎における VEGF の線溶系への影響を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病における VEGF 炎症増悪への果たす役割を VEGF の線溶系への影響、それに続く MMPs 産生への影響を検討することにより明らかにする。

3. 研究の方法

1) 材料

VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₅₆ は R&D Systems より購入した。

2) 細胞

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院成人系歯科センター歯周病科に来院した歯周病患者に、研究の主旨を十分説明し、承諾が得られた後、歯周外科手術あるいは抜歯時に歯肉組織を採取する。臨床診査を同時に行い、病態を記録する。得られた歯周組織より out-growth 法にて歯肉線維芽細胞を分離培養する。

3) ゼラチンザイモグラフィー

ヒト歯肉線維芽細胞を VEGF-A₁₂₁ および VEGF-A₁₅₆ にて刺激した培地中のマトリック スプロテアーゼ (Pro MMP-2、MMP-2、MMP-3、Pro MMP-9、MMP-9) をゼラチンザイモ電気泳動キット (ライフ研究所) にて検出した。

4) uPA 産生測定

ヒト歯肉線維芽細胞を 48well plate に播種し VEGF-A₁₂₁ にて刺激した培地を enzyme-linked immunosorbent

assay(ELISA)Kit(AssayPro)を用いて uPA を測定した。

5) IL-6 産生測定(ELISA)

ヒト歯肉線維芽細胞を 48well plate に播種し VEGF-A₁₂₁にて刺激した培地を ELISA Kit(Invitrogen)を用いて IL-6 を測定した。

6) Real-time RT-PCR

単層の培養細胞に1 ml の ISOGEN 溶液

(NIPPON GENE 社)を加えて溶解させ、0.2ml のクロホルムを混合し、12,000 g で15 分間、4°Cにおいて遠心した。RNA を含む水相を採取し、イソプロパノールを加え、12,000 g で15 分間、4°Cにおいて遠心することによって total RNA を、沈殿させた。沈殿物(total RNA)を70% エタノールで洗浄し、TE {10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)}に溶解した。

得られた total RNA から ReverTra Ace® qPCR RT Kit (TOYOBO)を用いて逆転写を行い、cDNA を作製した。

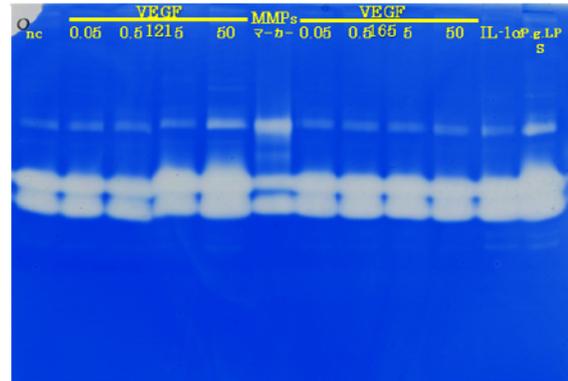
PrimerArray™ (TAKARA)を用いて 176 種類の遺伝子を Real-time RT-PCR 法にて網羅的に解析した。

4. 研究成果

1) ヒト歯肉線維芽細胞における VEGF-A₁₂₁・VEGF-₁₆₅刺激による MMPs 活性への影響

ヒト歯肉線維芽細胞の *in vitro* 培養系に、血管新生に対して強い作用を持つ VEGF-A のサブタイプである VEGF-A₁₂₁と VEGF-A₁₆₅を作用させた。線溶系にて働く uPA はプラスミノゲンをプラスミンに変える活性化因子であり、プラスミンは pro-MMP s を活性化することが知られているため、まず MMP s 活性をザイモグラフィにて検討した。その結果、VEGF-A₁₂₁では、pro-MMP-9、pro-MMP-2、

active-MMP-2 の活性を濃度依存的に亢進していることが確認された。一方、VEGF-A₁₆₅では pro-MMP-9、pro-MMP-2、active-MMP-2 いずれの活性にも影響を及ぼすことはなかった。以上の所見から、炎症の増悪には VEGF-A₁₂₁が関与している可能性が示唆された。



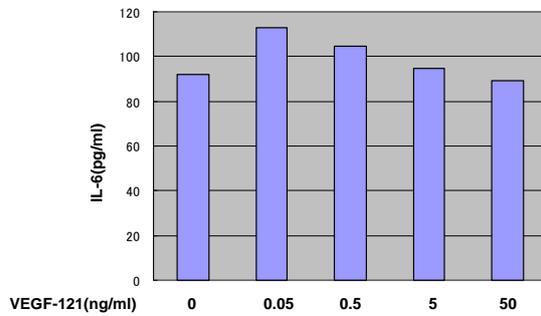
2) ヒト歯肉線維芽細胞における VEGF-₁₂₁の uPA 活性への影響

血管新生に対して強い作用を持つ VEGF-A のサブタイプである VEGF-A₁₂₁が炎症状態に関与している可能性が示唆されたため、VEGF-A₁₂₁のヒト歯肉線維芽細胞に対する影響を検討していった。VEGFは内皮細胞で線溶系の uPA 活性を亢進させることが知られている。さらに、uPAはプラスミノゲンをプラスミンに変換する活性化因子であり、プラスミンは pro-MMPs を活性化することが知られているため、まず、VEGF-A₁₂₁を歯周組織由来細胞に作用させ、uPAの産生について検討した。しかしながら、本実験系においては uPA の産生は確認できなかった。

3) ヒト歯肉線維芽細胞における VEGF-₁₂₁の IL-6産生への影響)

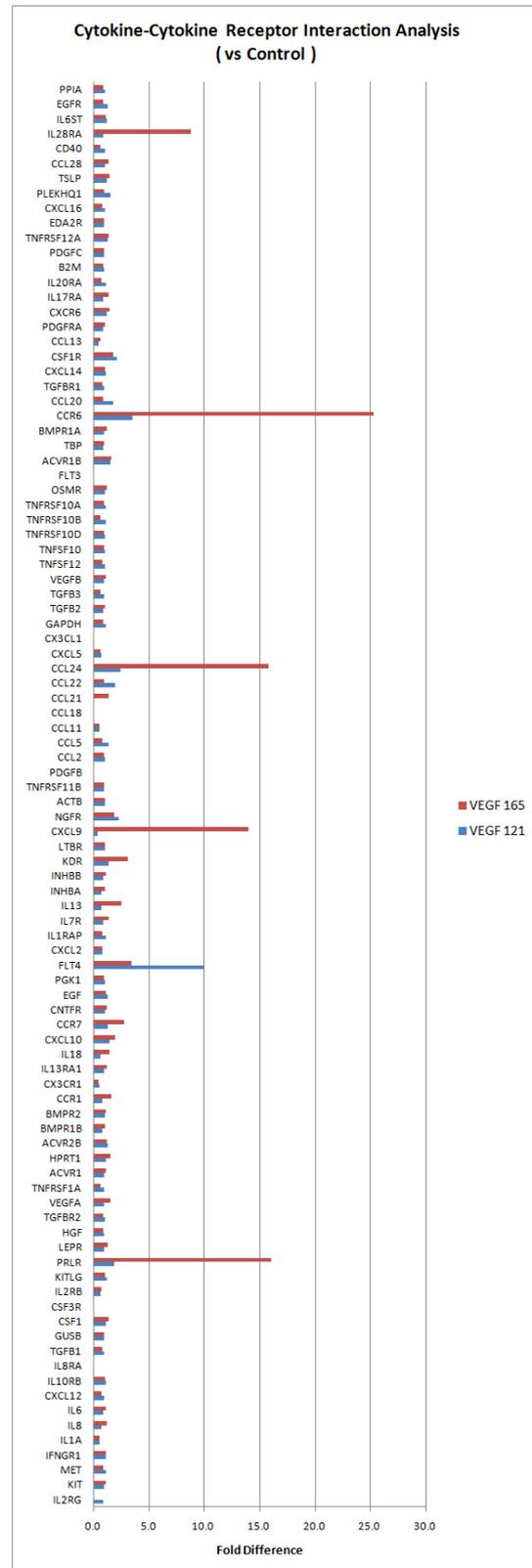
VEGF-A₁₂₁がヒト歯肉線維芽細胞に対し、直接

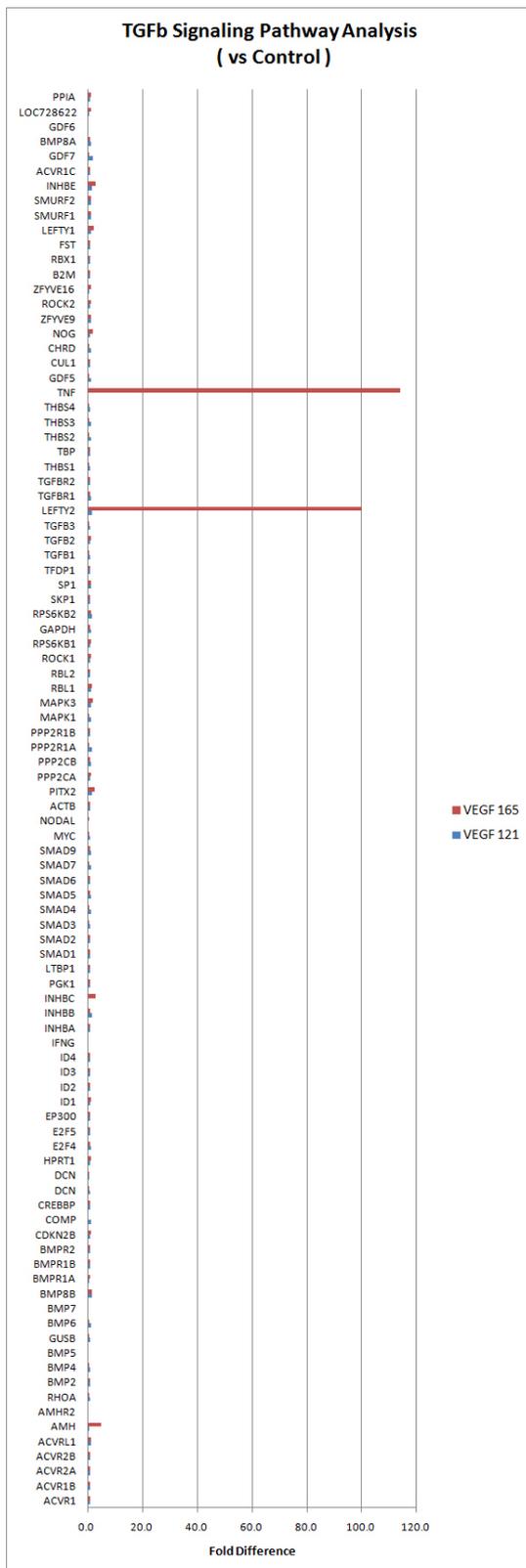
炎症性サイトカインの産生に関与しているかを検討するためにELISA法にてIL-6産生をみた。その結果、IL-6産生についても有意な変化をみることはなかった。



4) Real-time RT-PCR (PrimerArray™)

VEGF121 刺激では、FLT4、NGFR、CCL24、CCR6、CSF1R 遺伝子について発現増強が観察された。VEGF165 刺激では、AMH、INHBC、INHBE、PITX2、LEFTY1、LEFTY2、TNF α 、PRLR、CCR6、CCR7、FLT4、IL13、KDR、CXCL9、CCL24、IL28RA 遺伝子について発現増強が観察された。これら遺伝子発現の詳細な意義については今後解析していく必要がある。





以上から、炎症の増悪には VEGF-A₁₂₁ が関与している可能性が示唆された。本研究では、VEGF の uPA 活性の亢進は認められなかった。よって歯周炎においては VEGF-A₁₂₁ が、プラスミノゲンを介さず MMP-2、MMP-9 を産生することにより炎症増悪に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

宮脇正一、小椋幹記、瀬戸口尚志、小山徹、西原一秀、吉田礼子、坂口勝義、田畑純、五月女さき子、石神哲郎、川島清美、佐藤強志、重田浩樹、西恭宏、徳田雅行、志野久美子、鳥居光男、西川殷維

IT の活用と導線の工夫などによる客観的臨床能力試験 (OSCE) の新たな人的資源削減の試みとその効果

日歯教誌 2007;23:154-60 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志野 久美子 (SHINO KUMIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号 : 50325792