

平成21年5月8日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890031
 研究課題名（和文）歯周病巣インターフェイスにおける宿主-細菌相互作用に対する分子生物学的アプローチ
 研究課題名（英文）Molecular biological approaches to the interface between the host and parasite in the foci of periodontitis
 研究代表者
 真柳 弦 (MAYANAGI GEN)
 東北大学・病院・医員
 研究者番号：10451600

研究成果の概要：

本研究により、健康な歯肉縁下プラークでは、通性嫌気性の歯面初期付着細菌が優勢で、歯周炎患者では、嫌気性菌が優勢であったことから、歯周炎の進行に伴って、嫌気性菌の増殖に適した環境へとシフトすることが示唆された。さらに、歯周ポケットが深くなると、骨吸収に関与しているとされる IL-6 の検出量が増加傾向にあることが明らかになった。これらの結果を日常臨床にフィードバックし、歯周病診断に活かすことにより、国民の健康の確立に大きく寄与できるものと期待している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

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：歯学、免疫学、細菌学、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

「歯周病の病態は病巣局所に誘導される免疫応答の質と大きさにより決定される。」という免疫学的因子の解明を目指し、これまで、歯周炎病巣歯肉中の単核細胞が産生するサイトカインのプロファイルに関して様々な研究がなされてきた。しかしながら、Th1-Th2 サブセットの役割については今のと

ころ一致した見解が得られていない。Kiyonoらのグループは歯周組織より分離した単核球(GMC)は IL-5, IL-6 mRNA を優位に発現しているが、IL-2, IL-4 mRNA 発現は認められず、Th2 優位であることを示している。また Seymour らは Th1 inducer である IL-12 および Th2 inducer の IL-10 のいずれもが歯肉由来の

GMC で強く発現しているが、病変毎に違ったバランスが見られることを報告している。それに対して Taubman らは病変部位より得た GMC は spontaneous に IL-2 と IFN- γ を発現しており、さらに Con A 刺激を加えると IL-5, IL-6 mRNA 発現が見られることから、歯肉病巣中では Th1 サブセット優位であることを示している。しかしながら、これらの研究は全て歯周外科処置時に得られた組織を用いて行われたものであり、初期治療を行った結果、炎症が消退して、その程度の違いがとらえられている可能性が考えられる。従って、歯周病の発症・進展に果たす Th サブセットの役割については結論が得られていないのが現状である。

一方、近年の分子生物学の進歩により、サイトカインをコードする遺伝子に genotype が存在し、それにより個人におけるサイトカイン産生性が異なることが明らかにされてきた。従って、歯周病巣局所におけるサイトカイン産生を介した免疫調節機構も患者個人の遺伝的素因により影響されると考えられる。

また、歯周病巣局所においては、歯周病原性細菌により惹起された炎症反応の結果、集積した免疫担当細胞に加えて、歯肉線維芽細胞などのレジデント細胞も、これらの細菌由来物質の刺激を受けて様々なサイトカイン産生を行うとともに、細胞間でネットワークが形成されるなど、複雑な病態を呈している。さらに、これまでの研究代表者を含めた細菌学的検索研究結果から、*M. timidum*, *P. gingivalis* 等の特定の歯肉縁下細菌が歯周病の発症・進展にキーロールを果たすことが示唆されており (Mayanagi *et al.*: Oral Microbiol Immunol 2004 年)、歯周病巣局所に誘導される免疫応答の質・大きさは、そこに存在する細菌叢の違いによっても影響を受ける可能性があると考えられる。

従って、歯周病原性細菌により惹起される免疫応答が歯周病の発症・進展に果たす役割を明らかにするためには、これらの細菌の存在と病巣局所で誘導されている免疫応答、さ

らにそれらの遺伝子 genotype について解析を行い、その結果と臨床病態との関わりについて多面的に解析することが必要と考えた。

2. 研究の目的

歯周病の病態は、病巣局所に誘導される免疫応答の質・大きさ (免疫学的因子)、患者個人の遺伝的素因 (遺伝学的因子)、病巣局所に存在する細菌叢 (細菌学的因子) により決定される。従って、歯周病の病態を解明するためにはこれらの3つの因子を単独で検討するだけでなく、各因子の相関性について多面的に検討する必要があるが、これまで、これら全てを考慮した研究は行われていない。例えば、歯周病患者におけるサイトカイン遺伝子の genotype 解析結果は臨床病態との比較しか行われておらず、歯周病巣局所でのサイトカインプロファイルについては歯周病原性細菌の存在とのバランスの観点からは検討されていない。本研究では、これら3つの因子を全て考慮に入れて広い観点から歯周病の病態を決定し、個々の患者間で異なる病態を比較・検討していくことで、歯周病の発症・進展機構の解明を目指し、歯科臨床に直結・貢献する診断法や治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

免疫学的、遺伝学的、細菌学的パラメータの解析に必要な臨床試料として用いたものは、それぞれ歯肉、末梢血、歯肉縁下プラークであり、これらの試料は東北大学病院附属歯科医療センター歯内歯周療法科を受診し、歯周治療を開始する患者から規定に従ったインフォームドコンセントを行った後に得た。歯肉試料および歯肉縁下プラークは、初期治療のスクレーリング・ルートプレーニング時 (TBI、歯肉縁上スクレーリング終了後) に、歯肉試料はポケット底部を搔爬し、歯肉縁下プ

ラークは滅菌ペーパーポイントを用いて採取した。さらに、このときX線写真、口腔内マクロ写真、歯周ポケット測定などの臨床資料を得て、臨床病態の評価も行った。末梢血については、遺伝子解析を含むため、東北大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認と患者の理解を得た上で採取・解析した。臨床試料より得られた患者個々の前述した3つのパラメーターと、採取部位の臨床病態との関連性を比較・検討した。

(1) 歯周病患者からの臨床試料の採取および臨床病態の評価

前述の方法を用いて、患者から歯肉試料、末梢血ならびに歯肉縁下プラークを得た。末梢血およびプラークは genomic DNA を抽出した後-80°C、歯肉は mRNA を抽出した後-80°Cにて保存した。また、個々の患者の臨床資料から臨床病態の評価を行った。

(2) 歯肉縁下プラーク中の歯周病関連性細菌種の特定と歯周病原性の解明

歯肉縁下プラークから抽出した genomic DNA について、特定の歯周病原性細菌に対する特異的プライマーを用いた real time PCR を行うことで、歯肉縁下プラーク中での各細菌種の存在の有無および各細菌種の定量化を試みた。

(3) 歯周病巣歯肉中のサイトカインプロファイルの解析

歯肉試料より抽出した mRNA を RT-PCR した後、real time PCR により IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α などの炎症性サイトカイン、IL-10 などの抗炎症性サイトカインおよび IL-4、IL-12、IFN- γ などの調節性サイトカインの mRNA 発現を定量的に検出した。

(4) サイトカイン遺伝子 genotype の解析

患者の末梢血単核球画分より抽出した genomic DNA を用いて、PCR-RFLP 法により種々のサイトカイン遺伝子の genotype を決定した。

(5) 臨床パラメーターとの関連性の検討

クラスター分析あるいは多変量解析を用いて、採取部位の歯周病の病態と免疫学的、遺伝学的、細菌学的パラメーターとの関連性を多面的に検討した。

4. 研究成果

(1) プラーク genomic DNA を用いて、歯周病原性細菌特異的な real time PCR 法を確立した結果、健康な歯肉縁下プラークでは、*Streptococcus* 属などの通性嫌気性の歯面初期付着細菌が優勢であり、一方、歯周炎患者の歯肉縁下プラークでは、嫌気性菌が優勢であったことから、歯周炎の進行に伴って、嫌気性菌の増殖に適した環境へとシフトすることが示唆された。

(2) 採取した歯肉 mRNA を用いて、TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40 の10種類をターゲットとして歯周病巣歯肉中のサイトカインプロファイルの定量的解析 (RT-real time PCR) を行った結果、歯周炎患者では歯槽骨吸収と関連して注目されている TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 の検出率は高く、破骨細胞の形成を抑制するとされる IFN- γ 、IL-4、IL-12p40 の検出率は低かった。さらに、臨床病態の指標である歯周ポケット深さと各種サイトカイン量との関連性について調べたところ、ポケットが深くなると、IL-6 の検出量が増加する傾向にあることが明らかになった。過剰に産生される IL-6 は骨吸収に関与していることが知られており、臨床指標と歯肉 mRNA から検出される IL-6 の関連性が示唆された。

これらの成果は、歯周病有病者のスクリーニング、歯周治療前後の状態を比較することによる治療効果の判定、メンテナンス中のモニタリング手段などに活用することが可能となり、その結果を日常臨床にフィードバックすることができる。すなわち、中年以降の

歯周病有病率が高い我が国において、歯周病の早期診断・治療の一助となることで国民の健康の確立にも大きく寄与できるものと期待される。

なお、サイトカイン遺伝子 genotype の解析については末梢血の採取が必要であり、また遺伝子解析を含むため、試料採取に同意の得られない患者が多く、サンプル数が不十分で本研究期間内においては、分析を行えなかった。今後はサンプル数を増やし、採取部位の歯周病の病態と免疫学的、遺伝学的、細菌学的パラメーターとの関連性をさらに多面的に検討して行き、歯周病の発症・進展機構の解明および歯周病の診断法の開発を目指す予定である。

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3件)

- ① Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, Hirata H, Sakamoto M, Benno Y and Shimauchi H: Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: A double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, in press, 2009. 査読あり
- ② Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, Hirata H: Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* 35 (10): 897-905, 2008. 査読あり
- ③ Sato T, Matsuyama J, Mayanagi G, Abiko Y, Kato K and Takahashi N:

Nested PCR for the sensitive detection of cariogenic bacteria.

Cariology Today 3 & 4(1):17-20, 2007.

査読あり

[学会発表] (計1件)

- ① 中谷清吾、大山祐賀子、真柳 弦、八巻恵子、伊藤康博、南淵麻衣子、平田晴久、島内英俊：
「歯周病関連細菌に対する *Lactobacillus salivarius* WB21 株の影響」
第50回 日本歯周病学会春季学術大会（横須賀）2007年5月18日

[図書] (計4件)

- ① Mayanagi G, Nakaya S, Yamaki K, Ito Y, Minamibuchi M, Kimura M, Hirata H and Shimauchi H: Effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21 supplement on periodontal clinical parameters and microflora. *Interface Oral Health Science*, Springer, Tokyo, 269-270, 2007.
- ② Sato T, Abiko Y, Mayanagi G, Matsuyama J and Takahashi N: Detection of periodontopathic bacteria in periodontal pockets by nested polymerase chain reaction. *Interface Oral Health Science*, Springer, Tokyo, 267-268, 2007.
- ③ Ito Y, Sato T, Mayanagi G, Yamaki K, Shimauchi H and Takahashi N: Microflora profiling of root canal utilizing real-time PCR and cloning-sequence analyses based on 16S rRNA genes -Differences between before and after root canal treatments-. *Interface Oral Health Science*, Springer, Tokyo, 265-266, 2007.

- ④ Abiko Y, Sato T, Mayanagi G and Takahashi N:
Profiling of subgingival plaque biofilm microflora of healthy and periodontitis subjects by real-time PCR.
Interface Oral Health Science, Springer, Tokyo, 213-217, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真柳 弦 (MAYANAGI GEN)

東北大学・病院・医員

研究者番号:10451600

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者