

機関番号：	3 2 6 6 5
研究種目：	基盤研究 (C)
研究期間：	2 0 0 8 ~ 2 0 1 0
課題番号：	2 0 5 9 2 2 4 0
研究課題名 (和文)	難治性根尖性歯周炎の血管内皮細胞による炎症防御機構の解明
研究課題名 (英文)	Defense mechanisms of periapical inflammation by endothelial cells in persistent apical periodontitis
研究代表者	
	武市 収 (TAKEICHI OSAMU)
	日本大学・歯学部・講師
	研究者番号：1 0 2 7 7 4 6 0

研究成果の概要 (和文) : 難治性根尖性歯周炎の病態を解明するため、炎症メディエーターである一酸化窒素 (NO) と糖化最終産物受容体 (RAGE) および炎症防御に関する midkine に着目した。根尖病巣を免疫組織学的、分子生物学的に検索した結果、NO と midkine は血管内皮細胞で共発現していた。RAGE の発現は内皮細胞で強く、そのリガンドである AGE と共発現していた。また、midkine を発現した内皮細胞はケモカインも共発現していたことから、内皮細胞が中心となり、発現される NO と RAGE が炎症を惹起する一方、midkine が炎症の防御を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : To determine the mechanisms of persistent apical periodontitis, nitric oxide (NO), receptor for advanced glycation end products (RAGE) and midkine were analyzed using immunohistochemical and molecular biological techniques. NO and midkine were co-expressed by endothelial cells. RAGE was also expressed by AGE-expressing endothelial cells. In addition, co-expression of midkine and chemokines by endothelial cells were determined. The data suggested that endothelial cells could play a central role in extension and defense of periapical inflammation.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2 0 0 8 年度	1, 300, 000	390, 000	1, 690, 000
2 0 0 9 年度	1, 200, 000	360, 000	1, 560, 000
2 0 1 0 年度	1, 100, 000	330, 000	1, 430, 000
総 計	3, 600, 000	1, 080, 000	4, 680, 000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・保存治療系歯学

キーワード： 慢性根尖性歯周炎、歯根肉芽腫、歯根嚢胞、血管内皮細胞、一酸化窒素、糖化最終産物受容体、midkine、ケモカイン

#### 1. 研究開始当初の背景

難治性根尖性歯周炎は通常の根管治療では治癒せず、外科療法が選択されることがある。しかし、根管内に抗炎症薬を応用することで治癒することができれば、患者にとって大きな福音となる。

研究代表者は現在まで、難治性根尖性歯周炎のメカニズムを解明する目的で、インター

ロイキンなどの炎症メディエーターの発現が難治性根尖性歯周炎に及ぼす影響について研究を行い、以下の結果を得た。

- (1) 難治性根尖性歯周炎では健常歯肉に比較して誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) が有意に発現しており、多量の NO が合成されている

ことから、NO が難治性根尖性歯周炎の発症と遷延に大きく関わっていることを示唆した。

(2)NO 合成が発現されると、血管内皮細胞の細胞間接着分子である血管内皮 (vascular endothelial: VE) カドヘリン発現が減少し、血管透過性の亢進が誘導された。

(3)NO 合成阻害酵素である 1400W を血管内皮細胞に応用したところ、NO 合成が阻害され、VE-カドヘリン発現が上昇することで、血管の透過性が減少した。

以上のことから、根尖性歯周炎に NO 合成阻害薬を作用させることにより、炎症が消退する可能性が示唆され、炎症メディエーターを研究することが治療方法へと導く鍵となることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

これまでの研究により、難治性根尖性歯周炎の血管内皮細胞が炎症の発症と遷延に関与するだけでなく、炎症に対する防御機構を担っている可能性が示唆されたが、そのメカニズムについては不明な点が多く、未だにその詳細は明らかにされていない。

midkine はヘパリン結合性成長因子であり、悪性腫瘍に特異的に発現されていることから、悪性腫瘍の腫瘍マーカーと考えられている。しかし、細胞増殖、組織再生や細胞遊走にも関与していることが報告され、抗炎症作用を有することが知られるようになってきたことから、難治性根尖性歯周炎に対する炎症防御にも関与している可能性が示唆される。しかし、根尖性歯周炎における midkine 発現について検索された報告はなく、その関連性や機能については不明のままである。

そこで、本課題ではこの midkine に着目し、慢性根尖性歯周炎における midkine 発現が根尖性歯周炎に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試試料

#### ① 根尖病巣

日本大学歯科病院歯内療法科を受診した患者のうち、打診・根尖部触診で疼痛を訴え、歯髄電気診に反応せず、自発痛がない症例に対し、根管治療を行っても治癒せず、経過が長い症例で難治性根尖性歯周炎と臨床的に診断された患者を被験者とした。治療の一環として歯内外科療法を行い、摘出した根尖病巣組織を本研究に供試した。

#### ② 健常歯肉

近医での歯科検診の際に撮影したオルソパントモ写真により、埋伏智歯の存在を認め、

日本大学歯科病院口腔外科に抜歯の紹介をされた患者を被験者とした。患歯は完全埋伏智歯であり、疼痛と腫脹はなく、炎症を認めないため、抜歯の際に切除する歯肉を健常歯肉として本研究に供試した。

### ③ 倫理的配慮

本研究の内容はヘルシンキ条約に基づき、日本大学歯学部倫理委員会の審査、承認を得ている (倫許 2004)。また、試料の採取前には患者に研究内容を説明し、起こりえる不利益などを説明したのち、試料の提供に同意を得た場合にのみ同意書に署名を受け、試料を本研究に供試した。

### (2) 試料の準備

得られた試料を 2 分割し、一方を中性緩衝ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、7  $\mu$ m の切片を作製した。また、他方は OCT コンパウンドに包埋後、ドライアイス・アセトン内で凍結し、7  $\mu$ m の切片を作製後、4% パラホルムアルデヒドで固定した。

### (3) 病理組織学的検索

通法に従い、パラフィン切片を脱パラシ、ヘマトキシリン・エオジン重染色した。その後、光学顕微鏡を用いて病理組織学的に検索した。

### (4) 免疫組織化学的検索

通法に従い、凍結切片を用いて ABC 法による免疫組織化学的検索を行った。すなわち、正常ウサギ、ヒツジ、ヤギまたはウマ血清でブロッキング処理を行ったのち、一次抗体として抗ヒト midkine、RAGE、AGE、S100 またはケモカイン (CXCL12、CXCL13、CXCL16、CX3CL1) 抗体を反応させた。その後アビジン・ビオチン複合体を反応させ、次いで発色其質を反応させた。標的タンパクの発現細胞は光学顕微鏡を用いて検索した。

### (5) 二重免疫染色法

通法に従い、凍結切片を用いて二重免疫染色法を行った。すなわち、一方の標的タンパクは抗ヒトモノクローナル抗体を用い、ABC 法による免疫染色と其質の発色を行った。次いで、他方の標的タンパクに対する抗ヒトポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、其質の発色を行った。その後、光学顕微鏡を用いて発現細胞の検索を行った。

なお、標的としたタンパクの組み合わせを以下に示す。

- ① RAGE と CD34
- ② AGE と CD34
- ③ S100 と CD34
- ④ CXCL12 と CD34
- ⑤ CXCL13 と CD34

- ⑥ CXCL16 と CD34
- ⑦ CX3CL1 と CD34
- ⑧ midkine と iNOS
- ⑨ midkine と VE-カドヘリン

#### (6) 蛍光二重免疫染色法

通法に従い、凍結切片を用いて蛍光二重免疫染色法を行った。すなわち、一次抗体として一方の標的タンパクは抗ヒトモノクローナル抗体を用い、他方の標的タンパクは抗ヒトポリクローナル抗体(免疫動物：ヤギ)を用いて、反応を行った。次いで、fluorescence isothiocyanate 標識抗マウス抗体と rhodamine isothiocyanate 標識抗ヤギ抗体を用いてそれぞれの標的タンパクの発現細胞を特定した。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて発現細胞の検索を行った。

なお、標的としたタンパクの組み合わせを以下に示す。

- ① RAGE と AGE
- ② RAGE と S100
- ③ midkine と CXCL12
- ④ midkine と CXCL13
- ⑤ midkine と CXCL16
- ⑥ midkine と CX3CL1

#### (7) 分子生物学的検索

根尖病巣組織における midkine、iNOS、VE-カドヘリン、RAGE およびケモカイン (CXCL12、CXCL13、CXCL16、CX3CL1) の遺伝子発現を定量的に検索した。すなわち、試料の凍結切片から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて相補的 DNA を合成した。次いで、SYBR Green、DNA ポリメラーゼと標的分子の特異的 PCR プライマーを加え、サーマルサイクラーを用いて real time PCR 法を行った。

なお、PCR 法の標準化を行うため、ヒトグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: G3PDH) の増幅を行ったのち、その増幅値に対する標的遺伝子の発現強度を算出した。

#### (8) 細胞培養

##### ① 歯周病原菌菌体内毒素の抽出

歯周病原菌として *Porphyromonas gingivalis* 381 株を使用した。通法に従い、温フェノール法により菌体内毒素 (lipopolysaccharide: LPS) を抽出した。

##### ② 供試細胞

ヒト T 細胞白血病由来細胞 (MOLT-4) とヒト臍帯静脈血由来血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVEC) を使用した。

##### ③ 細胞培養

MOLT-4 は *P. gingivalis* 由来 LPS で刺激し、HUVEC は *P. gingivalis* 由来 LPS とリコンビナントインターロイキン 1、インターロイキン 6 および腫瘍壊死因子で刺激した。

#### ④ 分子生物学的検索

*P. gingivalis* 由来 LPS で刺激した培養細胞から RNA を抽出し、相補的 DNA を合成したのちヒト midkine またはヒト CXCL13 特異的 PCR プライマーを用いて real time PCR 法を行った。

なお、PCR 法の標準化を行うため、G3PDH の増幅を行い、その値に対する標的遺伝子の発現強度を算出した。

#### (9) 統計分析

統計学的有意差の検定には、Mann Whitney U-test または ANOVA を用い、検定ソフトとして SPSS Ver10 を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 病理組織学的検索

#### ① 根尖病巣

歯内外科療法の際に摘出した根尖病巣組織 121 例を病理組織学的に検索したところ、109 例は多数の円形細胞浸潤と毛細血管に富む肉芽組織が観察され、歯根肉芽腫と病理診断した。また、12 例には重層扁平上皮を認め、肉芽組織中にコレステリン結晶を認めたため、歯根嚢胞と診断した。

#### ② 健常歯肉

完全埋伏智歯を抜去した際に得られた健常歯肉 10 例を病理組織学的に検索したところ、全ての組織で重層扁平上皮を認め、細胞浸潤および毛細血管の少ない結合組織を確認した。

### (2) 免疫組織化学的検索

組織の凍結切片を使用し、抗ヒト midkine、RAGE、AGE、S100 またはケモカイン (CXCL12、CXCL13、CXCL16、CX3CL1) 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、根尖病巣の血管内皮細胞から強い midkine 発現を認めた。また、midkine を発現した血管内皮細胞の周囲に、midkine を発現するマクロファージやリンパ球、好中球などが集積している傾向が認められた。

同様に RAGE、AGE、S100 またはケモカインも血管内皮細胞で発現されていることから、根尖性歯周炎局所では炎症の遷延と同時に炎症の修復機転が生じている可能性が示唆された。

### (3) 二重免疫染色法

標的タンパクの発現細胞を特定することを目的として二重免疫染色法を行った。

その結果、RAGE、AGE、S100 および 4 種のケモカインが CD34 陽性血管内皮細胞から発現されていることが確認された。しかし、血管内皮細胞による RAGE の発現率は AGE または S100 発現率よりも有意に高かった。なお、4 種のケモカインの発現率に有意差は認められなかった。

また、複数の標的分子の共発現を検索したところ、血管内皮細胞は midkine と iNOS を共発現しており、また midkine と VE-カドヘリンも共発現していることが確認された。すなわち、根尖性歯周炎局所では炎症の遷延と同時に炎症の修復機転が生じている可能性が確認された。また、血管内皮細胞が根尖性歯周炎における中心的な役割を担っている可能性が示唆された。

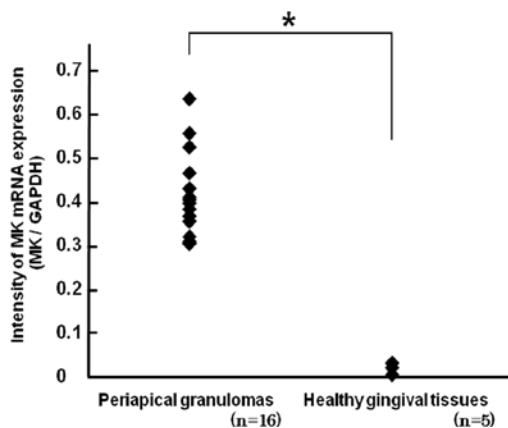
#### (4) 蛍光二重免疫染色法

複数の標的分子の共発現を検索する別の方法として、蛍光二重免疫染色法を行った。その結果、血管内皮細胞は RAGE の発現と同時に AGE と S100 も発現していた。しかし、RAGE と AGE の共発現率は RAGE と S100 の共発現率よりも有意に高かった。すなわち、RAGE と AGE が結合することにより、根尖性歯周炎の発症や遷延を惹起する可能性が示唆された。

midkine と 4 種のケモカインも血管内皮細胞で共発現していた。その発現率はさまざま、統計学的有意差を認めなかったが、midkine よりもケモカインの発現率の方が高い傾向にあった。

#### (5) 分子生物学的検索

midkine、iNOS、VE-カドヘリン、RAGE およびケモカイン (CXCL12、CXCL13、CXCL16、CX3CL1) の遺伝子発現を検索するため、real time PCR 法を行った。その結果、根尖病巣組織ではこれら全ての遺伝子発現が確認された。しかし、健康歯肉からは発現を認めないか、わずかに発現が確認される程度であった。



#### (6) 細胞培養

MOLT-4 を *P. gingivalis* 由来 LPS で刺激したところ、コントロールに比較して有意な midkine および CXCL13 遺伝子の発現が認められた。また、*P. gingivalis* 由来 LPS で刺激した HUVEC から高い midkine 発現が認められた。

以上の結果から、難治性根尖性歯周炎を惹起した病巣組織中の血管内皮細胞は、iNOS や RAGE を発現することで炎症の拡散に作用するが、同時に midkine が発現することにより、炎症の防御に作用することが示唆された。また、これらの免疫反応は根尖病巣組織中の血管内皮細胞が中心となり、炎症性細胞の遊走を制御と関連して行われている可能性が示唆された。

#### 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 1 件)

① Hatori K, Takeichi O, Ogiso B, Maeno M, Komiyama K (2011) Midkine expression in human periapical granulomas, *Journal of Endodontics*, 37, in press, (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

① Takeichi O, Hatori K, Ogiso B, Saito I (2010) RAGE-AGE interactions are important in periapical granulomas, 88th General Session and Exhibition of the IADR, July 14-17, Barcelona, Spain

② Hatori K, Takeichi O, Ogiso B (2010) Midkine is expressed in human periapical granulomas, 88th General Session and Exhibition of the IADR, July 14-17, Barcelona, Spain

③ 羽鳥啓介, 武市 収, 他 4 名 (2010) 歯根肉芽種における midkine 遺伝子発現, 第 132 回春季日本歯科保存学会, 6 月 4 - 5 日, 崇城大学市民ホール, 熊本市, 熊本県

④ 羽鳥啓介, 武市 収, 小木曾文内 (2010) 歯根肉芽種における midkine 発現とその機能的役割について, 第 62 回日本大学歯学会総会, 5 月 15 日, 日本大学歯学部, 千代田区, 東京都

⑤ 羽鳥啓介, 武市 収, 岩田桜子, 勝呂 尚, 小木曾文内 (2009) 歯根肉芽種中の血管内皮細胞による midkine 及び chemokine 発現, 第 131 回秋季日本歯科保存学会, 10

月 29 - 30 日、仙台国際センター、仙台市、  
宮城県

⑥ Takeichi O, Hama S, Fujisaki K,  
Tanabe N, Hayashi M, Ogiso B, Maeno M,  
Ochiai K (2008) Nitric oxide controls  
VE-cadherin-mediated vascular integrity  
in periapical granulomas, 86th General  
Session and Exhibition of the IADR, July  
3-5, Toronto, ON, Canada

⑦ Hayashi M, Ogata H, Suzuki N,  
Komori N, Takeichi O, Tamura K,  
Morisaki Y, Ogiso B, Fujita T (2008)  
Biocompatibility of novel vacuum  
sintered bodies of titanium medical  
apatite, 86th General Session and  
Exhibition of the IADR, July 3-5, Toronto,  
ON, Canada

[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

武市 収 (TAKEICHI OSAMU)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号 : 1 0 2 7 7 4 6 0

### (2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし