

機関番号： 11301
 研究種目： 研究活動スタート支援
 研究期間： 2009 ～ 2010
 課題番号： 21890020
 研究課題名(和文) 唾液中のメタロプロテアーゼによる歯周疾患と心臓血管疾患のリスクファクターの評価
 研究課題名(英文) The evaluation of salivary MMPs expression in periodontitis patients as a maker of cardiovascular disease

研究代表者

細川 亮一 (HOSOKAWA RYOICHI)
 東北大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：40547254

研究成果の概要(和文)：本研究では、唾液中に含まれる MMPs の発現について歯周病患者と心臓疾患関連患者との間で量的相関関係を検索した。唾液中の MMP-8 の発現は、健常者と歯周病患者とで有為に発現量が増加していることが示された。しかしながら、心臓疾患関連患者と歯周病単独の患者の間では発現量の間に変化は認められなかった。また、それ以外の MMP-2,-9 についても発現量に有為な変化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：I evaluated salivary MMPs expression in periodontitis patients and cardiovascular disease patients to reveal the correlation between two diseases. MMP-8 expression level in periodontitis patient was higher than that of control. However, there was no significance difference between periodontitis patients and cardiovascular disease patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,050,000	315,000	1,365,000
22年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：歯学、口腔ケア、歯周疾患

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患とメタボリック症候群との関わりが、近年の研究によって明らかになりつつある。特に、歯周病と糖尿病の重篤度の相関関係は統計的研究で明らかになっている(J. Int. Acad. Periodontol 3,104-111)。また、歯周病治療の結果、糖尿病患者の血糖値が低下することが報告されている(J. Periodontol 68,843-848; J Periodontol 72,774-778)。歯

周疾患と心臓血管疾患との相関関係が、喪失歯の数、プラークに含まれる細菌種などから多く報告されている(J. Dent. Res. 75,1631-1636; Ann. Periodontol. 3, 339-349; J Am. Dent. Assoc. 129,301-311)。歯周組織また、心臓血管疾患の病変部で MMP(Metalloproteinase)の発現が有意に増加していることが報告されている(Ann. Med. 38,306-321; Atherosclerosis 170,269-276;)

Circulation 106,3024-3030)。また、トランスジェニック マウスを用いた研究から MMPs が心臓血管疾患発症に重要な役割を示していることが明らかになった(J. Biol. Chem. 284,1765-1771; Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. 29;27-32)。

ヒトでは 22 種の MMP(Metalloproteinase)が報告されており、癌転移、炎症の拡大や創傷治癒機序に関与していることが知られている。(Cell 103, 481-490)。MMP の主要な役割は、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分解であり、特に上皮内癌の癌細胞の間葉組織への転移に関係している(J. Biol. Chem. 276, 22341-22350)。また、心臓血管疾患患者のバイパス手術後に病変部プラークを精査したところ、MMP-1, -2, -3, -8, -9 の発現が認められた(Atherosclerosis 170,269-275)。更に、歯周病の進行過程において、MMP-1, -2, -9, -8, -13 が線維芽細胞ならびに好中球から分泌され、骨組織を破壊することが報告されている。(J. Periodontol. 75,283-291 ; J. Periodontol. 79,1592-1600)。このように、歯周疾患と心臓血管疾患は病状の進行に対して、共通の因子として MMPs が検出される。また、癌や心臓血管疾患治療薬として、MMP の活性を抑制する MMPi (Metalloproteinase inhibitor)が注目を集めてきたが、実際に臨床応用されたものは、歯周病治療薬としての Subantimicrobial-dose doxycycline (SDD)商品名 Periostat のみである。

全身疾患診断のための唾液の有効性が報告されている。その理由として血中に存在するタンパク質や内分泌ホルモンが唾液中に含まれている (J. Proteome. Res. 7,1994-2006; J. Clin. Endocrinol. Metab. 3741-3748)。よって、唾液成分を調べることによって様々な病因因子を検出することが可能となってきている。その一つとして癌マーカーの検出による早期癌の発見に関する研究が行われている (Clin. Cancer. Res. 14,6246-6256)。特に膵臓癌といった早期発見が難しい臓器について、日常の歯科医院受診時の唾液採取といった簡便な方法によって癌の早期発見の可能性が示され、診査法の確立が期待されている。また、採血と異なり唾液の採取は痛みを伴わないことも特記すべき点である。

2. 研究の目的

以上の背景から唾液を用いたメタボリック症候群のスクリーニングが簡便に行うことが出来れば、慢性疾患の早期発見ならびに症状増悪の抑制の可能性が大きくなると期待されている。

歯周疾患の成人における罹患率は 80%

以上であり、多くの成人が歯科医院を受診する可能性が高い。また、高齢者では喪失歯が増大するため、義歯の作成並びにその義歯の調整のため、同様に歯科医院を受診することが多い。また、歯周病は健康寿命の更なる延長、生活の質の向上を実現し、明るい高齢者社会を築く為の推進運動である「健康日本 21」の九つの項目の一つである。九つの項目は、生活習慣に起因する 1) 栄養、食生活、2) 身体活動・運動、3) 休養・こころの健康づくり、4) 禁煙、5) 歯科、6) アルコール、7) 糖尿病、8) 循環器疾患、9) がんの九つである。健康増進の観点から各自治体における健診事業に歯科の項目、特に歯周疾患に関する健診事業が取り入れられている。これらの健診事業においての唾液の採取を行うことが可能となれば、簡便で大規模なメタボリック症候群に対するスクリーニングを行うことが可能となることを示唆している。また、唾液の採取は採血と異なり痛みを伴うこともなく気軽に行うことが出来るこのようなことから、唾液によるメタボリック症候群のスクリーニング検査の手法を確立することによって、医療期間にアクセスしにくい遠隔地においても歯科医院を受診した際もしくは、地域行政における住民健診において気軽にスクリーニングを行うことが可能となる。そこで本研究の目的は、唾液を検体としたメタボリックシンドロームのスクリーニング法の確立とメタボリック症候群患者での罹患率の高い心臓血管疾患 (Cardiovascular disease, CVD) と同様に成人において罹患率の高い歯周疾患罹の相関関係を明らかにし、歯周疾患から心臓血管疾患を引き起こす機序の検索を行うことである。

近年、誤嚥性肺炎や心臓血管疾患が口腔内細菌に起因することが科学的に証明されており、口腔内衛生状態とこれらの疾患との関連性について多くの研究がなされ、関連性が証明されている。また、口腔衛生状態状態の改善のため、介護施設を初めとした多くの福祉施設や医療機関において、口腔ケアの取り組みが充実してきている。そこで、本研究のもう一つの目的は、口腔ケアを行った際のその効果を評価法として MMPs をマーカーとする唾液検査法の有効性について検索を行う。

3. 研究の方法

(1) 採取法についての検討

唾液の採取法としては、二つの方法を考えた。口腔内に存在する唾液の採取 (混合唾液) と唾液腺開口部から採取 (純唾液) とがあり、それぞれの唾液中に含まれる MMPs (歯周疾患と心臓疾患に共通の MMP-2,-3,-8,-9,-13) の含有量について濃度の測定を行い、それぞ

れの採取法を比較し、今後の実験に使う採取法を検討する。

唾液採取は、安静時唾液を採取するためロールワッテを口腔底に5分間留置しておくワッテ法とガムを5分間噛んでもらい、口腔内の唾液をコニカルチューブに唾棄してもらう方法とで、安静時唾液と刺激唾液の療法についても比較検討を行った。

(2) 採取後の検体の保存法の比較検討 スクリーニングの方法としてこれらの検査を確立するため、唾液採取直後と採取後氷上で2時間保存し、その後研究室の-20℃の冷凍庫にて一週間冷凍保存したサンプルについて、タンパク質の検出感度について比較検討を行い、今後の実験に使用するサンプルについて保存可能かどうかについて検討を行った。

(3) 唾液中の MMP の含有量とその活性の程度について検討を行う。

① ウェスタン ブロット法を用いてタンパク質の唾液中への含有を確認する。

TNE buffer (50mM Tris (pH 7.5) 140 mM NaCl 5mM EDTA) にて唾液中よりタンパク質を抽出し、BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) と Varioskan (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) を用いてプロテイン アッセイを行い 20 µg のタンパク質を調整し電気泳動を行った。電気泳動にはミニプロティアン Tetra セル (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) を用いた。一次抗体として MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いてその発現を確認した。ポジティブ コントロールとして GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いて定量性を持たせ、画像を PhotoshopCS4 (Adobe System Incorporated, San Jose, CA) のピクセル数でカウントすることによって定量をおこなった。

②ゼラチン ザイモグラフィー
ゼラチン ザイモグラフィーを用いて MMP-2 と MMP-9 の活性型、非活性型について検索を行った。ゲルは、10%ポリアミデゲル中に 1 mg/ml となるようにゼラチンを溶解させ、電気泳動後、活性化溶液 (50 mM Tris Ph8.0, 0.5 mM CaCl, 10M ZnCl) にてゼラチナーゼを活性化させ、クマシーブルー (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) を用いて染色を行い、ゲルをデジタルカメラで撮影後、ウェスタンブロッティングと同様 PhotoshopCS4 を用いて定量を行った。

4. 研究成果

(1) 採取法の検討

先ず、歯周ポケット 2mm 以下の 20 代の成人男性について、前日の晩ご飯から絶食をし、朝九時から唾液の採取をおこなった。採取した唾液から BCA Protein Assay kit にて定量を行った。混合唾液と純唾液とでは、混合唾液の方がより多くのタンパク質を抽出できた。両週出サンプルにおける MMP-2, -8, -9, -13 の発現を比較したところ、今後の実験に検索可能な量であるかという観点から比較したところ、混合刺激唾液でもウェスタンブロッティングで検出可能な量を得られることが分かった。これより採取法が簡便ということもあり、今後の実験は混合刺激唾液を用いて行うこととした。また、ザイモグラフィーによる MMP-2 と MMP-9 の活性化についても、混合唾液を用いることとした。また、健康男性では、十分な安静時唾液が採取出来るため、安静時唾液を採取することが可能で、安静時唾液と刺激唾液における含有タンパク質に関する比較検討は可能であったが、歯周疾患に罹患群においては、十分な安静時唾液を採取出来ないものもいた為、今後の実験においては刺激唾液を使用することとした。

(2) 保存法の比較

採取直後の唾液と採取直後に液体窒素で冷却し-20℃で一週間保存した唾液とで、タンパク量について比較検討を行ったところ、-20℃で保存したサンプルからも、必要量のタンパク質を検出することが出来たため、今後の実験は、-20℃で保存した唾液を使用することとした。

(3) 健常者と歯周病患者 (歯周ポケット 4 mm 以上を有する男性間での MMPs の発現について

MMP-8 の発現については、歯周病患者において増加が認められた。これは、以前から報告されていた実験と同様の結果であり、私の手技に問題が無いと思われる。また、MMP-2 と MMP-9 については、発現量は歯周病罹患患者群において若干の増加傾向が認められた。また、ザイモグラフィーで確認した MMP-2, MMP-9 の活性型の割合 (活性型/非活性型) には、歯周病罹患患者群では、今回の実験では大きな変化を認められなかった。

(4) 歯周病罹患患者と心疾患罹患患者群との比較

最初の予備実験を行う際に、心疾患罹患患者で歯周病に罹患していない患者を探してみたが、心疾患を罹患している患者で歯周病を罹患していない患者がいなかったため、心

疾患罹患群は、全て歯周病を併発していた。そのこともある為、歯周病のみ罹患患者群と心疾患罹患群との間に、MMPs の発現について有為な差を認めることが出来なかった。今後は、被験者数を増やして、純粋な心疾患罹患罹患間患者の検索を行うこと。また、歯周病患者の長期の調査を行うことで心疾患罹患のリスクを評価していく必要性が示唆された。

(5) 口腔ケアの評価における MMPs のマーカーの有効性について
長期患者にける検索を行っていないため、有効性についての結論を得ることが出来なかったが、軽度の歯肉炎を有する被験者に対するプレリミナリーな実験では、PMTC などの専門的口腔ケアの介入を行って一ヶ月後の MMPs の唾液中の量的な変化は認められなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

細川 亮一 (Ryoichi Hosokawa)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 4 0 5 4 7 2 5 4

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :