

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792104

研究課題名（和文）宿主-細菌インターフェイスにおける歯周炎発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of developing the periodontitis at the host-parasite interface

研究代表者

真柳 弦 (MAYANAGI GEN)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：10451600

研究成果の概要（和文）：歯周治療を開始する患者の歯肉縁下プラークおよび歯肉を分析した結果、歯周ポケットが深いほど嫌気性菌量と炎症性サイトカイン発現量が増加することが明らかとなった。本研究によって、歯周病患者の初期治療時における歯周病の病態を細菌学的、免疫学的に複眼的視点から捉えることが可能となった。今後、これらの指標をプロファイリングすることで、歯周病患者により効果的な歯周治療を提供できるようになると考える。

研究成果の概要（英文）：Analyzing the subgingival plaque and the gingival tissues samples, it was elucidated that the deeper the periodontal pocket the patient has, the larger the amounts of the anaerobic bacteria and the inflammatory cytokines were detected. It is possible to evaluate the profiles of the clinical conditions of periodontitis in the initial preparation stage from the views of microbiology and immunology. In the future, we will be able to provide the effective treatment for the periodontitis patient by profiling the amounts of the anaerobic bacteria and the inflammatory cytokines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：細菌学、免疫学、遺伝学、歯周病学

1. 研究開始当初の背景

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行われてきたが、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。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。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と考えられる。さらに、その細菌叢が実際何をしているかを探る、すなわち細菌が代謝して得られる代謝産物や代謝中間体の中から、歯周病原性を発揮する要素とその機構を追求することも必要であると考えられる。

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や生物活性、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 について臨床サンプルの解析を行い、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、本研究を行なうこととした。

2. 研究の目的

歯周病の病態は、口腔内の宿主 - 細菌インターフェイスにおける細菌叢と病巣局所に

誘導される免疫応答の質・大きさの相互作用により決定される。さらに患者個人の遺伝的素因が影響を及ぼすとも考えられている。従って、歯周病の病態を解明するためにはこれらの因子を単独で検討するだけではなく、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。本研究ではこれらの因子を全て考慮し、複眼的視点から歯周病の発症・進展メカニズムの解明を目指し、歯科臨床に直結・貢献する診断法や治療法へと応用することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、歯周治療を開始する患者から臨床試料 (歯肉縁下プラーク、歯肉、末梢血) を採取し、以下の (1) ~ (3) を行った。

(1) 細菌学的パラメーターとして、real time PCR 法を用いた歯肉縁下プラーク中の特定の歯周病原性細菌種の定量的検出、ならびに CE-TOFMS を用いたプラークの代謝活性や各種酵素活性、菌体成分などの分析、

(2) 免疫学的パラメーターとして RT-real time PCR 法を用いた歯周病巣歯肉中のサイトカインプロファイルの解析、

(3) 遺伝学的パラメーターとして、PCR-RFLP 法により (2) で検討したサイトカインのうち genotype が存在することが報告されているものについて種々のサイトカイン遺伝子の genotype を決定した。

その後、臨床試料より得られた (1) ~ (3) の患者個々のパラメーターと、採取部位の臨床病態の関連性を比較・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

東北大学病院歯周病科を受診し、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臨床試料を得た。歯肉縁下プラークおよび歯肉は、初期治療のスケーリング・ルートプレーニング時

(TBI、歯肉縁上スケーリング終了後) に、歯肉縁下プラークは滅菌ペーパーポイントを用いて、歯肉はポケット底部を搔爬し、採取した。さらに、このとき個々の患者の 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。なお、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。

② 歯肉縁下プラーク中の歯周病関連性細菌種の定量的検出と歯周病原性の解明

歯肉縁下プラークから genomic DNA を抽出し、特定の歯周病原性細菌に対する特異的

ライマーを用いた real time PCR を行うことで、各細菌種を定量的に検出した。さらに、CE-TOFMS によるメタボローム解析を確立し、細菌およびプラーク全体から得られる代謝産物及び代謝中間体を網羅的に解析した。

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及び 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（歯周ポケット深さ、歯槽骨吸収の程度など）と細菌学的、免疫学的、遺伝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

東北大学病院歯周病科を受診し、歯周治療を開始する患者からインフォームドコンセントを得た後、臨床資料（X線写真、口腔内マクロ写真、歯周ポケット測定）および研究試料（歯肉縁下プラーク、歯肉、末梢血）の収集を行った。

歯肉縁下プラークから genomic DNA を抽出し、歯周病原性細菌特異的なプライマーを用いた real time PCR を行い、歯周病関連性細菌種の定量的に検出した結果、歯周炎患者の歯肉縁下プラークからは、*P. gingivalis* などの種々の嫌気性菌が検出された。さらに、CE-TOFMS を用いた細菌およびプラーク全体から得られる代謝産物及び代謝中間体を網羅的に評価するメタボローム解析を確立した。この解析法は、今後、歯周病原性を発揮する要素とその機構を追求する際に有用であると考えられる。

また、歯肉試料から抽出した mRNA を RT-PCR した後、real time PCR 法により、炎症性サイトカイン（IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α など）、抗炎症性サイトカイン（IL-10 など）及び調節性サイトカイン（IL-4、IL-12、IFN- γ など）の mRNA 発現を定量的に検出し、歯周病巣歯肉中のサイトカインプロファイルの定量解析を行った。その結果、炎症性サイト

カイン（IL-1 α 、IL-1 β ）の検出率が高く、調節性サイトカイン（IL-4、IFN- γ ）の検出率が低い傾向がみられた。

さらに、臨床病態の主な指標の1つである歯周ポケット深さとの関連性の検討を行なったところ、歯周ポケットが深くなるにつれて嫌気性菌の量と炎症性サイトカインの発現量が増加することが明らかとなった。

本研究により、歯周病患者の初期治療時における歯周病の病態を細菌学的、免疫学的に複眼的視点から捉えることが可能となった。今後、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などに本手法を活用し、日常臨床にフィードバックすることが可能となると考える。

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7件）

- ① Takahashi N, Washo J, Mayanagi G
Metabolomic approach to oral biofilm characterization -A future direction to biofilm research-, Journal of Oral Biosciences, 査読有, 54 巻, 2012 年, 138-143,
DOI: 10.1016/j.job.2012.02.005
- ② Ma S, Imazato S, Chen J-H, Mayanagi G, Takahashi N, Ishimoto T, Nakano T, Effects of a coating resin containing S-PRG filler to prevent demineralization of root surfaces, Dental Materials Journal, 査読有, 31 巻, 2012 年, 909-915, DOI: 10.4012/dmj.2012-061
- ③ Ito Y, Sato T, Yamaki K, Mayanagi G, Hashimoto K, Shimauchi H, Takahashi N, Microflora profiling of infected root canal before and after treatment using culture-independent methods, The Journal of Microbiology, 査読有, 50 巻, 2012 年, 58-62, DOI: 10.1007/s12275-012-0459-4
- ④ Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N, Evaluation of pH at the bacteria-dental cement interface, Journal of Dental Research, 査読有, 90 巻, 2011 年, 1446-1450, DOI: 10.1177/0022034511423392
- ⑤ Takahashi N, Washio J, Mayanagi G, Metabolomics of supragingival plaque and oral bacteria, Journal of Dental Research, 査読有, 89 巻, 2010 年, 1383-1388, DOI: 10.1177/0022034510377792

- ⑥Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N, Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR, *Journal of Periodontal Research*, 査読有, 45 巻, 2010 年, 389-395, DOI: 10.1111/j.1600-0765.2009.01250.x.
- ⑦Washio J, Mayanagi G, Takahashi N, New Strategy of Study for Oral Microbiology! Challenge to Metabolomics of Oral Biofilm –From “What Are They” to “What Are They Doing?” –, *Journal of Oral Biosciences*, 査読有, 52 巻, 2010 年, 225-232, DOI: 10.1016/S1349-0079(10)80025-8

[学会発表] (計 14 件)

- ①Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Takahashi N, Stephan curve and tooth surface solubility at tooth-bacteria interface, The 91th International Association for Dental Research (IADR), 2013 年3月23日, Washington State Convention Center, Seattle, WA, USA
- ②Fukushima A, Mayanagi G, Nakajo K, Sasaki K, Takahashi N, The biocorrosion behavior of titanium under artificial biofilm, The 91th International Association for Dental Research (IADR), 2013年3月21日, Washington State Convention Center, Seattle, WA, USA
- ③福島梓、真柳弦、中條和子、佐々木啓一、高橋信博、*S. mutans*人工バイオフィルムによるチタンの生物学的腐食、第5回口腔環境制御研究カテゴリー集会、2013年2月1日、長崎大学
- ④Ma S, Imazato S, Chen J-H, Mayanagi G, Takahashi N, Ishimoto T, Nakano T, Effects of a coating resin containing S-PRG filler to prevent demineralization of root surfaces, 日中歯科医学大会 2012、2012 年 4 月 27 日、四川大学華西口腔医学院、中国
- ⑤高橋信博、真柳弦、中條和子、鷺尾純平、佐藤拓一、竹内裕尚、佐久間陽子、松尾洋、末永華子、鈴木治、佐々木啓一、バイオマテリアル-パラサイト・インターフェイスへの挑戦-バイオマテリアルの生物学的劣化の理解へー、九州大学応用力学研究所平成23年度共同利用研究集会「力学適応能、自己組織化能を有するバイオマテリアル-生体インターフェイスの創製」、2012年3月2日、九州大学
- ⑥鷺尾純平、小川珠生、真柳弦、高橋信博、CE-TOFMS を用いた口腔プラークバイオフィルムの糖代謝メタボローム解析～フッ化物やキシリトールによる影響を *in vivo* で探る～、キャピラリー電気泳動シンポジウム、2011 年 11 月 10 日、鶴岡
- ⑦真柳弦、五十嵐公英、鷺尾純平、中條和子、土門-俵谷ひと美、高橋信博、イオン感受性電界効果型トランジスタ微小 pH 電極による細菌-歯科修復材料・インターフェイス pH 測定、粉体粉末冶金協会 平成 23 年度秋季大会 (第 108 回講演大会)、2011 年 10 月 28 日、大阪大学
- ⑧Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N, Evaluation of pH at the bacteria-restorative material interface, 第 59 回 JADR 学術大会、2011 年 10 月 8 日、広島
- ⑨Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N, Evaluation of pH using an ISFET at the interface between bacteria and restorative materials, The 6th International Workshop on Nano-, Bio- and Amorphous Materials, 2011 年 8 月 9 日、遠刈田
- ⑩Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N, Evaluation of pH at the interface between bacteria and restorative materials, The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2011 年 3 月 8 日、仙台
- ⑪Washio J, Mayanagi G, Takahashi N, Metabolome analysis of oral plaque biofilm using CE-TOFMS, The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2011 年 3 月 8 日、仙台
- ⑫鷺尾純平、真柳弦、高橋信博、プラークバイオフィルムのメタボローム解析 -糖代謝からアミノ酸代謝まで-、第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010 年 9 月 21 日、船堀
- ⑬Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N, Evaluation of pH using an ISFET at the parasite-biomaterial interface, The 5th International Workshop on Nano, Bio and Amorphous Materials, 2010 年 8 月 10 日、遠刈田

⑭ Washio J, Mayanagi G, Sakurada K, Sato K, Katsuda Y, Tsuji N, Hata T, Takahashi N, Metabolome analysis of glucose fermentation by dental plaque using CE-TOFMS, The 88th International Association for Dental Research, 2010年7月16日、Barcelona, Spain

[図書] (計3件)

① Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N, Springer 社, Evaluation of pH at the interface between bacteria and restorative materials, In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) Interface Oral Health Science 2011, 2012年, 192-194

② Washio J, Mayanagi G, Takahashi N, Springer 社, Metabolome analysis of oral plaque biofilm using CE-TOFMS, In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) Interface Oral Health Science 2011, 2012年, 218-220

③ Takahashi N, Washio J, Mayanagi G, Springer 社, Metabolomic approach to oral microbiota, In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) Interface Oral Health Science 2011, 2012年, 334-340

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真柳 弦 (MAYANAGI GEN)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：10451600