

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592786

研究課題名(和文)慢性歯周炎進展機序におけるT細胞浸潤の解明 - 骨免疫の解明 -

研究課題名(英文)The mechanism of T cell invasion in chronic periodontitis

研究代表者

合田 征司 (GODA, Seiji)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70351476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：慢性歯周炎進展機序におけるT細胞浸潤とSTATとの関係を解明するために実験を行った。T細胞においてCXCL12刺激によりI型コラーゲンへの細胞浸潤が増強した。STATノックダウンT細胞においてはCXCL12刺激によるI型コラーゲンへの浸潤の増強は認めなかった。CXCL12刺激によりSTATのリン酸化が増強した。STATはCXCL12刺激によりI型コラーゲンへの細胞浸潤に関与する事が示唆された。さらに共焦点レーザー顕微鏡にてCXCL12刺激によるSTATの局在は核に移行する事を観察した。CXCL12刺激によりSTATは細胞質から核の移動しMMPsの産生に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：T cells play a key role in inflammation through their ability to migrate into connective tissues. CXCL12 is one of the chemokines that promote leukocytes invasion and migration into tissues, while the exact molecular mechanisms are not clear at present. In this study, we showed that CXCL12 significantly enhances CD4+human jurkat T cells invasion into type I collagen by the catalytic activity of MMP-1. siRNA STAT blocked CXCL12 enhanced invasion into type I collagen on jurkat T cells. STAT localized in nuclear in CXCL12 stimulated jurkat T cells. We suggest that STAT regulated the production of MMPs and invasion into type I collagen on T cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：T細胞 ケモカイン I型コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

現在、歯科保健の分野では、高齢者においても歯の喪失が10歯以下であれば食生活に大きな支障を生じないとの研究に基づき、生涯にわたり自分の歯を20歯以上保つことにより健全な咀嚼能力を維持し、健やかで楽しい生活を送るという8020運動が提唱・推進されている。現実には55~64歳で歯周炎の有病者率が82.5%となるなど、歯周疾患の有病状況は他の疾患に類を見ないほど高率を示している。また、咀嚼能力に直接的な影響を与える歯の喪失状況についても、60歳代で半分(14歯)の歯を失い、80歳代では約半数の人がすべての歯を喪失している。口腔領域の生活習慣病と位置づけられる歯周炎は、長く局所感染症として認識されてきたが、近年高感度CRP陽性、高フィブリノーゲン血症、IL-2、IL-6やTNF-などの炎症性サイトカインが局所だけにとどまらず全身的にも上昇すること、さらに生活習慣病である糖尿病、骨粗鬆症や動脈硬化に伴う虚血性心疾患との関連も報告されていることから、歯周疾患は国民の保健上、大きな課題となっている。

慢性歯周炎の発生機序において、T細胞が重要な役割を担っている。線維芽細胞などから産生された炎症性サイトカインによりインテグリンなどの接着分子が活性化されたT細胞は、血管内皮細胞と接着、血管外へと遊走し、慢性歯周炎局所へと浸潤する。さらに、T細胞が発現する破骨細胞誘導因子であるRANKLが破骨前駆細胞の破骨細胞分化を促し、骨破壊を伴う炎症病態に関与していると考えられている。以上のことより、炎症発症機序におけるT細胞の遊走と組織浸潤機序を解明することで、慢性歯周炎の進展機序が明らかになる。我々は、慢性歯周炎組織に発現している炎症性ケモカインCX3CL(Fractalkine)とマクロファージ、T細胞およびNK細胞と細胞外マトリックスとの接着機構を報告した。また、細胞接着と遊走を担う1-インテグリンの活性化にチロシンキナーゼであるZAP-70が関与している事や歯周炎組織に見られる炎症性ケモカインCXCL12刺激によりリンパ細胞はマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-1)を産生し、産生されたMMP-1は活性化1-インテグリンと結合し活性化され、I型コラーゲンを分解し、組織浸潤に関与することを報告した。さらに、MMPsが骨リモデリング促進に関与する事も明らかにした。しかし、歯周炎組織におけるリンパ球が破骨細胞の分化に関与しているかは明らかでない。そこで、骨免疫の機序を解明することにより、歯周炎発症に関与するリンパ球の選択的な浸潤や活性化を制御し、慢性歯周炎の治療に役立てたいと考える。

2. 研究の目的

炎症の発生機序において、T細胞などの免

疫細胞は、重要な役割を担っている。免疫細胞は、ケモカインやサイトカインなどにより活性化されたインテグリンなどの接着分子の影響により血管から遊走し、炎症組織への浸潤が進む。慢性歯周炎局所では、免疫細胞が発現するRANKL、IL-1やTNF-などにより破骨細胞の分化が促され、骨破壊を伴う炎症病態に進行する。T細胞などの免疫細胞の慢性歯周炎組織への浸潤機序の解析を進め、組織破壊や骨破壊を伴う慢性歯周炎の効率の良い安全な治療法の現実化と骨免疫の解明を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) STAT knock down T細胞の作製とCXCL12刺激によるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)産生能の検討：STAT knock down T細胞を作製する。その細胞を24時間CXCL12刺激し、培養上清を回収後、Microconを用いて5倍に濃縮する。その上清をタンパク質分離泳動装置とパワーサプライを用いてMMPを検出する。

(2) STAT ノックダウン T細胞のCXCL12刺激によるI型コラーゲンゲル浸潤の影響と分解能の検討：I型コラーゲンゲルに、S.down1,2,3細胞を播種した後、I型コラーゲンゲルを浸潤した細胞を計測する。I型DQコラーゲンに、遺伝子導入した細胞を播種後、共焦点レーザー顕微鏡にて分解されたI型コラーゲン像(Fluorescence)、微分干渉像(DIC)、2つを重ね合わせた像(Merge)を観察する。

(3) STAT ノックダウン T細胞のCXCL12刺激による細胞内タンパク質のチロシンリン酸化状態の検討とSTAT結合細胞内シグナル伝達物質の同定：Jurkat細胞、S.down1,2,3細胞をCXCL12で刺激後、可溶化し、western blotting法により細胞内タンパク質のチロシンリン酸化状態を検出する。得られた可溶性タンパク質の免疫沈降を行い、JAKとSTATのリン酸化状態を検出する。

(4) STAT ノックダウン T細胞のCXCL12刺激によるERKの細胞内局在の検討：Jurkat細胞、S.down1,2,3細胞をCXCL12で刺激後、ERKの局在を観察する。

(5) SHIP ノックダウン T細胞のCXCL12刺激によるMMP産生能の検討およびI型コラーゲンゲル浸潤の影響を検討：プラズミドpcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR STAT細胞を作製する。その細胞をCXCL12刺激し、Western blotting法によりMMPを検出する。I型コラーゲンゲルに遺伝子導入した細胞を播種後、浸潤した細胞を計測する。

慢性歯周炎組織に発現が見られる炎症性ケモカインCXCL12(SDF-1)刺激によるT

細胞の慢性歯周炎症組織浸潤機序、STAT との関係について解明する。

4. 研究成果

本研究では、慢性歯周炎症組織に発現がみられる炎症性ケモカイン CXCL12(SDF-1)刺激によるT細胞の慢性歯周炎症組織浸潤機序についての解明を進め、特に、その機序におけるSTAT との関係について解明するために実験を行った。

T細胞においてCXCL12刺激によりI型コラーゲンへの細胞浸潤が増強した。STAT ノックダウンT細胞においてはCXCL12刺激によるI型コラーゲンへの浸潤の増強は認めなかった。CXCL12刺激によりSTAT のリン酸化が増強した。密度勾配遠心分離法にてCXCL12刺激により核内におけるSTAT2のタンパク質増加を確認した。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いT細胞におけるCXCL12刺激によるSTATの局在は核に移行することを観察した。CXCL12刺激によりSTATは細胞質から核の移動しMMPsの産生に関与し、I型コラーゲンを分解し浸潤する可能性が示唆された。以上の結果からT細胞は、炎症性サイトカインであるCXCL12などの刺激により組織浸潤する機序には、CXCL12刺激により活性化したSTATが核に移行しMMPsのタンパク質合成を促し、産生されたMMPsが組織を分解し、細胞浸潤に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

竹内 撰, 合田征司, 吉川一志, 堂前英資, 池尾 隆, 山本一世. ヒト歯髓由来線維芽細胞におけるIL-1刺激によるMMP-3産生の影響. 日本歯科保存学雑誌, 査読有, 57巻, 2014, 1-8.

Komasa R, Goda S, Yoshikawa K, Ikeo T, Yamamoto K. Effects of Rac1 on the production of MMP-3 by TNF-. 日本歯科保存学雑誌, 査読有, 56巻, 2013, 544-550.

Goda S, Inoue H, Domae E, Kagawa M, Hosoyama Y, Matsumoto N, Nishiyama Y, Ikeo T. Matrix metalloproteinase-1 produced by human CXCL8-activated NK cells. J Oral Tissue Engin, 査読有, 11巻, 2013, 163-171.

Hayashi H, Ujii Y, Goda S, Matsumoto N. Effect of VCAM-1 on the differentiation into osteoclast. J Oral Tissue Engin, 査読有, 11巻, 2013, 154-162.

Kato Y, Goda S, Ikeo T, Hayashi H. Effects on JNK on the production of MMP-3 by interleukin-1beta-stimulated human dental pulp fibroblast like cells. 日本

歯科保存学雑誌, 査読有, 56巻, 2013, 48-54.

Ujii Y, Goda S, Matsumoto N. Effect of p38 MAP kinase on the production of MMP-1 in human gingival fibroblast-like cells. Orthodontic Waves, 査読有, 71巻, 2012, 26-30.
DOI:10.1016/j.odw.2011.11.002

Kawasaki T, Goda S, Matsumoto N. Effect of Akt on the differentiation into osteoclasts caused by RANKL stimulation. J Oral Tissue Engin, 査読有, 10巻, 2012, 67-76.

Tamura I, Kamada A, Goda S, Yoshikawa Y, Domae E, Ikeo T. Insulin-like growth factor-II promotes proliferation of human periodontal ligament fibroblasts via expression of early growth response transcription factors. J Oral Tissue Engin, 査読有, 10巻, 2012, 13-20.

Domae E, Ogawa Y, Takeuchi O, Ujii Y, Kato Y, Kawasaki T, Hayashi H, Komasa R, Domae N, Goda S, Ikeo T. The Effect of lysenin on the differentiation into osteoclast cells. J Oral Tissue Engin, 査読有, 9巻, 2011, 3-9.

Tanaka Y, Takeuchi O, Goda S, Yoshikawa K, Yamamoto K. Effect of GaAlAs semiconductor laser irradiation on the permeability of dentin and survival of dental pulp cells. J Osaka Dent Univ, 査読有, 45巻, 2011, 7-16.

〔学会発表〕(計37件)

小正玲子, 合田征司, 吉川一志, 竹内 撰, 堂前英資, 三木秀治, 小正紀子, 池尾 隆, 山本一世. ヒト歯髓由来線維芽細胞におけるMMP-3産生に及ぼすsmall G proteinの影響. 第139回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2013.10.17. 秋田県総合生活文化会館(アトリオン)(秋田市).

氏井庸介, 合田征司, 堂前英資, 川崎俊也, 林 寛, 香川真貴子, 細山有規子, 池尾 隆, 松本尚之. ヒト歯肉由来線維芽細胞のTIMP-1産生に及ぼすp38MAP kinaseの影響. 第72回日本矯正歯科学会大会. 2013.10.8-9. キッセイ文化ホール(松本市).

林 寛, 氏井庸介, 合田征司, 松本尚之. 破骨細胞分化に及ぼすVCAM-1の影響. 第72回日本矯正歯科学会大会. 2013.10.8-9. キッセイ文化ホール(松本市).

香川真貴子,川崎俊也,氏井庸介,林 寛,
細山有規子,合田征司,池尾 隆,松本尚之.
Protein Kinase B の RANKL 刺激による破骨細胞
分化に及ぼす影響. 第 72 回日本矯正歯科
学会大会. 2013.10.8-9. キッセイ文化ホー
ル(松本市).

Yoshikawa Y, Domae E, Goda S, Tamura
I, Kamada A, Ikeo T. Small Interfering RNA
Targeting Smad1 suppresses osteoclast
differentiation. American Society for
Bone and Mineral Research 2013 Annual
Meeting. 2013.10.6 Baltimore, MD,USA.

小正玲子,合田征司,吉川一志,池尾 隆,
山本一世. Effects of Rac1 on the
production of MMP-3 by TNF-. 第 55 回日
本歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013.9.
22.岡山コンベンションセンター(岡山市).

林 寛,氏井庸介,合田征司,池尾 隆,
松本尚之. Effect of VCAM-1 on the
osteoclast differentiation in RAW264.7
cells. 第 55 回日本歯科基礎医学会学術大
会・総会. 2013.9.22.岡山コンベンシ
ョンセンター(岡山市).

井上 博,堂前英資,合田征司,内橋賢二,
西川泰央. RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に及
ぼす IL-17A の影響. J Oral Biosci Suppl
2013:208. 第 55 回日本歯科基礎医学会学術
大会・総会. 2013.9.22.岡山コンベンシ
ョンセンター(岡山市).

小正玲子,竹内 撰,合田征司,堂前英資,
谷本啓彰,三木修治,野村雄司,池尾 隆,
山本一世. ヒト歯髓由来線維芽細胞における
MMPs 産生におよぼす small G protein の影響.
日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会(第
138 回). 2013.6.28.福岡国際会議場(福岡
市).

合田征司,池野真紀,池尾 隆. ヒト歯髓
由来線維芽細胞における IL-1 刺激による
MMP-3 産生に及ぼす JNK の関与の解明. 第 13
回日本抗加齢医学会総会. 2013.6.28.パシ
フィコ横浜(横浜市).

加藤 侑,合田征司,池尾 隆,林 宏行.
ヒト歯髓由来線維芽細胞における IL-1 刺
激による MMP-3 産生に及ぼす JNK の影響. 第
538 回大阪歯科学会例会. 2013.4.13.大阪歯
科大学(枚方市).

田邊順一,鎌田愛子,田村 功,合田征
司,堂前英資,吉川美弘,池尾 隆. アデ
ィポネクチンコラーゲン様ドメインから新
規合成したペプチドの骨芽細胞におよぼす
影響. 第 11 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術
大会・総会. 2013.3.2.東京医科歯科大学

(東京都).

吉川美弘,川本章代,堂前英資,合田征
司,田村 功,鎌田愛子,小正 裕,池尾
隆. マウス骨芽細胞における Smad1 を介した
VDR の発現. 第 11 回日本歯科骨粗鬆症研究会
学術大会・総会. 2013.3.2.東京医科歯科
大学(東京都).

Kamada A, Ikeo T, Tamura I, Goda S,
Yoshikawa Y, Domae E, Yoshimoto H, Kakudo
K. Statin Regulates Runx2 Expression in
Human Dental Pulp Stem Cells. 91st General
Session & Exhibition of the IADR. 2013.3.
23. Seattle, WA, USA.

Tamura I, Kamada A, Goda S, Yoshikawa Y,
Domae E, Ikeo T. Kinetics of early growth
response proteins in human periodontal
fibroblast wound healing model. 2012
American Society for Cell Biology Annual
Meeting. 2012.12.17. San Francisco, CA, USA.

川崎俊也,合田征司,松本尚之. Akt の RANKL
刺激による破骨細胞分化に及ぼす影響. 第
536 回大阪歯科学会例会. 2012.12.8.大阪歯
科大学(枚方市).

加藤 侑,合田征司,池尾 隆,林 宏行.
Effects of JNK on the production of MMP-3
by interleukin-1 beta-stimulated human
dental pulp fibroblast like cells. 日本歯
科保存学会 2012 年度秋季学術大会(第 137
回). 2012.11.22.広島国際会議場(広島市).

竹内 撰,合田征司,小正玲子,宮地秀彦,
松田有之,小松首人,藤原秀樹,池尾 隆,
山本一世. ヒト歯髓由来線維芽細胞における
IL-1 刺激による MMP-3 産生への影響. 日本
歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会(第 137
回). 2012.11.22.広島国際会議場(広島市).

吉川美弘,堂前英資,合田征司,田村 功,
鎌田愛子,池尾 隆. 骨芽細胞による破骨細胞
分化には Smad1 が関与する. 第 22 回日本
歯科医学会総会. 2012.11.9.大阪国際会議
場.(大阪市)

川崎俊也,合田征司,松本尚之,池尾 隆.
RANKL 刺激による破骨細胞分化における Akt
の影響. 第 22 回日本歯科医学会総会. 2012.
11.9.大阪国際会議場.(大阪市)

②田村 功,鎌田愛子,合田征司,吉川美弘,
堂前英資,池尾 隆. EGFR 阻害薬を用いた分
子標的治療薬効マーカーの検索. 第 22 回日
本歯科医学会総会. 2012.11.9.大阪国際会
議場.(大阪市)

②鎌田愛子,池尾 隆,田村 功,合田征司,吉川美弘,堂前英資.メタボリックシンドロームと硬組織形成.第22回日本歯科医学会総会.2012.11.9.大阪国際会議場.(大阪市)

③Yoshikawa Y, Kamada A, Tamura I, Goda S, Domae E, Ikeo T. BMP-2 Promotes osteoclast differentiation by enhancing the activity of smad1. American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting. 2012.10.15. Minneapolis, MN, USA.

④林 寛,川崎俊也,氏井庸介,合田征司,池尾 隆,松本尚之.ヒト歯肉由来線維芽細胞のMMP-1に及ぼすp38 kinaseの影響.第71回日本矯正歯科学会大会.2012.9.27-28.盛岡市民文化ホール(盛岡市).

⑤川崎俊也,合田征司,松本尚之.RANKL刺激による破骨細胞分化におけるAktの影響.第71回日本矯正歯科学会大会.2012.9.27-28.盛岡市民文化ホール(盛岡市).

⑥合田征司,池野真紀,池尾 隆.PDGF-bbが歯肉線維芽細胞に及ぼす影響.第12回日本抗加齢医学会総会.2012.6.23.パシフィコ横浜(横浜市).

⑦氏井庸介,合田征司,松本尚之.ヒト歯肉由来線維芽細胞におけるMMP-1産生におよぼすp38 MAP Kinaseの影響.第533回大阪歯科学会例会.2012.4.14.大阪歯科大学(枚方市).

⑧加藤 侑,合田征司,小正玲子,竹内 撰,山本一世,池尾 隆,林 宏行.ヒト歯肉由来線維芽細胞のMMP-3産生に及ぼすMAP kinaseの影響.日本歯科保存学会2011年度秋季学術大会(第135回)2011.10.20-21.大阪国際交流センター(大阪市).

⑨林 寛,氏井庸介,川崎俊也,堂前英資,合田征司,池尾 隆,松本尚之.骨芽細胞遊走に及ぼすエムドゲインの影響.第70回日本矯正歯科学会大会.2011.10.19.名古屋国際会議場(名古屋市).

⑩川崎俊也,合田征司,氏井庸介,林 寛,堂前英資,池尾 隆,松本尚之.破骨細胞分化に及ぼすLipid raftsの影響.第70回日本矯正歯科学会大会.2011.10.19.名古屋国際会議場(名古屋市).

⑪氏井庸介,合田征司,松本尚之.ヒト歯肉由来線維芽細胞のMMP-1産生に及ぼすp38MAP kinaseの影響.第70回日本矯正歯科学会大会.2011.10.19.名古屋国際会議場(名古屋市).

⑫鎌田愛子,田村 功,合田征司,吉川美弘,堂前英資,池尾 隆.新規合成collagen-mimetic peptideの骨芽細胞分化に及ぼす影響.第53回歯科基礎医学会総会・学術大会.2011.10.11.長良川国際会議場(岐阜市).

⑬Ikeo T, Kamada A, Yoshikawa Y, Domae E, Goda S, Tamura I, Takaishi Y. Stain suppresses excess Runx2 expression in human osteoblastic osteosarcoma cells. American Society for Bone and Mineral Research 2011 Annual Meeting. 2011.9.19. San Diego, CA, USA.

⑭Kamada A, Ikeo T, Yoshikawa Y, Domae E, Goda S, Tamura I. Collagen-mimetic peptide of adiponectin accelerates osteoblastic differentiation. American Society for Bone and Mineral Research 2011 Annual Meeting. 2011.9.19. San Diego, CA, USA.

⑮川崎俊也,合田征司,竹内 撰,氏井庸介,林 寛,小正玲子,加藤 侑,林 宏行,山本一世,池尾 隆,松本尚之.PDGF-bbはヒト歯肉由来線維芽細胞においてMMP-1産生を増強する.第9回日本再生歯科医学会学術大会・総会.2011.9.10.大阪国際会議場(大阪市).

⑯吉川美弘,川本章代,新原拓也,竹山 旭,堂前英資,合田征司,田村 功,鎌田愛子,森田章介,岡崎定司,小正 裕,池尾 隆.歯根膜細胞においてVDR発現が破骨細胞分化因子を調節する.第9回日本再生歯科医学会学術大会・総会.2011.9.10.大阪国際会議場(大阪市).

⑰田村 功,鎌田愛子,合田征司,吉川美弘,堂前英資,池尾 隆.ヒト歯根膜線維芽細胞のEGR発現におけるIGF-IIの影響と糖修飾.第9回日本再生歯科医学会学術大会・総会.2011.9.10.大阪国際会議場(大阪市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合田征司(GODA, Seiji)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号:70351476

(2) 研究分担者

金下祐己(KANESHITA Yuki)
大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)
研究者番号:70595793

池尾 隆(IKEO, Takashi)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号:40159603

堂前尚親 (DOMAE, Naochika)
大阪歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号：60115889

堂前英資 (DOMAE, Eisuke)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：50454559
(追加：平成 25 年 4 月 12 日)