

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592811

研究課題名(和文) 難治性根尖性歯周炎の血管内皮細胞を介した炎症の遷延と治癒機構の解明

研究課題名(英文) Study of inflammatory and anti-inflammatory mechanisms by endothelial cells in persistent periapical periodontitis

研究代表者

武市 収 (TAKEICHI, Osamu)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10277460

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)：midkineの組織治癒機転を検索しiNOS inhibitorの影響を検討するため、歯根肉芽種69例を供した。血管内皮細胞にiNOS、midkineおよびCXCL1のタンパクおよび遺伝子発現が示されたが、健常歯肉では認められなかった。Porphyromonas gingivalisから抽出したLPSで血管内皮細胞を刺激したところ、iNOS、midkineおよびCXCL1の発現を認めたがiNOS inhibitorを添加するとiNOS量の著しい低下が認められた。以上のことから、歯根肉芽種中の血管内皮細胞は歯周病原菌の刺激を受け、iNOSおよびmidkineを発現することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the function of midkine and iNOS inhibitor to endothelial cells in periapical granulomas. Midkine, iNOS and CXCL1 protein and mRNA expression in 69 periapical granulomas were detected, although healthy gingival tissues did not show those expressions. LPS was extracted from Porphyromonas gingivalis, which is known as potent periodontopathic bacteria. Then, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were stimulated with the LPS. Stimulated HUVEC showed iNOS, midkine and CXCL1 protein and mRNA expression, but not after the application of iNOS inhibitor. The data are consistent with a hypothesis suggesting that endothelial cells in periapical granulomas express both iNOS and midkine, and these molecules may contribute tissue remodeling.

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：歯根肉芽種 midkine 誘導型一酸化窒素合成酵素 CXCL1 血管内皮細胞 遺伝子発現 Porphyromonas gingivalis LPS

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) はラジカル性の気体であり、大気中の汚染物質として知られている。しかし、NOが生体の炎症局所でも産生され、炎症のメディエーターとなって細胞傷害性および組織破壊性を有することが知られるようになってきた。これまでに、根尖性歯周炎局所におけるNO産生について研究を行い、(1) 排膿が止まらない症例の根管滲出液では高濃度のNOが産生されていること、(2) 歯根肉芽腫や歯根のう胞ではiNOS産生細胞が血管周囲に集積していること、などNOが難治性根尖性歯周炎の遷延に深く関与していることを明らかにし、(3) 歯根肉芽腫では血管内皮細胞が重要な役割を担っている、ことを報告した (Takeichi et al, *J Endod*, 33, 137-41, 2007; Takeichi et al, *Int Endod J*, 39, 179-84, 2006; Takeichi et al, *J Dent Res*, 79, 1548-55, 2000; Takeichi et al, *Int Endod J*, 32, 124-30, 1999; Takeichi et al, *Immunol*, 93, 275-80, 1998)。

また、炎症性サイトカインで刺激した血管内皮細胞にNO合成阻害剤を作用させたところ、血管内皮細胞の細胞接着分子である血管内皮カドヘリン発現が上昇し、血管の透過性が減少した。すなわち、根尖性歯周炎にNO合成阻害薬を作用させた場合に、その炎症が消退する可能性が示唆された (Takeichi et al, *Int Endod J*, 41, 401-7, 2008)。

Midkine は血管内皮細胞から発現されるヘパリン結合性成長因子であり、腫瘍細胞で多く発現されているが、炎症局所での細胞遊走と修復機序にも深く関与していると考えられている。そのため、midkine は炎症のメディエーターでありながら、創傷治癒促進に関与するという二面性を有していることが示唆され、根尖性歯周炎でも重要な役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は難治性根尖性歯周炎のメカニズムを解明するため、炎症の増悪や遷延に関与すると考えられているNOおよび炎症に対して防御的に作用するmidkineに着目したことに意義があり、この点が他の研究テーマに比べて独創的な点である。局所免疫に深く関与している血管内皮細胞に焦点を当てているため、NO inhibitorがiNOSおよびmidkineの発現に与える影響を検索することにより、NO inhibitorが難治性根尖性歯周炎の治療薬として応用できる可能性を示唆するものであり、日常臨床に大きく貢献する可能性が期待される。

また、midkineは細胞遊走能を有することから、炎症局所における治癒起点として骨芽細胞などの遊走に関与していることが示唆されることから、ケモカインの一つであるCXCL1に着目し、同様に検索を行った。

また歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来LPSで刺激したヒト臍帯静脈血由来血管内皮細胞 (HUVEC) を検索することで、歯根肉芽種内での血管内皮細胞のモデルとした。

本研究の目的は、難治性根尖性歯周炎のメカニズムを解明する一助とし、midkineの組織治癒機転を検索すると共に、iNOS inhibitorの根管治療への応用性を検討することである。

3. 研究の方法

健常歯肉と歯根肉芽種を供試試料とし、iNOSとmidkineのタンパクおよびmRNA発現をそれぞれ免疫染色法およびreal time PCR法で検索した。また、臍帯静脈血由来血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた細胞培養では、*Porphyromonas gingivalis* からLPSを抽出したのちHUVECを刺激し、iNOSまたはmidkineの発現を検索した。また、iNOS inhibitorをこ

の培養実験系に作用させ、iNOS 発現を検索した。

(1) 供試試料

根尖病巣の採取

日本大学歯学部歯科病院歯内療法科を受診した患者のうち、打診および根尖部歯肉の触診で疼痛を訴え、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患者と臨床的に診断された患者を被験者とした。歯根嚢胞の臨床診断の元、治療の一環として歯内外科療法である根尖切除術を行い、外科的に摘出した根尖病巣組織を本研究に供試した。

健常歯肉組織の摘出

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、完全埋伏智歯の存在を認めため、抜歯の必要性があったことから日本大学歯学部歯科病院口腔外科に紹介、来院された患者を被験者とした。患歯は完全埋伏の状態であり、疼痛や腫脹はなく、歯肉に炎症を認めなかった。智歯を抜去した際に歯肉を切除し、これを健常歯肉組織として本研究のコントロールとした。

倫理的配慮

本研究を実施するに先立ち、本研究の内容はヘルシンキ条約に基づいた、日本大学歯学部倫理委員会の審査、承認を得ている(倫許2007-24)。

組織を回収するのに先立ち、予め本研究の目的と予想される不利益などを患者に説明し、研究に同意を得られた場合にのみ同意書に署名を受け、患者から得られた試料を以下の研究に供試した。また、本研究に使用するにあたり、試料採取のための術式の変更や大きな外科的侵襲を与えることはなかった。

(2) 試料の処理

得られた根尖病巣組織を二分割し、一方を中性緩衝ホルマリンで固定したのち、8 μ mのパラフィン切片を作製した。他方の組織は4%

paraformaldehyde/PBSで固定したのち - 80で凍結し、poly-L-Lysineでコーティングしたスライドガラス上に8 μ mの凍結切片を作製した。

(3) 病理組織学的検索

パラフィン切片を用いて、通法に従いヘマトキシリン-エオジン重染色した。その後、光学顕微鏡下で細胞形態を診査し、病理診断した。

(4) 免疫組織化学的検索

凍結切片を用い、通法に従って免疫染色を行った。すなわち、正常ウマ血清でブロッキング処理を行ったのち、メタノールを添加した0.3%過酸化水素をインキュベートし、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。次いで、一次抗体として抗ヒトiNOS、midkineまたはCXCL1抗体を30分作用させ、洗浄後抗マウスIgG抗体を反応させた。その後ペルオキシダーゼ添加アビジン・ビオチン複合体を反応させ、発色基質をインキュベートしたのち陽性細胞の検出を行った。光学顕微鏡を使用し、iNOS、midkineまたはCXCL1産生細胞の局在を観察した。

(5) 2重免疫染色法

抗ヒトmidkineおよび抗ヒトCXCL1抗体を用いて供試試料の2重免疫染色法を行った。すなわち、抗ヒトmidkineモノクローナル抗体で1次染色を行い、ペルオキシダーゼ添加アビジン・ビオチン複合体を作用させたのちmidkine陽性細胞の検出を行った。次いで、抗ヒトCXCL1ポリクローナル抗体(ヤギ)を用いて2次染色を行い、アルカリフォスファターゼ添加アビジン・ビオチン複合体を作用させたのちCXCL1陽性細胞の検出を行った。

(6) 分子生物学的検索

凍結切片から通法に従い、Trizol 溶液を用いて RNA を抽出した。次いで、分光光度計を用いて抽出した RNA の精製度および RNA 量を計測した。

逆転写酵素を用いて相補的なDNAを作製したのち、ヒト iNOS、midkine または CXCL1 に特異的な塩基配列を有する PCR プライマーと SYBR green を用いて real time PCR 法を行った。

また、ヒトハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に特異的な PCR プライマーを用いて同様に real-time PCR 法を行い、PCR 法のインターナルコントロールとした。すなわち、real-time PCR 反応後に得られた iNOS または midkine の遺伝子量を GAPDH の遺伝子量で除し、それぞれの遺伝子量とした。

(7) 血管内皮細胞に対する歯周病原菌の影響

歯周病原菌からのLPSの抽出

通常にしたがい、*P. gingivalis* から温フェノール法を用い、LPSの抽出を行なった。得られたLPSは一度凍結乾燥させたのち定量し、以下の細胞培養に使用した。

細胞培養法

ヒト臍帯静脈血由来血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、(6) で抽出した *P. gingivalis* 由来LPSとインターロイキン1、腫瘍壊死因子、インターフェロン γ で1、2、4、8、24、48時間刺激した。また、大腸菌由来LPSで刺激したものを陽性のコントロールとし、比較検討した。

P. gingivalis 由来LPSがHUVECの形態に及ぼす影響

チャンバーフラスコにHUVECを播種し、コンフルエントになった時点で *P. gingivalis* 由来LPSとインターロイキン1、腫瘍壊死因子、インターフェロン γ 添加し、1、2、4、8、24、48時間培養した。各時間で継時的に形態の変化を観察した。

標的分子の免疫学的検索

(7) で得られた培養液を試料とし、iNOSの産生をELISA法で定量した。またHUVECをスライドグラス上で培養し、iNOS

免疫染色を行った。

分子生物学的検索

(7) で得られたHUVECから通法に従い、Trizol溶液を用いてRNAを抽出した。既に記載したようにreal time PCR法でiNOSおよびmidkineの遺伝子発現を検索する。

(8) iNOS inhibitorの検討

HUVECを用いて *P. gingivalis* 由来LPSと炎症性サイトカインで刺激し、iNOS inhibitorを添加した。得られたHUVECを回収し、RNAを抽出したのちiNOSの遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 病理組織学的検索

根尖病巣

根尖切除を行い、根尖部病巣組織85例を外科的に摘出した。直ちに二分割し、一方を用いてパラフィン切片を作製したのちヘマトキシリン-エオジン染色を行った。その結果、69例に幼弱な毛細血管に富む肉芽組織を認め、多数の炎症性細胞浸潤を確認したため、歯根肉芽種と病理診断した。また、残りの19例については重層扁平上皮の層を認め、肉芽組織中にコレステリン空隙を確認したことから歯根嚢胞と診断し、本研究から除外した。

健常歯肉

完全埋伏智歯を抜去した際得られた歯肉組織10例をヘマトキシリン-エオジン染色し、病理診断したところ、全ての試料に重層扁平上皮とその下層に肉芽組織を認めた。しかし、歯根肉芽種と比較して炎症性細胞の浸潤は著しく少なかった。

(2) 免疫組織化学的検索

歯根肉芽種と病理診断した組織の、分割した他方を用いて凍結切片を作製し、抗ヒトiNOS、midkineまたはCXCL1抗体を用いた免疫染色法を行った。その結果、肉芽種中のマクロファージやリンパ球などの炎症性細胞や血管内皮細胞に

iNOSおよびmidkine発現陽性を示し、特に血管内皮細胞で強陽性を示した。また、陽性細胞数は比較的少ないが、血管内皮細胞にCXCL1陽性を示した。

(3) 2重免疫染色法

歯根肉芽種の凍結切片に対して、抗ヒトmidkineおよび抗ヒトCXCL1抗体を用いて2重免疫染色法を行ったところ、血管内皮細胞はmidkineおよびCXCL1を共発現していた。また、midkineを発現する炎症性細胞の一部はmidkine およびCXCL1を発現する血管内皮細胞の周囲に局在していた。

なお、健常歯肉においてはmidkineおよびCXCL1発現を発現する細胞を認めなかった。

(4) 分子生物学的検索

歯根肉芽腫の凍結切片からmRNAを抽出し、ヒトiNOS、midkineおよびCXCL1に特異的なPCRプライマーを用いてreal time PCR法を行ったところ、iNOS、midkineおよびCXCL1遺伝子の発現を確認した。しかし、健常歯肉から抽出したmRNAを検索した結果、これらの遺伝子発現は認められなかった。なお、この遺伝子発現の強度に有意差を認めず、臨床所見との相関性も認められなかった。

(5) 血管内皮細胞に対する歯周病原菌の影響

*P. gingivalis*から通法に従いLPSを抽出し、凍結乾燥したのち定量を行い、10μg/mlの濃度に調整した。

この*P. gingivalis*由来LPSを用いてサイトカインと共にHUVECを刺激したのち培養液と細胞を回収し、解析を行った結果、以下の知見を得た。

HUVECの形態に及ぼす影響

無刺激ではHUVECは敷石状の形態を示したが、*P. gingivalis*由来LPSで刺激したのちその形態を紡錘状に変化さ

せた。また、iNOS inhibitorを添加したのち*P. gingivalis*由来LPSで刺激したところ、敷石状の形態を維持していた。

免疫学的検索

*P. gingivalis*由来LPSを用いてHUVECを刺激し、培養液中のiNOS量をELISA法で定量したところ、大腸菌由来LPSと比較して有意に低いiNOS量を確認した。また、iNOS inhibitorを添加したものではiNOS量の著しい低下が確認された。

分子生物学的検索

*P. gingivalis*由来LPSを用いてHUVECを刺激し、細胞を回収したのちRNAを抽出し、iNOSおよびmidkine遺伝子の発現をreal-time PCR法を用いて検索した。その結果、iNOSとmidkineの遺伝子発現が確認され、LPSの濃度依存的に発現強度は増加した。iNOS inhibitorを添加したものではiNOS遺伝子発現の有意な低下を確認した。

以上のことから、歯根肉芽腫中の血管内皮細胞は歯周病原菌の刺激を受け、炎症のメディエーターであるiNOSを発現すると共に創傷治癒に關与するmidkineを発現することが明らかとなった。また、MKはCXCL1とともに細胞遊走を誘導し、局所炎症の創傷治癒に關与し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 3 件)

Aida Y, Honda K, Tanigawa S, Nakayama G, Matsumura H, Suzuki N, Shimizu O, Takeichi O, Makimura M, Maeno M (2012) IL-6 and soluble IL-6 receptor stimulate the production of MMPs and their inhibitors via JAK-STAT and ERK-MAPK signaling in human chondrocytes, *Cell Biology International*, 36(4), 367-76 (査読)

あり)

Imai K, Inoue H, Tamura M, Cueno ME, Inoue H, Takeichi O, Kusama K, Saito I, Ochiai K (2012) The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification, *Biochimie*, 94(3), 839-46 (査読あり)

Takeichi O, Hatori K, Kamimoto A, Oka S, Ogiso B, Saito I (2011) Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-expressing endothelial cells co-express AGE and S100 in human periapical granulomas, *Journal of Dentistry*, 39(10), 679-85 (査読あり)

[学会発表](計 9 件)

牧野公亮、武市 収、羽鳥啓介、勝呂 尚、小木曾文内、今井健一、落合邦康(2013) 歯根肉芽種における Epstein-Barr virus の検出、第 139 回秋季日本歯科保存学会、10 月 17 - 18 日、秋田市、秋田県

武市 収、牧野公亮、羽鳥啓介、小木曾文内 (2013) 難治性根尖性歯周炎における midkine と iNOS 発現、第 6 回日本口腔検査学会、9 月 15 - 16 日、鶴見区、神奈川県

羽鳥啓介、武市 収、牧野公亮、小木曾文内 (2013) 歯根肉芽種中の血管内皮細胞における midkine および chemokine 発現、第 6 回日本口腔検査学会、9 月 15 - 16 日、鶴見区、神奈川県

Takeichi O, Makino K, Hatori K, Maeno M, Ogiso B (2013) Midkine and iNOS expression by endothelial cells in periapical granulomas, 46th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research with the Scandinavian Division, September 4-7, Florence, Italy

Takeichi O, Suguro H, Hayashi M, Ogiso B (2013) CD-34-positive endothelial cells in periapical granulomas express RAGE and midkine, 9th World Endodontic Congress of the

International Federation of Endodontic Associations, May 23-26, Tokyo, Japan

羽鳥啓介、武市 収、牧野公亮、小林 寛、兼坂絵理奈、鶴町 保、小木曾文内 (2012) 歯根肉芽種における midkine と chemokine 遺伝子発現、第 137 回秋季日本歯科保存学会、11 月 22 - 23 日、広島市、広島県

Takeichi O, Hatori K, Ogiso B, Kamimoto A, Maeno M (2012) Endothelial cells in periapical granulomas express midkine and RAGE, 6th Annual Congress of the Pan European Region of the International Association for Dental Research, September 12-15, Helsinki, Finland

大原絹代、清水康平、武市 収、鶴町 保、會田泰代、小木曾文内 (2012) CFA 誘導性歯髓炎により発症する舌の機械痛覚過敏に対する Toll-like Receptor4 の関与、第 136 回春季日本歯科保存学会、6 月 28 - 29 日、宜野湾市、沖縄県

岩田桜子、林 誠、武市 収、清水康平、鈴木直人、前野正夫、小木曾文内 (2011) MTA の骨芽細胞分化促進作用は溶出する Ca²⁺ を介する、第 135 回秋季日本歯科保存学会、10 月 21 日-2 日、大阪市、大阪府

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[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・准教授

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