

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659974

研究課題名（和文） 歯周組織老化誘導病因論の確立

研究課題名（英文） Establishment of the new concept “pathogenic mechanism of periodontal disease by the induction of senescence of the tissues”.

研究代表者

山崎 和久 (YAMAZAKI KAZUHISA)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00182478

研究成果の概要（和文）：歯周病原細菌口腔感染モデルマウスにおいて歯肉中で小胞体ストレスが誘導されていることが示唆され、ケミカルシャペロンである4-フェニル酪酸を投与して小胞体ストレスを解消すると歯槽骨吸収が抑制されることが明らかとなった。*in vitro*において4-フェニル酪酸が破骨細胞への分化を抑制することより、小胞体ストレスは歯周炎において破骨細胞の分化に関与することにより歯槽骨吸収を促進していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Endoplasmic reticulum stress was induced in gingival tissue of orally periodontopathic bacterium infected mice. Administration of chemical chaperone, 4-phenylbutyric acid, significantly inhibited alveolar bone resorption in the infected mice. In addition, 4-phenylbutyric acid inhibited osteoclastogenesis *in vitro*. Our findings suggest that endoplasmic reticulum stress involves osteoclastogenesis during alveolar bone resorption in the progression of periodontal disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患のリスク因子は細菌学的、環境および宿主因子に分類されている。とりわけ宿主因子は複雑多岐にわたり、正確な病態診断を困難にする要因となってきた。歯周疾患の主たる宿主因子を反映した生物学的リスクマーカーを見いだそうとする試みは主として遺伝子多型研究を中心に行われてきた。しかし、低いオッズ比、人種による多型頻度の逆転、機能研究との不一致など多くの問題を内包することが露呈した(Dimou et al., J Clin Periodontol, 2010)。こうした問題を打開し、病態診断を客観的かつ正確に行うためのマーカーの樹立は診断のみならず、新たな治療法の開発や予後判定基準の確立に結び

つく可能性がある。

近年、外的・内的要因による細胞老化の進行は様々な疾患と関連することが明らかになってきた(Weber et al., Exp Gerontol 2010)。細胞レベルでの老化予防には小胞体ストレス応答、オートファジー、テロメラーゼ活性などが重要な働きをしている。小胞体ストレスとは、脂質やタンパクの合成・輸送、高次構造形成を行う場である小胞体に制御能力を超える負荷がかかり、異常タンパクが蓄積して細胞機能に異常が生じる状態である。感染や炎症においては様々なタンパクが大量に合成されることから、小胞体ストレスに対する細胞機能は組織破壊と密接に関連している。我々は歯周炎と小胞体ストレス応

答の関連を初めて報告した (Clin Chim Acta, 2009)。オートファジーも細胞内における異常タンパクの蓄積を抑制する機構であると同時に、細胞内に侵入した病原体を排除する機構としても作用しており、恒常性の維持に重要な役割を演じている。一方、テロメラーゼは細胞分裂時に短縮されるテロメア構造を付加し、細胞老化を防ぐ働きをしている。特に獲得免疫を担う細胞においてはその寿命は免疫機能と密接に関連しており効果的な感染免疫機能を維持するためにテロメラーゼ活性は重要である。近年慢性炎症が細胞レベルでの老化を促進する、あるいは細胞の老化と慢性炎症やがん化の関連が注目されている。しかし歯周病学領域では細胞レベルでの老化に焦点を当てた研究は全くと言っていいほど存在していない。

2. 研究の目的

歯周組織構成細胞に対して細菌感染・炎症が小胞体ストレス応答をどのように変動させるかを明らかにする。これらにより歯周病原細菌の細胞老化に及ぼす影響を解明する。

3. 研究の方法

6週齢の C57BL/6 マウスに 10^9 CFU の *P. gingivalis* W83 株を週 2 回、計 10 回口腔感染させた。感染後、上顎の歯槽骨吸収を測定するとともに上顎臼歯部周囲歯肉を採取して全 RNA を抽出し cDNA を合成した。BiP, XBP1, ATF4, CHOP の各小胞体ストレス関連分子、炎症性サイトカイン、破骨細胞関連遺伝子発現について Real-time PCR 法にて定量解析を行った。また、小胞体のタンパク折り畳み機構を改善するケミカルシャペロンである 4-フェニル酪酸をマウスに投与しつつ *P. gingivalis* を 10 回口腔感染させ、同様の解析を行った。

さらに、*in vitro* において小胞体ストレスの破骨細胞形成へ及ぼす影響を確認するため、マウス骨髄由来細胞およびヒト CD14⁺細胞を分離し、M-CSF および RANKL 添加培地にて破骨細胞様多核巨細胞へ分化する系を確立し、同培地へ 4-フェニル酪酸もしくは小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを加えて破骨細胞様多核巨細胞形成に及ぼす影響を TRAP 染色にて検討した。

次に加齢による歯肉線維芽細胞への影響を検討するため、8 週齢と 24 月齢の C57BL/6 マウスより歯肉を採取して線維芽細胞を分離した。十分な細胞数を得るために 5-8 回継代をして *P. gingivalis* にて刺激を行い、遺伝子発現の変化を網羅的に定量解析した。

4. 研究成果

P. gingivalis 口腔感染感染群において歯槽骨吸収が誘導され、歯肉における小胞体ス

トレス関連遺伝子発現が有意に上昇していた。そこで小胞体のタンパク折り畳み機構を改善する薬剤である 4-フェニル酪酸をマウスに投与しつつ感染を行ったところ歯槽骨吸収が抑制された。4-フェニル酪酸投与群では非投与群と比較して歯肉の炎症性サイトカイン発現に差は認められないにもかかわらず、破骨細胞関連遺伝子発現の有意な減少が認められたことから、小胞体ストレスは破骨細胞への分化に直接関係しており、4-フェニル酪酸はそれを抑制したものの仮説を立てた。仮説を検証するため、*in vitro* においてマウス骨髄由来細胞およびヒト CD14 陽性細胞を M-CSF および RANKL 添加培地にて破骨細胞様細胞へ分化する系を確立した。同培地へ 4-フェニル酪酸もしくは小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを加えて破骨細胞様細胞形成に及ぼす影響を検討したところ 4-フェニル酪酸添加により RANKL 誘導性の破骨細胞様細胞形成が抑制されたが、ツニカマイシン単独では促進されなかった。以上より、歯周炎において歯槽骨吸収の際に誘導される破骨細胞への分化に小胞体ストレスが関与していることが強く示唆された。さらに 4-フェニル酪酸で歯槽骨吸収が抑制されたことから小胞体ストレスが歯周病治療・予防のターゲットとなりうる可能性があり今後も研究を進めていく予定である。

一方、加齢マウスの歯肉線維芽細胞の解析では、加齢により炎症性サイトカイン、ケモカイン、Toll 様受容体、TIMPs の減少が認められる一方、歯周組織破壊に関わる MMP の遺伝子発現の増加が認められた。また刺激による各種増殖因子の発現上昇が、加齢により抑制されることが明らかとなった。加齢による様々な遺伝子発現の変化が歯周炎の発症と進行に影響している可能性が示唆された。

これらの研究結果は今後国際学会での発表や、論文投稿により評価を問う予定である。

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 3 件)

- (1) Aoki-Nonaka Y, Nakajima T, Miyuchi S, Miyazawa H, Yamada H, Domon H, Tabeta K, Yamazaki K. Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res. 査読有. 2013 in press. doi: 10.1111/jre.12080.
- (2) Miyazawa H, Honda T, Miyuchi S, Domon H, Okui T, Nakajima T, Tabeta K,

Yamazaki K. Increased serum PCSK9 concentrations are associated with periodontal infection but do not correlate with LDL cholesterol concentration. Clin Chim Acta. 査読有. 413: 154-159, 2012.
doi: 10.1016/j.cca.2011.09.023.

- (3) Nakajima T, Okui T, Miyauchi S, Honda T, Shimada Y, Ito H, Akazawa K, Yamazaki K. The effects of systemic sitafloxacin on periodontal infection control in elderly patients. Gerodontology. 査読有. 29(2): e1024-e1032, 2012.
doi:
10.1111/j.1741-2358.2011.00605.x.
- (4) Miyauchi S, Maekawa T, Aoki Y, Miyazawa H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR -ApoEsh1 mice. J Periodont. Res. 査読有. 47(3): 402-408, 2012.
doi:
10.1111/j.1600-0765.2011.01441.x.
- (5) Maekawa T, Tabeta K, Kajita-Okui K, Takahashi N, Honda T, Nakajima T, Yamazaki K. Increased expressions of C-reactive protein gene in inflamed gingival tissues could be derived from endothelial cells stimulated with interleukin-6. Arch Oral Biol. 査読有. 56(11): 1312-1318, 2011.
doi:
10.1016/j.archoralbio.2011.04.010.

[学会発表] (計7件)

- (1) Yamada H, Yamazaki K et al. Chronic stimulation with *Porphyromonas gingivalis* induced IL-4-producing NKT cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR, Seattle, USA, March 20-23, 2013
- (2) Yamazaki K. Periodontal Disease and Atherothrombotic Disease; Lessons from Clinical and Basic Sciences. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species. Nagasaki, August 27-28, 2012.
- (3) 土門久哲、山崎和久ら. *Porphyromonas gingivalis* 口腔感染モデルマウスにおけ

る小胞体ストレスの誘導. 第136回日本歯科保存学会2012年度春季学術大会、那覇、2012.6.29.

- (4) Aoki-Nonaka Y, Yamazaki K et al. NKT cells promote the inflammatory responses in *P. gingivalis*-infected mice. 90th General session of the IADR, Iguazu Falls, Brazil, June 22, 2012.
- (5) Domon H, Yamazaki K et al. Up-regulation of Endoplasmic Reticulum Stress Response in Mouse Periodontitis Model. 90th General session of the IADR, Iguazu Falls, Brazil, June 21, 2012.
- (6) Miyazawa H, Yamazaki K et al. *Porphyromonas gingivalis* infection modulates lipid profile by including PCSK9 production in murine model. EUROPERIO7, Vienna, Austria, June 6-7, 2012.
- (7) Miyauchi S, Yamazaki K et al. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR-ApoEsh1 mice. EUROPERIO7, Vienna, Austria, June 6-7, 2012.
- (8) Yamazaki K. Keynote Lecture "Periodontal Disease and Atherothrombotic Disease; Lessons from Clinical and Basic Sciences". Special Lecture. QOL International Symposium, Niigata, February 9, 2012.

[図書] (計4件)

- (1) 山崎和久, 中島貴子: 臨床歯周病学第2版 (吉江弘正, 伊藤公一, 村上伸也, 申基喆 編著). 2編ベーシック編 第13章 歯周組織の病理変化, 146-155頁, 医歯薬出版, 2013.
- (2) 山崎和久: イラストで語る歯科医学最前線 (吉江弘正 監修). 6. 歯周疾患が及ぼす冠動脈性心疾患のリスク, 23-26頁, クインテッセンス出版株式会社, 2013.
- (3) 山崎和久, 中島貴子: 5 疾病の口腔ケア (藤本篤士, 武井典子, 片倉 朗, 大野友久, 糸田昌隆, 杉山 勝, 吉江弘正, 小林芳友 編著). 急性心筋梗塞と口腔, 146-147頁, 医歯薬出版, 2013.

- (4) 山崎和久, 多部田康一, 中島貴子: ビジュアル歯周病を科学する (天野敦雄・岡賢二・村上伸也 編著) CHAPTER 4 歯周病病因論・宿主因子 1. 宿主免疫と歯周組織破壊 230-246 頁, クインテッセンス出版株式会社, 2012.

[その他]

ホームページ等

http://www.dent.niigata-u.ac.jp/yamazaki_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 和久 (YAMAZAKI KAZUHISA)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 00182478

(2) 研究分担者

本田 朋之 (HONDA TOMOYUKI)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号: 30447635