

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463218

研究課題名(和文) TrkBシグナルを介した炎症制御メカニズムの解明と歯周炎治療への展開

研究課題名(英文) BDNF regulates inflammatory cytokine expressions through TrkB in human vascular endothelial cells

研究代表者

武田 克浩 (Takeda, Katsuhiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：10452591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究から、脳由来神経栄養因子(BDNF)は、IL-1 β によって誘導されるヒト血管内皮細胞(HMVEC)におけるIL-6、IL-8といった炎症性サイトカイン発現や好中球のHMVECへの接着を制御することが示唆された。BDNFが有する炎症制御能がin vivoにおける速やかな歯周組織再生促進効果の発現に寄与していると推察される。

研究成果の概要(英文)：Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) enhances periodontal tissue regeneration. Tissue regeneration is characterized by inflammation which directs the quality of tissue repair. In this study, we investigated the effect of BDNF on intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, which is an inflammatory marker, expression in interleukin (IL)-1 β -treated human microvascular endothelial cells (HMVECs). We demonstrate that BDNF attenuates the IL-1 β -increased ICAM-1 mRNA and protein expressions. In addition, we studied the effect of BDNF on neutrophil-like differentiated HL-60 cells adhesion to HMVECs by cell adhesion assay. Treatment of HMVECs with IL-1 β led to an increase in the number of adherent neutrophil-like HL-60 cells. BDNF decreased significantly the number of neutrophil-like HL-60 cells attached HMVECs. In conclusion, BDNF may reduce excess inflammation through reduced neutrophil recruitment by regulating the ICAM-1 expression.

研究分野：歯周病学

キーワード：脳由来神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

。申請者らは、これまで成長因子の1つである脳由来神経栄養因子 (BDNF) の歯周組織再生治療薬としての臨床応用を目指して、BDNF が歯周組織再生に有用であることを *in vitro* および *in vivo* の両面から検討し、明らかにしてきた (Takeda K et al. 2005, 2011)。

2. 研究の目的

近年、炎症の治癒機転には多くの再生現象が関与し、逆に再生医療を成功に導くためには炎症に関係するサイトカインなど多くの分子の制御が必要であることが明らかとなってきた。実際、これまでの研究においても BDNF 投与群では炎症性細胞の浸潤が非投与群より軽度であった。そこで、本研究は、BDNF の抗炎症作用を明らかにすることで、BDNF による歯周組織再生機転機構を明確にし、歯周組織再生促進作用・抗炎症作用の両面からより多くの歯周炎患者に安心・安全なサイトカイン療法を展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 炎症性サイトカインの mRNA 発現に及ぼす BDNF の影響

血管内皮細胞として正常ヒト皮膚微小血管から獲得した human microvascular endothelial cell (HMVEC, LONZA, Walkersville, MD) を購入して、5代継代 HMVEC を本研究では使用した。

培地は添加因子セット (LONZA) を加えた EBM-2 培地 (LONZA) を用いた (培地 A)。添加因子セット (LONZA) には fetal bovine serum (FBS), fibroblast growth factor-2, epidermal growth factor, hydrocortisone, vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, ascorbic acid, amphotericin B が含まれている。

HMVEC を I 型コラーゲンがコートされた 6 穴プレート (SUMILON セルタイト、住友ベークライト、秋田) に 1.0×10^5 cells/well となるように播種し、サブコンフルエントになるまで培地 A で 7 日間培養した。7 日目の培養終了前の 24 時間は、添加因子を含まない EBM-2 培地で培養した。培養終了前の 0、3、6、24 時間前から HMVEC に 50 ng/ml の BDNF (R&D, Minneapolis, MN) を作用させた。

HMVEC 培養終了後、EBM-2 培地で細胞を 2 回洗浄後、RNA iso plus (TAKARA、大津、日本) を用いて総 RNA を抽出した。RNA 濃度は分光光度計 (260 nm、280 nm) で測定し算出した。

cDNA は Rever Tra Ace (東洋紡、大阪) を用いて $1.0 \mu\text{g}$ の総 RNA から逆転写し合成し、STEP ONE PLUS™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) と Light Cycler® Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Swiss) を用いてリア

ルタイムでモニタリングし、mRNA 発現を解析した。炎症性サイトカイン IL-6、IL-8、MCP-1 または抗炎症性サイトカイン IL-4、IL-10 の mRNA 発現は glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現に対する比で表した。

(2) Interleukin (IL) -1 β 刺激された HMVEC の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF 前処理の影響

HMVEC を I 型コラーゲンがコートされた 6 穴プレート (SUMILON セルタイト、住友ベークライト) に 1.0×10^5 cells/well となるように播種し、サブコンフルエントになるまで培地 A で 7 日間培養した。7 日目の培養終了前の 24 時間は、添加因子を含まない EBM-2 培地で培養した。培養終了 6 時間前に IL-1 β (10 ng/ml, R&D) を HMVEC に作用した。BDNF 前処理として、IL-1 β 添加 0、3、6、18 時間前に BDNF (1、10、50、100 ng/ml) 作用した。

(3) HMVEC における ICAM-1 のタンパク質発現に及ぼす BDNF と IL-1 β の影響

免疫染色法においては、HMVEC を Collagen Type I Cellware 8-well culture side (BD, Franklin Lakes, NJ) に 2.5×10^4 cells/well となるように播種し、サブコンフルエントになるまで培地 A で 7 日間培養した。7 日目の培養終了前の 12 時間は、添加因子を含まない EBM-2 培地で培養した。培養終了 6、12 時間前に IL-1 β (10 ng/ml) あるいは BDNF (50 ng/ml) を作用させた。

Western blot 法では、HMVEC を I 型コラーゲンがコートされた 6 穴プレート (SUMILON セルタイト、住友ベークライト) に 1.0×10^5 cells/well となるよう播種し、サブコンフルエントになるまで培地 A で 7 日間培養した。7 日目の培養終了前の 12 時間は、添加因子を含まない EBM-2 培地で培養した。培養終了 12 時間前に IL-1 β (0、0.1、1、10、20 ng/ml) あるいは BDNF (0、1、10、50、100 ng/ml) を作用させた。

(4) IL-1 β 刺激された HMVEC の ICAM-1 発現に及ぼす BDNF 前処理の影響

Real-time PCR 法に関しては、前述と同様の方法でおこなった。

免疫染色法においては、HMVEC を Collagen Type I Cellware 8-well culture side (BD) に 2.5×10^4 cells/well となるように播種し、サブコンフルエントになるまで培地 A で 7 日間培養した。7 日目の培養終了前の 12 時間は、添加因子を含まない EBM-2 培地で培養した。培養終了 12 時間前に IL-1 β (10 ng/ml) を作用させ、さらに IL-1 β (10 ng/ml) 作用 12 時間前に BDNF (50 ng/ml) を作用させた (BDNF 前処理)。

Western blot 法では、HMVEC を I 型コラ

ーゲンがコートされた 6 穴プレート (SUMILON セルタイト、住友ベークライト) に 1.0×10^5 cells/well となるよう播種し、サブコンフルエントになるまで培地 A で 7 日間培養した。7 日目の培養終了前の 12 時間は、添加因子を含まない EBM-2 培地で培養した。培養終了 12 時間前に IL-1 β (10 ng/ml) を作用させ、さらに IL-1 β (10 ng/ml) 作用 12 時間前に BDNF (1, 10, 50 ng/ml) を作用させた (BDNF 前処理)。

(5) IL-1 β 刺激された HMVEC に対する好中球様 HL-60 細胞の接着に及ぼす BDNF 前処理の影響

HL-60 細胞は ATCC 社から購入した。HL-60 細胞はセルカルチャーフラスコ (BD) を用いて培養した。RPMI1640 培地 (SIGMA) に 10% FBS と 1.25% DMSO (SIGMA) を添加した培地で 6 日間培養することで好中球様細胞に分化させたものを、以下好中球様 HL-60 細胞とした。

HMVEC を Collagen Type I Cellware 8-well Culture Slide (BD) に 2.5×10^4 cells/well となるように播種し、サブコンフルエントになるまで培地 A で 7 日間培養した。7 日目の培養終了前の 8 時間は添加因子を含まない EBM-2 培地で培養した。BDNF 前処理として BDNF (50 ng/ml) を添加し、その 4 時間後に IL-1 β (10 ng/ml) を作用し、その後さらに 4 時間培養した。培養終了後 EBM-2 培地で 3 回 HMVEC を洗浄した。その後 EBM-2 培地で 2.5×10^6 cells/well の密度に調整した好中球様 HL-60 細胞を HMVEC 培養スライドに播種し 2 時間後共培養した。共培養後 HMVEC を EBM-2 培地にて 3 回洗浄を行い、70%エタノールにて細胞を固定した。その後 Hematoxylin 染色 (MERCK, Darmstadt, Germany) を行い、光学顕微鏡にて観察した。異なる 3 つの培養系で、各スライドあたり $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ のエリアを無作為に 5 ヶ所選択した。各視野内の好中球様 HL-60 細胞が近接している HMVEC の細胞数を計測し、同視野内の総 HMVEC 細胞数に対する割合を百分率でグラフ化した。

4. 研究成果

(1) 炎症性サイトカインの mRNA 発現に及ぼす BDNF の影響

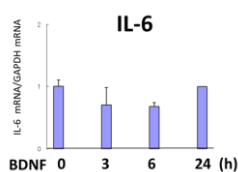
BDNF (50 ng/ml) は作用後 3~6 時間で IL-6、IL-8、MCP-1 の mRNA 発現を抑制する傾向がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった。作用後 24 時間で再び非刺激時のレベルまで mRNA 発現は回復した (図 1)。

抗炎症性サイトカインである IL-4 は BDNF (50 ng/ml) 作用後 3~6 時間で発現量が $1/3 \sim 1/2$ に減少したが、12 時間で回復し、24 時間では倍増した。IL-10 は、BDNF 24 時間作用で統計学的に有意な mRNA 発現の

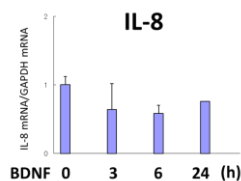
促進が認められた (図 2)。

< 図 1 >

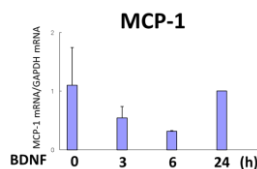
A



B



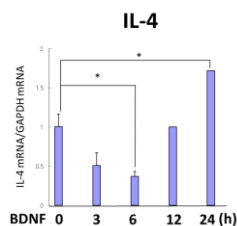
C



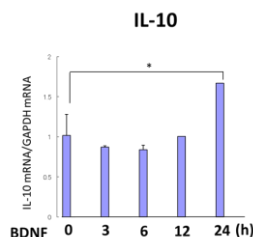
培養終了 0, 3, 6, 24 時間前に BDNF (50 ng/ml) を HMVEC に作用させたときの IL-6 (A)、IL-8 (B)、MCP-1 (C) の mRNA 発現を Real-time PCR によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す。

< 図 2 >

A



B



培養終了 0, 3, 6, 12, 24 時間前に BDNF (50 ng/ml) を HMVEC に作用させたときの IL-4 (A)、IL-10 (B) の mRNA 発現を Real-time PCR によって解析した。非刺激時の発現量を

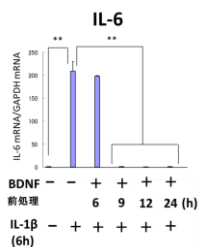
1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student's t-test *: $p < 0.05$)。

(2) Interleukin (IL) -1 β 刺激された HMVEC の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF 前処理の影響

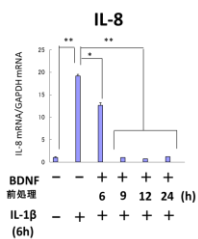
IL-1 β (10 ng/ml) 6 時間作用によって促進された IL-6、IL-8、MCP-1 の mRNA 発現は、BDNF 前処理 3 時間以上で非刺激時のレベルまで統計学的に有意に減少した (図 3)。さらに濃度 10 ng/ml 以上の BDNF 前処理 3 時間 (作用時間としては 9 時間) は、IL-1 β (10 ng/ml) 6 時間作用によって促進された IL-6、IL-8、MCP-1 の mRNA 発現を非刺激時のレベルまで統計学的に有意に抑制した (図 4)。

< 図 3 >

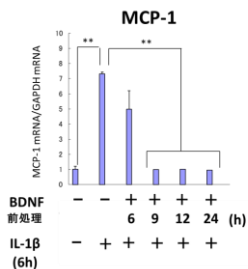
A



B



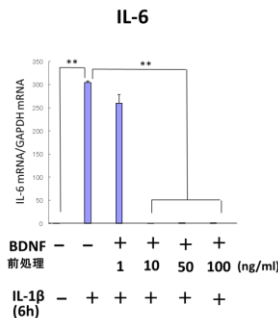
C



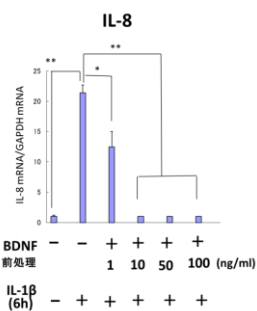
HMVEC 培養終了 6 時間前に IL-1 β (10 ng/ml) を作用させ、さらに IL-1 β 添加 0、3、6、18 時間前に BDNF (50 ng/ml) を HMVEC に作用させたときの IL-6 (A)、IL-8 (B)、MCP-1 (C) の mRNA 発現を Real-time PCR によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student's t-test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

< 図 4 >

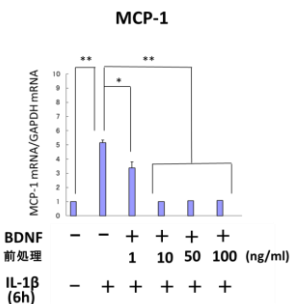
A



B



C



HMVEC 培養終了 6 時間前に IL-1 β (10 ng/ml) を作用させ、さらに IL-1 β 添加 18 時間前に BDNF (1, 10, 50, 100 ng/ml) を HMVEC に作用させたときの IL-6 (A)、IL-8 (B)、MCP-1 (C) の mRNA 発現を Real-time PCR によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student's t-test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

(3) HMVEC における ICAM-1 のタンパク質発現に及ぼす BDNF と IL-1 β の影響

1. 免疫染色法

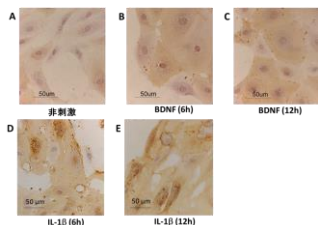
BDNF (50 ng/ml) 6 時間作用群、12 時間作用群は、非刺激群と比較して、ICAM-1 発現の著明な変化は認められなかった (図 5A, B, C)。一方、IL-1 β (10 ng/ml) 6 時間作用群、12 時間作用群では、非刺激群と比較して HMVEC の細胞膜に ICAM-1 の陽性反応の亢進を認めた (図 5A, D, E)。

2. Western blot 法

IL-1 β (12 時間作用) は 10~20 ng/ml まで

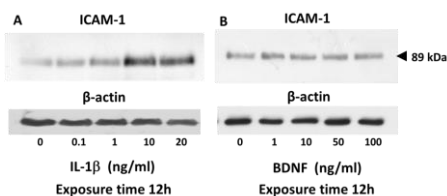
濃度依存的に ICAM-1 のタンパク質発現を促進した (図 6A)。BDNF (12 時間) 作用群は、すべての濃度で非刺激群と比較し、著明な ICAM-1 発現量の変化は認められなかった (図 6B)。

< 図 5 >



- A: 非刺激群
- B: BDNF (50 ng/ml) 6 時間作用群
- C: BDNF (50 ng/ml) 12 時間作用群
- D: IL-1β (10 ng/ml) 6 時間作用群
- E: IL-1β (10 ng/ml) 12 時間作用群

< 図 6 >



HMVEC に (A) IL-1β (0.1, 1, 10, 20 ng/ml) または (B) BDNF (1, 10, 50, 100ng/ml) を 12 時間作用させた。SDS サンプルバッファーを用いて細胞回収後 Western blot 法を行った。(A), (B)ともに上段に ICAM-1、下段に β-actin のバンドを示す。

(4) IL-1β 刺激された HMVEC の ICAM-1 発現に及ぼす BDNF 前処理の影響

1. Real-time PCR 法

ICAM-1 の mRNA 発現量は IL-1β (10 ng/ml) の 6 時間刺激によって増加した。その発現上昇は BDNF (50 ng/ml) の同時作用で減少傾向を示した。そして、BDNF 前処理 3 時間以上で統計学的に有意に減少した (図 7)。

2. 免疫染色法

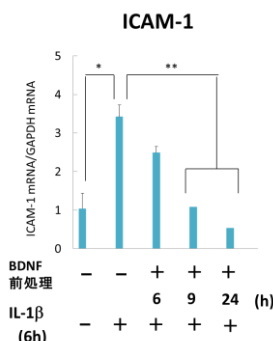
非刺激群と比較して IL-1β (10 ng/ml) 12 時間作用によって ICAM-1 の陽性反応は亢進した (図 8A, B)。その亢進は BDNF (50 ng/ml) の前処理 12 時間によって抑制された (図 8B, C)。

3. Western blot 法

ICAM-1 のタンパク質発現は非刺激群と比較して IL-1β (10 ng/ml) 12 時間作用によって増加した。その発現上昇は、BDNF (1, 10, 50 ng/ml) 前処理 12 時間によって濃度依存

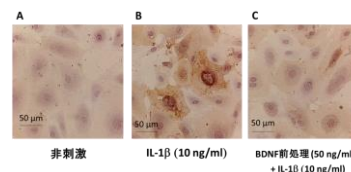
的に減少した。発現は定量化したグラフにおいても抑制傾向を示した (図 9)。

< 図 7 >



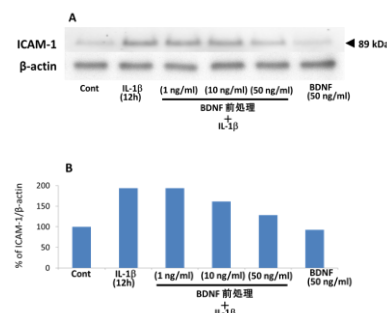
HMVEC 培養終了 6 時間前に IL-1β (10 ng/ml) を作用させ、さらに IL-1β 添加 0, 3, 18 時間前に BDNF (50 ng/ml) を HMVEC に作用させたときの ICAM-1 の mRNA 発現を Real-time PCR によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student's t-test *: p<0.05, **: p<0.01)。

< 図 8 >



- A: 非刺激群
- B: IL-1β (10 ng/ml) 12 時間作用群
- C: BDNF 前処理群 (IL-1β (10 ng/ml) 添加の 12 時間前に BDNF (50 ng/ml) を添加した。)

< 図 9 >

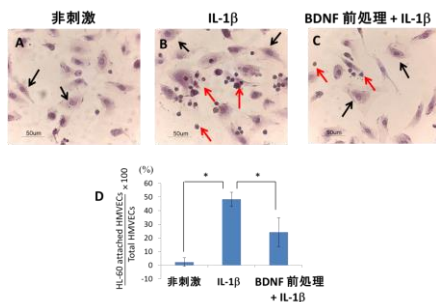


- A: ICAM-1 のタンパク質発現量は非刺激群と比較して IL-1β (10 ng/ml) 12 時間作用によって増加した。その発現上昇は、BDNF (1, 10, 50 ng/ml) 前処理によって濃度依存的に減少した。写真上段は ICAM-1、下段は β-actin のバンドを示す。
- B: Western blot 法の画像をコンピュータに取り込み Image J (NIH, USA) によって画像解析したグラフを示す。各値は 2 つの培養系の平均値を示す。

(5) IL-1 β 刺激された HMVEC に対する好中球様 HL-60 細胞の接着に及ぼす BDNF 前処理の影響

IL-1 β 刺激群では、非刺激群と比較すると好中球様 HL-60 細胞が周囲に集積した HMVEC が多く認められた (図 10A, B)。一方、BDNF 前処理群は、IL-1 β 刺激群と比較して、好中球様 HL-60 細胞が集積する HMVEC が減少していた (図 10B, C)。好中球様 HL-60 細胞の近接を伴う HMVEC の細胞数の割合は、非刺激群と比較し IL-1 β 刺激群では統計学的に有意に上昇していた。(図 10D)。その上昇を、BDNF 前処理群は統計学的に有意に抑制した (図 10D)。

< 図 10 >



- A: 非刺激群
B: IL-1 β (10 ng/ml) 刺激 12 時間
C: BDNF 前処理群 (IL-1 β (10 ng/ml) 添加の 4 時間前に BDNF (50 ng/ml) を添加した。)
D: グラフは、異なる 3 つの培養系で、各スライドあたり 300 μ m \times 300 μ m のエリアを 5 つランダムに選択した。そのエリア内の好中球様 HL-60 細胞が近接している HMVEC の細胞数をカウントし、エリア内の総 HMVEC 細胞数に対する割合を百分率で表した。
光学顕微鏡像の矢印 (黒) は HMVEC を、矢印 (赤) は好中球様 HL-60 細胞を示す。(A), (B), (C) Hematoxylin 染色。

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 2 件)

1. 脳由来神経栄養因子 (BDNF) はヒト血管内皮細胞の炎症性サイトカイン発現を制御する; 大日方 祐介, 武田克浩, 小西昭弘, 片桐菜穂子, 加治屋幹人, 藤田 剛, 柴 秀樹, 栗原英見; 第56 回春季日本歯周病学会学術大会 (2013 年5月31日, 東京)

2. BDNF regulates inflammatory cytokine expressions in human vascular endothelial

cells; 大日方祐介, 武田克浩, 小西昭弘, 片桐菜穂子, 加治屋幹人, 藤田 剛, 柴 秀樹, 栗原英見; 第46 回広島大学歯学会総会 (2013 年6月8日, 広島)

[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

武田 克浩 (Katsuhiko Takeda)
広島大学・医歯薬保健学研究院 (歯)・助教
研究者番号: 10452591

(2) 研究分担者

柴 秀樹 (Hideki Shiba)
広島大学・医歯薬保健学研究院 (歯)・教授
研究者番号: 60260668

(3) 連携研究者

()

研究者番号: