

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861812

研究課題名(和文) 歯根肉芽腫におけるmidkineの発現と機能的役割

研究課題名(英文) The expression and function of midkine in human periapical granulomas

## 研究代表者

羽鳥 啓介 (HATORI, Keisuke)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30632583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)： 歯根肉芽腫サンプルの蛍光二重免疫染色から歯根肉芽腫中の血管内皮細胞からmidkine(MK)、CXCL12、CXCL13およびCX3CL1の共発現が認められた。一方、健康歯肉ではその発現は認められなかった。Real time PCR法において、MKおよびchemokine遺伝子の発現は歯根肉芽腫中で健康歯肉に比べ、有意に高かった。また、刺激群では未処理群に比べ、MKとCX3CL1遺伝子の発現が有意に高かった。一方、CXCL12は刺激群で未処理群と比べ、その発現は有意に低かった。以上より、MKおよびchemokineは歯根肉芽腫の発症と遷延に関係する可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Two-color immunofluorescence image analysis indicate that co-expression of midkine(MK) and chemokine(CXCL12, CXCL13 or CX3CL1) in human periapical granulomas. Furthermore, MK and chemokines messenger RNA expression in periapical granulomas was significantly higher than healthy gingival tissues by real time PCR analysis. In addition, the MK and CX3CL1 mRNA expression in stimulated human vascular endothelial cells was significantly higher than negative control. On the other hand, CXCL12 mRNA expression was significantly lower than negative control. These data indicated the possibility that MK, CXCL12, CXCL13 and CX3CL1 related to pathogenesis and growth of human periapical granulomas.

研究分野：歯学

キーワード：midkine CXCL12 CXCL13 CX3CL1 血管内皮細胞 歯根肉芽腫

### 1. 研究開始当初の背景

近年、歯科医療の発展により、国民の歯の喪失は戦後と比較して、減少している。しかし、現在でも歯を喪失する患者は多く、その原因の1つに根尖性歯周炎が挙げられ、根尖性歯周炎の発生機序の解明は国民のQ.O.Lを向上させると考えられる。根尖性歯周炎は、感染根管に起因した炎症性細胞の遊走や骨吸収を伴う根尖周囲の炎症性疾患である。これまでに、根尖性歯周炎の病態解明を目的としてサイトカインや成長因子などの炎症性メディエーターの研究が行われてきたが、その詳細は未だに明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究ではmidkine(MK)に着目し、難治性根尖性歯周炎である歯根肉芽腫中で細胞遊走や破骨細胞分化を促進することによって、その発症に關与する可能性を着想した。MKは歯根肉芽腫中で発現し、その成因や遷延に深く関わりがあると考えられることから、申請者は歯根肉芽腫中でMKの発現の検討を行い、歯根肉芽腫中でMKの発現を証明した。しかし、その機能的役割についてはまだ明らかにされていない。

そこで申請者は、根尖病巣発症過程でMKが直接的または間接的に働き、免疫担当細胞の浸潤や骨吸収を惹起し、根尖性歯周炎の拡大に關与すると仮定し、その解明を目的とした。

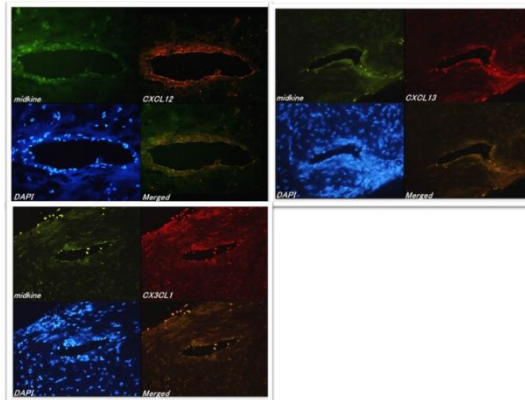
### 3. 研究の方法

歯根肉芽腫中でMKおよびchemokine発現の解析にはマウス抗ヒトMKモノクローナル抗体とヤギ抗ヒトchemokineポリクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的に行う。さらに、歯根肉芽腫サンプルからRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR法により、候補遺伝子の解析を行う。

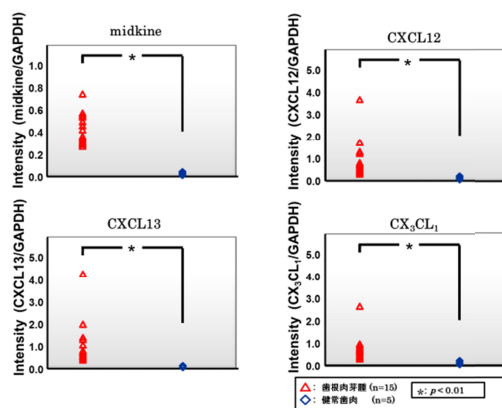
供試細胞を刺激するためのサイトカインには、TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  を用いる。供試細胞には、ヒト血管内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cells)とし、2%ウシ胎児血清を含む Endothelial cell basal medium-2 培地にて培養する。白血球の cell line である Daudi, Molt-4 および U-937 を、RPMI1640 培地にて 10%ウシ胎児血清を添加したものをを用いて培養する。供試細胞に炎症性サイトカインによる刺激を行い、MK および chemokine 遺伝子とタンパクの発現の解析を行う。その後、HUVEC と cell line の共培養を行い、MK による遊走能を解析する。

### 4. 研究成果

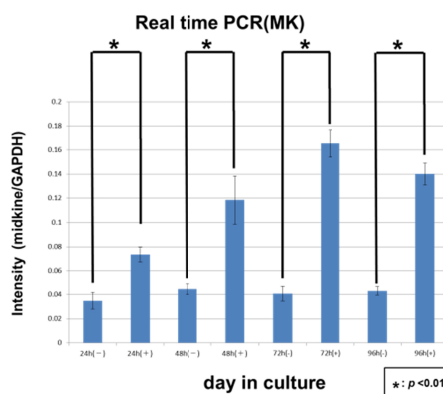
(1)免疫組織学的検索から、歯根肉芽腫中の血管内皮細胞において、MK、CXCL12、CXCL13 および CX3CL1 の共発現が認められた。



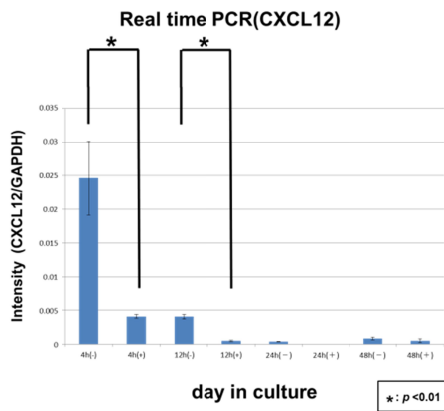
(2)Real-time PCR 法において、歯根肉芽腫中での MK および chemokine 遺伝子発現は健常歯肉と比較して、有意に高かった。



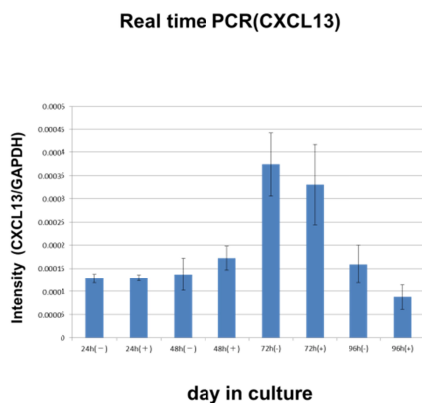
(3)培養した細胞を TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  および LPS を用いて、刺激し、その RNA を抽出後 real time PCR 法にて、経時的に MK、CXCL12、CXCL13 および CX3CL1 の遺伝子発現を検索した。その結果を下に示す。



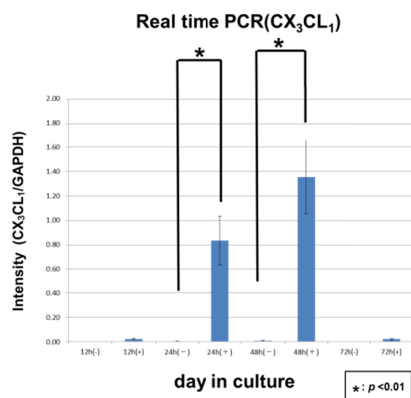
刺激した培養細胞において、MK 遺伝子は経時的に発現が上昇し、その発現はコントロールと比較して有意に高かった。また、刺激から 72 時間後に遺伝子発現はピークであった。



CXCL12 遺伝子は刺激した細胞において、コントロールと比較して、有意に減少した。



CXCL13 遺伝子は刺激した細胞とコントロール間において有意差は認められなかった。



刺激した培養細胞において、CX3CL1 遺伝子は経時的に発現が上昇し、その発現はコントロールと比較して有意に高かった。また、刺激から 48 時間後に遺伝子発現はピークであった。

## 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2件)

Makino K, Takeichi O, Hatori K, Imai K, Ochiai K, Ogiso B. Epstein-barr virus infection in chronically inflamed periapical granulomas. PLoS One, 査読

有り,10(4):e0121548.DOI:10.1371/journal.pone.0121548, 2015

Shimizu K, Matsumoto K, Noma N, Matsuura S, Ohara K, Komiya H, Watase T, Ogiso B, Tsuboi Y, Shinoda M, Hatori K, Iwata K. Involvement of trigeminal transition zone and laminated subnucleus caudalis in masseter muscle hypersensitivity associated with tooth inflammation., PLoS One, 査読有り,9(10):e109168. DOI: 10.1371/journal.pone.0109168,2014

[学会発表](計7件)

Hatori K, Takeichi O, Makino K, Ishii K, Komiya K, Maeno M, Ogiso B, Co-expression of Midkine and Chemokine in Human Periapical Granulomas (2015/3/12)., 93<sup>rd</sup> General Session and Exhibition of the International Association For Dental Research(Boston, USA)

Takeichi O, Makino K, Hatori K, Kudo H, Ogiso B, Inflammatory and Anti-inflammatory Reactions in Periapical Granulomas(2015/3/12)., 93<sup>rd</sup> General Session and Exhibition of the International Association For Dental Research (Boston, USA)

Makino K, Takeichi O, Hatori K, Kudo H, Imai K, Ochiai K, Ogiso B, The Evidence of the Epstein-Barr Virus Infection in Periapical Granulomas (2015/3/12)., 93<sup>rd</sup> General Session and Exhibition of the International Association For Dental Research (Boston, USA)

牧野公亮、武市収、羽鳥啓介、勝呂尚、今井健一、落合邦康、小木曾文内、歯根肉芽腫における Epstein-Barr virus の検出(2013/10/17)、第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会、秋田県総合生活文化会館(秋田県秋田市)

羽鳥啓介、武市収、牧野公亮、小木曾文内、歯根肉芽腫中の血管内皮細胞における midkine および chemokine 発現(2013/9/15)、第 6 回日本口腔検査学会総会・学術大会、鶴見大学会館(神奈川県横浜市)

武市収、牧野公亮、羽鳥啓介、小木曾文内、難治性根尖性歯周炎における midkine と iNOS 発現(2013/9/15)、第 6 回日本口腔検査学会総会・学術大会、鶴見大学会館(神奈川県横浜市)

Takeichi O, Makino K, Hatori K, Ogiso B, Midkine and iNOS expression by endothelial cells in periapical granulomas(2013/9/6)., 46<sup>th</sup> Meeting of the Continental European Division of International Association for Dental Research(Firenze, Italy)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽鳥 啓介 (HATORI, Keisuke)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30632583

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：