

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463133

研究課題名(和文)細胞由来マイクロパーティクルが歯周組織の恒常性に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effect of cell-derived microparticles on the homeostasis of periodontal tissue

研究代表者

柳田 学 (Yanagita, Manabu)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：80379081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症時に細胞から放出される細胞由来マイクロパーティクル(MP)が歯周組織構成細胞の恒常性に及ぼす影響について検討した。LPS、炎症性サイトカインによる刺激を受けた血管内皮細胞由来のMPは無刺激血管内皮細胞由来MPと比較してannexin、ICAM-1、HLA-DRの発現が高かった。また、細菌刺激、炎症性サイトカイン刺激を受けた血管内皮細胞由来MP存在下で、歯肉線維芽細胞からのIL-8産生は、無刺激血管内皮細胞由来MP存在下と比較して有意に高かった。以上のことから、炎症刺激を受けた細胞由来MPはそれ自体が起炎因子となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have examined the effect of cell-derived microparticles (MP) on homeostasis of gingival cells. Endothelial cell-derived microparticles (EMP) released from the cells with LPS or inflammatory cytokine expressed annexin, ICAM-1 and HLA-DR higher than EMP from the non-stimulated cells. IL-8 expression in human gingival fibroblasts in the presence of EMP released from the cells with LPS or inflammatory cytokine was significantly elevated compared with EMP from non-stimulated cells. These results suggested that MP released from cells stimulated with inflammatory stimulation could be inflammatory factor.

研究分野：歯周病学

キーワード：マイクロパーティクル

1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌バイオフィルムを形成する病原微生物の感染によって、歯周組織に慢性炎症が生じ、同組織が破壊される疾患である。そして、この局所炎症には免疫系の細胞のみならず、線維芽細胞、血管内皮細胞といった非免疫系細胞の関与も考えられている。これら cell type において、感染あるいは障害、アポトーシスをおこした際に微小粒子:細胞由来マイクロパーティクル (cell-derived microparticles:MP) と呼ばれる 0.1-1.5 μ m の細胞膜由来する小胞を放出し、細胞相互間の活性化に関わる可能性が近年報告されている。MP の形成過程とその役割を理解することは様々な疾患の病態解明に寄与するものとして注目されている。MP は敗血症やメタボリックシンドロームなどの急性・慢性炎症に伴い血中濃度が増加することが知られており慢性炎症性疾患である歯周炎患者においても末梢血液中あるいは歯周病病巣局所に MP が放出されていることが想定される。MP 表面には多くの炎症性接着因子が発現していることから、MP が歯周組織構成細胞と接触することで歯周組織構成細胞に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで本研究では MP が歯周炎の発症・病態形成にどのように関わっているか検討することとした。

2. 研究の目的

MP の中でも研究の進んでいる endothelial cell-derived microparticles (EMP) を精製分離して、その MP 刺激により歯肉線維芽細胞から誘導される炎症性サイトカイン・ケモカイン産生と、細胞表面抗原の変化に焦点を当て、MP による免疫機能制御に果たす役割を検討する。さらに、ヒト歯周炎病変部における MP の存在・濃度を歯肉溝滲出液より検出して、歯周炎慢性化と MP の関連性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

血管内皮細胞からの MP の精製分離

血管内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC) を用いた。HUVEC を無刺激、あるいは歯周病原性細菌 *P.gingivalis* の LPS (Pg-LPS) や炎症性サイトカインで刺激した後、MP を含む培養液から細胞残骸・破片・核を取り除くために 5,000g、10 分にて遠心し、その上清を回収した。それらを 20,000g、45 分間超遠心し、そのペレットを phosphate-buffered saline (PBS) で懸濁し、以後の研究に供する。

MP 表面抗原の検討

前項にて分離精製した MP における annexin, ICAM-1, VCAM-1, CD31, CD62E, HLA-DR 等の発現を FITC 標識あるいは PE 標識された抗体を用いてフローサイト

メトリー (FACS) にて解析する。

HUVEC 由来 MP の起炎因子としての可能性の検討

HUVEC 由来 MP の刺激により、HUVEC や歯肉線維芽細胞 (HGF) から誘導される IL-6、IL-8 の発現をリアルタイム PCR 法やサイトカイン特異的 ELISA 法を用いて測定する。また、細胞の活性化により発現誘導される細胞表面抗原の変化に関して、細胞接着分子である ICAM-1、VCAM-1、CD44 の発現を RT-PCR 法や FACS により検出する。

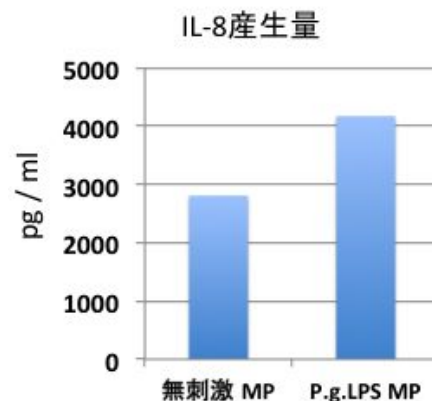
歯周炎病変部における MP の検出

歯周炎患者の歯肉溝より極細パスツールピペットにて歯肉溝滲出液を採取して、 に準拠して歯肉溝滲出液中に存在する MP の表面抗原の発現を検出する。

4. 研究成果

HUVEC を Pg-LPS、TNF- α で 24 時間刺激したのち、その上清を回収し、研究の方法に従って MP を回収した。Pg-LPS あるいは TNF- α で刺激して得られた MP は無刺激細胞の培養上清から得られた MP と比較して annexin、ICAM-1、HLA-DR 等の発現が高かった。

HGF を無刺激あるいは Pg-LPS、TNF- α で刺激して得られた MP で 8 時間あるいは 24 時間刺激して、HGF における炎症性サイトカイン mRNA 発現量、およびタンパク量を検討した。その結果、無刺激 MP と比較して Pg-LPS、TNF- α で刺激後の MP は HGF においてリアルタイム PCR 法にて IL-6、IL-8 の mRNA 発現、ELISA 法にてタンパク量が有意に増強していた。また、HGF 上の接着分子については ICAM-1 の発現が無刺激 MP と比較して Pg-LPS、TNF- α で刺激後の MP ではやや高い傾向を示したものの、有意な差は認めなかった。



歯周病患者の歯肉溝滲出液中の MP 分離を試みたが、サンプル量が微小であり、細胞表面分子の検討等を進めることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Kawahara T, Yamashita M, Ikegami K, Nakamura T, Yanagita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. TGF-beta negatively regulates the early commitment of periodontal ligament cells into hard tissue forming cells. PLoS One 2015. 10:e0125590.

Mori K, Yanagita M, Hasegawa S, Kubota M, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Necrosis-induced TLR3 activation promotes TLR2 expression in gingival cells. Journal of Dental Research 2015. 94:1149-1157.

Awata T, Yamada S, Tsushima K, Sakashita H, Yamaba S, Kajikawa T, Yamashita M, Takedachi M, Yanagita M, Kitamura M, Murakami S. PLAP-1/aspirin positively regulates FGF-2 activity. Journal of Dental Research 2015. 94:1417-1424.

Yamaba S, Yamada S, Kajikawa T, Awata H, Sakashita H, Tsushima K, Fujihara C, Yanagita M, and Murakami S. PLAP-1/asporin regulates inflammation through Toll-like receptors 2 and 4. Journal of Dental Research 2015. 94: 1706-14.

Yamada S, Ozaki N, Tsushima K, Yamaba S, Fujihara C, Awata T, Sakashita H, Kajikawa T, Kitagaki J, Yamashita M, Yanagita M, Murakami S. Transcriptome analysis reveals cathepsin K in human periodontal ligaments. Journal of Dental Research 2016.95:1026-1033.

Kubota M, Yanagita M, Mori K, Hasegawa S, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. The effects of cigarette smoke condensate and nicotine on periodontal tissue in a periodontitis model mouse. PLoS One 2016 11:e01555594.

Takedachi M, Iyama M, Sawada K, Mori K, Yamamoto S, Morimoto C, Yanagita M, Murakami S. HIF-1 inhibits IL-6 and IL-8 production in gingival epithelial cells during hypoxia. Journal of Periodontal Research 2017.52:127-134.

Miyauchi S, Kitagaki J, Masumoto R, Imai A, Kobayashi K, Nakaya A, Kawai S, Fujihawa C, Yamashita M, Yanagita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. SMPD3 enhances cytodifferentiation of periodontal ligaments. Journal of Dental Research 2017.96: 339-346.

〔学会発表〕(計12件)

久保田実木子、柳田学、森健太、長谷川詩織、山羽聡子、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也：マウス実験的歯周炎モデルにおけるタバコ煙濃縮物および

ニコチンの影響、第140回春季日本歯科保存学会、大津、2014/6/20.

Mori K, Yanagita M, Kubota M, Hasegawa S, Yamaba S, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. DAMPs via TLR3 expand inflammatory response with upregulation of TLR2 in human gingival epithelial cells. 100th American Academy of Periodontology Annual Meeting. San Francisco, USA, 2014/9/20.

長谷川詩織、柳田学、久保田実木子、森健太、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也：FGF-2存在下で分化した単球はM2マクロファージに類似した形質を有する、第141回秋季日本歯科保存学会、山形、2014/10/31.

Kubota M, Yanagita M, Mori K, Hasegawa S, Yamaba S, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Cigarette smoke condensate and nicotine destroy periodontal tissues. 第62回国際歯科研究学会日本部会学術大会、大阪、2014/12/5.

Yanagita M, Kubota M, Mori K, Hasegawa S, Yamaba S, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Cigarette smoke condensate and nicotine exacerbate periodontal tissue destruction in periodontitis-model mouse. 93th IADR. Boston, USA, 2015/3/13.

Hasegawa S, Yanagita M, Kubota M, Mori K, Yamaba S, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Cigarette smoke accelerates periodontal tissue destruction in mouse experimental periodontitis model. Europerio 8. London, UK, 2015/6/3.

久保田実木子、柳田学、長谷川詩織、森健太、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也：マウス実験的歯周炎モデルにおけるタバコ煙濃縮物およびニコチンの影響、第58回秋季日本歯周病学会、浜松、2015/9/11.

森健太、柳田学、久保田実木子、長谷川詩織、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也 歯肉上皮細胞におけるTLR3を介したTLR2発現上昇の機構、第143回秋季日本歯科保存学会、東京、2015/11/13.

長谷川詩織、柳田学、久保田実木子、山下元三、北村正博、村上伸也：アロマトータゼ阻害薬が歯周組織構成細胞に及ぼす影響、第59回春季日本歯周病学会、鹿児島、2016/5/20.

久保田実木子、柳田学、長谷川詩織、森健太、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也：マウス実験的歯周炎モデルにおけるタバコ煙濃縮物およびニコチンの

影響、第 144 回春季日本歯科保存学会、宇都宮、2016/6/9.

久保田実木子、柳田学、長谷川詩織、辰巳真理、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也：タバコ煙濃縮物およびニコチンの全身投与がマウス実験的歯周炎の病態形成に及ぼす影響、第 145 回秋季日本歯科保存学会、松本、2016/10/28.

三木康史、山下元三、柳田学、北村正博、村上伸也：歯根膜細胞における非神経性コリン作動系の発現、第 145 回秋季日本歯科保存学会、松本、2016/10/28.

〔図書〕(計 1 件)

柳田学、村上伸也. 歯周病に伴う歯周組織破壊と治療の最前線 ; Clinical Calcium 26、p751-757, 2016.

〔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

柳田 学 (YANAGITA MANABU)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：80379081

(2) 研究分担者

山下元三 (YAMASHITA MOTOZO)
大阪大学大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90524984

竹立匡秀 (TAKEDACHI MASAHIDE)
大阪大学大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60452447

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし