

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861808

研究課題名(和文)新規イオンチャネルTRPV1が歯周炎病態形成に及ぼす影響

研究課題名(英文)The Effect of TRPV1 channel in the pathogenesis of periodontitis.

研究代表者

高橋 直紀(Takahashi, Naoki)

新潟大学・医歯学系・特別研究員

研究者番号：80722842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉上皮細胞は、物理的なバリアとして機能するだけでなく、細菌に対して免疫応答を誘導することで生体防御の最前線として重要な役割を果たす。近年同定された新規イオンチャネルであるTRPチャネルタンパクは炎症性疾患への関与も報告されている。本研究において、歯肉上皮細胞にTRPV1が遺伝子レベル・タンパクレベルで発現していることが確認され、TRPV1を介したシグナリングが細胞増殖能に関与していることが明らかとなった。これらのことより、歯周炎の病態形成におけるこれらのタンパクの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：TRPV1, a member of the calcium-permeable thermosensitive transient receptor potential super family, is a sensor of thermal and chemical stimuli. TRPV1 was recently found to be expressed by non-neuronal cells, such as epithelial cells. The oral gingival epithelium is exposed to multiple noxious stimuli, including heat and acids derived from endogenous and exogenous substances; however, whether gingival epithelial cells (GECs) express TRPV1 is unknown. We show that both TRPV1 mRNA and protein are expressed by GECs. Capsaicin, a TRPV1 agonist, elevated intracellular Ca²⁺ levels in the gingival epithelial cell line, epi 4. Moreover, TRPV1 activation in epi 4 cells accelerated proliferation. These responses to capsaicin were inhibited by a specific TRPV1 antagonist, SB-366791. We also observed GEC proliferation in capsaicin-treated mice in vivo. Our results suggest that functional TRPV1 is expressed by GECs and contribute to the regulation of cell proliferation.

研究分野：歯周病

キーワード：歯肉上皮細胞 イオンチャネル TRPV1 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

歯周炎による影響は口腔内局所のみにとどまらず、動脈硬化性疾患、誤嚥性肺炎や糖尿病等の重篤な全身疾患のリスクファクターであることが多くの疫学調査および動物実験によって明らかにされている。我々はこれまでに、歯周炎モデルマウスを用いた実験系において、歯周病原細菌の口腔内投与が脂質代謝異常を介して動脈硬化を促進することを報告した (Takahashi, Maekawa *et al.*, PLoS One, 2011)。物理的なプラークコントロールに加え、より効果的な生物学的予防法・治療法の確立が強く望まれる。

歯周ポケット内のバイオフィルムに対峙する歯肉上皮細胞は、物理的なバリアとしての機能を担うだけでなく、細菌の付着にตอบสนองして炎症性サイトカインやケモカインを産生することで免疫応答の誘導に積極的な役割を果たすことが知られている。生体防御の最前線に位置する歯肉上皮細胞の生物学的機能を明らかにすることは歯周炎の病態形成メカニズムの解明につながると考えられる。

近年同定された Transient receptor potential (TRP) タンパクは電気生理学的な解析により陽イオンチャネルとして機能することが明らかとなり、その後、多くの TRP ホモログが同定されるとともに、全身の臓器、組織、細胞に広く発現していることが報告されている。現在 TRP チャネルは、アミノ酸配列や分子構造の違いから7つのサブファミリーに分類され、またそれぞれのサブグループは更に細分化されている。TRP チャネルタンパクは、温度、機械刺激、化学刺激、浸透圧、酸などによって活性化されることが確認されており、感覚センサーとして機能するユニークなチャネルタンパクであることが知られている。

最も盛んに研究が進んでいる TRPV ファミリーに属する Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) は、唐辛子の辛味成分である Capsaicin や酸、43 度以上の熱刺激によって活性化され、細胞内に流入するカルシウムイオンをセカンドメッセンジャーとして、細胞の増殖・分化、炎症応答、細胞死の制御に関与していることが報告されている。近年では、気管支喘息や、炎症性腸疾患における TRPV1 の関与が報告されており、炎症性疾患の病態形成における TRPV1 の関与が大きな注目を集めているが、歯肉上皮細胞におけるこれら TRP チャネルファミリーの発現およびその機能に関してはこれまでにほとんど報告がない。

2. 研究の目的

歯肉上皮細胞における TRPV1 の機能を *in vivo* と *in vitro* から体系的に解析を行うことで歯周炎の病態形成におけるこのタンパクの関与を解明する。

3. 研究の方法

歯周炎モデルマウスにおける TRPV1 を介した細胞増殖能および炎症応答の評価 (*in vivo* における解析)

(1) 野生型マウスと TRPV1 ノックアウトマウスにおける比較検討

我々が以前確立した歯周炎モデルマウスの方法を参考に、*P. gingivalis* の口腔内感染を行う。8 週齢の野生型マウスと TRPV1 ノックアウトマウスに *P. gingivalis* 全菌体を 3 日に 1 度、計 10 回、フィーディングニードルを用いて経口的に感染させる。感染終了時に安楽死させ、サンプルの回収、解析を行う。マイクロ CT による歯槽骨吸収を測定、歯肉組織を採取し mRNA を抽出し、各種炎症性サイトカイン (IL-1、TNF- α)・ケモカイン (IL-8、MCP-1) の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析する。歯槽骨吸収量と炎症性サイトカイン発現の違いにより歯周炎の重症度を比較検討する。また歯周組織の脱灰組織標本を作製し、細胞増殖マーカーである Ki67 および PCNA の免疫組織染色による細胞増殖の評価を行う。

(2) 野生型マウスへの TRPV1 アゴニスト、アンタゴニスト投与による比較検討

TRPV1 のアゴニスト (Capsaicin)、アンタゴニスト (SB-366791) を飲料水もしくは食餌に混和して投与後、前述と同じ方法で *P. gingivalis* の口腔内感染を行い、同様の解析を行う。

歯肉上皮細胞における TRPV1 を介した細胞増殖能および炎症応答の評価 (*in vitro* における解析)

(1) MTT assay による細胞増殖能の解析

TRPV1 アゴニストにて培養細胞を刺激し、24、48、72 時間後に MTT 溶液を加えてインキュベートし、吸光度測定により細胞増殖能を解析する。

(2) Wound healing assay による細胞増殖能の解析

培養細胞をピペットの先で線状に剥離し、TRPV1 アゴニストを添加し 12、24、36 時間後、顕微鏡下で剥離部への細胞の遊走・増殖を画像解析し、比較検討を行う。

(3) 細胞内カルシウムイオンのモニタリング
カルシウムイオンはセカンドメッセンジャーとして細胞の増殖や分化に関与していることが一般的に知られており、TRPV1 アゴニストによる細胞刺激時の細胞内へのカルシウムイオンの流入量を、Fura2 を用いた蛍光カルシウムイメージング法により経時的に観察する。

(4) DNA マイクロアレイを用いた細胞増殖関連候補遺伝子の探索

TRPV1 を介した細胞増殖を引き起こすメカニズムを検討する目的で、TRPV1 アゴニストで刺激 4 時間後に mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析により、刺激により変動した細胞増殖関連遺伝子の網羅的な検索を行う。

4. 研究成果

歯周炎モデルマウスにおける TRPV1 を介した細胞増殖能および炎症応答の評価(*in vivo* における解析)

(1)野生型マウスと TRPV1 ノックアウトマウスにおける比較検討

より炎症性骨吸収が誘導しやすい歯牙結紮歯周炎モデルを用い検討を行ったところ、野生型に比較し TRPV1 ノックアウトマウスにおいては骨破壊が有意に重度であることが確認された。歯肉組織における炎症性サイトカインおよびケモカインの遺伝子発現は、一部傾向が認められた。

(2)野生型マウスへの TRPV1 アゴニスト、アンタゴニスト投与による比較検討

TRPV1 のアゴニストとして Capsaicin を 200ppm の濃度で食餌に混和し、計 14 日間与えた。肉眼的な所見および体重の変化には異常は認めなかった。Capsaicin 投与群と非投与群に歯牙結紮による歯周炎を惹起し、歯槽骨吸収レベルを検討したところ、投与群は非投与群に比較し、有意に骨破壊が減少したことが確認された。また、細胞増殖能を評価する目的で BrdU をマウスに投与し、経時的な上皮細胞の増殖をモニタリングしたところ、Capsaicin 投与群においては BrdU 陽性細胞数の増加が認められた。さらに細胞増殖マーカーである PCNA の陽性細胞数も有意に増加することが確認された。

歯肉上皮細胞における TRPV1 を介した細胞増殖能および炎症応答の評価(*in vitro* における解析)

(1)MTT assay による細胞増殖能の解析

TRPV1 アゴニストである Capsaicin にて培養細胞を刺激し、MTT assay にて細胞増殖能を解析したところ、未刺激群と比較して有意に細胞増殖能が増加した。また、TRPV1 のアンタゴニストである SB-366791 にて前処置するとその細胞増殖能が抑えられることより、TRPV1 依存的に細胞増殖が制御されることが示唆された。

(2)Wound healing assay による細胞増殖能の解析

MTT assay と同様に、Capsaicin 刺激により細胞の増殖・遊走が確認され、SB-366791 の前処置によりその効果が有意に抑制された。

(3)細胞内カルシウムイオンのモニタリング

Capsaicin 刺激 1 分後の Fluo-4 の蛍光強度をプレートリーダーにて測定したところ、Capsaicin の濃度依存的に蛍光強度の増加が確認された。これらのことから TRPV1 がカルシウムイオンチャネルとして機能していることが確認された。

(4)DNA マイクロアレイを用いた細胞増殖関連候補遺伝子の探索

Capsaicin の刺激の有無による遺伝子発現の変動を網羅的に確認したところ、刺激によって 227 遺伝子が有意に増加し、232 遺伝子が有意に減少した。それらの中から細胞増殖に關与する遺伝子をピックアップし、リアルタイム PCR 法にて再現性を確認したところ、FGF-17 および NRG2 が有意に変動することが明らかとなった。

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 6 件)

Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Sato K, Ohno H, Yamazaki K. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. J Periodontal Res. In press. doi: 10.1111/jre.12344. (査読あり)

Minagawa T, Okui T, Takahashi N, Nakajima T, Tabeta K, Murakami S, Yamazaki K. Resveratrol suppresses the inflammatory responses of human gingival epithelial cells in a SIRT1 independent manner. J Periodontal Res. 2015 Oct;50(5):586-93. doi: 10.1111/jre.12238. (査読あり)

Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, Ohno H, Yamazaki K. Oral Administration of *P. gingivalis* Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver. PLoS One. 2015 Jul 28;10(7):e0134234. doi: 10.1371/journal.pone.0134234. (査読あり)

de Jong PR, Takahashi N, Peiris M, Bertin S, Lee J, Gareau MG, Paniagua A, Harris AR, Herdman DS, Corr M, Blackshaw LA, Raz E. TRPM8 on mucosal sensory nerves regulates colitogenic responses by innate immune cells via CGRP. Mucosal Immunol. 2015 May;8(3):491-504. doi: 10.1038/mi.2014.82. (査読あり)

Takahashi N, Matsuda Y, Yamada H, Tabeta K, Nakajima T, Murakami S, Yamazaki K. Epithelial TRPV1

Signaling Accelerates Gingival Epithelial Cell Proliferation. J Dent Res. 2014 Nov;93(11):1141-7. doi: 0.1177/0022034514552826. (査読あり)

de Jong PR, Takahashi N, Harris AR, Lee J, Bertin S, Jeffries J, Jung M, Duong J, Triano AI, Lee J, Niv Y, Herdman DS, Taniguchi K, Kim CW, Dong H, Eckmann L, Stanford SM, Bottini N, Corr M, Raz E. Ion channel TRPV1-dependent activation of PTP1B suppresses EGFR-associated intestinal tumorigenesis. J Clin Invest. 2014 Sep 2;124(9):3793-806. 2014. doi: 10.1172/JCI72340. (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Tabeta K, Yamazaki K : Neuronal TRPV1 activation regulates alveolar bone resorption by osteoclasts via CGRP : 63rd Annual meeting of JADR, Fukuoka, October 30, 2015.

Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Yamada H, Tabeta K, Yamazaki K : Neuronal TRPV1 prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis mice model. 11th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Bali, Indonesia, October 8-9, 2015.

高橋直紀、有松圭、中島麻由佳、松田由実、佐藤圭祐、多部田康一、中島貴子、加藤完、大野博司、山崎和久：歯周炎モデルマウスにおける腸内細菌叢の変動と免疫応答への影響。第 19 回腸内細菌学会、東京都港区 北里大学、2015 年 6 月 18 日。

Takahashi N, Matsuda Y, Yamada H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K : Epithelial TRPV1 signaling accelerates gingival epithelial cell proliferation. : 62nd Annual meeting of JADR, Osaka, December 4-5, 2014.

Takahashi N, Matsuda Y, Tabeta K, Yamazaki K : TRPV1 Signaling Accelerates Cell Proliferation of Gingival Epithelial Cells . 92nd General session of the IADR, Cape Town, South Africa, June 25-28, 2014.

高橋直紀、松田由実、山田ひとみ、中島貴子、多部田康一、村上伸也、山崎和久：歯肉上皮細胞におけるカプサイシン受容体 TRPV1 の発現および機能解析。日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会(第 140 回)、滋賀県大津市 滋賀県立芸術劇場、2014 年 6 月 19 日。

〔図書〕(計 1 件)

高橋直紀、山崎和久、シーエムシー出版、第 編 口腔細菌と疾患 第 14 章 腸内細菌叢への影響。「バイオテクノロジーシリーズ 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患」、2015、P195-203

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 直紀 (TAKAHASHI, Naoki)
新潟大学・医歯学系・特別研究員
研究者番号：8 0 7 2 2 8 4 2