

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861809

研究課題名(和文)薬剤性歯肉増殖症における病態ネットワーク解析

研究課題名(英文) Changes in biomarkers after initial periodontal treatment in gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontitis presenting with drug-induced gingival overgrowth

研究代表者

清水 太郎 (SHIMIZU, TARO)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：60609121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マルチプレックスサスペンションシステムを用いて歯肉増殖症の歯肉溝浸出液を採取して、そのメカニズム解析を行った。その結果歯肉増殖症部位で特異的に発現した12個の因子(細胞増殖因子・細胞接着因子・炎症性サイトカイン)、またこれらの因子間の関連性について調べた。我々の研究結果からGOでは、Interleukin (IL)-1 and TGF- $\beta$ 1は有意に強く発現し、また T. denticola菌との関連性も高いことが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to simultaneously quantify the levels of 14 biomarkers in gingival crevicular fluid (GCF) samples from sites with both gingival overgrowth (GO) and chronic periodontitis (CP) by multiplex immunoassays. In addition, we examined the relationship between the subgingival microbiota and GCF biomarkers before and after therapy. we used a multiplex bead immunoassay to detect levels of 12 biomarkers including IL-1 and TGF- $\beta$ 1 in GCF from GO, and we also clarified the presence and quantity of T. denticola from the same sites.

研究分野：医歯学

キーワード：歯肉増殖症 歯肉溝浸出液 マルチプレックスサスペンション

## 1. 研究開始当初の背景

近年の急速な社会人口高齢化は、歯周病や高血圧症といった生活習慣病の増加を招いている。それに伴い、降圧剤を服用する歯周炎患者も増え、歯肉の線維性増殖と炎症を伴う Ca 拮抗薬剤性歯肉増殖症 (GO) の増加につながっている。これまでに歯肉増殖症については、*in vitro* (Salo et al. *J Oral Pathol Med* 1990, Johnson et al. *J Oral Pathol Med* 2003) や動物実験での報告 (Kataoka et al. *J Periodontol* 2001, Spolidorio et al. *J Periodont Res* 2003) がなされている。また、当講座においても遺伝子発現 (Kubota et al. 2008) や遺伝子多型 (Ogino et al. 2005) の側面から解析が続けられてきたが、未だ病因究明には至っていないため着目した。当講座では、歯周炎の病因を解明すべく、かねてより歯周組織の代謝で最も重要といわれる matrix metalloproteinases (MMPs) 及びそのインヒビターである tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) のバランスに着目し研究してきた (Nomura et al. 1993, Kubota et al. 1996, 1997, 2004, 2008, 2009, Itagaki et al. 2004)。

当講座もそれら研究をさらに発展させ、GO 組織において TIMP-3, -4 が遺伝子およびタンパクレベルで上昇していることを報告している (Nakasone et al. 2009)。また GO 罹患歯肉組織中の全 RNA 遺伝子 (Transcriptome) をマイクロアレイにより網羅的に解析して、GO の発症に MMP-1 を始めとする炎症関連遺伝子が関与していることを明らかにした (Shimizu et al. *Arch Oral Biol* 2011)。

現在まで GO に関する GCF 中のタンパク

質を網羅的に解析した研究は少ない。また、唾液の GCF での研究は数種類のサイトカイン等を各々調べたものに過ぎず、包括的な報告は皆無であった。

## 2. 研究の目的

降圧薬として用いられる Ca 拮抗薬は GO を誘発することが知られている。本研究では、Ca 拮抗薬剤性歯肉増殖症罹患歯肉の歯肉溝滲出液 (GCF) におけるサイトカイン、細胞接着因子、細胞増殖因子、マトリックスメタルプロテアーゼ、Ca イオンチャネル分子の発現量を測定し、更に細菌との関連性について各種因子間の相関関係を解析することを目的とする。また、それらが GO の病態形式に關与する機序を検証する。

## 3. 研究の方法

インフォームドコンセントが得られた被験者 (GO 患者) から GCF を採取する (GO 部位・慢性歯周炎 (CP) 部位)。具体的にはペリオペーパーを歯肉溝あるいは歯周ポケットに静置し (30 秒×4 回) GCF を採取する (Shimada et al. 2010)。採取した GCF を含むペリオペーパーはペリオトロン®で定量した後 PBS に浸漬する。10 分間振盪、12000rpm で 10 分間遠心分離、上清を回収し、測定まで凍結保存する。

凍結保存した GCF をマルチプレックス・サスペンションアレイ・システム (MSAS) 解析で各検体から 18 項目の関連因子 (サイトカイン、細胞接着因子、細胞増殖因子、マトリックスメタルプロテアーゼなど) のタンパクレベル・炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカイン (Interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p40, p70) ・細胞接着因子 : intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ・細胞増殖因子 :

Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) Fiboblast growth factor (FGF-basic)・マトリックスメタルプロテアーゼ：MMP-1, MMP-3・イオンチャンネル因子：VRPV-1, -2, -3, -4を解析する。

1) 治療前の GO と CP、2)GO 治療前後の比較検討を行う。また、GO 部位と CP 部位において PCR-Invader 法による歯周病原細菌検査も行い、細菌叢と定量された関連因子との相関関係も明らかにする。

#### 4. 研究成果

この研究はマルチプレックスを用いて歯周初期治療における GCF 中の広範囲サイトカインと MMP s 定量的に効果的に解析された。

いくつかの選定した因子において歯肉増殖症と関連を示した (図 1)。



図 1 GCF 採取

GO 部位の治療前後比較において Interleukin (IL)-1beta, Transforming growth factor (TGF)-beta は有意に減少傾向を示した (Mann-Whitney U test 解析)。更に GO 部位と CP 部位比較においては、GO で IL-1alpha, IL-1beta, IL-8 が増加傾向を示した。また GO 部位の IL-8, VEGF-A が高く発現傾向を示した (図 2)。(Mann-Whitney t-test: P>0.2)

	GO			CP			*Intragroup comparison at baseline P-value
	Baseline	After	P-value	Baseline	After	P-value	
IL-1a	799.1 [1191.2]	683.4 [629.7]	0.25	332.7 [795.7]	370.7 [607.1]	0.48	0.38
IL-1β	73.9 [120.0]	53.8 [68.2]	0.02	46.3 [78.8]	23.6 [33.6]	0.79	0.18
IL-6	2.0 [2.1]	1.2 [1.7]	0.21	1.8 [3.2]	1.8 [0.6]	0.42	0.67
IL-8	218.8 [155.0]	222.0 [112.7]	0.66	161.1 [171.8]	106.5 [94.1]	0.33	0.97
ICAM-1	2007.3 [2856.1]	2157.3 [557.7]	0.42	2255.0 [3246.7]	2038.8 [2310.5]	0.92	0.72
MMP-1	71.0 [92.5]	108.1 [76.8]	0.48	69.3 [52.0]	63.6 [90.2]	0.66	0.92
MMP-3	214.4 [395.0]	206.4 [326.5]	0.48	202.5 [178.1]	91.4 [108.7]	0.13	0.20
MMP-12	142.1 [338.6]	322.5 [370.9]	0.13	231.2 [377.0]	109.1 [162.3]	0.51	0.40
MMP-13	611.6 [3143.6]	1444.0 [2742.7]	0.79	1073.4 [1780.8]	811.9 [1582.1]	0.29	0.72
TGF-β	4.4 [5.6]	3.1 [3.1]	0.01	4.1 [5.1]	1.7 [1.3]	0.29	0.49
TNF-α	1.3 [0.6]	1.8 [1.2]	0.79	1.8 [2.4]	1.4 [1.2]	0.88	0.53
VEGF-A	6.6 [9.9]	7.1 [8.1]	0.25	6.3 [6.7]	6.7 [4.9]	0.33	0.41

図 2 治療前後のタンパク質レベル

この結果、これまでの報告と類似していた。また細菌検査では治療前 GO 部位と治療前 CP 部位の比較において 3 菌種のうち *Treponema denticola* 菌が GO 部位で多く検出された。この結果はこれまでの細菌と歯肉増殖症との関連報告と同様のものであった (図 3)。

	GO			CP			*Intragroup comparison P-value
	Baseline	After 4 weeks	P-value	Baseline	After 4 weeks	P-value	
Total bacterial amount	5.3 (0.6)	4.8 (0.6)	0.17	4.8 (0.4)	4.6 (0.5)	0.31	0.43
<i>P. gingivalis</i> (log <sub>10</sub> )	0.5 (1.8)	0.5 (0.0)	0.66	0.50 (0.0)	0.50 (0.0)	0.08	0.55
<i>T. forsythii</i> (log <sub>10</sub> )	2.50 (2.9)	2.10 (2.5)	0.37	2.40 (2.0)	0.50 (1.0)	0.08	0.21
<i>T. denticola</i> (log <sub>10</sub> )	2.10 (1.8)	1.70 (1.6)	0.52	0.50 (0.9)	0.50 (0.0)	0.16	0.04
<i>P. gingivalis</i> ratio (%)	0.00 (0.0)	0.00 (0.0)	0.66	0.00 (0.0)	0.00 (0.0)	0.08	0.66
<i>T. forsythii</i> ratio (%)	0.41 (0.78)	0.16 (0.31)	0.32	0.08 (0.29)	0.00 (0)	0.04	0.35
<i>T. denticola</i> ratio (%)	0.04 (0.08)	0.04 (0.02)	0.65	0.00 (0)	0.00 (0)	0.25	0.28

図 3 治療前後の細菌検査

以上の結果を踏まえて国際学会 (第 98 回 American Academy of Periodontology) にて発表を行い、因子間のネットワークや相互作用、過剰な増殖細胞増幅のメカニズムについてまたまた上で、open journal stomatology (February 29, 2016)に論文として報告した。

#### 5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Taro Shimizu, Takehiko Kubota, Masanori Iwasaki, Toshiya Morozumi, Hiromasa Yoshie. Changes in biomarkers after initial periodontal treatment in gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontitis presenting with drug-induced gingival overgrowth. open journal stomatology. 査読有、February 29, 2016. DOI: 10.4236/ojst.2016.62008.

[学会発表] (計 1 件)

① Taro Shimizu, Takehiko Kubota, Masanori Iwasaki, Toshiya Morozumi, Naohiro Nakasone, Hiromasa Yoshie. 第98回 American Academy of Periodontology. September 29-October 2, 2012. Los angeles (USA).

[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：  
出願年月日：  
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

清水 太郎 (SHIMIZU, TARO )  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号： 60609121