

平成21年5月8日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390561  
 研究課題名（和文）新規炎症調節物質（ANAとHMGB-1）を軸とした歯周病態形成機構の解明と制御  
 研究課題名（英文）Elucidation and reguration of the periodontal disease progression mechanism based on new inflammation adjustments (ANA and HMGB-1).  
 研究代表者 和泉 雄一（IZUMI YUICHI）  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
 研究者番号：60159803

研究成果の概要：(200字)

歯周炎の疾患進行における、新規炎症メディエーターであるアナンダマイド(ANA)と High Mobility Group Box-1(HMGB-1)に関する研究を行った。ANAは神経性物質であり、神経末端から放出される。このANAは歯周炎局所で発現が亢進しており、歯周炎疾患進行において神経機構が関与している可能性が示唆された。HMGB-1は核内では転写因子として働き、細胞外では起炎性物質として働く。HMGB-1の歯周組織での発現が認められ、疾患進行に関与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病、HMGB-1、アナンダマイド、炎症

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病の病態は、プラーク細菌が歯頸部に付着した後に引き続いて起こる歯肉や歯根膜の炎症性病変と歯槽骨の吸収があげられる。特に、歯周病原性細菌として重要なグラム陰性嫌気性菌の持つエンドトキシン(LPS)が歯周組織内での炎症性サイトカイン産生を誘導し、炎症性病変を誘発している。これまでの研究から、LPSは、CD14、Toll Like

Receptor-4 (TLR-4)を介して、NF- $\kappa$ Bを活性化し、炎症性サイトカインなどの炎症メディエーターを産生し、歯周組織の破壊に繋がっている事が明らかとなった。近年、LPSショックの研究から、新規炎症メディエーターとして、アナンダマイド(ANA)とHigh Mobility Group Box Chromosomal Protein-1 (HMGB-1)が発見された。ANAは、感染症の早期メディエーターとして、HMGB-1は、後期メディエ

ターとして注目されている。しかしながら、歯周炎局所における両者の発現や役割は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ANA と HMGB-1 の歯周炎局所での発現を検討し、歯周病の病態との関連、*in vitro* での歯周病態形成メカニズムでの役割・機能について明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 慢性歯周炎患者及び健常者から歯肉溝滲出液 (GCF) をペリオペーパーにて採取。歯肉溝滲出液中の HMGB-1 量を Western Blot 法にて測定した。また、アナンダマイド量を HPLC 法にて測定した。臨床症状を測定し、疾患進行との関連を調べた。

(2) HMGB-1 の歯周組織での発現メカニズムを調べる目的で、ヒト歯肉線維芽細胞を歯周病原細菌由来 LPS にて刺激し HMGB-1 の放出メカニズムを検討した。

(3) HMGB-1 の細胞外での役割を検討するために、歯根膜細胞を HMGB-1 にて刺激し、産生されるサイトカインについて検討した。

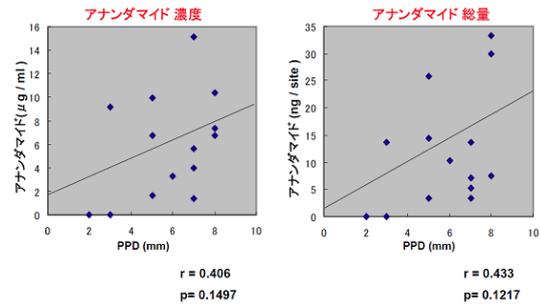
## 4. 研究成果

(1) 健常人の GCF 中には HMGB-1 は認められなかったが、歯周炎患者の GCF 中に HMGB-1 が認められた。しかしながら、ポケット深さと GCF 中の HMGB-1 量には有意な相関は認められなかった。

アナンダマイドは、初診時の歯周炎患者において、GCF 中にその発現が認められた。この患者群において、ポケット深さとアナンダマイド量には正の相関がみとめられた<図 1>。しかしながら、メンテナンス時でのサンプリングでは、ポケット深さと GCF 中のアナンダマイド量との間に相関は認められなかった。

アナンダマイドは、メンテナンス時においてプロービング時の出血 (+) 部位では (-) 部位に比べて有意に低い値を示した。

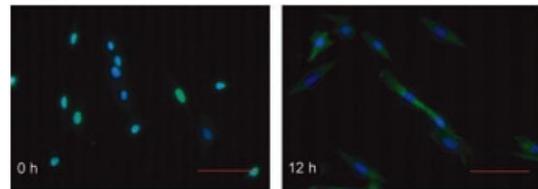
アナンダマイドは歯周病態の悪化とともにポケット内の総量が増加すること、また、歯肉の出血に関与していることが示唆された。



<図 1>アナンダマイドと歯周ポケット深さの関係

(2) ヒト歯肉線維芽細胞を歯周病原細菌由来 LPS を用いて刺激したところ、遺伝子レベルでの変化が見られないにも関わらず、細胞外での HMGB1 の蛋白レベルが濃度・時間依存的に誘導された<図 2>。さらに歯肉線維芽細胞にアポトーシス、ネクローシスを誘導すると、いずれの細胞死によっても HMGB1 の細胞外への放出が増強されることが明らかとなった

歯肉線維芽細胞が歯周組織での HMGB1 放出の重要な源の一つであることが示された。



<図 2>HGF を A. a. LPS にて刺激。緑色が HMGB-1 を表す。

(3) HMGB1 刺激により、ヒト歯根膜細胞は濃度・時間依存的に IL-6 及び IL-11 を産生した。さらに歯根膜細胞上に、HMGB1 のレセプターである RAGE, TLR2, TLR4 受容体の存在が確認された。これらのレセプターに対する中和抗体を用いたところ、どの中和抗体に対しても IL-6、IL-11 産生は抑制された

細胞外へ放出された HMGB1 が RAGE, TLR2, TLR4 などの受容体を介して歯根膜細胞に働き炎症性サイトカインの産生を上昇させ、歯周病態の形成に関与していることが示唆された。

## 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 29 件)

1. Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, Komaki M, Machigashira M, Ishikawa I, Izumi Y.

- Human gingival fibroblasts release HMGB1 through active and passive pathways. *Oral Microbiol Immunol* 24:1-7, 2009
2. Bando Y, Noguchi K, Kobayashi H, Yoshida N, Ishikawa I, Izumi Y. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 is involved in vascular endothelial growth factor production in interleukin-1 $\alpha$ -stimulated human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 44(3):395-401, 2009
  3. Soejima H., Oe Y., Nakayama, H., Matsuo K., Fukunaga T., Sugamura K., Kawano H., Sugiyama S., Shinohara M., Izumi Y., Ogawa H., Periodontal status and *Prevotella intermedia* antibody in acute coronary syndrome. *Int J Cardiol*, 2008, doi: 10.1016/j.ijcard.2008.05.057.
  4. Kitamura M., Nakashima K., Kowashi Y., Fujii T., Shimauchi H., Sasano T., Furuuchi T., Fukuda M., Noguchi T., Shibutani T., Iwayama Y., Takashiba S., Kurihara H., Ninomiya M., Kido J., Nagata T., Hamachi T., Maeda K., Hara Y., Izumi Y., Hirofuji T., Imai E., Omae M., Watanuki M., Murakami S., Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor -2: Randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS ONE* 3(7): e2611. Doi10.1371/j.pone.0002611
  5. S. Tancharoen, T. Matsuyama, K. Abeyama, K. Matsushita, K. Kawahara, V. Sangalungkarn, M. Tokuda, T. Hashiguchi, I. Maruyama, Y. Izumi, The role of water channel aquaporin 3 in the mechanism of TNF- $\alpha$ -mediated proinflammatory events: Implication in periodontal inflammation. *J Cell Physiol*, 217: 338-349, 2008.
  6. K. Iwasaki, M. Komaki, K. Mimori, E. Leon, Y. Izumi, I. Ishikawa, IL-6 induces osteoblastic differentiation of periodontal ligament cells. *J Dent Res*, 87: 937-942, 2008.
  7. Y. Ushida, G. Koshy, Y. Kawashima, M. Kiji, M. Umeda, H. Nitta, T. Nagasawa, I. Ishikawa, Y. Izumi, Changes in serum interleukin-6, C-reactive protein and thrombomodulin levels under periodontal ultrasonic debridement. *J Clin Periodontol*, 35: 969-975, 2008.
  8. D. Wang, T. Nagasawa, Y. Chen, Y. Ushida, H. Kobayashi, Y. Takeuchi, M. Umeda, Y. Izumi, Molecular mimicry of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* with b2 glycoprotein I. *Oral Microbiol Immunol*, 23: 401-405, 2008.
  9. Kadomatsu, H., Matsuyama, T., Yoshimoto, T., Negishi, Y., Sekiya, H., Yamamoto, M. Izumi, Y., Injectable growth/differentiation factor-5/recombinant human collagen composite induces endochondral ossification via sox9 expression and angiogenesis in murine calvariae. *J. Periodontal Res*, 43: 483-489, 2008.
  10. Matsuyama, T., Tokuda, M., Izumi, Y., Significance of thrombomodulin release from gingival epithelial cells in periodontitis patients. *J Periodontal Res* 43: 379-385, 2008.
  11. Morimoto, Y., Kawahara, K-I., Tancharoen, S., Kikuchi, K., Matsuyama, T., Hashiguchi, T., Izumi, Y., Maruyama, I., Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. *J Periodontal Res*. 43: 76-83, 2008.
  12. Yi-Wen Chen, Makoto Umeda, Toshiuki Nagasawa, Yasuo Takeuchi, Yi Huang, Yoshinori Inoue, Takehisa Iwai, Yuichi Izumi, Isao Ishikawa, Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 35: 153-158, 2008.
  13. Shirakata, Y., Setoguchi, T., Machigashira, M., Matsuyama, T., Furuichi, Y., Hasegawa, K., Nakamura, T. and Izumi, Y.: Comparison of injectable calcium phosphate bone cement grafting and open flap debridement in periodontal intrabony defects: A randomized clinical trial. *J. Periodontol*. 79: 25-32, 2008.
  14. Iwaya Y, Machigashira M, Kanbara K, Miyamoto M, Noguchi K, Izumi Y, Ban S. Surface properties and biocompatibility of acid-etched titanium. *Dent Mater J* 27:415-421, 2008
  15. Kawakatsu N, Oda S, Kinoshita A, Kikuchi S, Tsuchioka H, Akizuki T,

- Hayashi C, Kokubo S, Ishikawa I, Izumi Y. : Effect of rhBMP-2 with PLGA/gelatin sponge type (PGS) carrier on alveolar ridge augmentation in dogs. *Journal of Oral Rehabilitation* 35: 647-655, 2008.
16. Maruyama H, Aoki A, Sasaki KM, Takasaki AA, Iwasaki K, Ichinose S, Oda S, Ishikawa I, Izumi Y. The effect of chemical and/or mechanical conditioning on the Er:YAG laser treated root cementum: analysis of surface morphology and periodontal ligament fibroblast attachment. *Lasers Surg Med* 40(3):211-222, 2008.
  17. Takeuchi H, Setoguchi T, Machigashira M, Kanbara K, Izumi Y. Hydrogen sulfide inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest via an elevated p21Cip1 level in Ca9-22 cells. *J Periodontal Res* 43: 90-95, 2008.
  18. Sakurai K, Wang D, Suzuki J, Umeda M, Nagasawa T, Izumi Y, Ishikawa I, Isobe M. High incidence of actinobacillus actinomycetemcomitans infection in acute coronary syndrome. *Int Heart J.* 48: 663-675, 2007.
  19. M. Ibi, A. Ishisaki, M. Yamamoto, A. Wada, T. Kozakai, A. Nakashima, J. Iida, S. Takao, Y. Izumi, A. Yokoyama, M. Tamura, Establishment of cell lines that exhibit pluripotency from miniature swine periodontal ligaments. *Arch Oral Biol*, 52: 1002-1008, 2007.
  20. Gunji, T., Onouchi, Y., Nagasawa, T., Katagiri, S., Watanabe, H., Kobayashi, H., Arakawa, S., Noguchi, K., Hata, A., Izumi, Y., Ishikawa, I., Functional polymorphisms of the *FPRI* gene and aggressive periodontitis in Japanese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364: 7-13, 2007.
  21. Shirakata, Y., Yoshimoto, T., Goto, H., Yonamine, Y., Kadomatsu, H., Miyamoto, M., Nakamura, T., Hayashi, C. and Izumi, Y.: Favorable periodontal healing of 1-wall infrabony defects after application of calcium phosphate cement wall alone or in combination with enamel matrix derivative: A pilot study with canine mandibles. *J. Periodontol.* 78: 889-898, 2007.
  22. H. Goto, T. Matsuyama, M. Miyamoto, Y. Yonamine, Y. Izumi, Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation., *J Periodont Res*, 41, 455-462, 2006.
  23. Toshihisa Kawai, Takashi Matsuyama, Yoshitaka Hosokawa, Seicho Makihiro, Makoto Seki, Nadeem Y. Karimbux, Reginaldo B. Goncalves, Paloma Valverde, Serge Dibart, Yi-Ping Li, Leticia A. Miranda, Cory W.O. Ernst, Yuichi Izumi, Martin A. Taubman, B and T Lymphocytes Are the Primary Sources of RANKL in the Bone Resorptive Lesion of Periodontal Disease., *Am J Pathol*, 169, 987-998, 2006.
  24. Shozo Sonoda, Katsuro Tachibana, Eisuke Uchino, Akiko Okubo, Matsuo Yamamoto, Kenji Sakoda, Toshio Hisatomi, Koh-Hei Sonoda, Yoichi Negishi, Yuichi Izumi, Sonshin Takao, Taiji Sakamoto, Gene Transfer to Corneal Epithelium and Keratocytes Mediated by Ultrasound with Microbubbles., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 558-564, 2006.
  25. Yumiko Nakajima, Yasushi Furuichi, Kamal Krishna Biswas, Teruto Hashiguchi, Ko-ichi Kawahara, Kazuyo Yamaji, Tomonori Uchimura, Yuichi Izumi, Ikuro Maruyama, Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF- $\kappa$ B pathway inhibition., *FEBS Letters*, 580, 613-619, 2006.
  26. K. Sakoda, M. Yamamoto, Y. Negishi, J.K. Liao, K. Node, Y. Izumi, Simvastatin Decreases IL-6 and IL-8 Production in Epithelial Cells., *J Dent Res*, 85, 520-523, 2006.
  27. T. Yoshimoto, M. Yamamoto, H. Kadomatsu, K. Sakoda, Y. Yonamine, Y. Izumi, Recombinant human growth / differentiation factor - 5 induced bone formation on murine calvariae., *J Periodont Res*, 41, 140-147, 2006.
  28. M. Miyamoto, H. Kono, A. Yuda, H. Goto, M. Machigashira, S. Ban, Y. Izumi, Early cellular responses of osteoblast-like cells on acid-etching and alkaline treated titanium., *Key Engineering Materials*, 309-311, 403-406, 2006.

29. T. Into, M. Inomata, Y. Kanno, T. Matsuyama, M. Machigashira, Y. Izumi, T. Imamura, M. Nakashima, T. Noguchi and K. Matsushita Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* deprive protective functions of secretory leukocyte protease inhibitor in periodontal tissue. *Clin Exp Immunol*, 145(3), 545-554, 2006

[学会発表] (計 27 件)

1. Morimoto Y. Gingival Epithelial Cells Potently Release HMGB1: Implication in Periodontitis. The 86<sup>th</sup> General session of international association of dental Research. 2008. 7. 2-5. Toronto
2. Feghali K. Human gingival fibroblasts release HMGB1 after stimulation with LPS. The 86<sup>th</sup> General session of international association of dental Research. 2008. 7. 2-5. Toronto
3. Suda T. RANKL expression in abdominal aortic aneurysms might be associated with periodontopathic bacteria. 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. 2008. 11. 6-9, Seattle
4. Feghali K. Human gingival fibroblasts release HMGB1 through active and passive pathways. 56<sup>th</sup> Annual meeting of Japanese Association of Dental Research. 2008. 11. 29-30. Nagoya
5. 小菌清香 歯周創傷治癒に内因性カンナビノイドが関与している。第51回春季日本歯周病学会学術大会。2008年4月25-26日。大宮
6. 長澤敏行  $\beta$ -2 glycoprotein I と相同性を有する歯周病原細菌由来ペプチドに対する歯周炎患者の抗体反応 第51回春季日本歯周病学会学術大会 2008年4月25-26 大宮
7. 長谷川奈美 High Mobility Group Box 1(HMGB1)がヒト歯根膜に与える影響 第51回春季日本歯周病学会学術大会 2008年4月25-26 大宮

8. 長谷川奈美 High Mobility Group Box 1は歯根膜細胞のIL-8産生を増強する 第29回日本炎症・再生医学学会 2008年7月9日都市センターホテル
9. 大西英知歯周炎患者由来の歯肉溝滲出液中に存在するForsythia detaching factor:FDFに対する抗体価と歯周炎の病態との関連性の解析 第50回歯科基礎医学学術大会 2008年9月23-26 東京
10. 大西英知 歯周炎患者と健常者における歯肉溝滲出液中の抗FDF抗体価の比較 第51回秋季日本歯周病学会学術大会 2008年10月19日 四日市
11. 牛田由佳 超音波スケーラーによる full-mouth debridement 後の血清IL-6, CRP および可溶性トロンボモジュリンの変動 第51回秋季日本歯周病学会学術大会 2008年10月19日 四日市
12. 須田智也 腹部大動脈瘤でのRANKL発現と歯周病原細菌の検出との関連 口腔病学会第73回学術大会 2008年12月6日 東京
13. Bando Y. Effect of PGE<sub>2</sub> on VEGF production in human periodontal ligament cells. The 7<sup>th</sup> Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (APSP 2007), 2007. 9. 21-22., Beijing, China.
14. Wang D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection and acute coronary syndrome. The 7<sup>th</sup> Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (APSP 2007), 2007. 9. 21-22., Beijing, China.
15. Nagasawa T. Molecular mimicry of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with beta-2 glycoprotein I. American Academy of Periodontology 93<sup>rd</sup> Annualmeeting, 2007. 10. 27-30, Washington DC, USA
16. Kobayashi H. IL-23 production from monocytes stimulated with periodontopathic bacteria. American Academy of Periodontology 93<sup>rd</sup> Annual Meeting, 2007. 10. 27-30, Washington DC, USA
17. Suda T, AP-1 suppresses

- osteoprotegerin synthesis in periodontal ligament fibroblasts., American Academy of Periodontology 93<sup>rd</sup> Annual Meeting, 2007. 10. 27-30, Washington DC, USA
18. Yashiro R. Production of BMP-2 by Human periodontal fibroblasts stimulated with TGF- $\beta$ . Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia-Pacific Chapter Meeting, 2007. 12. 5, Tokyo, Japan
19. 中島結実子、アナンダマイドによる歯周病の炎症制御、第50回春季日本歯周病学会学術大会、2007年5月18-19日、神奈川県
20. 甘 美和、慢性歯周炎患者の歯周病原性細菌に対する血清抗体価に与える喫煙の影響。第50回春季日本歯周病学会 (2007.5.19, 横須賀)
21. 白井通彦、軟骨細胞においてBMP2の誘導するRANKL活性化はRANKL promoterのRunx2 binding sitesを介する。第50回春季日本歯周病学会 (2007.5.19,横須賀)
22. 森元陽子、ヒト歯肉上皮細胞のIL-8産生に及ぼすHigh Mobility Group Box 1 (HMGB1)の影響、第50回秋季日本歯周病学会50周年記念大会、2007年9月21-22日、東京
23. 陳 イ紋、歯周病がBurger病患者における抗Cardiolipin抗体に与える影響、第50回秋季日本歯周病学会50周年記念大会、2007年9月21-22日、東京
24. 須田智也、歯根膜細胞における転写因子AP-1によるOPG抑制効果について、第50回秋季日本歯周病学会50周年記念大会、2007年9月21-22日、東京
25. M. Machigashira, The Effectiveness of TACE Inhibitor : New Option for Treating Periodontal Inflammation. Europerio 5, 29 June ~1 July 2006, IFEMA Madrid, Spain
26. Y. Morimoto, Expression of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) in gingival epithelial cells.

Europerio 5, 29 June ~1 July 2006, IFEMA Madrid, Spain

27. Y. Nakajima, Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF- $\kappa$ B pathway inhibition. Europerio 5, 29 June ~1 July 2006, IFEMA Madrid, Spain

〔図書〕 (計 0 件)

特記事項なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

特記事項なし

○取得状況 (計 0 件)

特記事項なし

〔その他〕

特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和泉 雄一 (IZUMI YUICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号 : 601589803

### (2) 研究分担者

丸山 征郎 (MARUYAMA IKURO)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号 : 20082282

町頭 三保 (MACHIGASHIRA MIHO)

鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・講師

研究者番号 : 80253897

中村 利明 (NAKAMURA TOSHIAKI)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号 : 60381183

小林 宏明 (KOBAYASHI HIROAKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号 : 50396967

### (3) 連携研究者

なし