

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592395

研究課題名（和文） 歯周組織における血小板由来因子の役割

研究課題名（英文） The roles of platelet-derived factors in periodontal tissue.

研究代表者

大島 光宏（OHSHIMA MITSUHIRO）

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：30194145

研究成果の概要：血小板には様々な因子が含まれており，歯周組織の恒常性の維持，創傷治癒ならびに歯周炎の病態形成に関与していると考えられる。本研究では，血小板に由来する成長因子のうち，血小板由来成長因子(PDGF)-BB およびトランスフォーミング成長因子(TGF)- β に焦点を当て，歯周炎の病態形成への関与を推測した。PDGF-BB は線維芽細胞の肝細胞増殖因子(HGF)産生を促進させ，歯肉上皮細胞の走化性を亢進させることにより，上皮の深行増殖に関与することが示唆された。また TGF- β シグナルは，三次元培養において線維芽細胞によるコラーゲン分解に深く関わっていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：血小板由来因子，歯周組織，歯周炎の病態形成

1. 研究開始当初の背景

血小板に由来する成長因子のうち，血小板由来成長因子(PDGF)は，長い間歯周組織の治癒を促進する因子として位置づけられてきた。しかしながら，PDGFはまた線維芽細胞による肝細胞増殖因子(HGF)産生を促進する作用もあることが知られている。これまでにわれわれは，歯周炎における上皮の深行増殖に HGF が関与する可能性を指摘してきた。このことは platelet-rich plasma (PRP) などに多量に含まれる PDGF の臨床応用により，歯周炎を進展させてしまう可能性があるこ

ともも意味していると考えられる。そこで本研究では，どの PDGF アイソフォーム，すなわち PDGF-AA, -AB, -BB, -CC, -DD のいずれが歯根膜線維芽細胞による HGF 産生を促進するのか，また歯周組織における PDGF アイソフォームの供給源はどの細胞なのかを明らかにすることにより，PDGF の歯周疾患における役割を推定したいと考えた。

歯周炎においてみられる歯と骨との結合組織性付着の喪失と，これに引き続いて起こる歯の脱落は，生体表面において上皮が連続性を保とうとする一種の生体防御反応であ

るとも考えられる。われわれは、その防御反応のひとつとして歯周組織の線維芽細胞から分泌されるラミニン、フィブロネクチンおよび HGF など上皮の治癒を促進する物質が、上皮の深行増殖を誘導することによりアタッチメントロスが起こるものと考え、一連の研究を行ってきた。PDGF は線維芽細胞の走化性誘導因子として、また強力な増殖促進因子として作用することから、その歯周組織治癒促進効果が期待されてきた。しかしながら PDGF は、血管新生を誘導して腫瘍形成を促進する作用も報告されており、その臨床応用は慎重に行うべきだと考えられる。また、PDGF アイソフォームのうち、最近報告された PDGF-CC および PDGF-DD に関しては、線維芽細胞による HGF 産生促進作用があるのかどうか、およびその歯周組織における産生細胞が特定されていない。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、歯周組織における主要な PDGF-CC および-DD 産生細胞が歯根膜線維芽細胞であることを明らかにするとともに、この因子が歯周組織の治癒促進に働くのか、またはその HGF 産生促進作用を介して歯周炎の進展に関与するのかを *in vitro* で検討することであった。さらに、歯肉上皮細胞が分泌する PDGF が歯根膜線維芽細胞に作用することにより、どのような反応が引き起こされるのかを併せて検討する予定であった。しかしながら、研究開始後に他のグループから歯根膜線維芽細胞による PDGF-CC および-DD の発現が報告された。このため当初の研究計画を一部変更し、ヒトマラッセの上皮遺残由来細胞および歯肉上皮細胞によるサイトカインのプロファイリング、初代培養ヒト歯肉上皮細胞の IV 型コラーゲンに対する走化性、および歯肉上皮細胞と線維芽細胞との三次元培養を研究計画に加えた。

3. 研究の方法

(1) sis-NIH3T3 細胞を用いた実験モデル系の確立

実験を開始するに先立って、マウス線維芽細胞 (NIH3T3 以下 wt) に強制的に PDGF-B を発現させた線維芽細胞 (sis-NIH3T3 以下 sis) が株化歯肉上皮細胞の走化性を誘導するか否かを検討した。wt および sis はカロリンスカ研究所より供与された。両細胞ともに、D-MEM (含 High glucose, 10%ウシ新生児血清, 1%抗生物質) にて継代培養する。プレコンフルエントに達した時点で一定時間培養後、その培養上清を回収し試料とした (wt-CM, sis-CM)。上皮細胞に対する走化活性は、株化歯肉上皮

細胞 (Ca9-22) を用いて改良ポイデンチャンバー法で調べた。wt, sis の HGF 産生量は、ロット ELISA キットにより定量した。

(2) 線維芽細胞の HGF 産生に及ぼす PDGF の影響

歯根膜線維芽細胞をコンフルエントになるまで培養したのち、PDGF-AA, -AB, -BB を含むまたは含まない無血清の α -MEM と交換し、さらに 48, 96 時間培養を継続した。回収した培養上清中の HGF 量は市販の ELISA kit を用いて調べた。また、PDGF による HGF 産生促進作用は、IL-1 のそれと比較した。

(3) HGF の生物活性

産生された HGF の生物活性は改良ポイデンチャンバー法を用いて、株化歯肉上皮細胞に対する走化活性で評価した。

(4) 培養ヒト歯肉上皮細胞による PDGF 産生

歯肉上皮細胞の培養上清を線維芽細胞に作用させ、その HGF 産生促進に及ぼす影響を調べた。また、これが PDGF によるものかどうかは相関関係を調べることによって検討した。

(5) ヒトマラッセの上皮遺残由来細胞の初代培養法の確立とサイトカインプロファイリング

歯根膜組織から外生してきた上皮細胞の characterization を行った。併せて歯肉上皮細胞も培養し、サイトカインアレイを用いてサイトカインのプロファイルを比較検討した。

(6) 初代培養歯肉上皮細胞を用いたケモタキシスアッセイ

これまで、HGF や細胞外マトリックス成分に対する歯肉上皮細胞の走化活性の検討には、株化歯肉上皮細胞である Ca9-22 を用いてきたが、歯肉上皮細胞を用いて走化活性が調べられるよう、培養法に工夫を行った。この方法を用いて、IV 型コラーゲンに対する走化活性を調べた。

(7) 三次元培養法による歯周炎モデルの作成

コラーゲンゲルに線維芽細胞を埋め込んでゲル化させ、その上に歯肉上皮細胞を播種して三次元培養を開始した。翌日、浮遊培養を開始し、5 日目に表面を空気に曝露してさらに 5 日間培養を行った。上皮細胞がゲル内に浸潤しているかどうかは、HE 標本を作製して調べた。

4. 研究成果

(1) sis-NIH3T3 線維芽細胞の性質の再検討

PDGF-B を強制発現させた sis-NIH3T3 線維芽細胞の遺伝子発現を RT-PCR 法によって調べたところ、この細胞は PDGF-A, -B, -C, -D 鎖全てを発現していた。Wt の線維芽細胞では、PDGF-A および-C 鎖のみを発現していた。さらに、sis では HGF および MMP-9 遺伝子の発現がみられた。PDGF-AA, -AB,

および-BB の 48 時間での分泌レベルを ELISA kit によって調べたところ、sis では PDGF-AA がわずかに、-AB が 3 ng/ml、-BB が 150 ng/ml 程度分泌されることが明らかとなった。wt では、ごくわずかな量の PDGF-AA が検出された。

HGF の分泌レベルを ELISA 法によって調べたところ、sis では 10 ng/ml 程度の分泌が見られたが、wt では数百 pg/ml であった。

Ca9-22 細胞の sis 培養上清に対する走化活性は、wt の 10 倍以上であった。

このことから、PDGFR 阻害剤である Imatinib (STI571/Glivec, カロリンスカ研究所がんセンター Arne Östman 教授より提供) が HGF の分泌に及ぼす影響を調べた。その結果、この阻害剤が逆に sis の HGF 分泌を 2 倍に促進させてしまうことが判明した。しかしながら、Imatinib を作用させた培養上清に対する Ca9-22 細胞の走化活性は 1/2 程度に減少したことから、HGF 以外の因子の関与も推測された。

Imatinib の sis に対する効果を調べたところ、1 μ M の濃度で sis のアポトーシスを誘導した。その効果は、血清および bFGF によってレスキューされることが判明した。

(2) 歯根膜線維芽細胞の HGF 産生に及ぼす PDGF の影響

培養ヒト歯根膜細胞を PDGF-AA、-AB、-BB、IL-1 α 、または IL-1 β で刺激したときの HGF 産生を調べたところ、PDGF-AA には HGF 産生促進作用が見られなかったが、ある細胞群では PDGF-AB および-BB には、IL-1 による産生促進作用の 70%~80% 程度にまで、HGF 産生を促進した。しかしながら、別の細胞群では PDGF による HGF 産生促進効果は見られなかった。このことから、歯根膜線維芽細胞には、PDGF に反応して HGF 産生が促進されるタイプと反応を示さないタイプが存在することが明らかとなった。

(3) 培養ヒト歯肉上皮細胞による PDGF 産生

歯肉上皮細胞による PDGF 産生を、他の株細胞と比較した。歯肉上皮細胞は、PDGF-A、-B 両鎖の遺伝子を発現していたが、明らかな分泌が確認されたのは、PDGF-AA であり、他の株細胞は PDGF-AA をほとんど分泌していなかった。株化上皮細胞には PC-3 など PDGF-BB を分泌する細胞も見られた。また、歯肉上皮細胞は他の株細胞よりも IL-1 α を多量に分泌していた。

数種類の歯肉上皮細胞が分泌した PDGF-AA、-AB または IL-1 α 量とその培養上清の刺激によって歯根膜線維芽細胞が産生した HGF 量との相関を調べた。その結果、IL-1 α 量と HGF 量とは高い相関が見られた。分泌量の多かった PDGF-AA 量と HGF 量とは相関しなかったが、PDGF-AB 量と HGF

量とは、弱いながらも有意に相関した。このことから、歯根膜線維芽細胞の HGF 産生には歯肉上皮細胞の PDGF が少なからず影響を及ぼしていることが示唆された。

(4) ヒトマラッセの上皮遺残由来細胞のサイトカインプロファイル

歯根表面を取り囲むマラッセの上皮遺残が、歯周炎の病態形成に関与するかどうかは未だに知られていない。そこで、歯根膜組織からマラッセの上皮遺残由来細胞を培養する方法を確立した。この細胞は FGFR のうち FGFR2-IIIb のみを発現していたことから、マラッセの上皮遺残由来細胞であることが同定できた。PDGF の分泌を調べたところ、歯肉上皮細胞に加えて、マラッセの上皮遺残由来細胞でも、PDGF-AA および PDGF-BB が (もちろん IL-1 α も) 分泌されていることが判明した。このことから、マラッセの上皮遺残由来細胞が、多彩なサイトカインを分泌している可能性が示唆された。そこでこの細胞のサイトカイン発現 (分泌) プロファイルを、サイトカイン抗体アレイ (120 種類) によって調べた。驚いたことに、マラッセの上皮遺残由来細胞は少なくとも 29 種類のサイトカイン/成長因子および関連因子を分泌していることが判明した。また、歯肉上皮細胞のサイトカインプロファイルとも良く似ていた。このことから、マラッセの上皮遺残由来細胞は歯肉上皮細胞と共に、歯周組織の恒常性の維持や、歯周炎の病態形成に関与していることが示唆された。

(5) 初代培養ヒト歯肉上皮細胞を用いたケモタキシスアッセイ

初代歯肉上皮細胞の培養技術ならびに凍結保存法が確立できたことにより、この細胞の安定供給が可能となった (特許申請準備中)。そこで、これまで株化歯肉上皮細胞である Ca9-22 を用いて行ってきた改良ボイデンチャンバー法による上皮細胞のケモタキシスアッセイを、歯肉上皮細胞を用いて行うことができるかどうか検討した。走化性誘導因子として、IV 型コラーゲン、細胞性フィブロネクチン、ラミニン-1 を用いて比較した。その結果、IV 型コラーゲンにはどちらの細胞に対しても高い走化活性を誘導した。ラミニン-1 は IV 型コラーゲンの 1/2 程度であった。細胞性フィブロネクチンは Ca9-22 の走化性を誘導したが、歯肉上皮細胞の走化性をほとんど誘導しなかった。これらの結果は、歯周病研究における初代培養細胞使用の重要性を再認識する必要があることを示唆すると思われた。

(6) 三次元培養法による歯周炎モデルの作製

歯周炎の病態形成における上皮と間葉との相互作用をシミュレートするために、三次元培養法が有効であるかどうかを調べた。コラーゲングル内に線維芽細胞を懸濁し、6 穴

プレート内に播種して硬化させた後、上皮細胞を播種した。24時間後にゲルをプレートの底から浮かせさらに培養を継続した。培養5日目に、ゲルをメッシュ上に載せ、表面が空気に曝される状態でさらに5日間培養を行った。回収したゲルは、通法に従いHE標本作製した。Ca9-22はコラーゲンゲル内に浸潤したが、歯肉上皮細胞はゲル内には浸潤せずにゲル表面全体を覆った。Ca9-22を用いた場合、コラーゲンゲルの収縮は少なかったが、歯肉上皮細胞と歯根膜線維芽細胞を組み合わせた場合、ゲルの直径が8~10mm程度に収縮した。さらに歯肉上皮細胞と、ある歯周炎患者由来の歯肉線維芽細胞とを組み合わせた場合、ゲルがほとんど分解され、直径が3mm程度まで収縮した。このとき、HE標本では多くの線維芽細胞周囲に空胞が観察され、ゼラチン・ザイモグラフィでは、活性型マトリックス金属プロテアーゼ(MMP)の検出される割合が高かった。また、この歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞の組み合わせにMMP阻害剤(Marimastat)を加えておくと、ゲルの収縮が顕著に抑制された。各種成長因子受容体阻害剤がゲル収縮に及ぼす効果を調べたところ、TGF- β RI kinase inhibitorが収縮を1/2程度に抑えたが、PDGFR阻害剤であるImatinibは効果がなかった。このことは、歯周炎による結合組織破壊にTGF- β シグナリングが関与することを初めて示したことに加え、歯周炎治療薬のスクリーニングにこの三次元培養法が応用できることを示唆するものと思われた(特許出願済)。

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3件)

- ① Ohshima M*, Yamaguchi Y, Kappert K, Micke P, Otsuka K, bFGF rescues imatinib/STI571-induced apoptosis of sis-NIH3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 165-170 (2009), 査読有
- ② Ohshima M*, Yamaguchi Y, Micke P, Abiko Y, Otsuka K, In vitro characterization of the cytokine profile of the epithelial cells of rests of Malassez. *J Periodontol* 79, 912-919 (2008) 査読有
- ③ Hayashi M, Ohshima T, Ohshima M*, Yamaguchi Y, Miyata H, Takeichi O, Ogiso B, Ito K, Östman A, Otsuka K, Profiling of radicular cyst and odontogenic keratocyst cytokine production suggests common growth mechanisms. *J Endod* 34, 14-21 (2008) 査読有
(*corresponding author)

[学会発表] (計4件)

- ① 大島光宏, 三次元培養法による歯周炎モデルの試作, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月12日, 神戸
- ② 山口洋子, デキサメタゾン前処理によるCa9-22細胞の基底膜成分に対する走化性の亢進, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月10日, 神戸
- ③ 大島光宏, 三次元培養法を用いた歯周炎モデルの開発, 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
- ④ 山口洋子, IV型コラーゲンは初代培養ヒト歯肉上皮細胞の走化性を誘導する, 第51回春季日本歯周病学会学術大会, 2008年4月25日, 大宮

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 特許
発明者: 大島光宏
権利者: 日本大学
種類: 特願
番号: 2008-261265
出願年月日: H20.10.8
国内外の別: 国内

名称: 特許
発明者: 大島光宏, 山口洋子, 松本直行,
加藤光保
権利者: 日本大学
種類: 特願
番号: 2009-072185
出願年月日: H21.3.24
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 光宏 (OHSHIMA MITSUHIRO)
日本大学・歯学部・専任講師
研究者番号: 30194145

(2) 研究分担者

山口 洋子 (YAMAGUCHI YOKO)
日本大学・歯学部・助手
研究者番号: 00239922

(3) 研究分担者

大塚 吉兵衛 (OTSUKA KICHIBEE)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 50059995