

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18989

研究課題名(和文) DAMPsおよび咬合性外傷に注目した限局型侵襲性歯周炎の発症機序の解明

研究課題名(英文) Analysis on DAMPs and Disease Progression of Periodontitis

研究代表者

前川 祥吾 (MAEKAWA, Shogo)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：20793574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：急速な歯周組織破壊を呈する結紮誘導歯周炎歯肉組織を網羅的な遺伝子解析を行ったところ、自然免疫応答の亢進やストレスに対する細胞反応の増加を認めた。同定した発現変動遺伝子のうち傷害関連分子パターン(DAMPs)であるS100A8やS100A9、骨吸収に関連するMMP9やカテプシンKの有意な発現増加を認めた。S100A8およびS100A9は接合上皮部において発現しており、結紮誘導歯周炎にて発現の増加、結合組織への浸潤を認めた。口腔由来ヒト上皮細胞株(Ca9-22)を用いた実験により、S100A8およびS100A9はカテプシンKの発現に関与しており、DAMPsによる急速な歯周組織破壊の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会となった日本だけでなく、世界においても高齢化が進んでおり、また歯周病の罹患率も現在に至る約30年間増加している。歯周炎は主な歯の喪失原因であり、長年にわたる健康的な口腔内環境の確立と維持、疾病予防のためにも、歯周組織破壊のメカニズム解明は重要である。今回、急速な歯周組織破壊を呈する歯周炎モデルから傷害関連分子パターンであるS100A8やS100A9のカテプシンKへの関与、骨吸収に関わるメカニズムの一端を解明することができた。今後の歯周炎の予防、治療に応用することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive genetic analysis of inflamed gingival tissues with ligature-induced periodontitis showing rapid periodontal tissue destruction revealed enhanced innate immune response and increased cellular response to stress. The expression of S100A8 and S100A9, which are damage-associated molecular patterns (DAMPs), and MMP9 and cathepsin K, which are related to bone resorption, were significantly increased in ligated gingival tissues. In addition, increased expression of S100A8 and S100A9 was observed in ligature-induced periodontitis, and eventually their expression was infiltrated into connective tissue. Experiments using an oral-derived human epithelial cell line (Ca9-22) showed that S100A8 and S100A9 were involved in the expression of cathepsin K. This study elucidated a part of the rapid destruction of periodontal tissues by DAMPs.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 S100A8 Cathepsin K RNA sequencing

1. 研究開始当初の背景

歯周組織破壊のメカニズムは多種多様な因子が複雑に絡み合うため、現在において未だ解明されていない部分も多い。超高齢社会となった日本だけでなく、世界においても高齢化は進んでおり、歯周病の罹患率も増加している。そのため、長期にわたる健康的な口腔内環境の構築および維持のためにも、歯周病の病態進行の解明は欠かせない。一方、若くして重度の歯周炎に悩む侵襲性歯周炎の患者も少なく無く、急速な歯周組織破壊のメカニズムの解明が求められている。研究面において、長らく口腔内に歯周病原細菌を投与するマウスモデルが使用されてきたが、2013年に報告されたマウスを用いた結紮誘導歯周炎では、従来の歯周病原細菌を口腔内に投与する歯周病マウスモデルと異なり、わずか数日で重度の歯周組織破壊を呈すること示された。

2. 研究の目的

急速な歯周組織破壊に着目し、結紮誘導歯周炎の歯肉組織における遺伝子発現の網羅的な解析を行い、急速な歯周組織破壊に関わる因子を同定すること、およびその機能について解析を行うこととした。

3. 研究の方法

9週齢の C57BL/6J 雄野生型マウスを用いて、#6-0 の絹糸を上顎左側第二臼歯に結紮し、結紮誘導歯周炎を惹起させた。右側は非結紮とし、対照側とした。

(1) in-vivo マイクロ CT による歯槽骨吸収の経時的な評価

イソフルランにてマウスに吸入麻酔を行い、結紮前、結紮 1、3、5、8 日後に in vivo micro CT imaging (R_mCT2, Rigaku corp.) 撮影を行った。経時的かつ 3 次元的な歯槽骨吸収の評価を行なった。

(2) 組織切片における歯周組織の評価

8 日後における結紮側および対象側の組織切片を作製し、HE 染色、TRAP/ALP 染色を行なった。

(3) RNA シーケンス解析

結紮 3 日後における非結紮側および結紮側の辺縁歯肉組織から抽出した total RNA をそれぞれ 3 サンプルずつ Illumina 社の Mi-seq を用いてシーケンス解析を行った。FastQC や Tophat2 cufflinks パイプラインを用いて今回のシーケンスデータの質を確認し、FPKM が 1 以上の 12,853 遺伝子に関して本研究で使用した。さらに結紮による歯肉組織の変化に着目するため、fold change が 2 倍以上、q 値が 0.05 未満のものを発現変動遺伝子(DEGs)と定義し、78 個の DEGs を同定した。また、GO 解析を行った。

(4) DEGs の定量的 PCR

RNA シーケンス解析の結果で得られた 78 個の DEGs のうち、炎症反応、自然免疫応答、および結合組織の代謝に関連する遺伝子に関して定量 PCR を行い、結紮 1、3、7 日後の経

時的な遺伝子の発現量を計測、解析した。

(5) S100A8 免疫組織染色

3、8 日後における結紮側および対象側の組織切片を作製し、S100A8 の免疫組織染色を行ない、発現部位の評価および発現量に関して解析した。

(6) 口腔内由来上皮細胞株(Ca9-22)および siRNA を用いたトランスフェクション

口腔内由来上皮細胞株(Ca9-22)を用い、s100A8 および s100A9 の siRNA を用いてノックダウンを行った。さらに TNF- α 刺激を行った際の遺伝子発現を解析した。

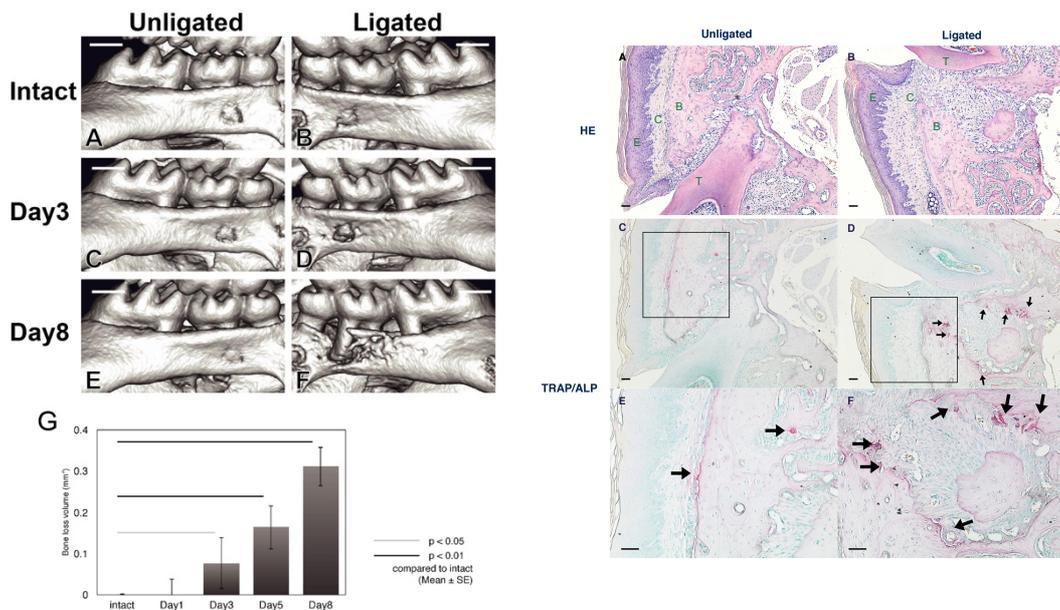
4. 研究成果

(1) 結紮誘導歯周炎による骨吸収の経時的な評価

結紮 3 日後から歯槽骨吸収が認められ、5 日後、8 日後に有意な歯槽骨の吸収を認めた。

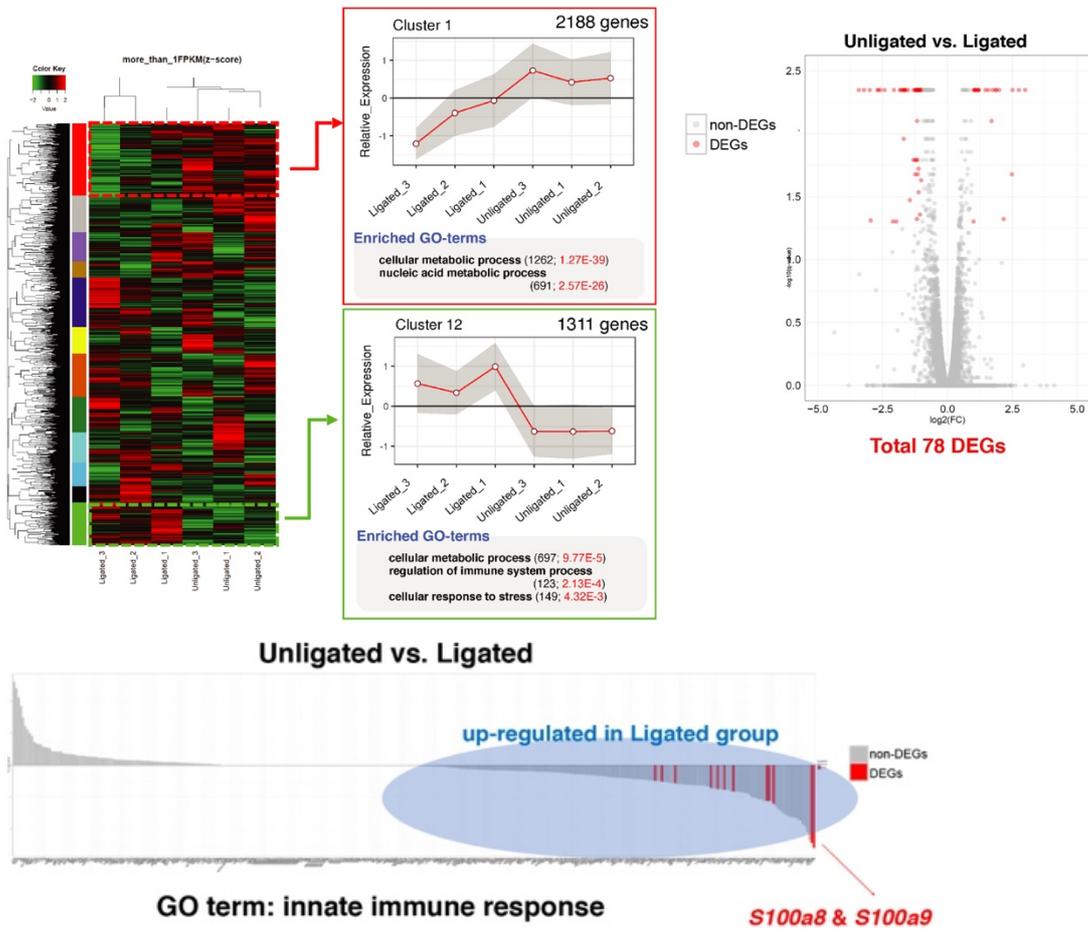
(2) 組織切片における歯周組織および歯周炎の評価

結紮側の歯根周囲の歯槽骨に破骨細胞が多く認められた。



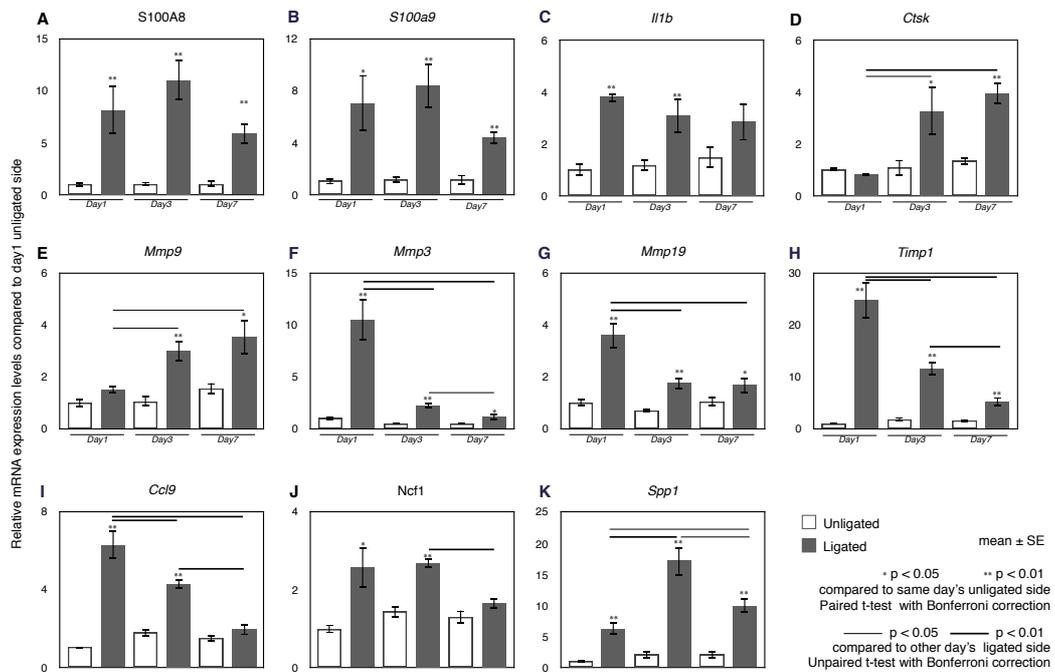
(3) RNA シーケンス解析

結紮後 3 日における歯肉組織を用いて RNA シーケンス解析および GO 解析を行った結果、結紮側において自然免疫応答の亢進やストレスに対する細胞反応の増加を認めた。また DEGs を 78 個同定した。さらに自然免疫応答の GO-term に注目すると、結紮側において *S100a8*、*S100a9* の有意な発現上昇が確認された。



(4) DEGs の定量的 PCR

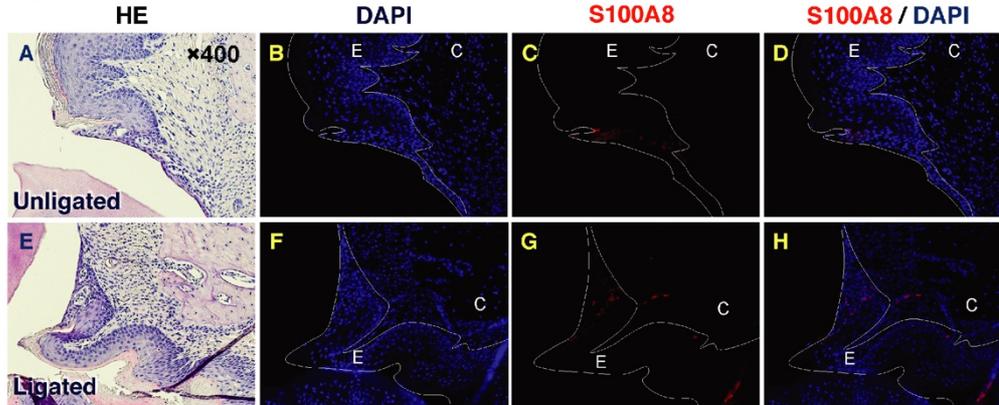
結紮側歯肉組織における *S100a8*, *S100a9* の有意な発現増加を認めた。また多く DEGs が結紮 1 日後に最も高い発現を示した後、発現が減少してくのに対し、*Mmp9*, *Ctsk* は結紮の時間の経過と共に発現が有意に増加していた。



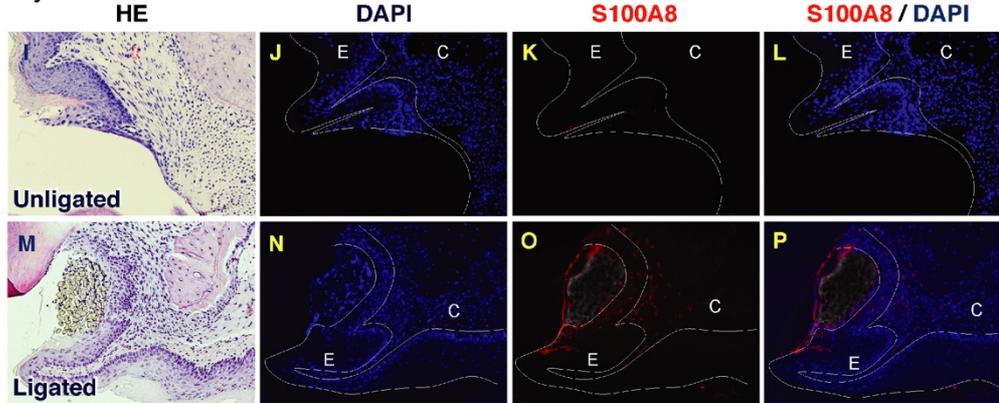
(5) S100A8 免疫組織染色

非結紮側において、傷害関連分子パターン(DAMPs)である S100A8 は接合上皮に限局してわずかに発現していた。結紮による歯周組織の破壊に伴い、発現が増加し、結合組織内にまで発現が拡大していた。

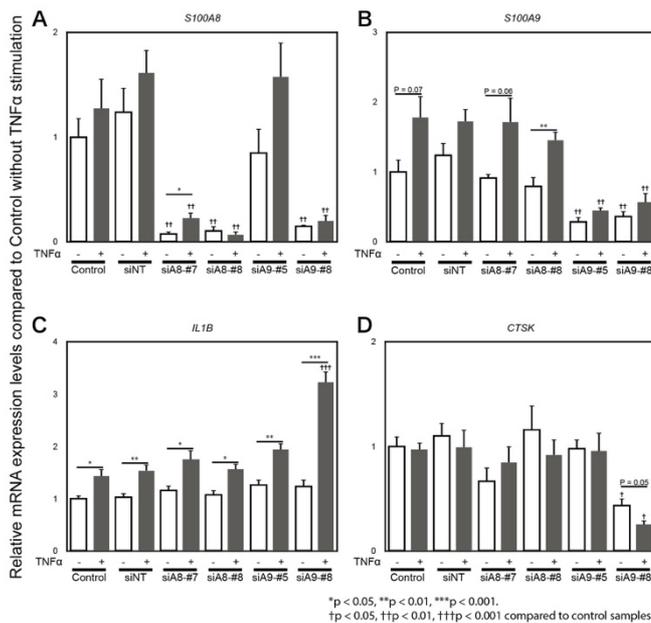
Day3



Day8



(6) 上皮内における S100A8 および S100A9 の IL-6 および Cathepsin K への関与
S100A8 および S100A9 の両方が欠失することにより、Tnf α 刺激によって IL1 β は有意に増加し、CTSK は有意に減少した。



上記の結果より、結紮誘導歯周炎における急速な歯周組織破壊において、上皮内の S100A8 や S100A9 および Cathepsin K による骨吸収の関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maekawa Shogo, Onizuka Satoru, Katagiri Sayaka, Hatasa Masahiro, Ohsugi Yujin, Sasaki Naoki, Watanabe Kazuki, Ohtsu Anri, Komazaki Rina, Ogura Kohei, Miyoshi-Akiyama Tohru, Iwata Takanori, Nitta Hiroshi, Izumi Yuichi	4. 巻 9
2. 論文標題 RNA sequencing for ligature induced periodontitis in mice revealed important role of S100A8 and S100A9 for periodontal destruction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50959-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前川祥吾、鬼塚理、片桐さやか、佐々木直樹、渡辺数基、大津杏理、駒崎利奈、小倉康平、秋山徹、新田浩、和泉雄一、岩田隆紀
2. 発表標題 結紮誘導歯周炎マウスの炎症歯周組織におけるRNAシーケンスを用いた発現変動遺伝子の解析
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	片桐 さやか (KATAGIRI Sayaka)		
研究協力者	鬼塚 理 (ONIZUKA Satoru)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	畑佐 将宏 (HATASA Masahiro)		
研究協力者	大杉 勇人 (OHSUGI Yujin)		
研究協力者	佐々木 直樹 (SASAKI Naoki)		
研究協力者	渡辺 数基 (WATANABE Kazuki)		
研究協力者	大津 杏理 (OHTSU Anri)		
研究協力者	駒崎 利奈 (KOMAZAKI Rina)		
研究協力者	小倉 康平 (OGURA Kohei)		
研究協力者	秋山 徹 (AKIYAMA Tohru)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岩田 隆紀 (IWATA Takanori)		
研究協力者	新田 浩 (NITTA Hiroshi)		
研究協力者	和泉 雄一 (IZUMI YUICHI)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関