

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592226

研究課題名 (和文)

ラット根管治療モデルを用いたラミニン γ 2発現動態からみた根尖病巣治癒メカニズム

研究課題名 (英文)

Healing mechanism of rat experimental periapical lesions targeting laminin γ 2 expression

研究代表者

畑中 加珠 (HATANAKA KAZU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50362992

研究成果の概要 (和文)：根尖性歯周炎 (根尖周囲に骨吸収をきたす炎症性疾患) の治癒過程において遺伝子発現の亢進を報告した細胞外基質ラミニンおよび炎症性サイトカイン IL-1 α を中心に、骨再生を担う骨芽細胞に対するこれら分子の効果を検討した。IL-1 α は骨芽細胞のインテグリン α 3 発現を亢進し、また、骨芽細胞のラミニンに対する細胞接着性を亢進させたという結果は、根尖病巣の治癒期に病巣部への骨芽細胞の誘導・定着を示唆するものである。

研究成果の概要 (英文)：We have previously reported that cellular matrix laminin and inflammatory cytokine IL-1 α genes increased during periapical healing phase in a rat periapical periodontitis. In this study, we investigated the effect of these molecules to osteoblast that play a central role in bone formation. Our findings the enhancement of integrin α 3 expression by IL-1 α and the attachment of osteoblasts to laminin after stimulation with IL-1 α suggest an important mechanism for adherence of osteoblasts in periapical healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯科保存学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：根尖性歯周炎, 骨芽細胞, IL-1, ラミニン

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎に対する治癒効果は、臨床的

に、症状の消退やエックス線診査によって判断されており、その治癒過程における分子病

態レベルでの動態は反映されていないのが現状である。近年の遺伝子マイクロアレイ技術の発展により、根尖病巣で繰り広げられる分子動態の情報を網羅的に捉えることが可能となった。我々は、根管治療の動物モデル（ラット）を樹立し、その治癒過程における分子病態の推移をマイクロアレイ法（Rat genome 230 2.0 array, Affymetrix: 約30,000遺伝子）によって網羅的に解析し、根尖病巣治癒期においてIL-1 α （およびラミニン γ 2）の発現が亢進する知見を報告した（Martinez *et al*, *J Endod*, 2007）。

ラミニン、コラーゲンなどの細胞外基質は生体接着剤として組織の構築に重要な機能を有するのみならず、インテグリンなどの細胞表面受容体を介して細胞の増殖、接着、分化、細胞死などを調節することが明らかになってきた。また近年、IL-1 α が膵臓がん由来細胞のインテグリン発現を誘導し、がん転移が亢進することが報告された。さらに、インテグリンはラミニンなどの細胞外基質の刺激を受けるレセプターとしての役割を担うという報告から、我々は、根尖病巣の治癒過程においても、IL-1 α がインテグリンなどの接着分子を産生誘導することで、治癒促進に作用するという着想を得るに至った。すなわち、根尖病巣の治癒期において亢進するIL-1 α は、根尖周囲の細胞（骨芽細胞など）に作用してインテグリン発現を誘導し、ラミニンに対する細胞の組織定着性が亢進されることで治癒機転が働くという仮説を想定した。

2. 研究の目的

本研究は、根尖病巣治癒過程における接着分子ラミニンを中心とした炎症性サイトカインの動態を調べることで、根尖性歯周炎の治癒メカニズムの一端を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラミニン γ 2の発現の病理組織学的検討 (*in vivo* 研究)

雄性SDラットの根管治療モデルを用いて、その根尖歯周組織を摘出し、免疫染色法によってラミニン γ 2の発現を病理組織学的に検討する。

(2) 炎症性サイトカイン刺激による各種細胞のラミニン、インテグリン発現の検討 (*in vitro* 研究)

リコンビナントIL-1 α 、IL-1 β で刺激した

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1、ヒト歯根膜細胞におけるラミニン（ α 、 β 、 γ 鎖）、インテグリン（ α 3 β 1、 α 5 β 1、 α 6 β 1など）の発現動態を定量PCR法、ウエスタンブロット法を用いて検討する。

① 細胞増殖活性

MC3T3-E1をIL-1 α で刺激し、その細胞増殖活性をMTT法によって調べる。

② インテグリンの遺伝子発現の検出

MC3T3-E1において、IL-1 α で刺激した後のインテグリンmRNA発現を定量RT-PCR法によって検出する。

③ インテグリンタンパク質発現の検出

MC3T3-E1において、IL-1 α で刺激した後のインテグリンタンパク質産生をウエスタンブロット法によって検出する。

④ 細胞接着性に及ぼす影響の検討

IL-1 α で刺激したMC3T3-E1をラミニンでコートしたプレートで培養し、プレートへの細胞接着性を指標にして調べる。

4. 研究成果

IL-1 α 刺激によるMC3T3-E1細胞のラミニン、インテグリン発現の検討 (*in vitro* 研究)

(1) IL-1 α がMC3T3-E1の細胞増殖活性に与える影響

IL-1 α (0.01-10 ng/ml) で刺激したMC3T3-E1の細胞増殖活性は、無刺激時のそれと比較して有意に亢進した（図1：* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ）。

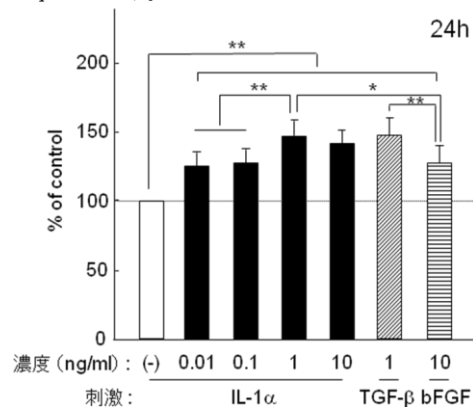


図1. IL-1 α がMC3T3-E1の細胞増殖活性に与える影響

(2) IL-1 α が細胞内のインテグリンのmRNA発現に与える影響

MC3T3-E1において、IL-1 α 刺激は細胞内におけるインテグリン α 3のmRNA発現を増加させる傾向が観察された。インテグリン α 3のmRNA発現は、IL-1 α (0.1, 1 ng/ml) 刺激時

に有意に増加し、10 ng/mlの刺激時に抑制された。また、IL-1 α 刺激は、インテグリン α 6、 β 1のmRNA発現には影響を及ぼさず、インテグリン β 4の発現を抑制する傾向が観察された (図2 : * $p < 0.05$)。

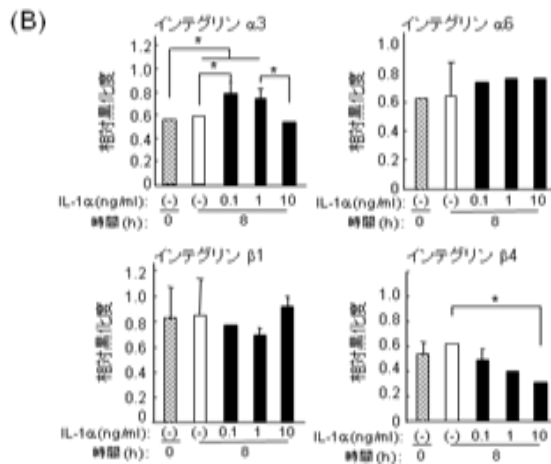
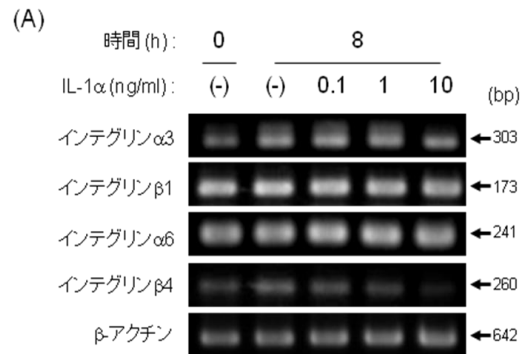


図2. IL-1 α が細胞内のインテグリンのmRNA発現に与える影響

(3) IL-1 α がインテグリンタンパク質レベルに与える影響

IL-1 α 刺激時におけるインテグリン α 3 mRNA発現様態に呼応して、インテグリン α 3タンパク質レベルは、IL-1 α (0.1 ng/ml) 刺激時に、無刺激時と比較して有意に増加したが、10 ng/mlの刺激時に抑制された。また、IL-1 α は、インテグリン α 6のタンパク質レベルに影響を及ぼさず、統計的な有意差はないもののインテグリン β 1、 β 4のタンパク質レベルを抑制する傾向が観察された (図3 : * $p < 0.05$)。

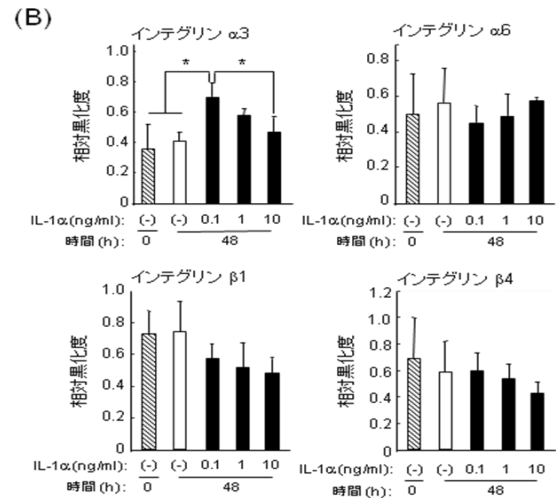
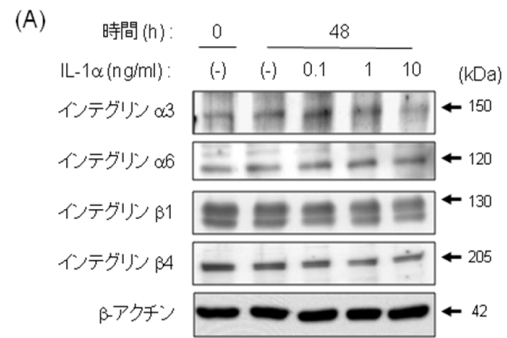


図3. IL-1 α がインテグリンタンパク質レベルに与える影響

(4) IL-1 α がMC3T3-E1のラミニンに対する細胞接着性に与える影響

IL-1 α で刺激したMC3T3-E1のラミニンコートされた培養プレートへの細胞接着性は、フィブロネクチンでコートした培養プレートと比較して、有意に亢進した。また、結果(2)、(3)に相応して、IL-1 α (0.1 ng/ml) 刺激時に、細胞接着性も有意に亢進し ($p = 0.001$)、IL-1 α (1, 10 ng/ml) 刺激時において、濃度依存的に低下した (図4 : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

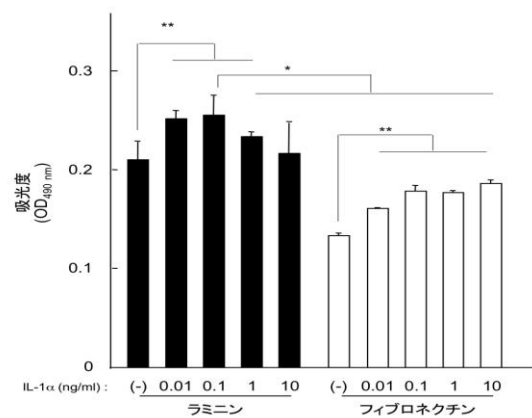


図4. IL-1 α がMC3T3-E1のラミニンに対する細胞接着性に与える影響

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 1 件)

①富山高史、インターロイキン-1 α によるマウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1の接着性の変化に関する研究、岡山歯学会雑誌、査読有、29巻、2010、1-13

[学会発表] (計 5 件)

①久保克行ら、IL-1 α によるマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 における IL-1 誘導性 OPG および IL-6 の産生制御、日本歯周病学会 春季学術大会 (第 53 回)、2010/5/14、盛岡市

②Koji Naruishi, Perspective Basic and Clinical Research for Periodontal Diseases, Association for Dental Sciences of the Republic of China, 2009/11/29, Kaohsiung

③Takashi Tomiyama, *et al.*, α 1 integrin-mediated MC3T3-E1 osteoblasts adherence induced by interleukin-1 α , 56th Annual Meeting, Japanese Association for Dental Research, 2008/11/30, Nagoya

④富山高史ら、IL-1 α および IL-1 β によるマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の動態における MAPK 系の関与、日本歯科保存学会 秋季学術大会 (第 129 回)、2008/11/6、富山市

⑤富山高史ら、ラット根管治療モデルを用いた根尖周囲組織の遺伝子マイクロアレイ解析に基づいた根尖病巣治癒病態の考察、日本歯科保存学会 春季学術大会 (第 128 回)、2008/6/6、新潟市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑中 加珠 (HATANAKA KAZU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50362992

(2) 研究分担者

山本 直史 (YAMAMOTO TADASHI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：50432662

高柴 正悟 (TAKASHIBA SHOUGO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50226768

下江 正幸 (SHIMOE MASAYUKI)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：60580264 (H22)

山口 知子 (YAMAGUCHI TOMOKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90580267 (H22)

成石 浩司 (NARUISHI KOJI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：00346446 (H20~H21)

加古 綾 (KAKO AYA)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：60448230 (H20~H21)