

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791572

研究課題名 (和文) ダウン症候群の早期発症型歯周炎に關与する宿主因子の検索

研究課題名 (英文) An investigation of host factor associated with early onset periodontitis in persons with Down syndrome.

研究代表者

村上 旬平 (MURAKAMI JUMPEI)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70362689

研究成果の概要 (和文) : 従来培養困難であったダウン症候群由来歯肉上皮細胞の長期培養可能株を作製した. 同細胞を用いてダウン症候群歯肉上皮における Toll-like receptor (TLR) の発現とサイトカイン産生経路の関係を明らかにした. *P. gingivalis* LPS の作用により, TLR2 の発現増加と IL-6 および IL-8 の発現の有意な上昇を認めた. また, TLR の阻害により, サイトカイン産生が減少したことから, TLR を介したサイトカイン産生が, ダウン症候群の主な歯周炎経路であることが示唆された.

研究成果の概要 (英文) : The long-term culture possibility stock of the gingival epithelial cell derived from the Down syndrome that had difficulty with culture conventionally was manufactured in this study. The expression of Toll-like receptor (TLR) in the Down syndrome gingival epithelial cells and the cytokines production were clarified. By *P. gingivalis* LPS, the expression of TLR2 and inflammatory cytokine, IL-6 and -8, was significantly promoted. In addition, it was suggested that cytokines production through TLR mainly causes the periodontitis in persons with Down syndrome because the cytokine production was decreased by TLR inhibition.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：ダウン症候群, 歯肉上皮細胞, 歯周炎, *Porphyromonas gingivlalis*, TLR, サイトカイン, LPS

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

ダウン症候群は 21 番染色体トリソミーを主とする先天異常である. 約 700～1,000 人に 1 人の割合で発現するため, 一般歯科で

は最も遭遇する先天異常である. 特に障害児・者の歯科治療を専門とする我々の診療室には, 毎月のべ 100 人以上のダウン症候群患者が来院している.

ダウン症候群の口腔内における最重要課

題は、早期に発症し急速に進行する歯周炎である。10 台前半で歯周炎が観察され、30 台に残存歯数のごくわずかとなる例が多い。これらは、ダウン症候群者の QOL を低下させている。

一方ダウン症候群では、心臓疾患や白血病が死亡原因の多くを占め、心臓疾患の一因に、歯周病原細菌等の口腔細菌による心臓弁膜症や心内膜炎が示唆されている。歯周病原細菌は血管内への侵入後、心臓に到達する。これらの病態の入り口としての歯周炎の病態解明も急務である。

ダウン症候群ではアルツハイマー型認知症の発症率が高く、ダウン症候群由来細胞を用いた病態解明が大きな成果をあげている。同様のことが、成人性歯周炎にも応用できると考えられる。

ダウン症候群の歯周炎に関する基礎的研究は、国内で数施設、国外ではほぼ認められない状態であるが、中でもわれわれの施設は独創的な研究を進めている。

(2) これまでの研究結果

①ダウン症候群の歯周炎と非ダウン症候群の成人性歯周炎は、同種の細菌(特に *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* および *Tannerella forsythia*) によって起炎する。

②ダウン症候群由来の歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞は *P. gingivalis* の感染(細胞内への侵入)を受けやすい。

③ *P. gingivalis* の感染を受けたダウン症候群の歯肉線維芽細胞は、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 発現の減少による細胞移動の不全と組織修復の遅延を生じる。

2. 研究の目的

ダウン症候群の宿主反応が非ダウン症候群者と異なることは明らかであり、さらなる解析を行うことが必要との考えに至ったことから、本研究では実験に耐えうる歯肉上皮細胞の作製とその細胞を用いた宿主免疫反応の解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ダウン症候群歯肉上皮細胞 DHGE-SV40 の長期培養株の作製

①ダウン症候群由来歯肉上皮細胞(DHGE)は KBM broth を用いて 37°C, 5%CO₂ 下で培養した。

②SV40 largeT 抗原の形質導入

13cm dish 内で継代 2 代目(P2) の DHGE 細胞をセミコンフルエントまで培養。SV40 largeT 抗原を含む配列を挿入されたプラス

ミド pMT10D (図 1) を Lipofectamine® 2000 (invitrogen) にて DS-HGE にトランスフェクションした。24 時間後、13cm dish に継代し、増殖した細胞をコンフルエントまで培養した。段階希釈により単一細胞からなるコロニーを得た。

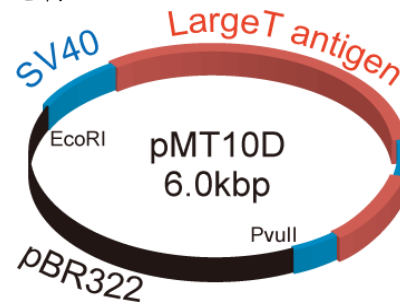


図 1 pMT10D の遺伝子マップ

③テロメラーゼ活性の測定

TeloTAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS (Roche) を用いて測定した

(2) *P. gingivalis* 感染および *P. gingivalis* LPS 刺激とサイトカイン発現解析

①感染実験:*P. gingivalis* ATCC33277 株(線毛 I 型)および OMZ314 株(II 型)を MOI=100 (1 細胞あたり 100cfu の菌)で 2 時間感染させ、細胞を回収した。

② LPS 刺激実験: *P. gingivalis* LPS (InvivoGen) を最終濃度 50 μ g/ml で添加し、6, 12 および 24 時間後の細胞を回収した。

③発現解析(RT-PCR): QuickGene-800 (FUJIFILM) にて totalRNA を抽出し PrimeScript® 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) で逆転写したのち、特異的プライマーを用いた PCR を行い、mRNA 発現を調べた。

④統計: Dunnet の多重比較検定を行った。

(3) 抗 TLR 抗体によるサイトカイン産生阻害実験

DHGE-SV40 に対して *P. gingivalis* および *E. coli* LPS (InvivoGen) を最終濃度 50 μ g/ml で添加し、6, 12 および 24 時間後の細胞を回収した。抗体は抗 TLR2 および抗 TLR4 モノクローナル抗体(ALEXIS)を用い、最終濃度 10 μ g/ml となるよう、LPS 添加前に 1 時間作用させた。上記と同様に発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) ダウン症候群歯肉上皮細胞の長期培養株の作製

SV40 largeT 抗原を導入することによる、著明な形態的变化は認めなかった(図 2)。ま

た、形質導入後も敷石状構造を認め、上皮細胞としての形態学的特徴は保存されていた。

導入前細胞は4代まで継代できたが、導入後は21代まで継代可能であった。

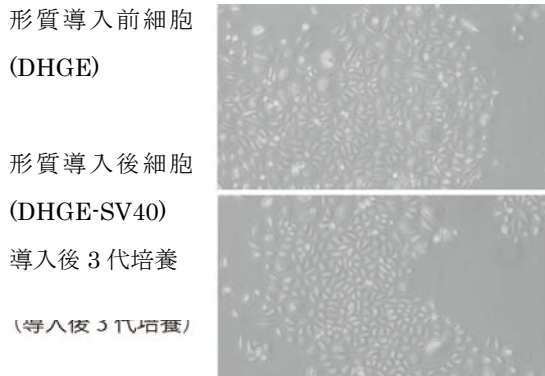


図2 形質導入前後の歯肉上皮細胞の形態

(2) LPS 刺激と TLR およびサイトカインの発現解析

①TLR2 および TLR4 発現(図3)

無刺激時において、TLR2 および TLR4 とも恒常的な発現を認めた。 *P. gignivalis* LPS 刺激 6, 12 および 24 時間で TLR2 発現が有意に増加したが、TLR4 発現は変化しなかった。

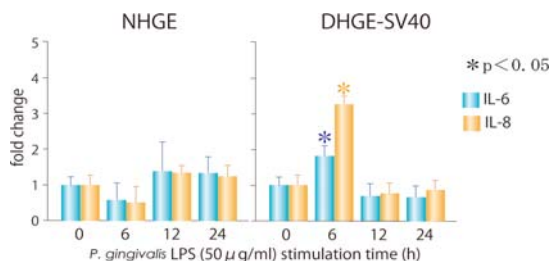


図3 *P. g* LPS 刺激による TLR2 と TLR4 の mRNA 発現

②IL-6 および IL-8 発現 (図4)

P. gignivalis LPS 刺激 6 時間で、IL-6 および IL-8 発現の有意な増加を認めたが、12 および 24 時間では無刺激時との有意な差を認めなかった。また、*P. gignivalis* 感染によるサイトカイン産生は、IL-6 と IL-8 とも有意に増加していた。

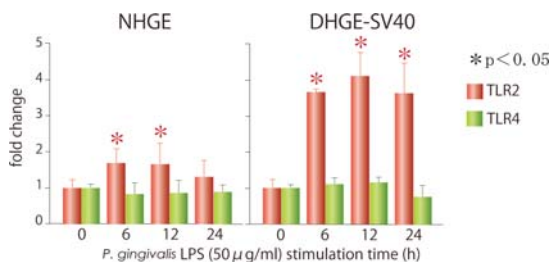


図4 *P. g* LPS 刺激による IL-6 と IL-8 の mRNA 発現

(3)抗 TLR 抗体によるサイトカイン産生阻害実験

①大腸菌 LPS 刺激と抗 TLR4 抗体によるサイトカイン産生への影響 (図5)

LPS 刺激 6 時間で、IL-6 および IL-8 mRNA とも発現の有意な増加を認めたが、12 および 24 時間では、発現量が有意に減少した。

抗 TLR4 抗体を作用させたところ、LPS 刺激 6 時間で、IL-6 および IL-8 mRNA とも発現が有意に減少したが、12 および 24 時間では無刺激時と有意な差をみとめなかった。

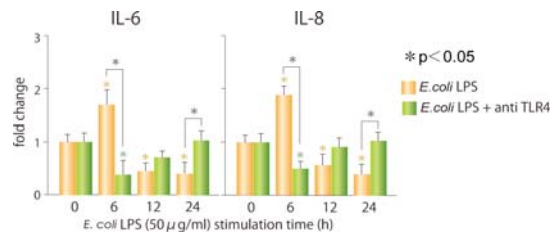


図5 大腸菌 LPS および抗 TLR4 抗体を作用させた場合の IL-6 と IL-8 の mRNA 発現

②*P. gignivalis* LPS 刺激と抗 TLR2 抗体によるサイトカイン産生への影響 (図6)

LPS 刺激6および12時間で、IL-6およびIL-8 mRNA とも発現の有意な増加を認めたが、24 時間では無刺激時と有意な差をみとめなかった。

抗 TLR2 抗体を作用させたところ、LPS 刺激 6, 12 および 24 時間で IL-6, 24 時間で IL-8 mRNA 発現が有意に減少した。

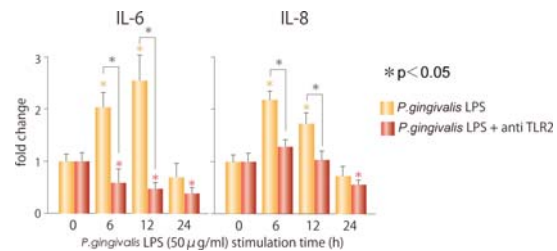


図6 *P. gignivalis* LPS および抗 TLR2 抗体を作用させた場合の IL-6 と IL-8 の mRNA 発現

以上より、DS 由来歯肉上皮細胞では、大腸菌 および *P. gignivalis* LPS 添加後に IL-6 および IL-8 発現の増加が観察された。 *P. gignivalis* LPS によるサイトカイン発現が大腸菌 LPS 刺激時よりも長時間継続する様子が観察されたことから、ダウン症候群由来歯肉上皮細胞においては、大腸菌よりも *P. gignivalis* 由来の LPS への反応が長く継続することが示唆された。

P. gignivalis LPS リガンドである TLR2 を

ブロックしたところ、IL-6 および IL-8 発現の抑制をみとめたことから、ダウン症候群歯周炎において、TLR を介し、LPS がもたらす免疫反応の関与が明らかとなった。一方で大腸菌 LPS リガンドである TLR4 をブロックしたところ、サイトカイン発現が早期に抑制状態から脱したことから、ダウン症候群の歯肉上皮では大腸菌と *P. gingivalis* LPS では自然免疫において反応性の違うことが示された。

したがって Toll-like receptor を介した炎症性サイトカインの発現増加が、ダウン症候群の歯周炎重篤化に関与す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 8 件)

- ① Terao Y, Isoda R, Murakami J, Hamada S, Kawabata S. Molecular and biological characterization of *gtf* regulation-associated genes in *Streptococcus mutans*. Oral Microbiology Immunology, 24, 211-217, 2009, 査読有
- ② Murakami J, Morisaki I, Ochiai TT, Akiyama S, Amano A, Friedman CS. Extensive dental caries in unerupted permanent teeth of a disabled child with phenytoin-induced gingival overgrowth. J Disability and Oral Health 9, 13-16, 2008, 査読有
- ③ Murakami J, Kato T, Kawai S, Akiyama S, Amano A, Morisaki I. Cellular motility of Down syndrome gingival fibroblasts is susceptible to impairment by *Porphyromonas gingivalis* invasion. J Periodontol, 79, 721-727, 2008, 査読有
- ④ Morisaki I, Ochiai TT, Akiyama S, Murakami J, Friedmann CS. Behavior guidance in dentistry for patients with autism spectrum disorder using a structured visual guide. J Disability and Oral Health, 9, 136-140, 2008, 査読有

[学会発表] (計 3 3 件)

- ① 村上旬平, 田中健司, 堤香奈子, 財間達也, 天野敦雄, 森崎市治郎. ダウン症候群由来歯肉上皮細胞における L P S 刺激

による I L - 6 および I L - 8 の発現. 第 27 回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2010/10/23, 東京

- ② 村上旬平, 竹内洋輝, 堤香奈子, 秋山茂久, 天野敦雄, 森崎市治郎. ダウン症候群由来歯肉上皮細胞における Toll-like receptor2 の発現. 第 26 回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2009/11/1, 名古屋
- ③ 竹内洋輝, 加藤隆大, 稲葉裕明, 村上旬平, 秋山茂久, 森崎市治郎, 天野敦雄. *Porphyromonas gingivalis* の細胞内動態の解析. 第 26 回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2009/11/1, 名古屋
- ④ 村上旬平, 福留麗実, 和田精久, 秋山茂久, 森崎市治郎. *Streptococcus mutans* バイオフィルム形成における酸化チタン光触媒の役割. 第 27 回日本小児歯科学会近畿地方大会, 2008/10/19, 大阪
- ⑤ 村上旬平, 木村敬次リチャード, 堤香奈子, 竹内洋輝, 天野敦雄, 秋山茂久, 森崎市治郎. ダウン症候群歯肉上皮細胞の SV40 largeT 抗原導入による長期培養可能株の作製. 第 25 回日本障害者歯科学会, 2008/10/10, 東京.

[図書] (計 2 件)

- ① 村上旬平, 医歯薬出版株式会社 (日本障害者歯科学会編), スペシャルニーズデンティストリー障害者歯科, 2009. 総 397 ページ (91-93, 175-203, 233-238, 348-363).
- ② 村上旬平, 大阪大学出版会 (米田俊之編), 生命歯科医学のカッティング・エッジ, 2008. 総 289 ページ (120-129).

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.osaka-u.ac.jp/~disabl/research/archives.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 旬平 (MURAKAMI JUMPEI)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70362689