

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592312
 研究課題名（和文） 前立腺癌の臓器転移に及ぼす歯周感染病巣の影響に関する基礎的研究
 研究課題名（英文） How periodontitis can affect prostate cancer metastasis?
 研究代表者
 谷本 一郎（TANIMOTO ICHIRO）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：00280686

研究成果の概要（和文）：

歯周病という慢性炎症において局所で繰り返す細菌感染は、感染局所と全身において、全く逆の生体反応をもたらすことがわかった。微細な感染を繰り返すことは、たとえば敗血症になるような多量の細菌感染から、あらかじめ全身を守ることにつながっていると考えられる。慢性炎症がもたらす全身的な生体反応制御が、感染以外のがん転移という侵襲に対しても影響を及ぼしているかもしれない。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we demonstrated the opposite association between localized and systemic inflammatory responses. Our finding suggests that appropriate infectious exposure might be needed to maintain our life. Taken together, a severe sepsis-like condition elicited by bacteremia, is likely responsible for the mortality associated with *P. gingivalis* infection, but immune system would regulate the unwanted systemic responses. These systemic responses may also impact metastatic cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎，慢性炎症，癌転移

1. 研究開始当初の背景

我が国において、前立腺がんは、増加の一途を辿ることが予想されており、早急な対応策の策定が急務となっている。前立腺がんは、骨、リンパ節および肺などの臓器に転移することが知られる。がん転移は、血行性、リンパ性および播種性のいずれかの様式によつ

て発生することは自明であるが、詳細な転移の機序については多くの報告はあるものの、未だ不明な点が多い。

一方、歯周病は、歯周組織に歯周病原細菌が感染して発症する慢性微弱性炎症性疾患である。昨今、歯周病の病巣から産生される炎症性サイトカインや歯周病細菌の血行性移行によって、糖尿病や冠動脈疾患などが悪

化することが報告されている。様々な歯周病原因子の血行性の全身への波及・影響のコンセプトは、歯周内科”Periodontal Medicine”として、一学術領域を築くまでに発展を遂げている。しかしながら、歯周炎という慢性炎症が、“がん”の病態のリスク因子になるかどうかは不明である。微弱で慢性炎症を引き起こすとはいえ、歯周病の罹患率は非常に高いものである。歯周病ががん転移にどのように影響を与えているのかを研究する意義は高いと考えた。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、歯周病の炎症病態を解明するために、炎症性サイトカイン IL-6 に着目し、その歯肉線維芽細胞に与える影響を検討してきた。歯周病組織に炎症細胞が浸潤すると、IL-6 によって歯肉線維芽細胞のカテプシン B, L の分泌、および VEGF 産生が劇的に亢進する。この VEGF が血行性移行することで、遠隔の前立腺がん細胞に影響を与える可能性は十分に考えられる。しかしながら、慢性微弱感染症である“歯周病”と“前立腺がん”の転移の相互作用に着目した研究は一切存在しない。

VEGF は強力な”angiogenesis”を誘導するサイトカインであり、血行性の前立腺がんの転移に多大な悪影響を与えることがわかっている。申請者らは、新規に樹立した膜蛋白カベオリン-1 過剰発現前立腺がん細胞 RM-9 を、マウス前立腺に注入して、前立腺がん病変を形成させると、その血中 VEGF 濃度が増加し、結果的に血行性肺転移が亢進することを報告した。この研究によって、申請者らは「歯周炎病巣で著明に産生される VEGF が血中移行して、遠隔に存在する前立腺がん細胞に作用して、結果的にがん転移を亢進させる」というメカニズムを発想し、これを作業仮説として検証することを目的とした。

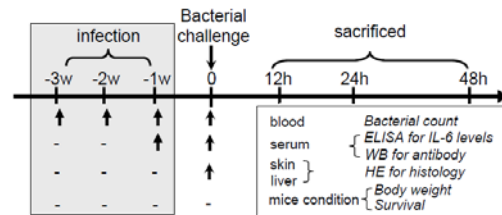
3. 研究の方法

①マウス慢性感染モデル

歯周病という慢性微弱性感染症をマウスで再現するために、歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の曝露接種回数を異にしたマウス群を作成し、暴露回数の違いを慢性感染の指標とし、感染頻度によってマウスの全身の炎症反応がどのように変わるかを調べた。

9 週齢オスの BALB/c マウスに *P. gingivalis* W83 生菌を一回につき 2.5×10^8 の量が右肢皮

下接種した。接種の回数を A グループ 4 回、B グループ 2 回、C グループ 1 回と変え、グループ分けした。陰性対照として D グループを PBS1 回接種したマウスとした。複数回接種は間隔を一週間開け、最後の一回の接種タイミングを全てのグループで合わせ、その後標本を採取した。また最後の接種後 2 日後に菌量 1.0×10^9 の *P. gingivalis* 生菌を接種した。その後の体重、生存率を 14 日後まで調べた。以上のタイムスケジュールを以下に示す。



②組織学的観察

最後の接種後 24 時間後に各グループの中の一部のマウスの接種部位の皮膚と肝臓を採取し、固定後パラフィン包埋し切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色の後に検鏡した。

③血清 IL-6 濃度測定

最後の接種後 12 時間と 24 時間後、48 時間後に血液を採取し、血清に存在する IL-6 の濃度を ELISA 法で測定した。

④*P. gingivalis* 生菌の検索

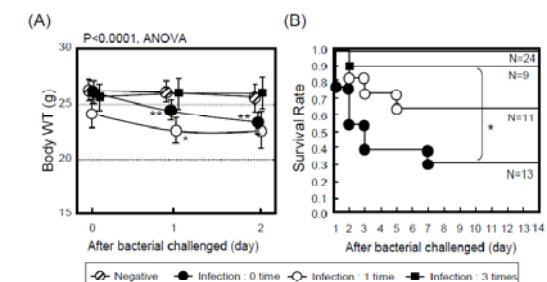
マウスの血液中に棲息している *P. gingivalis* を、血液寒天培地に播種し嫌気環境下で培養し生育する菌をコロニー数として測定した。

⑤抗体産生性

P. gingivalis 全菌を抗原、各グループのマウスの血清を一次抗体として用い、ウェスタンブロットで *P. gingivalis* 特異的 IgG の産生を検出した。

4. 研究成果

①マウスの体重変化、生存率

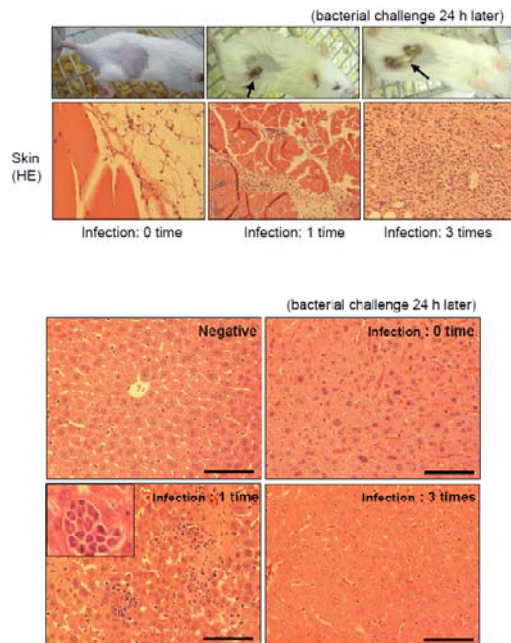


マウスの体重変化に関しては、*P. gingivalis* の接種回数が異なるグループで有意な差は無

かった、しかし生存率で有意な差が出現した。すなわち、事前に4回接種していたAグループがCグループに比べ生存率が有意に高かった。BグループはA,Cの中間の生存率であった。

②組織学的観察

接種局所と肝臓組織とで相反する反応となった。接種局所では、接種回数が多いAグループ群が肉眼的にも、組織学的にも高度な炎症反応を示していたのに比べ、接種回数が1回のCグループでは、わずかな反応しか示さなかった。対して、肝臓の組織像では複数回接種したAグループでは白血球の組織浸潤がごくわずか見られのみであるのに比べて接種の回数が少なかったC群では肝細胞が肥大化し血管新生が見られた。

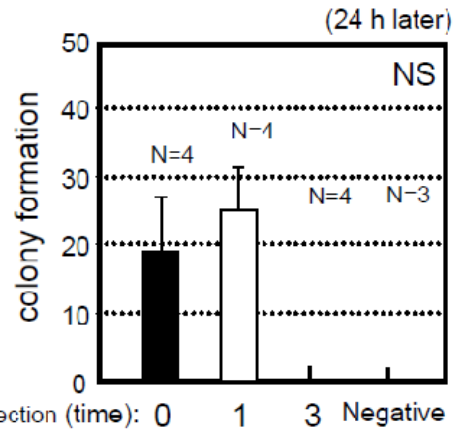


③血清 IL-6 濃度測定

最後の*P. gingivalis*暴露以降のIL-6の濃度の挙動は細菌接種1回のC群でIL-6濃度の上昇が著しく、4回接種したAグループは陰性対照Dグループと有意な差が無かった。

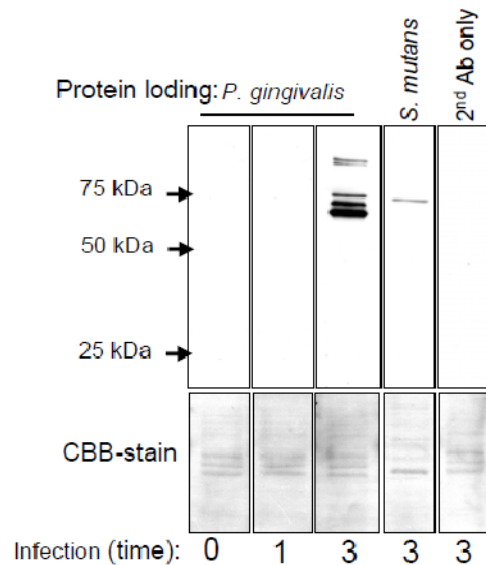
④*P. gingivalis*の生存

Cグループと陰性対照Dグループマウスの血液から生存している*P. gingivalis*を検出した。対して、事前に3回接種していたAグループでは血液中に生存している*P. gingivalis*を検出することは出来なかった。



⑤抗体産生性

多数回*P. gingivalis*に暴露したAグループではこの菌に対する特異的IgGが産生されているのに比べ、一度のみもしくは一度も暴露していないCグループ、Dグループではウェスタンブロットで検出できるだけの特異的IgGが産生されていなかった。



以上の結果から*P. gingivalis*の曝露回数によって、マウスの局所と全身での炎症反応はそれぞれ異なることが判明した。事前にあらかじめ暴露され、曝露回数が多いほど、すなわち慢性感染の状態では、より大きな感染が起こった際には感染局所の反応性が高くなり、全身的には感染に対する反応が小さくなる。反対に感染機会が少ない、もしくは全く無い状態で、暴露した場合には、局所の反応性が乏しく、全身での反応が大きくなるということがわかった。

慢性感染状態にあるマウスは全身的に反応性が低くなっており、がんの転移という感染

以外の侵襲に対しても、反応性を異にしているのかもしれない。

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 2 件)

- ① Takizawa N, Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K.
Secreted caveolin-1 enhances periodontal inflammation by targeting gingival fibroblasts.
Biomed Res. 2013 Feb;**34**(1):1-11.
- ② Naruishi K, Omori K, Maeda H, Sono N, Funakoshi K, Hirai K, Ishii M, Kubo K, Kobayashi H, Tomiyama T, Yamamoto D, Tanimoto I, Kunimatsu K, and Takashiba S.
Immune responses to *Porphyromonas gingivalis* infection suppress systemic inflammatory response in experimental murine model.
J Biol Regul Homeost Agents. 2011 Apr-Jun;**25**(2):195-202.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 一郎 (TANIMOTO ICHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00280686

(2) 研究分担者

渡部 昌実 (WATANABE MASAMI)
岡山大学・岡山大学病院・准教授
研究者番号：70444677

成石 浩司 (NARUISHI KOJI)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：00346446

峯柴 淳二 (MINESHIBA JUNJI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：00509383

大森 一弘 (OMORI KAZUHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20549860

高柴 正悟 (TAKASHIBA SYOGO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50226768

(3) 連携研究者

該当無し