

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861801

研究課題名(和文)根尖性歯周炎に対するIL-1 / ラミニンを用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文)The development of novel endodontic treatment using IL-1alpha/laminin for periapical periodontitis

研究代表者

大森 一弘 (Omori, Kazuhiro)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：20549860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：根尖性歯周炎の治癒機序は未だ不明な点が多い。本研究は、根尖病巣治癒期に発現が亢進するIL-1 とラミニンの動態に着目し、根尖部歯周組織の再生におけるIL-1 とラミニンの相互作用を検討した。MC3T3-E1細胞において、IL-1 とラミニンはFAKおよびMAPKsのリン酸化を亢進し、骨分化マーカーであるtype1 collagenのmRNA発現を亢進した。ラット歯内疾患モデルに分子イメージング技術を応用し、根尖部炎症の可視化と定量化する手法を確立した。以上の結果から、IL-1 およびラミニンの相互作用が根尖部歯周組織の再生に寄与し、歯内疾患研究における分子イメージング技術の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The precise periapical healing mechanism induced by root canal treatment (RCT) is unknown. We reported previously that interleukin (IL)-1a, but not IL-1b, and laminin were expressed during the healing phase in an experimental rat RCT model. However, the mechanism of the interaction between IL-1a and laminin for periapical healing is not clear. In this study, we investigated the biological effects of IL-1a and laminin on mouse osteoblastic cells, MC3T3-E1, and rat RCT model. IL-1a (0.1 ng/ml) and laminin (10 ng/ml) enhanced the phosphorylation of FAK and MAPKs (ERK1/2, p38, JNK1/2) in MC3T3-E1. In addition, IL-1a and laminin enhanced the mRNA expression of type1 collagen. We tried to visualize the inflammation of periapical region using molecular imaging. Inflammation of periapical region in rat RCT model was detected and quantified using molecular imaging. These data suggest that the dual effects of IL-1a and laminin may enhance the induction of osteogenesis during periapical healing.

研究分野：歯周病学，歯内療法学

キーワード：歯内療法 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療効果は、臨床症状の消退やエックス線画像検査による根尖部エックス線透過像の消失（骨再生）などを基準に判断されており、その治癒過程における分子病態レベルでの動態は診断に反映されていない。

これまで根尖性歯周炎の病態解明のために、様々な視点から研究成果が報告されてきた。申請者の研究グループは、根管治療の動物モデル（ラット）を作成し、その病巣治癒過程における分子病態を遺伝子マイクロアレイ法によって網羅的に捉えることに成功した。本研究成果の一つとして、根尖病巣治癒期において炎症性サイトカインの一つである IL-1 $\alpha$ の発現が亢進する知見を報告した（Martinez et al, J Endod, 2007）。また、細胞外基質の一つである Laminin  $\gamma$ 2 の発現が治癒期に上昇するという知見を得ている。

上記知見をもとに、骨再生を担う主細胞である骨芽細胞に対する IL-1 $\alpha$ とラミニンの効果を検討したところ以下のような結果を得た。マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いて、低濃度（0.1 ng/ml）から高濃度（10 ng/ml）のリコンビナントマウス IL-1 $\alpha$ を作用させたところ、低濃度 IL-1 $\alpha$ 刺激時にラミニンと特異的に結合する細胞接着因子の一つであるインテグリン $\alpha$ 3 の発現が mRNA およびタンパク質レベルで亢進することを確認した。炎症状態を想定した高濃度 IL-1 $\alpha$ 刺激ではインテグリン $\alpha$ 3 の発現が誘導されず、インテグリン $\beta$ 1 の発現には影響しない点にも着目したい。また、低濃度 IL-1 $\alpha$ 刺激によってインテグリン $\alpha$ 3 の発現を亢進させた MC3T3-E1 を用いてラミニンに対する接着性を検討したところ、その接着性が対照コントロールであるフィブロネクチンと比較しても有意に亢進することを確認した。さらに、低濃度 IL-1 $\alpha$ （0.1 ng/ml）およびラミニン存在下で MC3T3-E1 を長期培養してカル

シウム産生能を検討したところ、非存在下と比較して有意にカルシウム産生が亢進することを確認した。

これらの結果は、根尖病巣治癒期における病巣部への骨芽細胞の誘導・定着・硬組織産生に IL-1 $\alpha$ およびラミニンが関与する可能性を示唆するものと考えられる。しかし、詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、MC3T3-E1 を用いて硬組織産生に及ぼす IL-1 $\alpha$ とラミニンの影響を *in vitro* の実験系で確認し、さらに、ラット根管治療モデルを用いて低濃度 IL-1 $\alpha$ とラミニンを併用した根管治療が根尖病巣治癒に及ぼす影響を従来の治療法と比較し、その有用性を検討することとした。そして、根尖病巣治癒メカニズムに IL-1 $\alpha$ およびラミニンの相互作用が及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を用いて、まず、IL-1 $\alpha$ およびラミニン刺激時における骨分化マーカー発現に及ぼす影響を検討した。すなわち、サブコンフルエントの状態に培養した MC3T3-E1 をリコンビナントマウス IL-1 $\alpha$ およびラミニンで刺激した後、全細胞を試料として total RNA を経時的に回収した。RT-PCR 法を用いて cDNA を構築した後、骨分化マーカーの候補として runx2, osterix, osteocalcin, collagen type I の特異的プライマーを用いて、その mRNA 発現の量的変化を定量性 PCR 法にて解析した。なお、内部コントロールとしては GAPDH を用いて補正した。次に、IL-1 $\alpha$ およびラミニン刺激時におけるカルシウム産生性に細胞内シグナル伝達系が及ぼす影響を検討した。すなわち、サブコンフルエントの状態に培養し

た MC3T3-E1 をリコンビナントマウス IL-1 $\alpha$  およびラミニンで刺激する 30 分前に、硬組織産生性に関与すると報告されている各種阻害剤 (MAPK 阻害薬, FAK 阻害薬等) を作用させ、刺激 10~30 分後に全細胞タンパクは細胞溶解液を用いて回収した。各細胞内シグナル伝達系タンパク質のリン酸化は、ウエスタンブロット法を用いて検討した。

動物実験として、申請者らのグループが作成したラット根管治療モデルを用いて、まず、分子イメージング技術を応用し、ラット根尖病巣の炎症可視化する評価手法を検討した。すなわち、ラット根管治療モデルとして、雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット、10 週齢を実験に供した。通法に従って麻酔後、上顎左側第一大臼歯の歯髄腔をラウンドバーにて開放し、歯髄感染処置を行った (endo-model 群)。歯髄腔開放後 28 日間、口腔内の常在菌と感染させた。一方、歯髄開放処置を行っていない群をコントロール群とした (control 群)。なお、各群において、対側同名歯を個体内コントロールとして用いた。歯髄感染 29 日目に、炎症巣に集積する蛍光プローブ (XenoLight Rediject Inflammation Probe, 住商ファーマ) を腹腔から注入した。歯髄感染 30 日目にラットを安楽死させた後に上顎骨を摘出して、IVIS spectrum (Perkin Elmer) を用いて炎症の状態を評価した。イメージング解析終了後、通法に従い組織を固定した後、マイクロ CT を用いて骨欠損の状態を確認した。さらに、同評価系を用いて、根管充填時に IL-1 $\alpha$  およびラミニンを併用した際の病巣治癒に及ぼす影響の検討を試みた。

#### 4. 研究成果

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 において、ラミニンで前処理した後、IL-1 $\alpha$  で刺激すると、FAK および MAPKs のリン酸化が増強した ( $p < 0.05$ )。さらに、骨分化マーカーの一つである collagen type1 の mRNA 発現が亢進した

( $p < 0.05$ )。動物実験において、歯髄感染モデル (endo-model) において、歯髄感染させた上顎左側第一大臼歯部を中心に強い蛍光プローブの集積を確認した。また、対照側 (健側) である上顎右側第一大臼歯部にも蛍光プローブの集積を確認した (図 1)。一方、健常モデル (control) において、被験歯である両側第一大臼歯部への炎症プローブの集積に左右差は見られなかった。また、歯髄感染モデルと比較しても蛍光プローブの集積量は少ない傾向を確認した (図 1)。

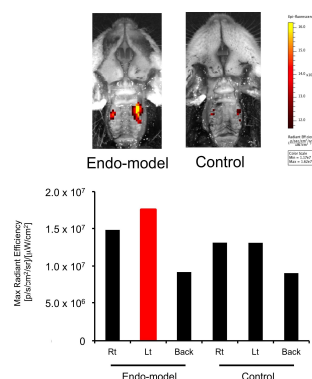


図1 歯髄感染ラットモデルにおける分子イメージング解析画像

歯髄感染モデルにおいて、根尖部骨組織の状態はマイクロ CT を用いて解析した。被験歯である上顎左側第一大臼歯根尖部を中心にエックス線透過性の亢進を確認した (図 2, 矢印)。一方、対照側 (健側) である上顎右側第一大臼歯根尖部にはエックス線透過性の亢進は確認できなかった。

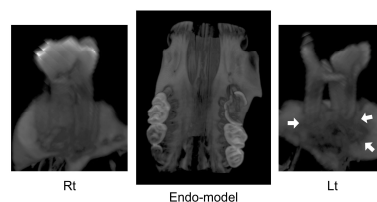


図2 歯髄感染ラットモデルにおけるマイクロCT解析画像

本研究において、IL-1 $\alpha$  およびラミニンの併用が根尖病巣部における硬組織産生を亢進し、根尖病巣治癒に関与する可能性が示唆された。また、分子イメージング技術を用いることによって歯内疾患の可視化が可能であることが示唆された。歯内疾患の治癒率を向上させることは、歯の保存の延命につながり、

ひいては咀嚼機能の維持，すなわち，国民の健康寿命の延伸に寄与できる。そのためにも，効果的な歯内治療の手法を開発することは非常に重要である。本研究結果は，根尖病巣治療における IL-1 $\alpha$ およびラミニンの効果のメカニズムの一部を解明したが，今後さらなる検討が必要である。

## 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0件)

[学会発表](計6件)

- 1) 中川沙紀，大森一弘，山本総司，小林寛也，後藤絢香，中村亜里紗，山本直史，高柴正悟，真菌由来代謝産物(+)-terrein は RANKL 誘導性破骨細胞分化を抑制する，第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会，2015 年 11 月 12 日，東京
- 2) 山本総司，大森一弘，後藤絢香，池田淳史，小林寛也，中川沙紀，山本大介，山本直史，前田博史，高柴正悟，真菌由来代謝産物(+)-terrein 誘導体が IL-6 誘導性 VEGF および CSF-1 の産生に及ぼす影響の検討，第 58 回日本歯周病学会春季学術大会，2015 年 5 月 18 日，千葉
- 3) 大森一弘，高柴正悟，新たな糖尿病合併症に迫る ～糖尿病患者にとっての歯周病治療を再考する～，第 29 回日本糖尿病合併症学会学術大会(シンポジウム)，2015 年 11 月 25 日，名古屋
- 4) 後藤絢香，大森一弘，富川知子，小林寛也，成石浩司，前田博史，高柴正悟，IL-6/sIL-6R は歯肉線維芽細胞から活性を有するリソソーム酵素カテプシン B，L の分泌を亢進する，第 57 回日本歯周病学会秋季学術大会，2014 年 10 月 18 日，神戸
- 5) 山本総司，大森一弘，後藤絢香，池田淳史，松永一幸，山本大介，山本直史，前

田博史，高柴正悟，真菌由来代謝産物(+)-terrein は interleukin-6 誘導性 colony stimulating factor-1 の遺伝子発現を抑制する，第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会，2014 年 10 月 31 日，山形

- 6) 山本大介，大森一弘，小林寛也，富山高史，久保克行，成石浩司，前田博史，高柴正悟，血管新生阻害物質 terrein がヒト歯肉線維芽細胞における IL-6/sIL-6R 誘導性 angiogenin および VEGF の産生に及ぼす影響，第 56 回日本歯周病学会春季学術大会，2013 年 5 月 31 日，東京

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

大森 一弘 (OMORI KAZUHIRO)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：20549860

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし