

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670896

研究課題名(和文) 歯肉溝滲出液の網羅的な質量分析解析法による乳歯と永久歯の生物学的特性の比較

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of protein in gingival crevicular fluids from deciduous and permanent teeth using LC-ESI-MS/MS quantitative proteomics

研究代表者

山本 松男 (YAMAMOTO, Matsuo)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50332896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳歯と永久歯の組織の性質の差の解明を目的に、同一個体において両者のGCF成分を質量分析(LC-ESI-MS/MS)により網羅的に比較した。被験者は混合歯列期(Hellmanの歯齢 IIIA)の小児40名(平均年齢：7.3 ± 0.9歳、男児31名、女児9名)とし、上顎中切歯と乳犬歯とからGCFを採取した。乳歯GCFでは好中球に由来するタンパク質が多く、特にミエロペルオキシダーゼおよびラクトフェリンの濃度は永久歯と比べて乳歯で有意に高いことが分かった(P<0.01)。このことより、同一口腔内に萌出している乳歯と永久歯の歯肉局所において、主たる生体防御機構が異なっている可能性が考察された。

研究成果の概要(英文)：To identify the biochemical characteristics of gingival tissues for distinguishing between permanent and deciduous teeth, the protein profiles of gingival crevicular fluids (GCF) were analyzed using quantitative proteomics. Forty children with mixed dentition (Hellman's dental age IIIA) were selected and their GCF samples were collected from both deciduous cuspids and central incisors in the maxilla. Among them, neutrophil-derived proteins, myeloperoxidase and lactoferrin, were upregulated in deciduous GCF. Protein levels of myeloperoxidase and lactoferrin in individual GCF samples, again determined by ELISA, were significantly higher in deciduous GCF than in permanent GCF (P < 0.01), confirming the predominance of neutrophil-derived proteins in deciduous GCF. These findings suggest that neutrophil accumulation is beneficial for gingival tissue of deciduous teeth and shows difference of protective mechanism against bacterial infection between deciduous and permanent teeth.

研究分野：歯周病態・診断学

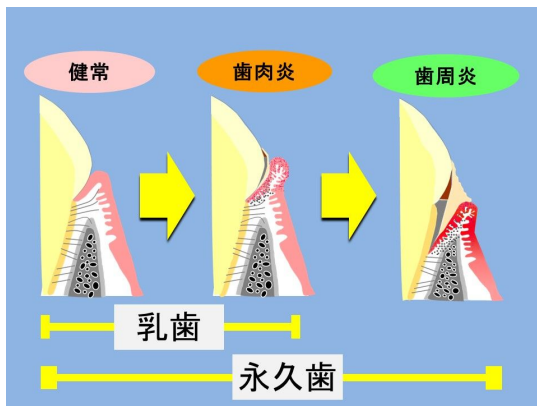
キーワード：歯肉溝滲出液 乳歯 永久歯 好中球 質量分析

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯肉溝付近に慢性的に付着したデンタルプラークにより炎症が惹起され、炎症性の組織破壊が進む疾患である。歯肉溝には接合上皮を通過してにじみ出てくる血漿由来の組織液を認め、歯肉溝滲出液（以下GCF）と呼ばれている。歯肉溝の深さが歯周病により深くなった状態を歯周ポケットと呼ぶが、歯肉溝もしくは歯周ポケットからのGCFには歯周ポケットに存在するデンタルプラーク細菌由来の物質だけではなく、歯周組織を構成する細胞や免疫細胞に由来するタンパク質構成物質、組織を栄養し感染からの防御に必要な組織液に含まれる成分が含まれている。歯周病学では、GCFに含まれる成分の解析が、歯周病による組織破壊や防御のメカニズムの解明につながると考えられ、古くから研究対象となってきた。私たちの研究グループでは、GCFに含まれる脂質をターゲットに解析を行い、特に炎症による酸化変性脂質と歯周病病態の解析を行ってきた。近年、少量サンプルに含まれるタンパク質の解析に質量分析装置が大きな威力を発揮しているが、GCFについても、より広範な成分の解析が可能になってきた。

2. 研究の目的

永久歯では歯周組織の破壊をとともう歯周炎にまで進展するが、乳歯では一般的に宿主免疫機能に異常を認める特殊な症例を除き、歯肉炎にとどまることがほとんどである。乳歯および永久歯において歯周組織の形態的な特徴の差や浸潤している免疫系細胞の数の差などについてはいくつかの報告があるもの、これまでに構成タンパク質等を網羅的に、また詳細に解析した報告はほとんどない。歯周炎に進展しないメカニズムの解明は、歯周病病態進行メカニズムの理解の一助になるものと考え、同一個体における乳歯および永久歯から採取したGCFのタンパク質構成成分の解析を行うことを目的とした。



3. 研究の方法

被験者は昭和大学歯科病院小児歯科に通院中の患者の内、Hellmanの歯齢Aの混合歯列期の小児36名を対象とした。本研究のプロトコールは昭和大学歯学部医の倫理委

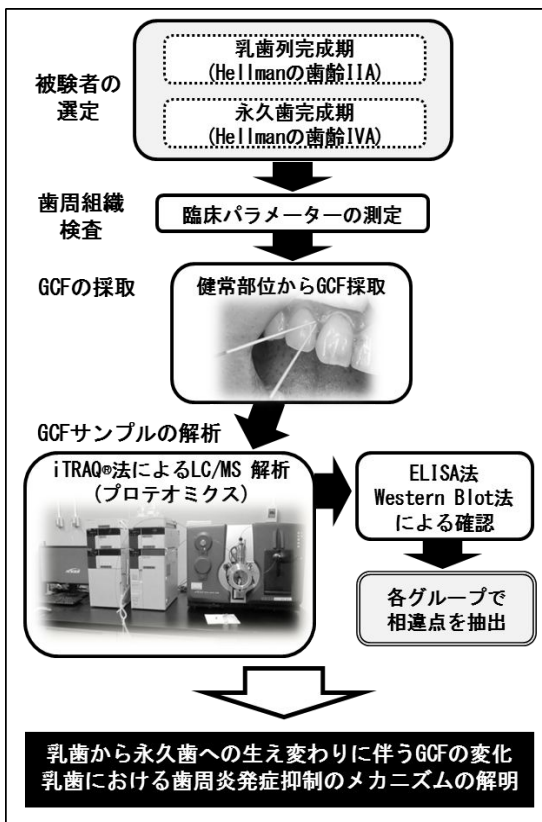
員会により承認された。

採取部位は同一口腔内の上顎中切歯(1)と乳犬歯(C)とし、歯肉の炎症の認められない臨床的に健康な状態(GI(Gingival Index)=0, 1)の歯肉溝より採取することとした。それぞれの歯肉溝に2本のペーパーポイントを用いて1分間挿入しGCFを採取した。ペーパーポイントを直ちにプロテアーゼインヒビター含有PBSに浸漬し、GCFを溶出させた。その後、BCAアッセイ法によりタンパク濃度を測定し、iTRAQ質量分析解析およびELISA法による分析の時点まで-80℃で凍結保存した。

その内、22名からのGCFサンプルはiTRAQ標識法を用いた質量分析法により永久歯もしくは乳歯に多い成分を検出する方法で解析を行った。質量分析法では微量な試料での解析が可能であるが、GCFサンプルそのものも、一カ所より1-数μlほどしか採取できないために、3もしくは4名分のサンプルを混合して7グループに分けて解析を行った。iTRAQ試薬(AB SCIEX)を用いて標識後、質量分析(LC-ESI-MS/MS)により解析した。

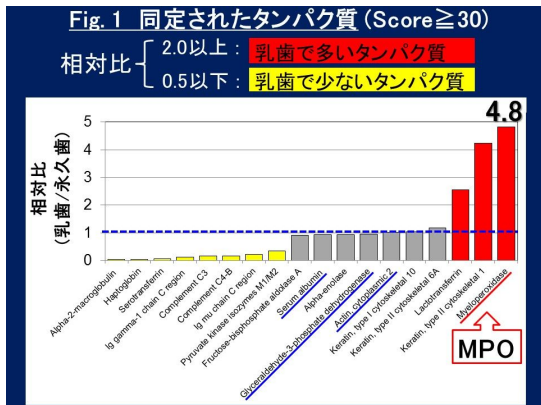
両者において差の大きい成分については、個別の定量的な検討を再確認するために、ELISA法による解析も行った。ELISAキット(R&D Systems)を用いて、14名分のGCF中のMPO濃度を測定した。

除外基準は以下に示すとおりである。全身疾患がある者、矯正治療の既往がある者、サンプル採取部位に外傷、重度なう蝕、歯内病変の既往がある者。

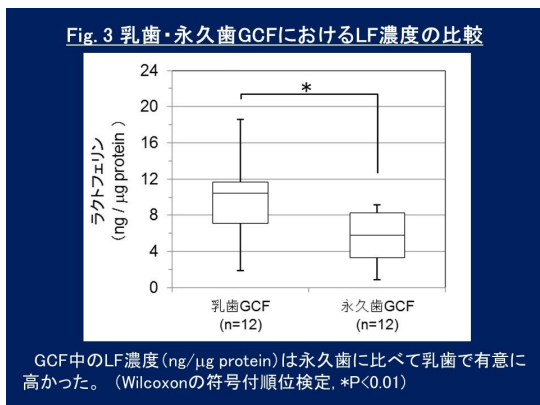
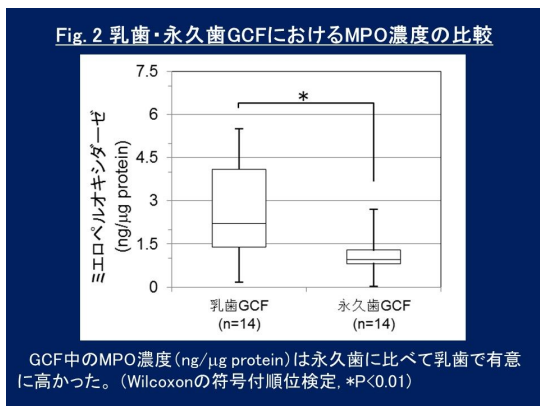


4. 研究成果

iTRAQ 標識法を用いた質量分析法により乳歯 GCF では細胞や好中球に由来するタンパク質が多く、永久歯 GCF では血漿由来のタンパク質が多い傾向を示した。特に、NETs を含む好中球機能に関連するタンパク質が乳歯 GCF で多かった。一方で、免疫グロブリン系タンパク質や補体は永久歯 GCF の方に多く含まれていた (図 1)。



好中球由来のタンパク質であるミエロペルオキシダーゼ(MPO)、ラクトフェリン(LF)について、個々のGCFサンプルを用いてELISA法で検出したところ、MPOとLFの濃度は永久歯と比べて乳歯で有意に高いことが分かった (P<0.01) (図 2, 3)。



このことより、乳歯周囲の接合上皮やその上皮下の結合組織には好中球が豊富に存在しており、同一口腔内から採取した乳歯・永久歯 GCF におけるプロテインプロファイルは異なっていることから、同一口腔内に萌出している乳歯と永久歯の歯肉局所において、主たる生体防御機構が異なっている可能性が

考察された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 発表者: 守屋佑美、小浜孝士、杉山智美、遠藤由美子、小出容子、野口江美子、石塚元規、井上美津子、板部洋之、山本松男
 演題名: 乳歯と永久歯の歯肉溝滲出液中に含まれるタンパク質の網羅的解析
 発表形式: 口演
 学会名: 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会(浜松) 2015/9/12,13
 日本歯周病学会会誌(秋季特別号)第 57 巻 p116

2. 発表者: 守屋佑美、小浜孝士、杉山智美、遠藤由美子、小出容子、野口江美子、石塚元規、井上美津子、板部洋之、山本松男
 演題名: 乳歯と永久歯の歯肉溝滲出液中に含まれるタンパク質の網羅的解析
 発表形式: ポスター
 学会名: 第 62 回昭和大学学士会総会(東京) 2015/11/28
 第 62 回昭和大学学士会総会プログラム・抄録集, 2015

3. 発表者: 守屋佑美、小浜孝士、小出容子、野口江美子、石塚元規、竹丸真以、板部洋之、山本松男
 演題名: 乳歯と永久歯の歯肉溝滲出液中に含まれるタンパク質の網羅的解析(第 2 報)
 発表形式: 口演
 学会名: 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会(鹿児島) 2016/5/20,21
 日本歯周病学会会誌(春季特別号)第 58 巻 p119

4. 開催日時: 2015 年 6 月 3 日 ~ 6 日

開催場所: ロンドン

演題名: Comparison between gingival crevicular fluids from deciduous and permanent teeth using iTRAQ quantitative proteomics

発表者: Y. Moriya, T. Obama, N. Sasabe, T. Aiuchi, Y. Endo, T. Sugiyama, Y. Koide, M. Inoue, H. Itabe, M. Yamamoto

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

山本松男 (YAMAMOTO, Matsuo)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50332896

(2)研究分担者

井上美津子 (INOUE, Mitsuko)

昭和大学・歯学部・客員教授

研究者番号：20112724

(3) 研究分担者

板部洋之 (ITABE, Hiroyuki)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：30203079

(4) 研究分担者

小出容子 (KOIDE, Yoko)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：40407466