

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15763

研究課題名(和文)病態可視化マウスを用いた新規歯周病病因論の探索

研究課題名(英文) Exploring the alternative pathology of periodontal disease by using ERAI mouse

研究代表者

山崎 和久 (YAMAZAKI, KAZUHISA)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00182478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体機能の障害を引き起こす小胞体ストレス応答は様々な疾患の病因と関連することが明らかになっており、特に感染症や炎症との関係が注目されている。そこで歯周疾患の際に小胞体ストレス応答が組織のどこで起こっているか明らかにするため小胞体ストレスを可視化できるERAIマウスを用いて歯周病原細菌投与と絹糸結紮という異なるモデルで明らかにしようとした。いずれの歯周組織破壊モデルにおいても歯肉組織で従来の方法を用いて小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現上昇が認められることが明らかになった。しかし、ERAIマウスでは局在を解明することはできなかったばかりか、陽性対照である組織でも可視化することができなかった。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) stress is the cell response that activates the unfolded protein response (UPR) pathway in a variety of conditions, such as inflammation and bone metabolism. In order to clarify the exact location of the UPR response in periodontal tissues in periodontal disease, we induced periodontal tissue destruction by administering *Porphyromonas gingivalis*, a periodontopathic bacterium, and ligature placement around the upper second molar in ERAI mouse in which UPR response can be visualized. Although the upregulation of the UPR response-related gene was observed by using conventional method, this response cannot be visualized in ERAI mouse. We tried to detect UPR response visually in gingival tissue by administering tunicamycin, a UPR response-inducing agent or pancreas, consistently occurring UPR response as positive control experiments. However, we were unable to detect UPR response visually.

研究分野：歯周病学

キーワード：小胞体ストレス応答 歯周組織破壊 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

細胞内小器官である小胞体は、タンパクの高次構造形成を行うと同時に異常なタンパクを分解して排除し、細胞機能が正常に営まれるよう制御している。しかし、その制御能力を超えて異常タンパクが蓄積すると細胞機能に悪影響を及ぼす。この異常タンパクが蓄積した状態を小胞体ストレスと呼ぶ。細胞には小胞体ストレスを回避する機構が備わっており、これを unfolded protein response (UPR) と称している。

小胞体ストレス応答は細胞機能のみならず、様々な疾患の病因と関連することが明らかになってきており、特に近年、感染症や炎症との関係が注目されている (Garg AD *et al.*, *Trend Mol Med*, 2012)。

我々はこれまでにヒト歯周炎組織の遺伝子発現解析を行い、小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現が上昇していることを報告した (Domon *et al.*, *Clin Chim Acta* 2009)。これは、歯周炎組織では各種サイトカインや抗体産生が亢進し、小胞体に大きな負荷がかかっていることが原因と推察される。また、小胞体ストレスを軽減する作用のある化学シヤペロンを投与すると *Porphyromonas gingivalis* 経口投与により誘導される骨吸収が抑制される (Yamada *et al.*, *J Periodont Res* 2015)。これらの結果は、歯周炎の病態においても小胞体ストレス応答が何らかの、しかも非常に重要な役割を演じていることを強く示唆するが、病原メカニズムについてはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

小胞体ストレスにより活性化される分子に蛍光タンパク遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウス (ERAI マウス) に人為的な歯槽骨吸収を誘導し、歯周組織のどこに、また全身のどの組織において小胞体ストレス応答が誘導されるかを明らかにするとともに、そのシグナルが骨吸収とどのように関連するかを遺伝子発現の網羅的解析により解明する。

3. 研究の方法

(1) ERAI マウスの繁殖

小胞体ストレスを可視化できる ERAI マウスを新潟大学動物実験施設内で繁殖させた。この段階で、ライセンスの獲得、胚受領の手続き、個体の繁殖等に予想以上に時間を要してしまったため、当初の計画を一部変更し、C57BL/6 マウスを用いた小胞体ストレス関連分子発現解析を下記(2)(3)の通り実施した。

(2) 実験的歯槽骨吸収モデルマウスにおける小胞体ストレス関連分子発現の解析

上顎第二臼歯の歯頸部に 5-0 絹糸を 2 週間結紮することでプラークを蓄積させ歯肉組織の強い炎症および歯槽骨吸収が誘導される結紮誘導歯周炎モデルマウスと、上顎第一臼歯の咬合面に歯科用レジンで築盛する

ことで歯根膜組織に機械的刺激を与え歯根分岐部の歯槽骨吸収が誘導される咬合性外傷モデルマウスを作成した。それぞれのモデルマウスから歯肉組織および肝臓組織を採取し、小胞体ストレス関連分子の遺伝子発現を real-time PCR 法にて解析した。

(3) 咬合性外傷モデルに対する Resveratrol 経口投与の小胞体ストレス関連分子発現に与える影響の解析

歯槽骨吸収を抑制する作用を有する Resveratrol を CM セルロースに懸濁させ咬合性外傷モデルマウスに経口投与した場合の歯肉組織における小胞体ストレス関連分子の発現を real-time PCR 法にて解析した。

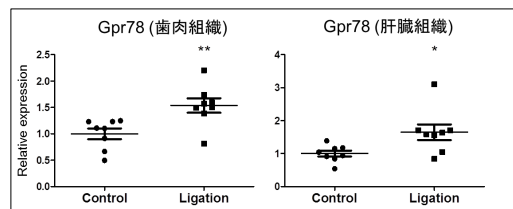
(4) ERAI マウスにおける小胞体ストレス発現の可視化方法の検討

先行研究ならびに我々の過去の報告から、Tunicamycin 投与により肝臓に小胞体ストレス応答が生じることが明らかになっている。そこで、ERAI マウスおよび C57BL/6 マウスに Tunicamycin を腹腔内投与し、16 時間後に肝臓組織を取り出しパラフィン切片を作成し、抗ルシフェラーゼ抗体による免疫染色を行うことで、小胞体ストレスの評価が可能かを検討した。また、内在性に小胞体ストレスが存在する膵臓においても同様の手法で小胞体ストレスの検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 結紮誘導歯周炎モデルにおける検討

結紮誘導歯周炎モデルマウスの歯肉組織において、小胞体ストレス関連分子である Grp78 遺伝子発現の有意な上昇を認めた。これは、*P. gingivalis* 経口投与モデルを用いた我々の過去の報告と同様の結果であった (Yamada *et al.*, *J Periodont Res* 2015)。他の小胞体ストレス関連分子 Atf4、Ire1a、Chop については有意な発現レベルの変化は認められなかった。肝臓組織においても同様に、Grp78 遺伝子発現のみ有意な上昇を認めた。

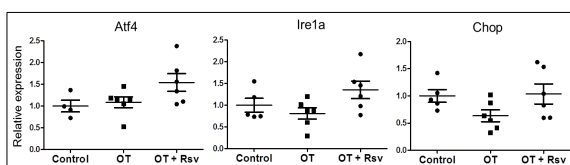


(2) 咬合性外傷モデルにおける検討

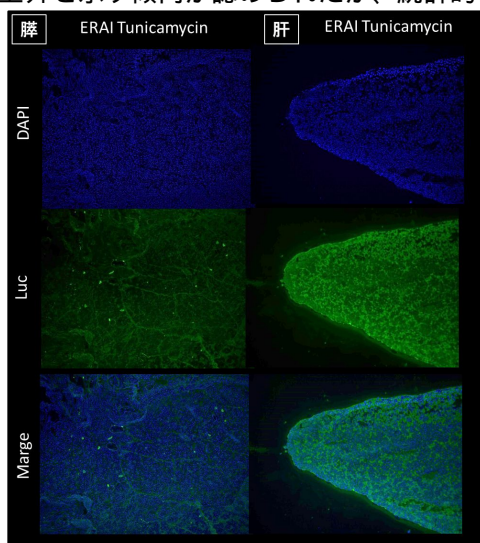
これまで、*P. gingivalis* 経口投与モデルおよび結紮誘導歯周炎モデルを用いて細菌感染が誘導する炎症性骨吸収における小胞体ストレスの影響を検討してきた。続いて、過度な咬合による機械的ストレスが誘導する歯槽骨吸収における小胞体ストレスの影響を検討する為に咬合性外傷モデルマウスを作成した。

このモデルは結紮誘導歯周炎モデルとは対照的に、歯肉組織における炎症性サイトカイン遺伝子発現の上昇や上皮組織の破壊は引き起こされず、機械的ストレスが加わる歯根膜組織において炎症性サイトカイン遺伝子発現が上昇するという特徴を持つ。さらに、抗炎症作用や骨吸収抑制作用を有するポリフェノールである Resveratrol を投与すると、歯根膜組織における炎症因子の遺伝子発現および歯槽骨吸収が抑制されることが明らかとなった。

このモデルの歯肉組織における小胞体ス



トレス関連分子の発現を解析したところ、結紮誘導歯周炎モデルおよび *P. gingivalis* 経口投与モデルの時とは異なり、Atf4、Ire1a、Chop のいずれも発現上昇は認められなかった。また、Resveratrol を投与した場合にいずれの分子も咬合性外傷単独と比較して発現上昇を示す傾向が認められたが、統計的に



有意な変動は示さなかった。

(3) ERAI マウスを用いた小胞体ストレス可視化方法に関する検討

予備実験として、小胞体ストレス誘導剤である Tunicamycin を投与し、小胞体ストレス応答が活発な組織として知られている肝臓組織のパラフィン切片を作成し、抗ルシフェラーゼ抗体による免疫染色を行った。しかし、この方法では、小胞体ストレスの検出は出来なかったことから、内在性に小胞体ストレスが存在する脾臓での検出を試みた。その結果、脾臓において未刺激、Tunicamycin 投与いずれにおいてもルシフェラーゼの反応は観察されなかった。これらの結果から、歯周病原細菌投与、歯牙結紮による小胞体ストレス応答を介した全身への影響を ERAI マウスを用いた今回の方法で検討することはできないと判断するに至った。

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2件)

2016年

(1) Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Matsuda Y, Sato K, Takahashi N, Nakajima T, Yamazaki K. Brazilian propolis mitigates impaired glucose and lipid metabolism in experimental periodontitis in mice. *BMC Complement Altern Med* 16:329, 2016. (査読あり)

(2) Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Sato K, Ohno H, Yamazaki K. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating IL-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. *J Periodont Res.* 51(5):639-46, 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計16件)

(1) Sato K, Takahashi N, Matsuda Y, Yamada M, Yokoji M, Tabeta K, Nakajima M, Yamazaki K. A novel mechanism linking periodontitis and rheumatoid arthritis. 95th General session of the IADR, San Francisco, March 24, 2017.

(2) Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Yokoji M, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. A bacterial metabolite ameliorates *P. gingivalis*-induced gingival epithelial barrier disruption. 95th General session of the IADR, San Francisco, March 24, 2017.

(3) Matsuda Y, Minagawa T, Okui T, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Effect of resveratrol on alveolar bone loss induced by the experimental occlusal trauma in mice. 95th General session of the IADR, San Francisco, March 24, 2017.

(4) Yokoji M, Tabeta K, Miyazawa H, Matsuda Y, Sato K, Yamada M, Yamazaki K. PCSK9 induction by *P. gingivalis* independent of inflammatory response. 95th General session of the IADR, San Francisco, March 24, 2017.

(5) Sato K, Takahashi N, Nakajima M, Kato T, Matsuda Y, Yokoji M, Yamada M, Ohno H, Yamazaki K. Periodontopathic bacteria increases the risk of rheumatoid arthritis by affecting gut

immune system. International Congress of Immunology 2016, Melbourne, Australia, August 24, 2016.

- (6) 松田由実、高橋直紀、中島麻由佳、佐藤圭祐、多部田康一、中島貴子、山崎和久。結紮誘導歯周炎モデルマウスにおける全身への影響とそのメカニズムの解析。第49回新潟歯学会総会、2016年4月23日
 - (7) 佐藤圭祐、高橋直紀、中島麻由佳、松田由実、山田実生、横地麻衣、多部田康一、中島貴子、山崎和久。Porphyromonas gingivalis 口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析。日歯周誌 58巻 春季特別号 116ページ。第59回春季日本歯周病学会学術大会、鹿児島、2016年5月20日
 - (8) 松田由実、皆川高嘉、高橋直紀、佐藤圭祐、横地麻衣、山田実生、多部田康一、中島貴子、山崎和久。外傷性咬合により誘導される歯槽骨吸収に対するResveratrolの影響。日本歯科保存学会第2016年度春季学術大会プログラムおよび講演抄録集 p27, 第144回日本歯科保存学会2016年度春季学術大会、宇都宮、2016年6月10日
 - (9) 山田実生、高橋直紀、松田由実、佐藤圭祐、横地麻衣、多部田康一、中島貴子、山崎和久。口腔細菌脂質代謝に由来する機能性脂肪酸HYAは歯肉上皮バリア機能の低下を抑制する。日歯周誌 58巻 秋季特別号 112ページ。第59回秋季日本歯周病学会学術大会、新潟、2016年10月7日
 - (10) 佐藤圭祐、高橋直紀、中島麻由佳、松田由実、山田実生、横地麻衣、多部田康一、中島貴子、山崎和久。Porphyromonas gingivalis 口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析。平成28年度新潟歯学会第2回例会、2016年11月5日
 - (11) 横地麻衣、多部田康一、宮沢春菜、野中由香利、高橋直紀、松田由実、佐藤圭祐、山田実生、伊藤晴江、中島貴子、山崎和久。細菌抗原によるPCSK9産生の誘導機構。第145回日本歯科保存学会2016年度秋季学術大会、松本市キッセイ文化ホール、2016年10月28日
 - (12) Sato K, Takahashi N, Matsuda Y, Yamazaki K: Effects of Prevotella intermedia administration on systemic inflammation in mice: The 11th APSP 2015, Bali, Indonesia, October 8, 2015
 - (13) Matsuda Y, Minagawa T, Okui T, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K: Effect of Resveratrol on alveolar bone loss induced by the experimental occlusal trauma in mice: 63rd Annual meeting of JADR, Fukuoka, October 30, 2015.
 - (14) 中島麻由佳、有松圭、高橋直紀、皆川高嘉、松田由実、佐藤圭祐、中島貴子、多部田康一、山崎和久。Porphyromonas gingivalis 経口単回投与によるマウス腸内細菌叢の変動。第48回新潟歯学会総会、2015.4.18.
 - (15) 高橋直紀、有松圭、中島麻由佳、松田由実、佐藤圭祐、多部田康一、中島貴子、加藤完、大野博司、山崎和久。歯周炎モデルマウスにおける腸内細菌叢の変動と免疫応答への影響。第19回腸内細菌学会、東京、2015.6.18.
 - (16) 松田由実、高橋直紀、有松圭、中島麻由佳、佐藤圭祐、多部田康一、中島貴子、山崎和久。歯周組織局所の炎症およびP. gingivalisによる腸内細菌叢の変動が全身に及ぼす影響とその分子機構の比較。日本歯周病学会誌 57巻 秋季特別号 129ページ、第58回秋季日本歯周病学会学術大会、浜松、2015.9.12
- 〔図書〕(計5件)
- (1) 山崎和久: ヒトマイクロバイオーム研究最前線(服部正平監修)第5編腸管以外のマイクロバイオームの生態と機能 第1章口腔マイクロバイオームの生態と機能 第2節口腔細菌が及ぼす腸内細菌叢への影響 - 歯周病と全身疾患の関連・腸内細菌叢 dysbiosisからの視点 - 331 - 342 ページ 株式会社エヌ・ティー・エス 2016年3月10日
 - (2) 山崎和久・高橋直紀・五味一博。日本歯周病学会編「歯周病と全身の健康」第1部臨床研究からのエビデンス 1) 歯周病と血管障害。10 - 16 ページ、日本歯周病学会 2016年3月25日
 - (3) 山崎和久・梅田誠・吉成伸夫。日本歯周病学会編「歯周病と全身の健康」第2部細胞・分子レベルのメカニズム 2) 歯周炎と動脈硬化症の関連メカニズム。92 - 95 ページ、日本歯周病学会 2016年3月25日
 - (4) Kazuhisa Yamazaki. Chapter 15 New paradigm in the relationship between periodontal disease and systemic diseases: effects of oral bacteria on the gut microbiota and metabolism.

243-261 In: Eds; Luigi Nibali and Brian Henderson. John Wiley & Sons, Inc. Oxford, UK; 2016.

- (5) 高橋直紀・山崎和久：腸内細菌・口腔細菌と全身疾患（落合邦康監修）【第III編 口腔細菌と疾患】第14章 腸内細菌叢への影響 195 - 203 ページ シーエムシー出版 2015年12月21日

〔その他〕

http://www.dent.niigata-u.ac.jp/yamazaki_lab

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 和久 (Yamazaki, Kazuhisa)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：00182478

(2) 研究分担者

中島 貴子 (Nakajima, Takako)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：40303143

高橋 直紀 (Takahashi, Naoki)
新潟大学・医歯学系・特任講師
研究者番号：80722842

宮沢 春菜 (Miyazawa, Haruna)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：50733721