

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20619

研究課題名(和文) 歯周病原細菌感染に対するビタミンDによる新規の予防・治療効果の検討

研究課題名(英文) Analysis of anti-inflammatory effect of vitaminD against periodontopathic bacteria

研究代表者

野中 由香莉 (NONAKA, Yukari)

新潟大学・医歯学総合研究科・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：40710520

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)：ビタミンDは、骨の恒常性維持に関わる栄養素である。本研究では歯周病原細菌感染に対するビタミンDの抗炎症作用を明らかとすることを目的とした。マクロファージにおいて歯周病原細菌由来LPSによって誘導される炎症応答に対し、活性型ビタミンD_{1,25(OH)2D3}添加による明らかな抑制効果は認めなかった。さらに創傷治癒効果について、ヒト歯肉上皮細胞由来であるEpi4細胞を用いて、Wound healing Assayを行ったが、活性型ビタミンD_{1,25(OH)2D3}添加による明確な創傷治癒促進効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Vitamin D is a nutrient involved in maintenance of bone homeostasis. The purpose of this study is to clarify the anti-inflammatory effect of vitamin D against periodontal pathogenic bacterial infection. Active vitamin D, 1,25(OH)₂D₃ couldn't suppress the inflammatory response induced by periodontal pathogenic bacterial LPS in macrophages. Furthermore, wound healing assay was performed using Epi4 cells derived from human gingival epithelial cells, but wound healing promoting effect was not observed by addition of active vitamin D.

研究分野：歯周病学

キーワード：ビタミンD 歯周病

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は歯周病原細菌による感染症であるが、その影響は口腔内局所のみにとどまらず、動脈硬化性疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、リウマチ等の重篤な全身疾患のリスクファクターであることが多くの疫学調査及び動物実験によって明らかにされている。申請者はこのメカニズム解明のため、歯周炎モデルマウスを用いた実験系において、これまでに以下のような研究を継続して行ってきた。歯周病原細菌の口腔内投与が脂質代謝異常を介して動脈硬化を促進すること (Takahashi, Maekawa, *et al.*, PLoS One, 2011) また、同様のマウスにおいて、脂肪組織や肝臓における脂肪変性が起こり、これらの組織において炎症関連遺伝子発現が上昇していることを明らかとした (Arimatsu, *et al.*, Sci Rep, 2014) さらに歯周病原細菌感染によって T helper (Th) 1, Th2, Th17 及び Natural Killer T (NKT) 細胞や制御性 T 細胞 (Treg) などの免疫バランスが歯周局所だけでなく全身に渡って変化することにより血清中の炎症性サイトカインや肝臓での炎症が上昇することを報告している (Aoki-Nonaka, *et al.*, J Periodontal Res, 2014) 上記のように歯周病原細菌感染により全身に及ぶ炎症病態や脂質代謝異常が誘導され各臓器の機能の恒常性の破綻が生じているといえる。

ビタミン D は、脂溶性ビタミンでありカルシウムホメオスタシスを制御することで骨代謝に重要な役割を果たすことが広く知られている。近年、ビタミン D の新たな機能として、高脂血症、高血圧などメタボリックシンドロームに加え、動脈硬化性疾患や自己免疫疾患に対し抑制的な効果を示すことが報告されている。これは、マクロファージ、樹状細胞、T 細胞、B 細胞にもビタミン D 受容体 (VDR) が発現し、これらの細胞の分化、増殖、活性化などを変化させることによるもので、ビタミン D が自然免疫、獲得免疫の両面に作用することが明らかとなってきた。また、単核白血球やマクロファージにおいては Toll like receptor (TLR) を介した病原性因子による刺激により VDR の発現が上昇し、それにより抗菌ペプチドである Cathelicidin が誘導され抗菌作用を示すことが報告されている。 (Liu, *et al.*, Science, 2006) また、ヒトやマウスを対象にした研究においても、血中のビタミン D レベルの低下が *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* などの細菌やウイルスの罹患につながるなどが報告され、ビタミン D の抗菌的な作用が感染症の分野でも注目されている (Lang, *et al.*, Osteoporos Int, 2013)。

ビタミン D と歯周炎の関連性については、これまでに主に臨床データに基づき、

特に歯槽骨吸収、骨代謝に着目した疫学研究が行われてきた。それと関連して骨粗鬆症患者における歯周炎の進行については数多くの研究がなされており、骨代謝異常と歯槽骨吸収に関連があるとする報告が多い。歯周炎が誘発する動脈硬化病変や脂質代謝異常などとビタミン D との関連はこれまでに報告がないが、冒頭に示したような、申請者がモデルマウスで確認してきたメカニズムを考慮すると、これらの病態に対してもビタミン D が有効に働く可能性が高いと考えられることから本研究の着想に至った。また、歯周病原細菌に対するビタミン D の作用については、歯根膜細胞における炎症性サイトカイン産生の抑制が報告されている (Andrukhov, *et al.*, PLoS One, 2014) が、抗菌ペプチドの産生や他の上皮やマクロファージなどの細胞における機能および *in vivo* における感染にどのような作用を示すのかは不明であり、他の細菌に対するように歯周病原細菌に対してもビタミン D が抗菌作用を示すのかどうかは未知の課題である。しかしながら、歯周炎患者の中には他疾患の治療薬としてビタミン D を使用している方も多く、また市販のサプリメントとしての利用も広く行われていることからその作用の解明が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病原細菌感染に対するビタミン D の抗炎症作用、および創傷治癒効果を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビタミン D による抗炎症作用の解析:

マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を 1×10^5 cells/mL にて 24 穴プレートへ播種した。37 °C、5% CO₂ 条件下にて、12 時間インキュベートした後に、活性型ビタミン D 1,25(OH)₂D₃ (Cayman, MI, USA) 添加培地にて、30 分間プレインキュベーションを行った。活性型ビタミン D 1,25(OH)₂D₃ 濃度は、10nM, 100nM, 1000nM と設定した。その後、1 µg/mL *P. gingivalis* LPS (Wako, Osaka, Japan) 及び、100ng/mL *E. coli* LPS (Invivogen, CA, USA) にて、5 時間または 24 時間刺激を行った。炎症性サイトカイン TNF-α の遺伝子を Real-time PCR 法、及びタンパク発現については ELISA 法を用いて解析を行った。

(2) ビタミン D による歯肉上皮細胞に対する創傷治癒効果の解析:

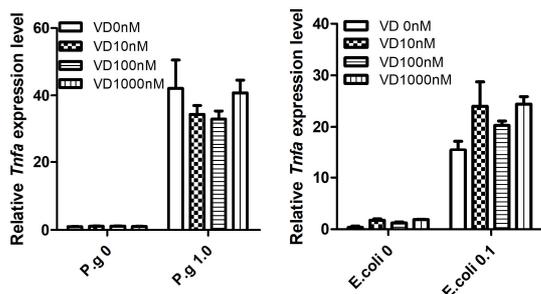
ヒト歯肉上皮由来 Epi4 細胞を 3×10^5 cells/mL にて 24 穴プレートへ播種した。37 °C、5% CO₂ 条件下にて、12 時間インキュベートした後に、細胞附着面にチップを用いて、細胞剥離部位を線状に形成した。10nM, 100nM, 1000nM の活性型ビタミン

D 1,25(OH)₂D₃ を添加し、さらに 24 時間培養した。細胞剥離部位の修復程度を、細胞剥離面積を測定することで評価した。解析には DP2-BSW (OLYMPUS, Tokyo, Japan) を使用した。

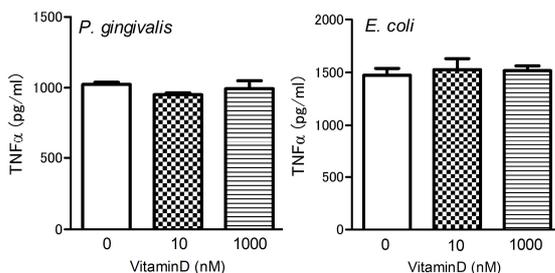
4. 研究成果

(1) ビタミン D による抗炎症作用の解析:

P. gingivalis LPS 及び *E. coli* LPS 刺激によって 5 時間後の TNF- α の遺伝子発現は上昇したが、ビタミン D 添加による TNF- α 発現の明らかな抑制効果は認められなかった (図 1: 下図)。



刺激 24 時間後のタンパク発現においても、*P. gingivalis* LPS 及び *E. coli* LPS とともに刺激によって TNF- α 産生が誘導されたが、ビタミン D 添加による TNF- α 産生抑制効果は認められなかった (図 2: 下図)。



また、ビタミン D のレセプターである VDR の発現量の変化の解析を行ったが、LPS 刺激による発現量の有意な変化は認められなかった。

(2) ビタミン D による歯肉上皮細胞に対する創傷治癒効果の解析: ヒト歯肉上皮細胞 Epi4 を用いて創傷治癒効果の評価として Wound healing Assay を行った。24 時間後の細胞剥離面積を測定したところ、活性型ビタミン D 1,25(OH)₂D₃ 添加による明確な創傷治癒促進効果は認められなかった。

以上より、マクロファージにおいて LPS 刺激で誘導される炎症性サイトカイン産生に対し、活性型ビタミン D 1,25(OH)₂D₃ による明らかな抗炎症作用は認められなかった。また、歯肉上皮細胞に対する創傷治癒促進効果も認めなかった。しかしながら、歯周病原細菌感染に対するビタミン D の抗菌活性については、今後の検討課題であると考えている。

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 1 件)

Bertin S, Aoki-Nonaka Y, Jihyng Lee, Petrus R de Jong, Peter Kim, Tiffany Han, Timothy Yu, Kieth To, Naoki Takahashi, Brigid S Boland, John T Chang, Samuel B Ho, Scott Herdman, Maripat Corr, Alessandra Franco, Sonia Sharma, Hui Dong, Armen N Akopian, Eyal Raz. "The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1." Gut, 2017, Sep;66(9):1584-1596. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

野中由香莉、多部田康一、横地麻衣、松田由実、山崎和久、吉江弘正、米由来抗菌ペプチドの歯周炎モデルマウスにおける抗炎症作用の検討 第 60 回春季日本歯周病学会学術大会 2017.5.12

野中由香莉、横地麻衣、多部田康一、山崎和久、コメ由来抗菌ペプチドの抗炎症作用と創傷治癒作用の解析 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会 2016.10.6

[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

野中 由香莉 (NONAKA, Yukari)
新潟大学・医歯学総合研究科・日本学術振
興会特別研究員
研究者番号：40710520

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()