

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11826

研究課題名(和文)多機能マトリックスタンパクThrombospondin-1の歯周疾患における役割

研究課題名(英文)Role of multifunctional matrix protein Thrombospondin-1 in periodontal disease

研究代表者

小林 宏明 (KOBAYASHI, Hiroaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50396967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Thrombospondin-1(TSP-1)は多機能細胞外マトリックスタンパクであり、様々な生物学的効果を持つ。本研究では、歯根膜細胞におけるTSP-1のレセプターであるCD36とCD47の発現解析および、TSP-1刺激によるヒト歯根膜細胞の反応を検討した。ヒト歯根膜には恒常的にCD36およびCD47 mRNAが発現しており、DAMPsおよびTSP-1刺激によりその発現は増強した。免疫染色し蛍光顕微鏡にて観察したところ、CD36レセプターおよびCD47レセプターの発現が確認された。TSP-1はヒト歯根膜細胞において、CD36、CD47レセプターを介して作用することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Thrombospondin-1(TSP-1)は多機能細胞外マトリックスタンパクであり、様々な生物学的効果を持つ。歯周炎の疾患進行におけるTSP-1の役割を解明することで、歯周治療における新規の標的分子として、治療ストラテジーを再構築できると考えられる。またTSP-1の周囲細胞へ及ぼす影響について明らかにすることで、歯周病原細菌感染後の歯周組織や歯槽骨破壊、重症化のメカニズムにおける新たな関与因子を同定できると考える。

研究成果の概要(英文)：Thrombospondin-1 (TSP-1) is a multifunctional extracellular matrix protein with various biological effects. In this study, we examined the expression analysis of TSP-1 receptors CD36 and CD47 in periodontal ligament cells, and examined the response of human periodontal ligament cells by TSP-1 stimulation. CD36 and CD47 mRNA were constitutively expressed in human periodontal ligament, and their expression was enhanced by DAMPs and TSP-1 stimulation. Immunostaining experiments confirmed the expression of CD36 receptor and CD47 receptor. TSP-1 was thought to act through CD36 and CD47 receptors in human periodontal ligament cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：TSP-1 ヒト歯根膜細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Thrombospondin-1(TSP-1)は多機能細胞外マトリックスタンパクであり、トロンビン感受性タンパクとしてヒト血小板から単離された。TSP-1は血管内皮細胞、好中球、単球、マクロファージなどから産生され、細胞表面受容体、特異的ドメインとの相互作用により、様々な生物学的効果を持つ。CD36に結合した場合は血管新生抑制などの抗炎症性作用を呈し、また、インテグリンやCD47と結合することで、炎症性サイトカインとRANKL発現を誘導し、局所の炎症と骨破壊を引き起こす。さらに、TGF-β 活性調節を介して、創傷治癒、細胞増殖、細胞分化、サイトカイン応答を制御する(Oiga et al. 2013)。これらの現象は、歯周炎の特徴である組織炎症や歯槽骨吸収に密接に関連している。マトリックスタンパクには、オステオネクチン(SPARC/ON)、Thrombospondin-1 (TSP1)、オステオポンチン(OPN)、テネイシン-X(TN-X)、シンデカン1~4などが存在している。しかし、その中でTSP-1の機能や歯周組織構成細胞に与える影響には不明な点が多い。

我々は、DNA マイクロアレイによる探索と歯周炎局所での発現をもとに、TSP-1 が歯周炎の疾患進行に関与していることを発見し報告した (Gokyu et al, PlosONE, 2014)。これまでの研究で、歯周病原細菌刺激によってヒト単球系細胞 THP-1 細胞から TSP-1 が強く発現産生されることを、マイクロアレイと real time RT-PCR による遺伝子発現測定、ELISA 法によるタンパク発現測定によって確認した。また、慢性歯周炎患者の歯周外科時に採取した炎症性歯肉組織において TSP-1 の発現を測定した結果、深い歯周ポケットの手術部位において TSP-1 の発現が亢進していることを報告した。また、歯周病原細菌で刺激したヒト単球系細胞 THP-1 細胞においては、Toll-like receptor 2 を介し、NF-κB 経路を活性化することで TSP-1 産生が亢進され、さらに IL-17A よりも IL-17F の共刺激によってその発現が増加することを明らかとした。TSP-1 は炎症過程において発現が上昇し、免疫応答の調節に関与するとされる多機能細胞外マトリックスタンパク質であるが、その作用に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

いままでの研究から、TSP-1 が TGF-β や TNF-α により発現増強 (Rico et al, 2008) すること、また、TSP-1 が破骨細胞形成に関与すること (Amend et al, 2015) や、CD47 との相互作用が RANKL 誘導性の骨吸収を引き起こすという報告 (Kukreja et al, 2009) がある。歯周炎の病態形成において重要である骨破壊に対し、TSP-1 がなんらかの役割を担っている可能性が考えられるが、歯根膜細胞を介した TSP-1 の働きや、破骨細胞や骨芽細胞との関連、歯槽骨吸収に至るメカニズムについての報告はない。

本研究では、歯周炎局所における TSP-1 発現が歯周組織構成細胞に与える影響を検討し、特に歯根膜細胞に対してどのように作用しているのかを解明することで、歯周炎の疾患進行における TSP-1 の役割を解明する。

歯周炎の疾患進行における TSP-1 の役割を解明することで、歯周治療における新規の標的分子として、治療ストラテジーを再構築できうと考えられる。また TSP-1 の周囲細胞へ及ぼす影響について明らかにすることで、歯周病原細菌感染後の歯周組織や歯槽骨破壊、重症化のメカニズムにおける新たな関与因子を同定できうと考える。

3. 研究の方法

本研究では、TSP-1 が歯周組織構成細胞に与える影響を検討することにより、歯周炎疾患進行における TSP-1 の役割を解明する。TSP-1 は多機能マトリックスタンパクであり、その受容体ごとに働きが異なることが予想される。特に CD36 受容体と CD47 受容体により、そのシグナル伝達機構が異なる。そのため、歯周組織構成細胞における TSP-1 受容体の発現を調べ、その受容体からのシグナルを解析する。

4. 研究成果

歯根膜細胞の役割を研究する目的で、抜去歯根表面からヒト歯根膜細胞を回収した。ヒト歯根膜細胞の初代培養を行い、細胞実験に用いた。歯周炎の刺激状態を再現するために、抜去歯の露出歯根面から DAMPs を回収し、刺激因子として用いた。次に、ヒト歯根膜細胞の挙動を調べる目的で、ヒト歯根膜細胞に対して、DAMPs、TSP-1 で刺激したところ、濃度依存的に IL-1、TNF-α を産生した。また、この炎症性サイトカイン産生はインフラマソーム阻害剤によって、抑制が認められた。

歯根膜細胞の TSP-1 のレセプターである CD36 と CD47 の発現解析を行った。ヒト歯根膜細胞を初代培養して研究に用いた。培養ヒト歯根膜細胞から mRNA を抽出し RT-PCR を行った。その結果から、ヒト歯根膜には恒常的に CD36 および CD47 mRNA が発現しており、DAMPs 刺激によりその発現は増強した。また、ヒト歯根膜細胞をチャンバースライド上で培養し、固定した後に抗 CD36 抗体および抗 CD47 抗体で免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、ヒト歯根膜上で CD36 レセプターおよび CD47 レセプターの発現が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1. Khemwong T, Kobayashi H, Ikeda Y, Sudo T, Kano C, Matsuura T, Mikami R, Izumi Y. Fretibacterium sp. human oral taxon 360 is a novel biomarker for periodontitis screening in the Japanese population. PlosONE, 2019 accepted
2. Khemwong T, Kobayashi H, Ikeda Y, Sudo T, Kano C, Matsuura T, Izumi Y. Eubacterium saphenum as a novel bacterial biomarker for periodontitis screening. The Journal of the Stomatological Society, Japan 85(2):62-67, 2018
3. Talungchit S, Buajeeb W, Lerdtripop C, Surarit R, Chairatvit K, Roytrakul S, Kobayashi H, Izumi Y, Khovidhunkit SP. Putative salivary protein biomarkers for the diagnosis of oral lichen planus: a case-control study. BMC Oral Health. 2018 :13;18(1):42. doi: 10.1186/s12903-018-0504-8. PubMed PMID: 29534707.
4. Nomura Y, Nomura Y, Morozumi T, Nakagawa T, Sugaya T, Kawanami M, Suzuki F, Takahashi K, Abe Y, Sato S, Makino-Oi A, Takano S, Minabe M, Nakayama Y, Ogata Y, Kobayashi H, Izumi Y, Sugano N, Ito K, Sekino S, Numabe Y, Fukaya C, Yoshinari N, Fukuda M, Noguchi T, Kono T, Umeda M, Fujise O, Nishimura F, Yoshimura A, Hara Y, Nakamura T, Noguchi K, Kakuta E, Hanada N, Takashiba S, Amitani Y, Yoshie H. Site-level progression of periodontal disease during a follow-up period. PLOS ONE 2017;12(12): e0188670. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188670>
5. Takeaki Sudo, Yukinori Okada, Kouichi Ozaki, Kevin Urayama, Masahiro Kanai, Hiroaki Kobayashi, Misa Gokyu, Yuichi Izumi, Toshihiro Tanaka. Association of NOD2 mutations with aggressive periodontitis. Journal of Dental Research. 96(10):1100-1105, 2017 DOI: 10.1177/0022034517715432 PMID: 28682159
6. Kakuta E, Nomura Y, Morozumi T, Nakagawa T, Nakamura T, Noguchi K, Yoshimura A, Hara Y, Fujise O, Nishimura F, Kono T, Umeda M, Fukuda M, Noguchi T, Yoshinari N, Fukaya C, Sekino S, Numabe Y, Sugano N, Ito K, Kobayashi H, Izumi Y, Takai H, Ogata Y, Takano S, Minabe M, Makino-Oi A, Saito A, Abe Y, Sato S, Suzuki F, Takahashi K, Sugaya T, Kawanami M, Hanada N, Takashiba S, Yoshie H. Assessing the progression of chronic periodontitis using subgingival pathogen levels: a 24-month prospective multicenter cohort study. BMC Oral Health. 2017 Jan 16;17(1):46. doi: 10.1186/s12903-017-0337-x. PubMed PMID: 28093069; PubMed Central PMCID: PMC5240246.
7. 青山典生、小林宏明、田中敬子、安原雄介、木ノ内 聡、高野琢也、今村亮祐、和泉雄一 電子歯ブラシの使用効果について 口腔病学会誌 84(1)19-24、2016
8. Thanakun S, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Gokyu M, Kobayashi H, Izumi Y. Inverse Association of Plasma IgG Antibody to Aggregatibacter actinomycetemcomitans and High C-Reactive Protein Levels in Patients with Metabolic Syndrome and Periodontitis. PLoS One. 2016 Feb 12;11(2):e0148638. doi: 10.1371/journal.pone.0148638. eCollection 2016. PubMed PMID: 26871443.
9. Morozumi T, Nakagawa T, Nomura Y, Sugaya T, Kawanami M, Suzuki F, Takahashi K, Abe Y, Sato S, Makino-Oi A, Saito A, Takano S, Minabe M, Nakayama Y, Ogata Y, Kobayashi H, Izumi Y, Sugano N, Ito K, Sekino S, Numabe Y, Fukaya C, Yoshinari N, Fukuda M, Noguchi T, Kono T, Umeda M, Fujise O, Nishimura F, Yoshimura A, Hara Y, Nakamura T, Noguchi K, Kakuta E, Hanada N, Takashiba S and Yoshie H. Salivary pathogen and serum antibody to assess the progression of chronic periodontitis: a 24-mo prospective multicenter cohort study. J Periodontal Res. 2016 51(6):768-778.. doi: 10.1111/jre.12353. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26791469.

〔学会発表〕(計9件)

1. T. Khemwong, H. Kobayashi, T. Sudo, C. Kano, T. Matsuura, Y. Ikeda, Y. Izumi. Fretibacterium oral taxon 360 is salivary biomarker for periodontitis. EuroPerio9. 2018.6.27 Amsterdam
2. T. Sudo, Y. Okada, K. Ozaki, K. Urayama, M. Kanai, H. Kobayashi, G. Misa, T. Tanaka, Y. Izumi. Association of NOD2 mutations. with aggressive periodontitis. EuroPerio9. 2018.6.27 Amsterdam
3. C. Kano, K. Mizutani, T. Ikawa, T. Sudo, H. Kobayashi, Y. Izumi. The effect of electric-powered ionic toothbrushing on plaque removal -randomized clinical trial - EuroPerio9. 2018.6.27 Amsterdam
4. Kengwong T, Kobayashi H, Sudo T, Kano C, Izumi Y. Beta-defensins inducing by interleukin-17s in oral epithelial cell. the 5th annual meeting of the international Cytokine and interferon Society. 2017.10.31 Kanazawa
5. 小林宏明, 須藤毅顕, Thatwee Kengwong, 鈴木苗穂, 加納千博, 和泉雄一. 歯周組織破壊における DAMPs の役割. 歯科基礎医学会 2017.9.16 塩尻

6. 鈴木苗穂、小林宏明、加納千博、和泉雄一. 歯肉線維芽細胞に対するラクトフェリンの作用について. 秋季日本歯科保存学会学術大会 2017.9.27 盛岡、岩手
7. 青木 章, 水谷幸嗣, 谷口陽一, 秋月達也, 小林宏明, 上窪彩乃, 高木 徹, 林 泰誠, 野田昌宏, 荻田真弓, 江尻健一郎, 澤辺正規, 竹内康雄, 小牧基浩, 佐々木好幸, 和泉雄一. Er:YAG レーザーを併用した新規の歯周ポケット治療法の臨床評価: ランダム化比較試験. 第 60 回春季日本歯周病学会学術大会 2017.05.13 福岡
8. 松浦孝典, 池田裕一, 小林宏明, 御給美沙, Thatawee Khemwong, 加納千博, 和泉雄一. 唾液中の歯周病原細菌量とアンケート調査を用いた歯周炎スクリーニングのための新規診断口ジックの開発. 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会 2016.10.07 新潟

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小田茂

ローマ字氏名：(ODA shigeru)

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：歯学部附属病院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70160869

研究分担者氏名：片桐さやか

ローマ字氏名：(KATAGIRI sayaka)

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：歯周病学分野

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：60510352

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。