

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592398

研究課題名（和文） 歯周病と生活習慣病の双方向性発症機序の解明

研究課題名（英文） Studies on the etiological relationship between periodontitis and life-style related diseases

研究代表者

堂前 尚親 (DOMAE NAOMICHIKA)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60115889

研究成果の概要：歯周病の発症および進展における免疫担当細胞の活性化と、それら細胞と血管内皮細胞との接着機構の一部を解明した。歯周病と虚血性心疾患および糖尿病や骨粗鬆症などの全身性疾患との双方向性発症関係を臨床医学的に検討した。歯周病有所見者は男性に多く、高年齢、高血圧、肥満および血清尿酸、 γ -GTP、中性脂肪、低比重コレステロール値/高比重コレステロール値比、血清アディポネクチン濃度の高値に有意の相関が見られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：①歯周病 ②メタボリック シンドローム ③シグナル伝達 ④歯学 ⑤内科

1. 研究開始当初の背景

歯周病は過去半世紀に渡り、歯の歯頸部に付着したバイオフィルム中の細菌による歯肉の炎症として始まり、歯周靭帯の破壊と歯槽骨の吸収へと進展する局所性感染症としてのみ認識されていた。しかし近年、歯周病患者に、高感度 CRP 陽性、高フィブリノーゲン血症、IL-1、IL-6、TNF- α などのケモカインの上昇が報告され、歯周病はほとんどの成人が罹患している生活習慣病の一つであり、全身性慢性炎症性疾患の一種として捉えられ始めた。また、一方、臨床医学の重要な課題となっている動脈硬化症に伴う虚血性心疾患、糖尿病や骨粗鬆症などの生活習慣病の発症における共通の病因として、

軽微な慢性炎症の存在の可能性が示唆されている。この慢性炎症の観点から歯周病と他の生活習慣病発症との関連の可能性が十分に考えられる。例えば、歯周病を悪化させたり治癒を遅延させたりすることが周知の事実であった糖尿病は近年、歯周ポケットが深い患者ほど耐糖能が悪化する事、歯周治療により HbA1c の値が改善する事や歯周病原性細菌が 2 型糖尿病を引き起こす可能性が報告されている。さらに、重症の歯周病患者は虚血性心疾患の発症率が高いとの臨床統計学的な報告もなされている。また、歯周病の進行に伴って見られる歯槽骨吸収の機序は、骨粗鬆症の発症機序とも共通性がある。このように少なくとも約 15 年以前

より歯周病は、虚血性心疾患や糖尿病などの全身性生活習慣病の発症に大きく関与していることが検討され、これら疾患の双方向性発症関係に関する多くの報告がなされているが未だ不明な事が多く論争中である。そこで我々は、歯科単科大学の内科学講座という特徴を生かし、歯科基礎・臨床系講座との連携のもと、歯周病の発症および進展の機序ならびに、歯周病と虚血性心疾患などのメタボリックシンドロームの病因となる動脈硬化の形成および糖尿病や骨粗鬆症などの全身性疾患発症との双方向性発症関係を、病的に解明すべく検討した。

2. 研究の目的

(1) 歯周病の発症・進展機序の解明。

①炎症病変におけるNK細胞およびT細胞などの免疫担当細胞の活性化機序、免疫担当細胞の細胞間接着およびそれら細胞と血管内皮細胞との接着機構、さらに接着後の核内転写因子までへの細胞内シグナル伝達経路を分子生物学的に詳細に解明する。②また、免疫担当細胞が炎症病変に侵入する際に関与する事を我々が明らかにした(Am J Pathology 169, 445-458, 2006)Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)、の炎症の場における役割の詳細なメカニズムを解明する。

(2) 歯周病病変と動脈硬化病変の形成過程における関連性の解明。

①動脈硬化症と歯周病の慢性炎症としての共通性に注目し、それらの病変部におけるケモカインの発現と病変形成への関与を検討する。②動脈硬化血管壁の石灰化発症の機序について、病変部における receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)とRANKLの機能を調節するosteoprotegerin (OPG)の発現と石灰化への関与を検討する。さらに培養血管壁細胞を用いてそれらの発現の調節についても検討する。

(3) 歯周病と生活習慣病の双方向性発症に関与の解明。

本学教職員定期健康診断(内科検診と歯科検診)の検診結果および、歯周病患者の内科的検査結果を詳細に分析し、これら両疾患に関与する臨床因子を同定する。さらに、その追跡結果を詳細に検討し、それらの発症の相互関係を歯周病の進展度も含めて解明する。

(4) 歯周病における骨組織の吸収機序と骨粗鬆症発症への関与の解明。

骨吸収のために分化した細胞である破骨細胞の形成ならびに活性化には、骨芽細胞が重要な役割を演ずる。しかし、骨芽細胞におけるRANKL発現誘導のシグナル伝達、さらには破骨細胞への分化誘導に関わるシグナル伝達の詳細は解明されていない。そこでマウス骨髄ストローマ様細胞株(ST2)およびマウスマクロファージ様細胞株(RAW264)がRANKLないしTNF- α により多核破骨細胞へ分化する際のシグナル伝達経路を解明する。

3. 研究の方法

(1) 歯周病の発症・進展機序の解明。

①歯周病などの炎症病変において、免疫担当細胞(NK細胞、T細胞と単球)がPKCを介して活性化される機序の核内転写因子に至る細胞内シグナル伝達の詳細な経路を、p72^{syk}チロシンキナーゼ、PI3チロシンキナーゼ、アダプター蛋白を対象として解析した。②ケモカイン刺激によって血管内皮に接着した免疫担当細胞は引き続いて病変部に浸入するが、我々はその浸入に関与することを明らかにしたMMP-1の役割の詳細なメカニズムを、I型コラーゲンゲルを用いたin vitroのシステムで解明した。③治療目的に切除された歯周病患者および対照として矯正などで抜歯を受けた患者から得た非炎症性の歯肉組織の凍結切片を作成した。これらの組織にフラクタルカインを含めた種々のケモカインおよびRANKLに対する抗体で免疫組織染色して、それらの発現の有無と歯周病発症に最も関与するケモカインを同定した。

(2) 歯周病病変と動脈硬化病変の形成過程における関連性の解明。

①動脈硬化症のモデル動物であるアポEノックアウトマウスから進行した動脈硬化病変を得て、フラクタルカイン、RANKLとOPGの発現および分布状態を調べ、血管の石灰化へのこれらの分子の関与について検討した。②免疫担当細胞の細胞間接着および血管内皮細胞との接着機構を、ヒト臍帯静脈内皮細胞株(HUVEC)と免疫担当細胞との接着および、これらの細胞とFibrinorectin、LamininおよびCollagenなどの細胞外マトリックス蛋白との接着に対する種々のケモカインによる

増強効果を Calcein-AM 放出能で検討した。

(3) 歯周病と生活習慣病の双方向性発症関係の解明。

① 歯周病の臨床評価を、残歯数と CPI (Community Periodontal Index) 最高値を用いて評価した。② 本学教職員定期健康診断において本研究への参加の承諾が得られた教職員を対象に、歯科検診のデータ(残歯数と CPI など)と内科検診のデータ(体格計測値、血圧、心電図、高感度 CRP、ADMA、血糖値、HbA1C、血清アディポネクチン濃度、各種脂質)を比較検討し、歯周病と虚血性心疾患の双方向性発症関係に関与する臨床因子を探索した。③ 歯周病患者の病状の変化に伴う、高感度 CRP、血中 ADMA 濃度(HPLC で測定し腎機能で補正)および血清アディポネクチン濃度の変化を検討した。さらにこれらの血中濃度の高い歯周病患者を対象に、脂質検査、糖尿病検査、腎機能、肝機能、安静時心電図検査、血圧脈波による動脈硬化度検査、負荷心電図検査、心エコー検査ならびに 頸動脈エコー検査を行い、頸動脈と冠動脈の動脈硬化病変および 糖尿病と歯周病の重症度との関連について評価した。

(4) 歯周病における骨組織の吸収機序と骨粗鬆症発症への関与の解明。

① 歯周病に伴う骨吸収の機序についての、歯周病の炎症の程度によって骨吸収を制御する分子である RANKL と OPG の発現に相違が見られるかを、ヒトの歯周組織を用いて免疫組織化学的に検討した。② 骨吸収の機序解明への *in vitro* のアプローチとして、RANKL ないし TNF- α によりマウスマクロファージ様細胞株 (RAW264) が多核破骨細胞へ分化する際のシグナル伝達経路における、セラミド、PKC、インテグリンなどの関与を、それらの誘導体や合成阻害剤を用い RT-PCR 法 およびウェスタンブロット法により検討した。③ 歯周病における骨吸収の機序を解明するため、骨芽細胞様細胞株 (ST2) を $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3、副甲状腺ホルモン、Prostaglandin E2 などの骨吸収因子および TNF α や IL2 などのケモカインで刺激し、RANKL 発現量と各細胞での RANK 発現の変化を RT-PCR 法(現有) およびウェスタンブロット法(現有)を用いて経時的に検討した。

4. 研究成果

(1) 歯周病の発症・進展機序の解明のため、炎症病変におけるNK細胞の浸潤機構を検討した。NK細胞はCXCL12刺激によりI型コラーゲンに浸潤し、この浸潤には α 2-Integrin およびMMP-1のNK細胞膜上の凝集と、MMP依存性のコラーゲン分解能に関与する可能性を示唆する結果を得た。

(2) 歯周病の重症度と虚血性心疾患との双方向性発症関係を検討するため、動脈硬化の危険因子と歯周状態との関連を、平成19年度および平成20年度大阪歯科大学教職員健康診断の検診結果を用いて検討した。検診受診者のうち、同意が得られた40歳以上の者209名(男性151名、女性58名)を対象者とした。CPI最大値が0の正常者群(n=57)と0以外の有所見者群(n=152)を比較すると、有所見者は男性に多く、年齢、血圧、体重、尿酸、 γ GTP、TG、LDL-C/HDL-C比が有所見者群で有意に高かった。一方、我々の検討で pro-inflammatory risk marker として多々報告されている高感度CRPには両群間に有意差が見られず、また BMIや糖尿病関連因子(FBS、HbA1C、IRD)にも有意差を認めなかった。また ELISA法で測定した血清アディポネクチン濃度は、女性の有所見者群で総量および高分子量分画が有意に高値であった。また、対象者の歯周状態は、加齢や性差のほか γ GTPおよび脂質データとの相関も見られた。

(3) 歯周病における骨組織吸収機序の解明のため、RAW264細胞の破骨細胞への分化機構を検討した。RANKL 刺激による破骨細胞の分化には p38MAPK を介して MMP-9 の発現が関与することが示唆された。また、一酸化窒素(NO)が破骨細胞の分化を促進することを解明し、その機序として、p38 の活性化および ERK の阻害が関与することを示唆する結果を得た。

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8件)

- ① HARAKAWA N, SHIGETA A, WATO M, MERRILL-SKOLOFF G, FURIE BC, FURIE B, OKAZAKI T, DOMAE N,

- MIYASAKAM, HIRATA T. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin independent leukocyte rolling in high endothelial venules of peripheral lymph nodes. *Int Immunol* 19; 321-329:2007. 査読有
- ② KANESHITA Y, GODA S, KAWAMOTO T. The effect of matrix metalloproteinase-9 on the differentiation into osteoclast cells on RAW264 cells. *Orthodont Waves* 66; 122-128:2007. 査読有
- ③ KANEDA K, MIYAMAE M, SUGIOKA S, OKUSA C, INAMURA Y, DOMAE N, KOTANI J, FIGUEREDO VM. Sevoflurane enhances ethanol-induced cardiac preconditioning through modulation of protein kinase C, mitochondrial K_{ATP} channels, and nitric oxide synthase, in guinea pig hearts. *Anesth Analg* 106; 9-16 : 2008. 査読有
- ④ SAWAI H, DOMAE N. Release of cytochrome c from mitochondria precedes Bax translocation/activation in Triton X-100-induced apoptosis. *Leuk Res* 32; 445- 453:2008. 査読有
- ⑤ GODA S, INOUE H, KANESHITA Y, NAGANO Y, IKEO T, IIDA J, DOMAE N. Emdogain stimulates matrix degradation by osteoblasts. *J Dent Res* 87; 782-787:2008. 査読有
- ⑥ INAMI K, SAWAI H, YAKUSHIJI K, KATAO Y, MASTUMOTO N, DOMAE N. Augmentation of TNF-induced osteoclast differentiation by inhibition of ERK and activation of p38 : Similar intracellular signaling between RANKL- and TNF-induced osteoclast differentiation. *Orthodont Waves* 67; 150-156: 2008. 査読有
- ⑦ SAWAI H, DOMAE N. Differential roles for Bak in triton X-100- and deoxycholate- induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 378; 529-533:2009. 査読有
- ⑧ INAMI K, SAWAI H, YAKUSHIJI K, DOMAE N, MASTUMOTO N. Induction of osteoclast differentiation by NOC-18, a long-acting nitric oxide donor. *Orthodont Waves* 68:20-27: 2009. 査読有
- [学会発表] (計 23 件)
- ① 薬師寺健太郎, 澤井宏文, 居波 薫, 神原正樹, 堂前尚親. アスピリンは MAPK を介して RANKL による RAW の破骨細胞様細胞への分化を促進する. 2007 日本歯周病学会春季学術大会 (第 50 回) 2007.5.17 神奈川県
- ② INAMI K, SAWAI H, YAKUSHIJI K, KAMBARA T, DOMAE N. Involvement of signal pathway in osteoclast differentiation induced by TNF-alpha. 83rd Congress of the European Orthodontics Society 2007. 6.22 Berlin
- ③ 井上 博, 合田征司, 池尾 隆, 堂前尚親, 西川泰央. CXCL12 刺激 NK 細胞における細胞膜上の Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) と $\alpha 2$ -Integrin の局在について. 第 49 回日本歯科基礎医学会 2007.8.29 北海道
- ④ GODA S, DOMAE E, OGAWA Y, TAKEUCHI O, YOSHIKAWA Y, TAMURAI, KAMADA A, DOMAE N, IKEO T. Enamel matrix derivatives stimulates matrix degradation by osteoclast. 37th Swiss Society of Periodontology / 11th International Academy of Periodontology Congress 2007 2007.9.13 Swiss
- ⑤ 居波 薫, 澤井宏文, 薬師寺健太郎, 片尾祐子, 神原敏之, 堂前尚親. 一酸化窒素による破骨細胞分化誘導における MAPキナーゼの関与について. 第 66 回日本矯正歯科学会大会 2007.9.20 大阪府
- ⑥ INOUE H, DOMAE N, NISHIKAWA Y. Matrix metalloproteinase-1(MMP-1) and $\alpha 2$ -integrin on the surface of NK3.3 cells

- stimulated by CXCL12. 第 85 回日本生理学会大会 2008.3.27 東京都
- ⑦ 能登原靖宏, 長野 豊, 堂前尚親, 上田雅俊. THP-1細胞のマクロファージ化に伴うosteoprotegerin mRNAの誘導. 日本歯周病学会2008春季学術大会 (第51回) 2008.4.25 埼玉県
- ⑧ 井上 博, 合田征司, 金下祐己, 松本尚之, 池尾 隆, 堂前尚親. NK細胞のI型コラーゲンに対する浸潤と分解について. 日本歯周病学会2008春季学術大会 (第51回) 2008.4.25 埼玉県
- ⑨ 池野真紀, 合田征司, 堂前尚親. ゼラチナーゼが破骨細胞分化におよぼす影響. 第 8 回日本抗加齢医学会総会 2008.6.6 東京都
- ⑩ 合田征司, 池野真紀, 池尾 隆, 堂前尚親. Lipid raftsが破骨細胞分化に及ぼす影響. 第 8 回日本抗加齢医学会総会 2008.6.6 東京都
- ⑪ 稲村吉高, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 大草知佳, 堂前尚親, 小谷順一郎. セボフルランによる心筋ポストコンディショニング効果はアプロチニンにより消失する. 日本麻酔科学会第 55 回学術集会 2008.6.12 神奈川県
- ⑫ 大草知佳, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 稲村吉高, 堂前尚親, 小谷順一郎. 1MACセボフルラン投与後の心筋細胞内 ϵ PKCの細胞膜へのtranslocationは 30 分以上持続し 60 分以内に停止する. 日本麻酔科学会第 55 回学術集会 2008.6.12 神奈川県
- ⑬ 金田一弘, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 大草知佳, 稲村吉高, 堂前尚親, 小谷順一郎. 慢性エタノール摂取による心筋プレコンディショニング効果は再灌流後の nitric oxide synthase 阻害により消失する. 日本麻酔科学会第 55 回学術集会 2008.6.12 神奈川県
- ⑭ 長野 豊, 有城久美子, 薬師寺健太郎, 能登原靖宏, 上田雅俊, 三宅達郎, 神原正樹, 堂前尚親. 動脈硬化の危険因子と歯周状態との関連. 第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2008.7.10 茨城県
- ⑮ NOTOHARA Y, NAGANO Y, DOMAE N, UEDA M. Osteoprotegerin is induced during differentiation of monocytes. The AAP 94th Annual Meeting. 2008.9.8 Seattle
- ⑯ 居波 薫, 澤井宏文, 薬師寺健太郎, 堂前尚親, 松本尚之. 長時間作用型 NO 供与体 (NOC-18) による破骨細胞分化誘導. 第 67 回日本矯正歯科学会大会 2008.9.18 東京都
- ⑰ 片尾祐子, 澤井宏文, 居波 薫, 堂前尚親, 松本尚之. 破骨細胞分化におけるエストロゲンの役割. 第 67 回日本矯正歯科学会大会 2008.9.18 東京都
- ⑱ 井上 博, 合田征司, 池尾 隆, 堂前尚親, 西川泰央. ケモカイン刺激 NK 細胞における Matrix metalloproteinase-1 の発現について. 第 50 回日本歯科基礎医学会 2008.9.25 東京都
- ⑲ 稲村吉高, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 大草知佳, 大西杏奈, 堂前尚親, 小谷順一郎. アプロチニンは虚血再灌流後の PKC δ , GSK3 β のリン酸化を阻害し、セボフルランによる心筋ポストコンディショニングを消失させる. 第 36 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会 2008.10.8 大阪府
- ⑳ 金田一弘, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 大草知佳, 稲村吉高, 大西杏奈, 堂前尚親, 小谷順一郎. 慢性エタノール摂取による心筋プレコンディショニング効果は再灌流後の nitric oxide synthase 阻害により消失する. 第 36 回日本歯科麻酔学会 総会・学術集会 2008.10.8 大阪府
- ㉑ 大草知佳, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 稲村吉高, 大西杏奈, 堂前尚親, 小谷順一郎. 1MACセボフルランによるプレコンディショニングの memory には、PKC α , ϵ の細胞膜への translocation を要するが、PKC δ は必要としない. 第 36 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会

2008.10.8 大阪府

② KANEDA K, MIYAMAE M,
SUGIOKA S, OKUSA C,
INAMURA Y, ONISHI A,
DOMAE N, FIGUEREDO V.
Persistent cardioprotection by
regular ethanol consumption after
abstention depends on eNOS but
not iNOS activity after
reperfusion. American Heart
Association Scientific Session
2008 2008.10.28 New Orleans

③ 能登原靖宏, 長野 豊, 堂前尚親,
上田雅俊. 単球系細胞のマクロファ
ージ化に伴うosteoprogen mRNA
の誘導. 第 516 回大阪歯科学会
2008.12.13 大阪府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂前 尚親 (DOMAE NAOCHIKA)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：60115889

(2) 研究分担者

上田 雅俊 (UEDA MASATOSHI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：00067117

神原 正樹 (MASAKI KAMBARA)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：90103085

長野 豊 (NAGANO YUTAKA)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：80228048

宮前 雅見 (MIYAMAE MASAMI)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：20298821

澤井 宏文 (SAWAI HIROFUMI)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：40298823

合田 征司 (GODA SEIJI)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：70351476

井上 博 (INOUE HIROSHI)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：10330143

(3) 連携研究者

なし