

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10270

研究課題名(和文)顎骨骨髄炎発症要因における歯源性細胞と細胞極性調節因子相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of odontogenic cell and cell polarity regulator interactions in the pathogenesis of osteomyelitis of the jaw.

研究代表者

石畑 清秀 (Ishihata, Kiyohide)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：10437957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨分化に対する細菌毒素の関与を解明することを目的とし、骨芽細胞に対するLTAとLPSの影響を検証した。LTA単独では低濃度で、石灰化能が促進し、高濃度では阻害された。骨分化マーカーの遺伝子発現は、低濃度LTAで促進され、対照的に、高濃度LPSは石灰化能を抑制し、低濃度LTAの添加により石灰化能の回復がみられ、抑制された骨分化関連マーカーの遺伝子発現量が回復した。骨分化に関連するp38の抑制は、TNF- α およびIL-6の遺伝子の発現に相反する影響を与えたことから、LTAとLPSの混合感染は、炎症マーカーとp38経路が関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、感染環境下における骨芽細胞を用いて、顎骨骨髄炎発症時の骨リモデリングや骨分化に関連する物質の発現を確認し、それらの発現と骨形成様式との関連を検討し、顎骨骨髄炎発症メカニズムを解明することを目的とした。

本研究は、歯科領域において、確立した治療法が未開発な疾患である顎骨骨髄炎を対象とした中で、顎骨骨髄炎発症機序の一端を見出したことが独創的と言える。歯性感染症が増悪して抜歯を余儀なくされ、顎骨切除をしていた症例に対しても、新しい治療の選択を付与できる可能性があり、学問的に重要な意味を持つと考えている。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of LTA and LPS on osteoblasts and found that LTA alone promoted alizarin red staining at low concentrations and inhibited it at high concentrations. Additionally, gene expression of osteogenic markers (ALP, OCN, and OPG) were enhanced at low concentrations of LTA. High concentrations of LPS suppressed calcification potential, and the addition of low concentrations of LTA inhibited calcification suppression, restoring the gene expression levels of suppressed bone differentiation markers (ALP, BSP, and OCN). Moreover, the suppression of p38, a signaling pathway associated with bone differentiation, had opposing effects on gene-level expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), suggesting that mixed LTA and LPS infections have opposite effects on bone differentiation through concentration gradients, involving inflammatory markers (TNF- α and IL-6) and the p38 pathway.

研究分野：歯性感染症

キーワード：歯性感染症 骨分化

1. 研究開始当初の背景

歯牙の発生には、外胚葉(口腔 粘膜上皮)と神経堤由来の中胚葉(外胚葉性間葉)との相互作用(上皮間葉相互作用)を通して、時間的・空間的に正確な細胞の増殖と細胞死の調節が行われ形態形成・細胞分化が進行すると言われている。また、骨は、その機能を過不足なく発揮するよう常にリモデリングされ、合理的な形態を呈することが知られているが、歯牙が植立し、咬合力を負担するという特殊な環境下にある顎骨は、歯牙を通じて様々な影響を受けていることが推察できる。歯性感染症(根尖性歯周炎、歯根肉芽腫等)は、歯原性上皮(残存上皮)が増殖する疾患の中で比較的発症頻度の高い疾患であり、その発生は歯原性残存上皮であるマラッセ残存上皮の増殖に由来すると考えられている。従来、歯性感染症発症時には、炎症性反応物質(マクロファージ、多核白血球、サイトカイン)の関与が示唆されており、申請者は、他の感染症疾患では見られない感染環境下での上皮形成を、感染に対する物理的な防御機構の一つとして考察する新しい概念を報告してきた(Ishihata K. et al, Oral Sci. int., 2013, 石畑ら, 月間「細胞」, 2018)。

顎骨骨髓炎は、ごく一般的な歯性感染症に継続して発症することが多い疾患であるものの、耐性菌の増加や根管治療を施しても治療が奏効せず、骨髓炎の進行が広範囲に至る場合は顎骨切除が余儀なくされ、また、外科的治療を施しても、数年経過後に再発する例もあり、患者 QOL に多大な影響を与えている。顎骨骨髓炎の病態像は、骨髓周囲の海綿骨が硬化し、患部周囲の血行の遮断から、最終的に腐骨が形成されるが、その発症機序に関しては未だ不明な点が多い。口腔内環境は、上皮・間葉系の両性質を有した歯牙、顎骨、さらには 700 種類以上の微生物が存在する特殊な生体環境であり、難治性の顎骨骨髓炎の発症には歯原性細胞、骨組織、細菌叢との密接な関係が寄与しているものと仮説できる。骨のリモデリング機構が破綻した疾患における歯原性細胞、骨関連細胞の関連性を解明し、これらを正確に制御できれば、顎骨骨髓炎発症機序の新たな知見を得るとともに、効果的な治療法開発につながるものと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、歯性感染症病変組織ならびに株化歯原性細胞から、骨リモデリングや骨分化に関連する物質の発現を確認し、それらの発現と骨形成様式との関連を検討し、顎骨骨髓炎発症メカニズムを解明することを目的としている。

本研究は、歯科領域において、確立した治療法が未開発な疾患である顎骨骨髓炎を対象とし、発生学的に異なる歯原性細胞と顎骨との関連性を見出そうとする点に特色があり、さらには顎骨骨髓炎における骨代謝変化に対して関連する有用な因子として想定している点は他に類がなく、独創的と言える。本研究から、歯原性細胞と顎骨骨髓炎との関連性を解明できれば、歯性感染症が増悪して抜歯を余儀なくされ、顎骨切除をしていた症例に対しても、新しい治療の選択を付与できる可能性があり、学問的に重要な意味を持つとともに、歯牙・顎骨を温存することを追求した本研究の結果は社会に大きな利益をもたらすことが期待できると考えている。

3. 研究の方法

材料と方法

(1) 細胞培養と骨形成分化

MC3T3-E1 細胞は理研細胞バンク(日本、つくば市)から入手し、10% ウシ胎児血清(FBS)、10mM HEPES (pH7.2-7.5)、100 unit/mL peni-cillin および 100 µg/mL streptomycin を含む Eagle の a-minimal essential medium(Sigma-Aldrich, Inc, St.Louis, MO, USA) で維持した。骨形成分化を誘導するために、MC3T3-E1 細胞を増殖培地(10%FBS 添加 -MEM)で培養した後、骨形成誘導培地(10%FBS, 5mM -グリセロリン酸, 840 µM L-アスコルビン酸-2-リン酸添加 -MEM)で培養をした。

(2) 抗体および試薬

LTA の濃度は、低濃度では 10ng/mL、高濃度では 5 µg/mL、LPS では 1 µg/mL に設定した。

(3) MTS アッセイ

準備として、 5×10^3 個の MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに接種し、24 時間培養した。次に、培養液を廃棄した後、10%FBS と各濃度の LTA を含む新鮮な DMEM 培地を 100 µL 添加した。細胞を異なる濃度(0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/mL)の LTA で 3 日間および 6 日間処理した。その後、製造者の説明書に従って MTS アッセイを進めた。CellTiter 96 AQ One Solution Reagent をアッセイプレートの各ウェルに 10 µL ずつピペティングした後、細胞を 37 °C で 1 時間インキュベートし、96 ウェルプレートリーダーを用いて 490 nm で吸光度を測定した。

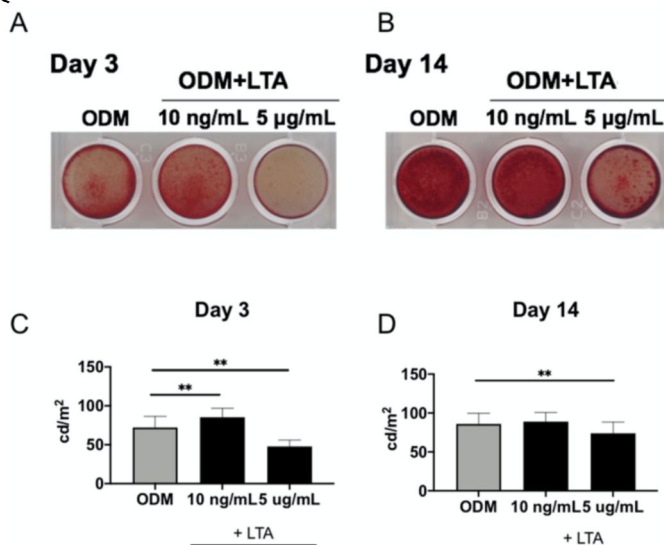
(4) アリザリンレッド染色

MC3T3-E1 のミネラル化は、アリザリンレッド染色により評価した。細胞を Ca²⁺フリーのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄し、10%ホルムアルデヒド/PBS で 4 °C、20 分間固定した。蒸留水で 3 回洗浄した後、細胞を 1%アリザリンレッド S 溶液で 5 分間染色し、マトリックスカルシウムの沈着を可視化した。蒸留水で数回洗浄することにより余分な染色を除去し、染色されたマトリックスを写真に収めた。

(5) リアルタイム逆転写 PCR 分析

LTA (10ng/mL または 5 µg/mL) および LPS (1 µg/mL) を添加したまたは添加しない骨形成誘導培地または非骨形成誘導培地で種々の時間培養した MC3T3-E1 細胞から、Isogen II (日本, 東京) により全 RNA を細胞から分離した。逆転写は、ReverTra Ace キット (東洋紡, 東京, 日本) を用いて、製造者の説明書に従って実施した。リアルタイム PCR は、CFX Connect™ システム (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて実施した。簡単に説明すると、0.05 µg のトータル RNA から合成した cDNA を、20 µL の容量で、0.11 x SYBR Green I (CAMBREX, Rockland, ME, USA), 0.2 mM/each of dNTPs, 0.5 µM/each of a pair of primers, and 0.5 unit Dream Taq Hot Start DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) とともに以下の条件下にアンプライズした。: 95 °C で 5 分, その後 95 °C で 30 秒、60 °C で 20 秒、72 °C で 40 秒のサイクルを 55 回繰り返し、蛍光シグナルをリアルタイムで測定し、製造元の説明書に従って各サンプルを定量化した。本研究で使用したプライマー配列を表 1 に示す。各反応に添加した総 RNA 量の違いを正規化するため、リボソームタンパク質 L13a (Rpl13a) を内因性コントロールとして使用した。任意の単位は、各 PCR 産物の濃度を Rpl13a PCR 産物の濃度で割ることにより決定した。

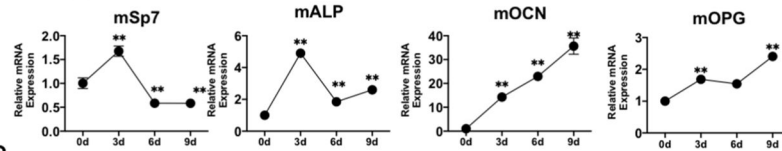
4. 研究成果



(1) MC3T3-E1 骨形成分化に対する LTA の影響。(A, B) MC3T3-E1 細胞を、LTA (10ng/mL または 5 µg/mL) を添加したまたは添加しない骨形成誘導培地で、指示した時間培養した。MC3T3-E1 の鉱化については、アリザリンレッド染色により検証(C, D)。MC3T3-E1 細胞を、LTA (10ng/mL または 5 µg/mL) を添加したまたは添加しない骨形成誘導培地で 3 日間または 14 日間培養した後、MC3T3-E1 ミネラル化を測定した (n=3)。骨形成誘導培地に LTA を添加した 3 日目には、10ng/mL で有意に鉱化が促進され、5 µg/mL で有意に抑制され、14 日目には、5 µg/mL で有意に鉱化が抑制され、10ng/mL では変化が見られなかった。

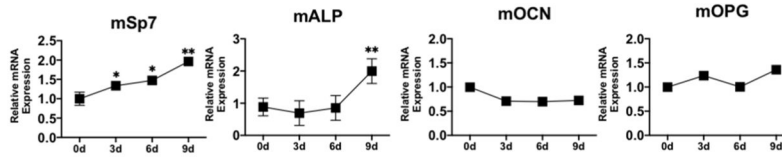
A

[ODM(-), LTA-SA 10 ng/mL]

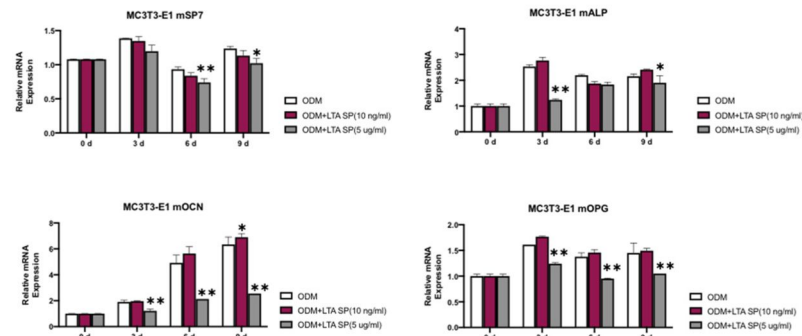


B

[ODM(-), LTA-SA 5 µg/mL]

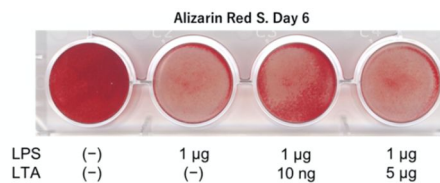


C

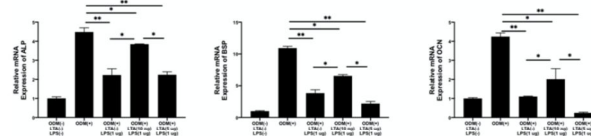


(2) 10ng/mL では、Sp7 と ALP が有意に LTA (10ng/mL または 5 µg/mL) を指示された時間添加したことを示した .10ng/mL では、Sp7 と ALP は有意な発現量の増加を示した .10ng/mL では、Sp7 と ALP は一時的に発現量が増加し、OCN と OPG は 9 日目まで時間依存的に発現量が増加した .5 µg/mL では、9 日目に Sp7 と ALP が増加したが、OCN と OPG の発現には変化がなかった . (C) LTA (10ng/mL または 5 µg/mL) を添加した骨形成誘導培地で指示された時間培養した MC3T3-E1 における骨形成マーカー遺伝子の発現を示す . 骨形成誘導培地では、LTA の添加は骨形成関連マーカーの発現を促進しなかった . 5 µg/mL では、6 日目と 9 日目の SP7, 3 日目と 9 日目の ALP, すべての測定日の OCN と OPG の発現が抑制された .

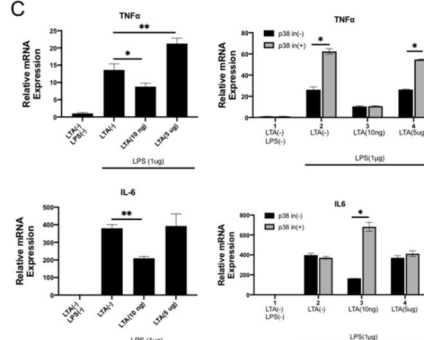
A



B



C



(3) LPS および LTA 刺激による MC3T3-E1 の骨形成分化における TNF- α , IL-6 および p38 シグナリングの関与 . (A) MC3T3-E1 細胞の骨形成分化に対する LPS および LTA の影響 . MC3T3-E1 細胞を、LPS のみ (1 μ g/mL) または LTA (10ng/mL または 5 μ g/mL) を併用した骨形成誘導培地で 6 日間培養した . MC3T3-E1 のミネラル化は、アリザリンレッド染色で評価した . LPS の単独添加は鉱化を阻害し、10 ng/mL の LTA の補充は LPS によって阻害された鉱化を回復させた . 5 μ g/mL の LTA の値では、鉱化阻害を解除しなかった . (B) LPS (1 μ g/mL) のみ、または LTA (10ng/mL または 5 μ g/mL) と組み合わせた骨形成誘導培地で 6 日間培養した MC3T3-E1 細胞における骨形成マーカー遺伝子の発現 (n = 3) . LPS 単独では ALP, BSP, OCN の発現が有意に抑制され、LTA10ng/mL の添加により骨形成マーカー遺伝子の発現が有意に回復し、LTA5 μ g/mL の添加により骨形成マーカー遺伝子の発現はさらに抑制された . ALP-アルカリホスファターゼ、BSP-ボーンシアロプロテイン、OPG-オステオプロテジェリン (OSTEP) . (C) LPS (1 μ g/mL) のみ、または LTA (10ng/mL または 5 μ g/mL) と組み合わせた骨形成誘導培地で 6 日間培養した MC3T3-E1 における炎症マーカー遺伝子の発現 (n = 3) . p38 特異的阻害剤である SB203080 の効果により、MC3T3-E1 細胞の骨形成分化が誘導された . 炎症マーカーである TNF- α と IL-6 の発現は、鉱化実験の結果と対称的に、LPS 単独および LTA5 μ g/mL の添加により増強され、LTA10ng/mL の添加により抑制された .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishihata K, Seong CH, Kibe T, Nakazono K, Mardiyantoro F, Tada R, Nishimura M, Matsuguchi T, Nakamura N	4. 巻 23(20)
2. 論文標題 Lipoteichoic acid and lipopolysaccharides are affected by p38 and inflammatory markers and modulate their promoting and inhibitory effects on osteogenic differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232012633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石畑清秀, Seong Chang-Hwan, 岐部俊郎, 中園賢太, Fredy Mardiyantoro, 松口徹也, 中村典史
2. 発表標題 骨芽細胞様細胞株の石灰化における細菌細胞壁構成成分の与える影響
3. 学会等名 第75回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1 2. 石畑清秀, 岐部俊郎, 中園賢太, 多田亮平, Fredy Mardiyantoro, 松口徹也, 中村典史
2. 発表標題 細菌細胞壁成分（LTA/LPS）はp38ならびにIL-6を介して骨芽細胞様細胞の骨分化能を制御する
3. 学会等名 第77回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 典史 (Nakamura Norifumi) (60217875)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原田 英光 (Harada Hidemitsu) (70271210)	岩手医科大学・歯学部・教授 (31201)	
研究分担者	小松澤 均 (Komatsuzawa Hitoshi) (90253088)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	
研究分担者	西村 正宏 (Nishimura Masahiro) (00294570)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	
研究分担者	柚木 寿理 (Yunoki Juri) (80815621)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関