

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24079

研究課題名（和文）歯周疾患治療法の確立に向けたポリリン酸の抗炎症作用の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the anti-inflammatory effect of polyphosphoric acid for the establishment of treatment for periodontal disease

研究代表者

長谷川 実華子（寺島実華子）（Hasegawa, Mikako）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00849408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：臨床敗血症を正確に反映する盲腸結紮穿孔刺（CLP）腹膜炎のマウスモデルにおける polyP150 の効果を調査したところ、polyP150 による治療が CLP 腹膜炎のマウスモデルの生存率を有意に改善することを示した。また、polyP150 は CLP を介した肺血管透過性の増加を抑制し、ヒト血管内皮細胞である HMEC-1 細胞における polyP150 の前処理は、腫瘍壊死因子- α が誘導する単球性 THP-1 細胞接着および細胞間接着分子 1/CD54 遺伝子発現の阻害を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リポ多糖（LPS）は、敗血症ショックなどの病態や歯周炎の発症に関与しており、医科領域と歯科領域に共通の重要な標的である。本研究の結果は、polyP150 が細胞接着分子の発現と血管内皮における白血球の蓄積を阻害し、それによって血管透過性の増加を抑制することにより、致命的な敗血症を改善することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of polyP150 on a mouse model of cecal ligation and puncture (CLP) peritonitis that accurately reflects clinical sepsis, and showed that treatment with polyP150 significantly improved survival in a mouse model of CLP peritonitis. In addition, polyP150 suppresses CLP-mediated increase in pulmonary vascular permeability, and pretreatment of polyP150 in HMEC-1 cells, which are human vascular endothelial cells, is a tumor necrosis factor- α -induced monocyte THP-1 cell. It showed inhibition of adhesion and cell-cell adhesion molecule 1 / CD54 gene expression. These results suggest that polyP150 improves fatal sepsis by inhibiting the expression of cell adhesion molecules and the accumulation of leukocytes in the vascular endothelium, thereby suppressing the increase in vascular permeability.

研究分野：歯科保存学

キーワード：ポリリン酸 LPS 炎症性サイトカイン 抗炎症作用 歯周炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リポ多糖(LPS)は、敗血症ショックなどの病態や歯周炎の発症に関与しており、医科領域と歯科領域に共通の重要な標的である。

本研究代表者は、敗血症モデルマウスにおいて無機ポリリン酸(polyP)が、TNF- α -JNK/p38経路を調節することでマクロファージの臓器への動員を阻害し、cox-2を抑制することで抗炎症作用を示し、LPSによって引き起こされる多臓器機能不全および致死性から保護することを明らかにした。

2. 研究の目的

平均重合度が150の無機ポリリン酸塩(polyP150)は、マウスの敗血症のリポ多糖モデルで死亡率を改善することが示されている。

本研究では、臨床敗血症を正確に反映する盲腸結紮穿孔(CLP)腹膜炎のマウスモデルにおけるpolyP150の効果を調査し、その作用機序と敗血症治療の候補としての適合性を解明することを目的とした。

また、敗血症と同様にLPSによって引き起こされる炎症性疾患であり、歯の喪失原因として重要である歯周炎に対してpolyPの抗炎症作用を応用し、歯周疾患治療の研究基盤を構築することを目的としている。

3. 研究の方法

【CLPマウスモデルの生存率】

CLP腹膜炎マウスモデルを作成し、盲腸を結紮穿孔した。

CLPの1日前もしくはCLPの1日後にpolyP50(0.1 mmol / kg)または生理食塩水を腹腔内投与し、CLP後14日間生存を観察した。

【CLPマウスモデルにおける血管透過性】

血管透過性は、エバンスブルー色素アッセイを使用して評価した。

CLP72時間後にマウス尾静脈に300 μ Lの0.5%エバンスブルーを投与した。

30分後に肺組織を採取して、組織の一部を150 $^{\circ}$ Cで24時間乾燥し、湿重量/乾燥重量比を測定した。また、肺組織をホモジナイズして55 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートし、遠心分離した後、2波長分光光度計(620/740 nm)を使用して光学密度を測定した。

【単球-内皮細胞の相互作用】

HMEC-1細胞を96ウェルプレートに播種、培養した。

10 μ M polyP150またはPBSで4時間処理した後、25 ng / mL TNF- α で20時間処理するか、未処理とした。

THP-1細胞を5 μ M カルセイン AM で30分間標識、PBSで2回洗浄し、抗生物質と0.5%ウシ血清アルブミンを含むFBS(-)RPMI1640とインキュベートした。

HMEC-1細胞を標識THP-1細胞と30分間共培養した。

THP-1細胞をTNF- α で処理した実験では、THP-1細胞を10 μ M polyP150またはPBSで4時間前処理した後、25 ng / mL TNF- α で20時間処理した。次に、細胞をカルセイン AM で標識し、HMEC-1と共培養した。

HMEC-1細胞をTNF- α で処理した後、polyP150、HMEC-1細胞は未処理か、25 ng / mL TNF- α で4時間前処理した後、PBSまたは10 μ M polyP150で20時間処理した。

THP-1細胞に付着したHMEC-1細胞をPBSで洗浄して、付着していない細胞を除去した。

蛍光強度をSpectraMax 13マルチモードプラットフォームを使用して定量化した。

【RNAの分離とqPCR】

HMEC-1細胞を6ウェルプレートに播種、48時間培養した。

10 μ MのpolyPまたはPBSで4時間前処理した後、25 ng / mL TNF- α で4時間処理するか未処理にしました。

RNAは、RNeasy Mini Kitのプロトコールに従ってHMEC-1細胞から調製した。

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitを使用してcDNAを調製した。

ICAM-1、VCAM-1、ヒトグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼに論文記載のプライマーを使用した。
定量 PCR (qPCR) は、PowerUp SYBRGreen Master Mix プロトコルに従って QuantStudio 3 で実行した。
グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ mRNA 発現と比較して mRNA レベルを測定した。
すべてのサンプルは 3 重に測定、CT 法で分析した。

4 . 研究成果

臨床敗血症を正確に反映する盲腸結紮穿刺 (CLP) 腹膜炎のマウスモデルにおける polyP150 の効果を調査したところ、polyP150 による治療が CLP 腹膜炎のマウスモデルの生存率を有意に改善することを示した。また、polyP150 はエバンスブルー色素アッセイで示されるように、CLP を介した肺血管透過性の増加を抑制し、ヒト血管内皮細胞である HMEC-1 細胞における polyP150 の前処理は、腫瘍壊死因子- α が誘導する単球性 THP-1 細胞接着および細胞間接着分子 1/CD54 遺伝子発現の阻害を示した。
これらの結果は、polyP150 が細胞接着分子の発現と血管内皮における白血球の蓄積を阻害し、それによって血管透過性の増加を抑制することにより、致命的な敗血症を改善することを示唆している。この研究における我々の結果は、polyP150 が新規敗血症治療の候補となる可能性があることを示唆している。

5. 主な発表論文等

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

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------