

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010 年

課題番号：20592243

研究課題名（和文） ラット根尖病変の成立過程における MMPs, TIMPs の発現

研究課題名（英文） Expression of MMPs and TIMPs in development of rat periradicular lesion

研究代表者

今泉 一郎（IMAIZUMI ICHIRO）

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：20308779

研究成果の概要（和文）：

ラットに実験的に根尖病変を形成し、その成立過程における MMP-8、MMP-13、TIMP1、TIMP2 の発現動態について検索した。

MMP-8 および MMP-13 とともに根尖病変が拡大するにつれ発現が強く認められ、MMP-13 は MMP-8 に比べ早期に発現することが確認された。さらに、MMP-8 および MMP-13 の発現が強く認められる時期と同時期に MMP のインヒビターである TIMP1、TIMP2 の発現が認められることが確認された。また、ラット根尖病変成立過程における MMP-8、MMP-13 の発現は、タンパクおよび遺伝子レベルで同様の発現傾向を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the expressions of MMP-8, MMP-13, TIMP1 and TIMP2 in experimentally induced rat periradicular lesions by means of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical staining.

These findings indicate that MMP-8, MMP-13, TIMP1 and TIMP2 were related to the development of periradicular lesions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：根尖病変、MMP-8、MMP-13、TIMP1、TIMP2

## 1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎は根尖部の歯周組織における炎症であり、主に歯髄あるいは根管の細菌感

染によって引き起こされる。その他に、機械的因子、化学的因子、免疫応答などが関与していると考えられている。根尖部歯周組織の

破壊、吸収は、結合組織の主要成分である細胞外マトリックス ( extracellular matrix: ECM ) の分解が深く関与していると考えられており、ECM を分解するタンパク分解酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ ( matrix metalloproteinases: MMPs ) が知られている。そして、MMPs の活性を阻害するインヒビターとしては TIMP が知られている。コラゲナーゼは MMPs の代表的な一つであり、ECM の主要な線維性タンパクであるコラーゲンを特異的に分解する。そして、コラゲナーゼは様々な炎症性病変の組織破壊に関与していると考えられている。コラゲナーゼは、現在 MMP-1(コラゲナーゼ 1)、MMP-8(コラゲナーゼ 2)、MMP-13(コラゲナーゼ 3)の 3 種類に分類される。一方 TIMP に関しては現在 TIMP1 から 4 までの 4 種類報告されており、そのうち TIMP1 と TIMP2 は MMPs の活性を阻害し、必要以上のコラーゲンの分解阻止に関与していると報告されている。MMP-8 は炎症組織内で好中球が放出し、I、II、III 型コラーゲンを分解すると言われている。一方、MMP-13 は他の MMPs と比較して広い基質特異性を持っていると言われており、腫瘍、骨関節炎患者の軟骨、リウマチ患者の滑膜、さらには創傷部位などいろいろな組織に認められるが、根尖病変中の発現を示した報告はほとんどみられない。そこで本研究は、ラットに実験的に根尖病変を形成し、その成立過程における MMP-8、MMP-13、TIMP1、TIMP2 の発現動態を免疫組織化学的に検索し、MMP-8、MMP-13 の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検索する。

## 2. 研究の目的

歯髄・根尖部歯周組織における組織破壊には、主として MMPs と破骨細胞が関与する。両者ともその活性発現には、サイトカイン、プロ

スタグランジンによる調節をうけていると考えられている。しかし、根尖病変中の MMPs による ECM 分解のメカニズムは未だ不明な点が多い。そこで、本研究は根尖病変における ECM の主要成分であるコラーゲンを特異的に分解するコラゲナーゼの動態を検討する目的で、ラット根尖病変成立過程における MMP-8、MMP-13、TIMP1、TIMP2 の発現を免疫組織化学的に観察し、さらに MMP-8、MMP-13 の m-RNA 発現についても検索する。

## 3. 研究の方法

平成 20 年度

免疫染色(ABC 法)にて MMP-8、MMP-13 の発現動態を検索する。

(1) 実験には、8 週齢体重約 250g の雄性ウイスターラットを 25 匹使用する。ラットは、エーテル麻酔下にて下顎第一臼歯の歯髄をラウンドバーにて露髄させる。その後そのまま放置し、1、2、3、4、6 週後に屠殺し、下顎骨を摘出する。

(2) 摘出した下顎骨を PLP 固定液で浸漬し、固定する。その後、4℃で EDTA 溶液にて低温脱灰を行う。脱灰後、Tissue-Tek O.C.T Compound で包埋し、凍結連続切片を作成する。

(3) 切片作成後、マイヤー・ヘマトキシリンと抗 MMP-8、抗 MMP-13 抗体を使用し、ABC 法(Avidin-Biotin-peroxidase Complex)にて免疫染色を行う。

(4) 免疫染色を施した切片を光学顕微鏡下で観察し、1、2、3、4、6 週における根尖病変の病理組織学的検索と根尖病変の面積および MMP-8、MMP-13 の発現動態を免疫組織学的に検索する。光学顕微鏡および根尖病変の面積を計測するのに用いる画像解析装置は既存のものを用いる。

平成 21 年度

免疫染色(ABC 法)にて TIMP1、TIMP2 の発

現動態を検索する。

(1) 実験には、8週齢体重約250gの雄性ウイスターラットを25匹使用する。ラットは、エーテル麻酔下にて下顎第一臼歯の歯髄をラウンドバーにて露髄させる。その後そのまま放置し、1、2、3、4、6週後に屠殺し、下顎骨を摘出する。

(2) 摘出した下顎骨をPLP固定液で浸漬し、固定する。その後、4℃でEDTA溶液にて低温脱灰を行う。脱灰後、Tissue-Tek O.C.T Compoundで包埋し、凍結連続切片を作成する。

(3) 切片作成後、マイヤー・ヘマトキシリンと抗TIMP1、抗TIMP2抗体を使用し、ABC法(Avidin-Biotin-peroxidase Complex)法で免疫染色を行う。

(4) 免疫染色を施した切片を光学顕微鏡下で観察し、1、2、3、4、6週におけるTIMP1、TIMP2の発現動態を免疫組織学的に検索する。

平成22年度

RT-PCR法にてMMP-8、MMP-13のm-RNA発現を検索する。

(1) 実験には、8週齢体重約250gの雄性ウイスターラットを25匹使用する。ラットは、エーテル麻酔下にて下顎第一臼歯の歯髄をラウンドバーにて露髄させる。その後そのまま放置し、1、2、3、4、6週後に屠殺し、下顎骨を摘出する。

(2) 摘出した下顎骨から、第一臼歯と根尖病変を含む歯周組織を一塊に取り出す。

(3) 取り出した組織をホモジナイズし、RNeasy Mini Kitを用いてRNAを抽出する。

(4) 抽出したRNAをReady-To-Go RT-PCRを用いてcDNAを合成する。合成したcDNAを増幅させるためにMMP-8、MMP-13プライマーを混和しPCRを行う。

(5) エチジウム・プロマイドを添加した2%

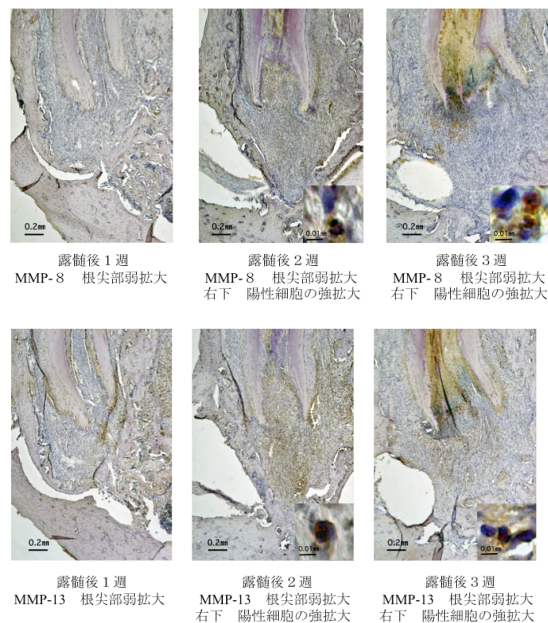
アガロースゲルに1、2、3、4、6週のPCR産物を等量分注後、電気泳動し、紫外線透過法にてそれぞれのMMP-8、MMP-13のm-RNA発現を検索する。

#### 4. 研究成果

平成20年度はラットに実験的に根尖病変を形成し、その成立過程におけるMMP-8、MMP-13の発現動態について免疫組織学的、組織形態計測学的に検索した。

##### 免疫組織化学的所見

MMP-8は露髄後1週ではほとんど認められず、2週でわずかに認められた。3週、4週では根尖部膿瘍内およびその周囲に発現が多く認められた。しかし、6週ではその発現は減少していた。MMP-13は、露髄後1週からわずかに認められ、2週、3週、4週とその発現は徐々に増加した。しかし、6週ではその発現は減少していた。

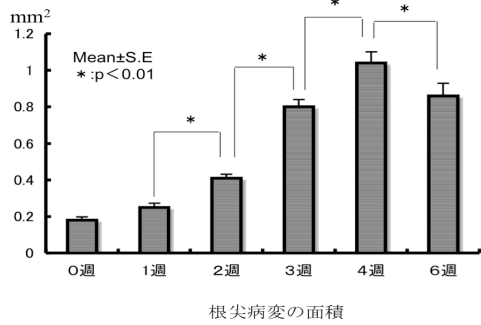


##### 組織形態計測学的所見

###### (1) 根尖病変の面積

根尖病変の面積は1週から4週にかけて次第に増加し、特に2週から3週では病変部の面積は大幅に増加を示した。しかし、6週

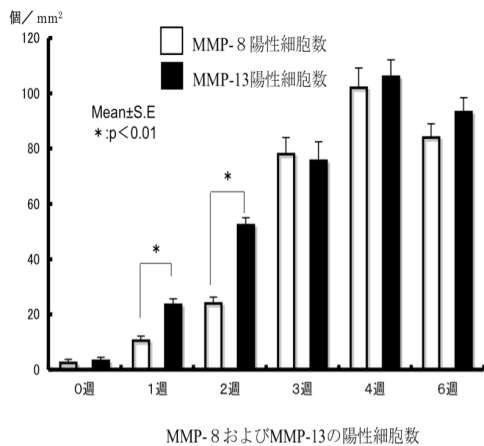
では面積は若干減少していた。



(2) 単位面積あたりの MMP-8 および MMP-13 陽性細胞数

単位面積あたりの MMP-8 陽性細胞数と MMP-13 陽性細胞数を比較すると、1 週と 2 週では MMP-8 陽性細胞に比べ、MMP-13 陽性細胞の方が有意に多く発現が認められた ( $p < 0.01$ )。しかし、その後は MMP-8 陽性細胞と MMP-13 陽性細胞の間に有意な差はみられなかった。

以上の結果により、MMP-8 および MMP-13 とともに根尖病変が拡大するにつれ発現が強く認められ、MMP-13 は MMP-8 に比べ早期に発現することが確認された。このことから、MMP-8 および MMP-13 は根尖病変における組織破壊に関与していると示唆された。

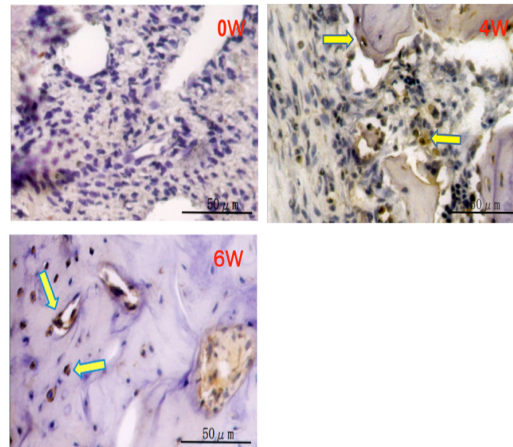


平成 21 年度はラットに実験的に根尖病変を形成し、その成立過程における TIMP1、TIMP2、の発現動態について免疫組織学的、組織形態計測学的に検索した。

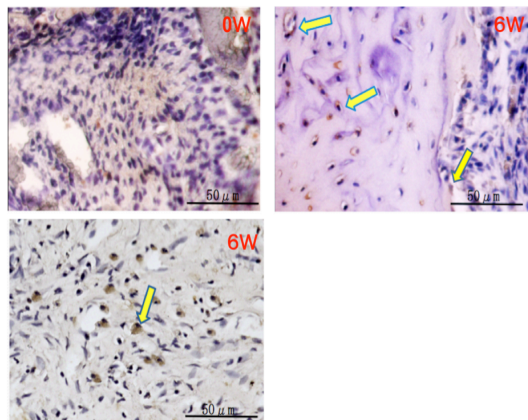
免疫組織化学的所見

TIMP1 は露髄後 1 週、2 週ではその発現は認められなかった。3 週では、根尖部膿瘍内に発現が認められるようになり、4 週では根尖部膿瘍内およびその周囲に発現が多く認められた。しかし、6 週では、その発現は減少していた。TIMP2 は、露髄後 1 週では、その発現は認められず、2 週では、ほとんど認められなかった。3 週では、その発現は徐々に増加し、4 週では根尖膿瘍内およびその周囲の歯根膜にも発現が認められた。しかし、6 週では、その発現は若干減少していた。

TIMP-1



TIMP-2



組織形態計測学的所見

単位面積あたりの TIMP1 および TIMP2 陽性細胞数

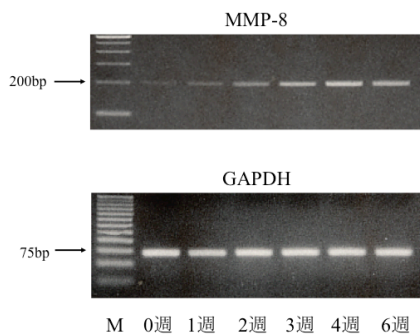
単位面積あたりの TIMP1 陽性細胞数は、露髄後 1 週、2 週では TIMP1 陽性細胞は認められず、3 週、4 週では TIMP1 陽性細胞数は増加傾向を示した。しかし、6 週では、TIMP1 陽性細胞数は減少した。TIMP2 陽性細胞数は、露髄後 1 週では TIMP2 陽性細胞は認められず、2 週、3 週、4 週と TIMP2 陽性細胞数は増加傾向を示した。しかし、6 週では、その発現は減少した。TIMP1 陽性細胞数と TIMP2 陽性細胞数を比較したが、有意な差は認められなかった。

前年度の実験結果および今回の実験結果より、ラット根尖病変成立過程において MMP-8 および MMP-13 の発現が強く認められる時期と同時期に MMP のインヒビターである TIMP1、TIMP2 の発現が認められることが確認された。

22 年度はラットの第一大臼歯を露髄させ、実験的に根尖病変を形成し、その成立過程における MMP-8 および MMP-13 の mRNA 発現の有無を、露髄後 1、2、3、4 および 6 週について RT-PCR 法を用いて調べた。

#### (1) MMP-8 の mRNA 発現

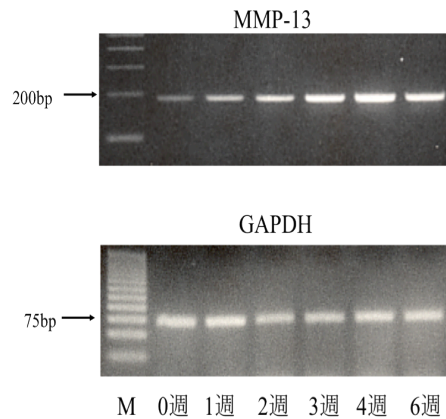
未露髄 0 週の対照群において、MMP-8 の発現はわずかに認められ、露髄後 1 週では対照群に比べ発現はわずかに強く認められた。そして、2、3、4 週とその発現は次第に強まったが、6 週ではその発現は若干低下した。



MMP-8 mRNA発現  
0 週から 4 週にわたり MMP-8 mRNA 発現が増加し、6 週でその発現は若干低下している。

#### (2) MMP-13 の mRNA 発現

未露髄 0 週の対照群において、MMP-13 の発現はわずかに認められた。露髄後 1、2、3 週とその発現は次第に強くなった。そして、4 および 6 週ではその発現は 3 週のものと同様に強い発現が認められた。



MMP-13mRNA発現

0 週に比べ 1 週から 3 週で MMP-13 mRNA 発現が増加し、4 週および 6 週でも強い発現が認められる。

今回の実験から、MMP-8、MMP-13 はともにラット根尖病変中に存在していることが示された。また、MMP-8、MMP-13 ともに根尖病変が拡大するにつれ発現が強く認められことが確認された。

平成 20 年度の実験では、ラット根尖病変成立過程における MMP-8、MMP-13 の発現動態を免疫組織学的、組織形態計測学的に検索を行ったが、MMP-8 陽性細胞および MMP-13 陽性細胞は今回の結果と同様な発現傾向を示していた。

よって、平成 20 年度の実験結果および今回の実験結果より、ラット根尖病変成立過程における MMP-8、MMP-13 の発現は、タンパクおよび遺伝子レベルで同様の発現傾向を示すことが示唆された。

#### 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1件)

H. Matsui, M. Yamasaki, K. Nakata,  
K. Amano, H. Nakamura  
Expression of MMP-8 and MMP13 in the  
development of periradicular lesions  
International Endodontic Journal, 査読有  
2011, in press

〔学会発表〕(計1件)

田中 毅、川谷里絵、松井寛敬、天野一晴、  
今泉一郎、中村 洋  
ラット根尖病変の成立過程におけるメタロ  
プロテアーゼの発現、日本歯科保存学会 2010  
年度秋季学術大会、岐阜、2010年10月29日

〔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

今泉 一郎 (IMAZUMI ICHIRO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号: 20308779

### (2) 研究分担者

中村 洋 (NAKAMURA HIROSHI)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号: 40064878

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: