

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592431

研究課題名(和文) 自然免疫系の活性化を指標とした歯周疾患活動性評価法の確立

研究課題名(英文) Evaluation of the periodontal disease activity measuring the ability of dental plaque to activate innate immune system

研究代表者

吉村 篤利 (YOSHIMURA ATSUTOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70253680

研究成果の概要(和文)：歯周病は、プラーク中の細菌により惹起される炎症性疾患である。歯周組織における菌体成分の認識にはTLR2およびTLR4が中心的役割を果たすことから、プラークのTLR2, 4刺激作用を解析したところ、TLR4刺激作用は、プラーク採取部位の臨床指数と関連性を示した。また、TLR4刺激作用は末梢血単核球からのサイトカイン産生誘導能とも関連性を示した。歯周病原細菌内毒素は強力な起炎作用を有し、レセプターであるTLR4の活性化度の測定は歯周疾患の活動性評価に有効と思われる。

研究成果の概要(英文)：Periodontal diseases are the inflammatory diseases caused by the bacteria in dental plaque. Since TLR2 and TLR4 play a central role in the recognition of bacterial products in periodontal tissue, we analyzed the ability of dental plaque to stimulate TLR2, 4. The ability of dental plaque to induce TLR4-mediated stimulation was positively associated with the clinical parameters at the sampled sites. The ability to induce TLR4-mediated stimulation was also associated with the levels of the cytokines produced by the peripheral blood mononuclear cells stimulated with the plaque. Endotoxins in the dental plaque possessed potent pro-inflammatory activities and measurement of the ability to induce TLR4-mediated stimulation would be useful for the evaluation of periodontal disease activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周疾患活動性、歯肉縁上プラーク、歯肉縁下プラーク、自然免疫、TLR2、TLR4

## 1. 研究開始当初の背景

(1) プラークの病原性評価法には、細菌学的手法や分子遺伝学的手法により歯周病原細菌を直接検出する方法や、生化学的に特異的酵素を検出する方法が存在する。これらは、プラーク中の特定の歯周病原細菌やその病

原因子を検出するには有用な方法であるが、数百種にもおよぶ口腔内細菌の存在を考慮すれば、未知の病原体が歯周病の進行に深く関与していることを否定できない。プラーク中の全ての病原体をを一塊として、その活動性を評価する方法の開発が期待されている。

(2) TLR を始めとするパターン認識分子の発見やそのシグナル分子の解明など、近年、自然免疫学の解析方法は飛躍的發展を遂げた。これにより宿主側のプラーク中の病原体認識分子を介する刺激の強さが測定可能となった。歯周病原細菌の認識には、TLR2 と TLR4 が特に重要な役割を果たすことから、TLR2 および TLR4 刺激作用が、プラークの病原性に特に関連性が強いと予想された。

## 2. 研究の目的

(1) 歯周組織における炎症反応は、プラーク中の細菌成分による歯周組織の刺激に対する宿主応答によって引き起こされることから、TLR2 および TLR4 を介する宿主側の応答性がプラークの病原性評価の指標となるかどうか検討した。まず、歯肉縁上プラークの TLR2、TLR4 刺激作用と採取部位の歯周病臨床指数との関連性を解析した。

(2) 次に、歯周組織と直接接触する歯肉縁下プラークの TLR2 および TLR4 刺激作用と採取部位の歯周病臨床指数との関連性を解析した。また、歯肉縁上プラーク並びに歯肉縁下プラークの細菌学的組成と TLR2 および TLR4 刺激作用との関連についても解析した。

(3) さらに、歯肉縁上プラークの TLR2 および TLR4 刺激作用が、どのようにして歯周組織に影響を及ぼすかを検討するために、末梢血単核球を歯肉縁上プラークで刺激した際に産生されるサイトカイン量との関連について解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 144 名の被験者の上顎右側中切歯から歯肉縁上プラークを採取した。採取部位の歯槽骨吸収度、プラーク指数、歯肉炎指数、ポケットの深さ、臨床的アタッチメントレベルなどの臨床指数を記録した。採取したプラークで TLR2、TLR4 のいずれかを発現したレポーター細胞を刺激した。レポーター細胞は、ハムスター線維芽細胞腫 CHO 細胞にヒト CD14 と NF- $\kappa$ B 依存性レポータープラスミドを遺伝子導入することにより作製され、TLR2 および TLR4 からの刺激が細胞内に伝わると、転写因子 NF- $\kappa$ B が活性化され、細胞表面にレポーター分子 CD25 を発現する。18 時間刺激後、それぞれのレポーター細胞に発現したレポーター分子発現量をフローサイトメトリー法で測定し、TLR2、TLR4 を介した NF- $\kappa$ B 活性化度を解析した。プラーク中の菌体成分は主に TLR2 および TLR4 を介して NF- $\kappa$ B を活性化するものと思われるが、TLR2、TLR4 以外の刺激により NF- $\kappa$ B が活性化されていないことを確認するため、TLR2、TLR4 非発現レポーター細胞の刺激も行った。

(2) 4 mm 以上の歯周ポケットを有する歯周炎患者(合計 100 名)のポケット最深部から、縁下プラークを採取した。縁下プラークの採取は縁上プラークの可及的除去後に行い、採取部位の臨床指数を記録した。(1) と同様に、採取したプラークで TLR2、TLR4 のいずれかを発現したレポーター細胞を刺激し、18 時間後のレポーター分子発現量をフローサイトメトリー法で解析した。

また、採取した縁上および縁下プラークから細菌ゲノム DNA を抽出し、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans* などの歯周病原細菌、*Streptococcus mutans* などのグラム陽性菌、並びに総真正細菌を特異的プライマーと TaqMan プロブを組み合わせて、定量的 real time-PCR 法で検出した。採取されたプラークの TLR2、TLR4 刺激作用とプラーク中に含まれる歯周病原細菌の割合との関連についても解析した。

(3) 上述の方法で採取したプラークでヒト末梢血単核球を刺激し、産生される TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-10 量を ELISA 法で測定した。プラークの TLR2、TLR4 刺激作用と産生されたサイトカイン量との関連について解析した。また TLR2、TLR4 の阻害剤がサイトカイン産生量に与える影響についても検討した。

## 4. 研究成果

(1) 縁上プラークの TLR4 刺激作用は、プラーク採取部位のプラーク指数、歯肉炎指数と正の相関を示した。また、縁上プラークの TLR2 刺激作用は、プラーク採取部位のポケットの深さ、臨床的アタッチメントレベルと負の相関を示した。その結果、縁上プラークの TLR2 刺激作用に対する TLR4 刺激作用の比は、図 1 に例を示すように、プラーク採取部位のプラーク指数、歯肉炎指数、ポケットの深さ、臨床的アタッチメントレベルと正の相関を示した。

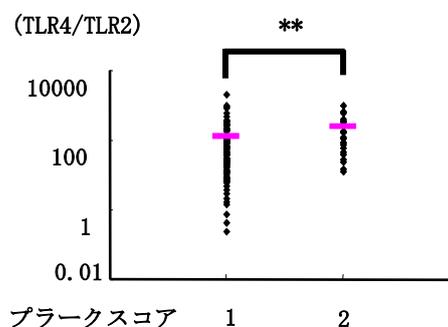


図 1 TLR2/TLR4 比とプラークスコアの関連

(2) 縁下プラークの TLR4 刺激作用とプラーク採取部位のプラーク指数との間には正の相関が認められるものの、他の臨床パラメーターとの明らかな相関は認められなかった。縁上プラークと縁下プラークの細菌叢について解析を進めた結果、プラーク中の *P. gingivalis* 数とプラークスコアなどの臨床指数に関連が認められた (図2)。また、縁下プラークでは、*P. gingivalis* 等の細菌が有意に増加しており、これらの細菌学的組成の違いが TLR 刺激作用に影響していることが示唆された。

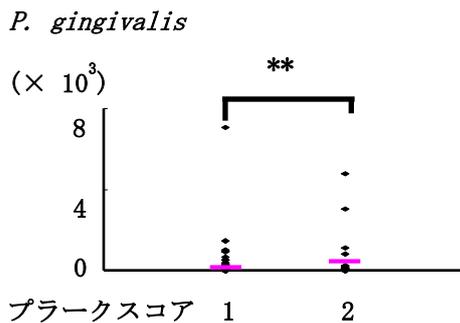


図2 歯肉縁上プラーク中の *P. gingivalis* 数とプラークスコアの関連

(3) 縁上プラークによる刺激で末梢血単核球から誘導される TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-10 量は、縁上プラークの TLR4 刺激作用と正の相関を示した (図3)。また、TLR4 阻害剤によりサイトカインの産生は有意に抑制された。

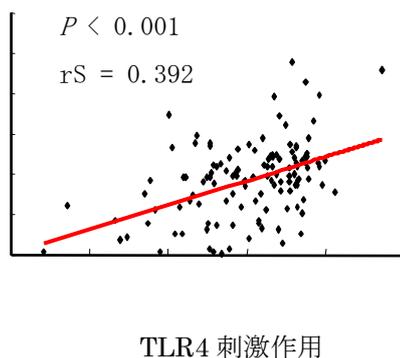


図2 プラークの TLR4 刺激作用と末梢血単核球からの TNF- $\alpha$  産生誘導能との関連

これらの結果から、プラークの TLR4 刺激性は、歯肉の炎症の程度に大きく影響を与えていると考えられる。歯周病感受性並びに歯周病活動性の評価においてプラークの TLR4 刺激性を測定することは有効と思われる。

## 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 11 件)

- ① Mikio Shoji, Atsutoshi Yoshimura, Hidenobu Yoshioka, Akemi Takade, Yasuko Takuma, Hideharu Yukitake, Mariko Naito, Yoshitaka Hara, Shin-Ichi Yoshida, Koji Nakayama, Recombinant *Porphyromonas gingivalis* FimA preproprotein expressed in *Escherichia coli* is a lipoprotein and recombinant FimA processed protein is auto-polymerized *in vitro*, Canadian Journal of Microbiology, 査読有, 56, 2010, 959-967
- ② Xinyue Li, Naoko Kato, Masaru Mezawa, Zhengyang Li, Zhitao Wang, Li Yang, Yoko Sasaki, Takashi Kaneko, Hideki Takai, Atsutoshi Yoshimura, Yorimasa Ogata, Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, Journal of Cellular Biochemistry, 査読有, 110, 2010, 823-833
- ③ Tsuyoshi Okugawa, Takashi Kaneko, Atsutoshi Yoshimura, Neal Silverman, Yoshitaka Hara, NOD1 and NOD2 Mediate Sensing of Periodontal Pathogens, Journal of Dental Research, 査読有, 89, 2010, 186-191  
[http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10069/24668/1/JDR89\\_186.pdf](http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10069/24668/1/JDR89_186.pdf)
- ④ Hirotaka Nakamura, Takashi Ukai, Atsutoshi Yoshimura, Yoshio Kozuka, Hidenobu Yoshioka, Yasunori Yoshinaga, Yoshihiro Abe, Yoshitaka Hara, Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption *in vivo*, Journal of Periodontal Research, 査読有, 45, 2010, 23-30
- ⑤ Ana Maria M. Suzuki, Atsutoshi Yoshimura, Yokio Ozaki, Takashi Kaneko, Yoshitaka Hara, Cyclosporin A and Phenytoin Modulate Inflammatory Responses, Journal of Dental Research, 査読有, 88, 2009, 1131-1136  
[http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10069/24540/1/JDR88\\_1131.pdf](http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10069/24540/1/JDR88_1131.pdf)
- ⑥ Koki Haruyama, Atsutoshi Yoshimura, Mariko Naito, Mami Kishimoto, Mikio Shoji, Yoshimitsu Abiko, Yoshitaka

- Hara, Koji Nakayama, Identification of a Gingipain-Sensitive Surface Ligand of *Porphyromonas gingivalis* That Induces Toll-Like Receptor 2- and 4-Independent NF- $\kappa$ B Activation in CHO Cells, *Infection and Immunity*, 査読有, 77, 2009, 4414-4420  
[http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10069/23135/1/InfImm77\\_4414.pdf](http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/bitstream/10069/23135/1/InfImm77_4414.pdf)
- ⑦ Hideaki Hayashida Koji Kawasaki, Atsutoshi Yoshimura, Noboru Takamura, Yoshitaka Hara, Takahiro Maeda, Toshiyuki Saito, Relationship between periodontal status and HbA1c in non-diabetics, *Journal of Public Health Dentistry*, 査読有, 69, 2009, 204-206
- ⑧ Ryusuke Yamaguchi, Atsutoshi Yoshimura, Hidenobu Yoshioka, Takashi Kaneko, Yoshitaka Hara, Activity of Supragingival Plaque to Induce Toll-Like Receptor 4-Mediated Stimulation is Associated with Cytokine Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Journal of Periodontology*, 査読有, 79, 2009, 512-520
- ⑨ 中村弘隆, 鶴飼孝, 吉永泰周, 尾崎幸生, 金子高土, 白石千秋, 岸本真実, 小野山美穂, 阿部嘉裕, 安部達也, 吉村篤利, 原宜興, グリチルレチン酸は LPS 誘導性骨吸収を抑制する, *日本歯科保存学雑誌*, 査読有, 51, 2008, 323-330
- ⑩ Hirotaka Nakamura, Yukiko Fukusaki, Atsutoshi Yoshimura, Chiaki Shiraishi, Mami Kishimoto, Takashi Kaneko, Yoshitaka Hara, Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in C3H/HeJ mice in vivo, *Oral Microbiology and Immunology*, 査読有, 23, 2008, 190-195
- ⑪ Hidenobu Yoshioka Atsutoshi Yoshimura, Takashi Kaneko, Douglas T. Golenbock, Yoshitaka Hara, Analysis of the Activity to Induce TLR2- and TLR4-Mediated Stimulation of Supragingival Plaque, *Journal of Periodontology*, 査読有, 23, 2008, 920-928
- [学会発表] (計 15 件)
- ① Mami Kishimoto *et al.*, Identification of a cell surface component of *Porphyromonas gingivalis* that induces TLR2-and TLR4-independent activation of NF- $\kappa$ B in CHO cells, The 10th International Endotoxin and Innate Immunity Society meeting, 2008年7月31日, Edinburgh, UK
- ② Takashi Kaneko *et al.*, NOD mediates cytoplasmic sensing of periodontal pathogens, The 10th International Endotoxin and Innate Immunity Society meeting, 2008年7月31日, Edinburgh, UK
- ③ Atsutoshi Yoshimura *et al.*, Analysis of the Activity to Induce TLR2- and TLR4-Mediated Stimulation of Supragingival and Subgingival Plaque, The 10th International Endotoxin and Innate Immunity Society meeting, 2008年7月31日, Edinburgh, UK
- ④ Ana Maria Masae Suzuki *et al.*, Cyclosporin A modulates TLR-mediated Responses in Human Gingival Fibroblasts, The 10th International Endotoxin and Innate Immunity Society meeting, 2008年7月31日, Edinburgh, UK
- ⑤ 奥川 剛志 他, 歯周病原細菌の NOD 活性化能に関する研究, 第 51 回春季日本歯周病学会学術大会, 2008年4月25日, さいたま
- ⑥ Ana Maria Masae Suzuki *et al.*, Effects of Cyclosporin A on TLR-mediated Responses of Gingival Fibroblasts, 第 51 回春季日本歯周病学会学術大会, 2008年4月25日, さいたま
- ⑦ 吉村篤利 他, 歯肉縁下プラークの Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4 刺激作用と歯周病臨床パラメーターの関連性について, 第 129 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2008年11月6日, 富山
- ⑧ 吉村篤利 他, 歯肉縁上プラークの TLR4 刺激作用と末梢血単核球からのサイトカイン産生誘導能との関連, 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会, 2009年5月15日, 岡山コンベンションセンター (岡山県)
- ⑨ Ana Maria Masae Suzuki *et al.*, Cyclosporin A and Phenytoin Differently Modulate Toll-Like Receptor-Mediated Responses in Human Gingival Fibroblasts, The 9th World Congress on Inflammation, 2009年7月7日, 京王プラザホテル (東京都)
- ⑩ Xinyue Li *et al.*, *P. gingivalis* Lipopolysaccharide Regulates Bone Sialoprotein Gene Transcription, The 6th Congress of the European

Federation of Periodontology, 2009年7月5日, Stockholm International Fairs (ストックホルム・スウェーデン)

- ⑪ 金子高士 他, NODによる歯周病原細菌の認識, 第131回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2009年10月29日, 仙台国際センター (宮城県)
- ⑫ Atsutoshi Yoshimura *et al.*, Cyclosporin A and phenytoin modulate inflammatory responses in gingival fibroblasts, 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010年7月16日, CCIB (バルセロナ・スペイン)
- ⑬ Takashi Kaneko *et al.*, NOD1 and NOD2 mediate sensing of periodontal pathogens, 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010年7月15日, CCIB (バルセロナ・スペイン)
- ⑭ Atsutoshi Yoshimura *et al.*, A gingipain-sensitive surface ligand of *Porphyromonas gingivalis* that induces TLR2- and TLR4- independent NF- $\kappa$ B activation in CHO cells, The 14th International Congress of Immunology, 2010年8月25日, 神戸コンベンションセンター (神戸)
- ⑮ 岸本隆明 他, ペプチドグリカンの骨吸収揺動能に関する実験病理組織学的研究, 日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会, 2010年11月23日, 福岡県歯科医師会館 (福岡)

[図書] (計1件)

- ① 吉村篤利, 他, 永末書店、ザ・ペリオドントロジー 第4章 歯肉炎および慢性歯周炎における治療法 IV. メインテナンス 1. メインテナンス, 2009, 212-215
- ② 吉村篤利, 他, 医歯薬出版株式会社、チェアサイドの歯科英会話 レッスン3 歯周処置, 2011, 16-21

[その他]

ホームページ等

[http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept\\_perio](http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_perio)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉村 篤利 (YOSHIMURA ATSUTOSHI)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
准教授  
研究者番号：70253680

### (2) 研究分担者

原 宜興 (HARA YOSHITAKA)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号：60159100

中山 浩次 (NAKAYAMA KOJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授

研究者番号：80150473

金子 高士 (KANEKO TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教

研究者番号：10284697

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：