

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 26 日現在

機関番号： 15401

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008 ~ 2010

課題番号： 20592456

研究課題名 (和文) 歯周疾患におけるストレス誘導性タンパク質の関与

研究課題名 (英文) Study of stress inducing proteins in periodontitis.

研究代表者

島津 篤 (SHIMAZU ATSUSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号： 10274094

研究成果の概要 (和文)：

retinoic acid early inducible gene-1(RAE-1)は分子量約 35kDa の膜タンパク質で、細菌感染、癌化等により発現が誘導されるストレス誘導性タンパク質である。しかし歯周組織を構成している種々の細胞が、RAE-1 を発現するのか否か、生理的作用や疾患への関与については全く不明である。そこで歯周組織を構成する種々の細胞細胞における RAE-1 の発現制御機構の検討を行ない、骨芽細胞、歯髄細胞が、外来刺激に対して RAE-1 の発現を誘導し、生体防御あるいは組織の崩壊に関与している知見を得た。

研究成果の概要 (英文)：

The retinoic acid early inducible gene-1 (RAE-1) is around 35 kDa protein induced by the exogenous stimulation, such as infection and tumorigenesis. However, there is completely unknown about the expression and the function of RAE-1 in periodontal tissue. In this study, we examined the the expression and the function of RAE-1 and our results provide novel evidence for a possible interaction in periodontal tissue and roles against the expgenous stumlation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 予防歯科学

科研費の分科・細目： 歯学・社会系歯学

キーワード： 歯周組織 歯周疾患 ストレス

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎える先進諸国において、歯

の喪失は QOL(Quality of Life)を阻害する重要な問題であるが、残念ながら日本において現在 80 才の人の平均歯数は 10 本に満たないのが現状である。

中高年が歯を喪失する原因の一つに歯周疾患が上げられるが、これらに対する予防法、治療法は十分確立されておらず十分な効果を上げていない。生涯自分の歯で噛める人を増やすためには、より効果的な予防法、早期検出法、治療法の開発、普及が望まれている。

レチノイン酸により誘導される新規タンパク質として見いだされた RAE-1 (retinoic acid early inducible gene-1)は「MHC Class I」と相同性を有することから、免疫担当細胞との相互作用が予測されていた。

そして近年 NK 細胞, $\gamma\delta$ T 細胞, 活性化マクロファージに発現する NKG2D が, RAE-1 受容体として明らかにされ, RAE-1 が NKG2D に結合すると細胞傷害活性を発揮することが明らかとなった。また RAE-1 は, 正常細胞ではほとんど発現していないが, 細菌やウイルスの感染, 癌化が引き金となって発現が誘導される「ストレス誘導性」のタンパク質であることも次第に明らかになった。

2. 研究の目的

しかしながら特に歯周組織局所における RAE-1 と NKG2D の研究は見当たらず, 歯周組織局所における RAE-1 発現細胞とその発現制御機構, RAE-1 発現細胞と NKG2D 陽性細胞との相互作用の詳細は不明のままである。

そこで今回, RAE-1 の誘導が歯周組織の崩壊に関与しているのか否かを明らかにすることを目的に研究費の交付の申請をおこなった。

3. 研究の方法

0~10 日齢雄性マウス大腿骨を脱灰後凍結切片を作製し,RAE-1 の免疫染色を行なった。

また骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞は, 10%FBS 含有 α -MEM にて培養し, 経時的に骨分化マーカーおよび RAE-1 を Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法にて検出した。さらに血清不含 α -MEM にて種々の濃度 (0~30 ng/ml) の LPS を添加し RAE-1 の発現を検出した。

マウス骨髄細胞を単離後, Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) および Macrophage colony-stimulating factor (MCSF) を添加し培養を行い, 経時的に RAE-1 および NKG2D を RT-PCR 法にて検出した。

4. 研究成果

10 日齢マウス大腿骨において,大腿骨内部の骨芽細胞に RAE-1 陽性細胞が認められた。MC3T3-E1 細胞は RAE-1 δ と ϵ を強く発現し, 分化誘導 培地にて培養すると細胞外基質の形成が盛んな時期に RAE-1 を強く発現していた。

また MC3T3-E1 細胞を LPS にて処置すると, 処置後 12 時間 10ng/ml の濃度において RAE-1 の発現が最大となった。

これらの結果は, 骨芽細胞が RAE-1 の発現能を備え, また骨芽細胞においても RAE-1 がストレス誘導性タンパク質としての機能, つまり細菌感染などによる RAE-1 の誘導が, 免疫細胞の遊走・定着の発端, 組織の崩壊に関与している可能性を示唆しているのかもしれない。

次に, 破骨細胞に対する機能的役割を解明するため検討を行なった。マウス骨髄細胞は RANKL および MCSF 処置により経時的に破骨細胞に分化する。この系を用いて RAE-1 の発現を検討したところ, 分化前後のいずれの時期においても破骨細胞の RAE-1 の発現

を検出することができなかったが、成熟破骨細胞は RAE-1 の推定受容体である NKG2D を強く発現していることが判明した。

これらの結果は、骨芽細胞が RAE-1 の発現能を備え、細菌感染などによる骨芽細胞の RAE-1 の誘導が、NKG2D を発現している成熟破骨細胞に伝播し、歯周組織の崩壊に関与している可能性を示唆しているのかもしれない。

さらに、0~10 日齢マウスを用いて、マウス歯冠および歯根形成期における RAE-1 発現細胞の検索を行った。歯冠形成期のエナメル芽細胞および歯根形成期のヘルトヴィッヒ上皮鞘を構成する細胞は、アモロブラスチンを強く発現していることが明らかとなったが、これらの細胞において RAE-1 の発現は認められなかった。

一方、歯髄細胞を用いた検索において、歯髄細胞は RAE-1 を強く発現していることを明らかとした。

本来エナメル質や象牙質で被覆されている歯髄が、細菌感染などによる外来刺激を直接受けた際には、骨芽細胞と同様に RAE-1 の発現を誘導し、生体防御あるいは組織の崩壊に関与している可能性を示唆しているのかもしれない。

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 2 件)

①Tsuruda, K., Shimazu, A., Sugai, M.: "Detection of a single bacterial cell using a 16S ribosomal RNA-specific oligonucleotide probe designed to investigate periodontal pathogens" Oral Microbiol. Immunol. 24. 133-140 (2009) (査読あり)

②NK レセプターリガンドによる IgA 産生増強: 島津 篤, 鶴田圭伊子: 臨床免疫・アレルギー科 49(1):22-27, 2008. (査読なし)

[学会発表] (計 9 件)

①エナメル芽細胞の増殖および分化に対するアモロブラスチンの生理活性: 廣瀬尚人, 島津 篤, 谷本幸太郎, 丹根由起, 國松亮, 尾崎徳継, 吉見友希, 内田 隆, 丹根一夫: 第70回日本矯正歯科学術大会・第4回国際会議 (名古屋), 2011.10.16~20

②マウス歯根形成期におけるアモロブラスチンの役割: 廣瀬尚人, 島津 篤, 渡邊峰朗, 伊藤剛志, 村崎恭子, 高橋拓史, 谷本幸太郎, 内田 隆, 丹根一夫: 第69回日本矯正歯科学会大会 (横浜), 2010. 9.27

③喫煙者における唾液中のストレス指標物質クロモグラニン A の定量: 久保皓太郎, 松本厚枝, 仁井谷善恵, 竹本俊伸, 島津 篤, 鶴田佳伊子, 天野秀昭, 第 20 回 日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方会総会 (広島), 2009. 6.21

④骨芽細胞における retinoic acid early inducible gene-1 の発現について: 島津 篤, 河原和子, 内田 隆: 第50回歯科基礎医学学会 (東京), 2008. 9.23~25

⑤骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞における retinoic acid early inducible gene-I の発現: 島津 篤, 河原和子: 第57回日本口腔衛生学会・総会 (さいたま), 2008. 10.4

⑥硬組織形成過程におけるレチノイン酸誘導タンパク質 retinoic acid early inducible

gene-1 (RAE-1)の機能解析：島津 篤：第1
回口腔からQOL向上を目指す連携研究 研
究集会（広島），2008.

なし （ ）

研究者番号：

⑦ヒト歯周組織におけるストレス応答性タン
パク質MICAの発現：河原和子，島津 篤：
第57回日本口腔衛生学会・総会（さいたま），
2008. 10.2～4

⑧歯周組織におけるストレス誘導タンパク質
MICA遺伝子発現と調節因子：河原和子，島
津 篤，加治屋幹人，柴 秀樹，河口浩之：
第50回歯科基礎医学会（東京），2008. 9.23
～25

⑨ヒト歯根膜細胞におけるMHC class
I-related chain A (MICA)の発現：河原和子，
島津 篤，加治屋幹人，永原隆吉，藤田 剛，
柴 秀樹：第51回春季日本歯周病学会学術大
会（さいたま），2008. 4.25～26

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島津 篤 (SHIMAZU ATSUSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教

研究者番号：10274094

(2) 研究分担者

藤本 勝巳 (FUJIMOTO KATSUMI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教

研究者番号：40294566

(3) 連携研究者