

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09981

研究課題名(和文) 歯肉溝滲出液(GCF)成分を用いた新たな歯周病検査法の探索

研究課題名(英文) Study on new periodontal status test using GCF contents.

研究代表者

沼部 幸博 (Numabe, Yukihiro)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：90198557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病の炎症部位に集積する末梢血好中球は、細菌の貪食を担いながら歯肉溝滲出液(GCF)に含有され、口腔内に至る。本研究では、GCFに含まれる好中球に発現する好中球細胞外トラップ(neutrophil extracellular traps: NETs)の状態から歯周組織の病態を感知する検査方法の可能性を検索した。その結果、末梢血内とは異なり、歯周組織では歯周病原細菌のLPSなどが好中球に作用し、好中球が細菌を捕獲するためにNETsを発現させており、そのGCF中好中球を採取、分離後、NETs発現レベルを解析することで局所の歯周組織の状態を類推できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、歯周組織検査では炎症を客観的に把握する手法が不足しており、歯周病を的確に探知し治療計画立案に繋げるためには、歯周組織の情報を別の角度から入手する必要がある。

本研究では、歯周組織内の好中球細胞外トラップ(NETs)の解析により歯周病原性細菌の侵襲などを感知することを可能とする基礎的データを提供しており、これまでと異なるアプローチで歯周病の病態診断法を提案することができた。これは新たな歯周組織検査の可能性を提示しており、本邦の歯周病の罹患率から、より精度の高い歯周病の診断システムが求められている現状を鑑みると、今後の歯周治療に大きく貢献するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The peripheral blood neutrophils to accumulate in the inflammatory sites of periodontal tissues are move into gingival crevicular fluid (GCF) in oral cavity while developing a phagocytic function for periodontopathic bacterias. In this study, we investigated the possibility of the laboratory procedure to detect the condition of periodontal tissues using the state of the neutrophil extracellular traps (NETs) which developed in neutrophils included in GCF.

As a result, unlike the peripheral blood neutrophils, the LPS of periodontopathic bacterias influence neutrophils in periodontal tissues and express NETs to capture periodontopathic bacterias. Thus, it is suggested that analyzing the status of NETs in GCF can be detected the periodontal health conditions at local areas.

研究分野：歯周病学

キーワード：好中球 歯周病 歯肉溝滲出液 好中球細胞外トラップ (NETs) 歯周組織検査 歯周病原細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Brinkmann ら (2004) により、好中球の新たな機能として好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps、以下 NETs) が報告された<sup>1)</sup>(図 1)。NETs は自然免疫の一環として、好中球から DNA、ヒストン、好中球エラスターゼ (以下 NE) などの細胞内抗菌タンパクを含む網目状構造物を能動的に放出し、細菌捕獲を行う機能である。歯周病の炎症部位に集積する末梢血好中球は、細菌の貪食を担いながら歯肉溝滲出液(GCF)に含まれ、口腔内に至る。この好中球は末梢血内のものとは異なり、歯周組織では歯周病原細菌の LPS などが好中球に作用することで好中球が細菌を捕獲するために NETs を発現させていることが一部報告されているが<sup>2)</sup>、その詳細は未だ不明である。

### 2. 研究の目的

しかしこのことから、GCF 中好中球を採取、分離後、NETs 発現レベルを解析することで局所の歯周組織の状態を類推できる可能性が考えられた。そこで本研究では、GCF に含まれる好中球に発現する NETs の状態から歯周組織の病態を探知する検査方法の可能性を検索する基礎的な情報を収集するために、まず歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* のビルレンス因子である lipopolysaccharide (以下 LPS) 刺激により好中球に NETs 発現を惹起するかを検索、次に *P. gingivalis* 由来 LPS の受容体でもある好中球の Toll Like Receptor (TLR) 2 および 4 の NETs 発現における役割について検討した。次に GCF から PMN を分離して NETs の発現状態を評価し、歯周組織の状態と好中球の NETs 発現との関連を検索し、歯周病検査試料としての性能について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 被験者の選択

被験者として、インフォームドコンセントを得ており、全身的な疾患および特記すべき既往歴がなく、過去 3 か月薬物投与を受けた経験のない健康人ボランティアを男性 10 名選択し、同意を得た。また、本研究は日本歯科大学生命歯学部倫理審査委員会の承認(承認番号 NDU-T2021-67)のもと行われた。

#### (2) 末梢血好中球の分離

被験者の前腕の皮静脈より、末梢血 10 ml をヘパリン加チューブを用いて採取した。サンプルチューブに血球分離溶液 Polymorphprep と採取血液を入れて遠心分離し、PMN を含むパフイーコートを取り出した。それを別のサンプルチューブに移し、リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、RPMI 1640 を用いて  $1.0 \times 10^6$  個/ml となるように調整した。PMN であることの確認は、メイギムザ染色を用い、白血球細胞中に分葉核が観察できること、細胞質中に顆粒が観察されることをもって高純度 (>95%) であることを確認した。また Trypan blue 染色によって、高生存率 (>95%) であることを確認した。

#### (3) 好中球に対する各刺激

ウェルプレートにて好中球に対し以下の物質で、37℃、0~4 時間刺激し、NETs 発現を誘導した。無刺激 (コントロール) phorbol 12-myristate 13-acetate (以下 PMA) *P. gingivalis* 由来 LPS (以下 PG-LPS) *Escherichia coli* 由来 LPS (以下 EC-LPS)

#### (4) PG-LPS による好中球の TLR2 および TLR4 の解析

Zhang ら (2021) の方法<sup>3)</sup>により、 $1.0 \times 10^6$  個/ml に調整した末梢血 PMN を anti-TLR2 または anti-TLR4 抗体を 37℃ で 1 時間インキュベートした。その後ネガティブコントロール (RPMI)、ポジティブコントロール PMA 50 nM、PG-LPS 100 µg/ml、EC-LPS 100 µg/ml を 4 時間、37℃、5% CO<sub>2</sub> 環境下でインキュベートした。放出された NET-DNA に関しては、定量化を行った。

#### (5) レーザー共焦点顕微鏡による観察

NETs 主要構造である DNA、ヒストン、好中球エラスターゼの形態学的解析を目的に蛍光免疫染色を行なった。

Poly-L-lysine (Sigma) でコーティングした 12 mm スライドガラス (MATSUNAMI, Osaka, Japan) を入れた 24 well プレートに  $1.0 \times 10^6$  個/ml に調整した末梢血 PMN を各 Well 200 µl 入れ、30 分間プレインキュベーションした。ネガティブコントロールとして RPMI 1640、ポジティブコントロールとして PMA 0-75 nM、PG-LPS 1-100 µg/ml、EC-LPS 1-100 µg/ml、で刺激し、0-4 時間、37℃、5% CO<sub>2</sub> 環境下でインキュベートした。また、NETs の確認を、DNA 分解物質である deoxyribonuclease (DNase) (100U/ml) を用いて行なった。16% Paraformaldehyde 溶液を加えて最終濃度を 4% にし、室温で 15 分間固定した。0.5% Triton X-100 による処理後、一次抗体として Anti-DNA/Histone H1 Antibody および Anti-Neutrophil Elastase Rabbit pAb を作用した。またアイソタイプコントロールとして、マウス IgG2a アイ

ソタイプコントロール マウスミエローマ由来および IgG ウサギ血清由来を使用した。その後、二次抗体 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, DyLight™ 488 および Goat anti-Rabbit IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 633 により染色を行なった。さらに Hoechst 3334 により DNA を染色し、ProLong™ Gold を用いて封入した。

撮影・観察にはレーザー走査型共焦点顕微鏡および LSM ソフトウェアを用いた。

また、撮影した画像から ImageJ を用いて、NETs を発現している面積の割合を測定した。

#### (6) NETs quantification assay による細胞外 DNA 量の測定

Palmer ら (2012) の方法<sup>4)</sup>で NETs の発現状態を評価した。1.0×10<sup>6</sup> 個/ml に調整した末梢血好中球を 96 well プレートに 100 μl 入れ、30 分間プレインキュベーションした後、RPMI、PMA または各 LPS で 4 時間刺激した。micrococcal nuclease を各ウェルにピペティングし、10 分間のインキュベーション後、Sytox Green 核酸蛍光染色を添加した。Fluorescence intensity (蛍光強度)の測定は、蛍光プレートリーダーを用いて 3 回に分けて行った。

#### (7) ELISA による NE 量の測定

Neutrophil Elastase Activity Assay Kit を使用し、添付文書に従って行なった。1.0×10<sup>6</sup> 個/ml に調整した末梢血好中球を 96 well プレートに 100 μl 入れ、30 分間プレインキュベーションした後、RPMI、PMA または各 LPS で 4 時間刺激した。培養上清 10 μl を使用した。Fluorescence intensity (蛍光強度) (AFU) の測定は、蛍光プレートリーダー (Corona Electric) を用い、3 回に分けて行った。

#### (8) GCF 好中球における NETs 発現の検討

沼部らの方法 (1992) に従い<sup>5)</sup>、PD 3mm 以下で BOP がない健康な上顎前歯部を対象に蠕動ポンプで 0.1%ゼラチンを加えた Hank's Balanced Salt Solution Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free を 2.8ml/min の速度で近心側から流入し、遠心側から吸引、採取した。採取当初の 10 ml は廃棄し、その後採取量が 200 ml になるまで採取した。採取後、その溶液を 400×g で 10 分間、室温で遠心分離し、細胞沈渣を HBSS 洗浄後、1.0×10<sup>6</sup>個/ml となるように調整した。前述のように PMA 及び PG-LPS で 4 時間刺激後、蛍光免疫染色および NETs quantification assay を行い、NETs 発現を末梢血 PMN と比較した。

#### (9) 統計解析

統計学的分析は、Kruskal-Wallis の検定を用いて統計解析を行った。なお、解析ソフトは SPSS version 25 を使用し、有意水準 5 %未満 ( $p < 0.05$ ) を統計的に有意差ありとした。

## 4. 研究成果

### (1) 被験者の情報

被験者として、過去 3 か月間抗菌薬の服用が無く全身的に健康で、日本歯科大学生命歯学部勤務する男性教員 10 名 (平均年齢 27.8 ± 1.5 歳, 平均ポケット深さ 2.58 mm, BOP 21%) の協力を得た。同意は本研究の趣旨を十分に説明した後に文書により得た。GCF 採取前に、その部位には歯周病の徴候であるポケットと BOP がないことを確認した。

### (2) 各刺激群の NETs 発現について

各刺激後の好中球における NETs の発現状況を、蛍光免疫染色、細胞外 DNA 量、NE 量を用いて評価した。同一濃度の刺激物質で異なる刺激時間 (0-4 時間) で処理した時の蛍光免疫染色像は、2 時間までは各群で変化は見られなかったが、3 時間から各刺激群で NETs の構造である、DNA、ヒストン、NE の細胞膜からの飛び出しや、NETs 発現の前兆である細胞の膨化が見られ始め、4 時間ではそれが顕著に見られた。また、異なる刺激物質の濃度で刺激した時の蛍光免疫染色像では、4 時間刺激後、PMA 群は 10nM 以上の濃度から NETs 発現が確認され、濃度が高くなるに従い、その構造物が多くなるような所見が得られた。PG-LPS 群、ECLPS 群では、100 μg/ml の濃度で NET 発現が確認できた。細胞外 DNA 量は、50、75nM PMA 群、100 μg/ml PG-LPS 群、100 μg/ml EC-LPS 群において、コントロールと比較して統計学的有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。NE 量は、50、75nM PMA 群、100 μg/ml PG-LPS 群、100 μg/ml EC-LPS 群において、コントロールと比較して統計学的有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

### (3) TLR ブロッキング後の各刺激による NETs 発現について

LPS の受容体でもある好中球の Toll Like Receptor (TLR) をブロッキングし、各刺激後の好中球の NETs 発現を蛍光免疫染色、細胞外 DNA 量、NE 量を用いて評価した。蛍光免疫染色像では anti-TLR2 および 4 を作用させた後、PG-LPS で刺激した場合、NETs が抑制され、anti-TLR4 を作用させた後、EC-LPS で刺激した場合においても NETs が抑制された。Neutrophil Elastase Activity Assay Kit (ELISA) の結果から、TLR のブロッキングが確認された。細胞外 DNA 量は、anti-TLR2 および 4 を作用させた後、PG-LPS で刺激した場合、anti-TLR を作用させなかった群と比較して、統計学的有意差が認められ ( $p < 0.05$ )、anti-TLR4 を作用させた後、EC-LPS で刺激した場合、anti-TLR を作用させなかった群と比較して、統計学的有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。PMA 刺激に関しては、anti-TLR による統計学的有意差は認められなかった。NE 量は、anti-TLR2 および 4 を作用させた後、PG-LPS で刺激した場合、anti-TLR を作用させなかった群と比較して、統計学的有意差が認められた ( $p < 0.05$ )、EC-LPS、PMA 刺激に関しては anti-TLR による統計学的有意差が認められなかった。

#### (4) GCF PMN の NETs 発現について

今回用いた採取方法により得られた歯肉溝滲出液から採取した PMN(GCF-PMN) は、好中球以外の細胞の混入がほとんどないことを確認した(図1)。また GCF-PMN の細胞生存率は高い値を示した。GCF-PMN を各刺激物質で刺激した場合の蛍光免疫染色を(図2,3)に示す。無刺激の場合でも、一部の PMN に NETs 発現が確認された。また、PMA および PG-LPS で刺激した場合も NETs の高い発現が確認された。細胞外 DNA は各刺激において、末梢血 PMN と比較して GCF-PMN で有意に高くなった ( $p < 0.05$ )。

#### (5) 考察と結論

本研究の結果から、好中球を PMA、PG-LPS、EC-LPS で刺激した結果、時間および濃度依存的に NETs 発現が誘導された。そして PG-LPS は TLR2 および 4 を介して NETs を発現し、EC-LPS は TLR4 を介して NETs 発現していることが示された。

また、歯肉溝滲出液中から採取・分離した好中球(GCF-PMN)に関する検索から、健康歯肉であっても、GCF-PMN に NETs の発現が観察されたことから、PMN は歯周組織内で NETs 発現に対する各種刺激を受ける環境にあること、また発現に対する感受性も高まっていることが推測された。これらのことから、健康な歯周組織でも GCF 中の好中球(GCF-PMN)は NETs を発現、または発現しやすい状況にあることから、末梢血内のものとは異なり細菌の侵入に速やかに対応する自然免疫発動への一翼を担っていることが示唆された。

これらの結果は、健康な歯周組織と病的な歯周組織を NETs の発現状態を Key として把握する有用性に関して基礎的な情報を提供するもので、歯肉溝滲出液(GCF)からの好中球を歯周病診断に応用する新たな検査方法への道筋が示されたものと考えられる。

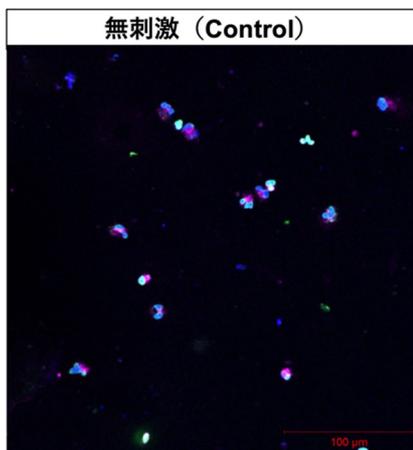


図1 GCF好中球(GCF-PMN)

DNA: blue, Histone: green, Neutrophil Elastase: red 倍率400倍

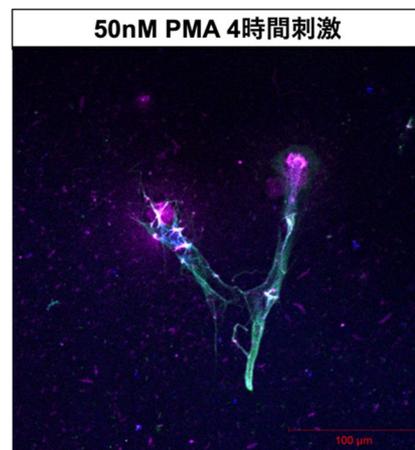


図2 GCF好中球(GCF-PMN)における PMA刺激によるNETs発現

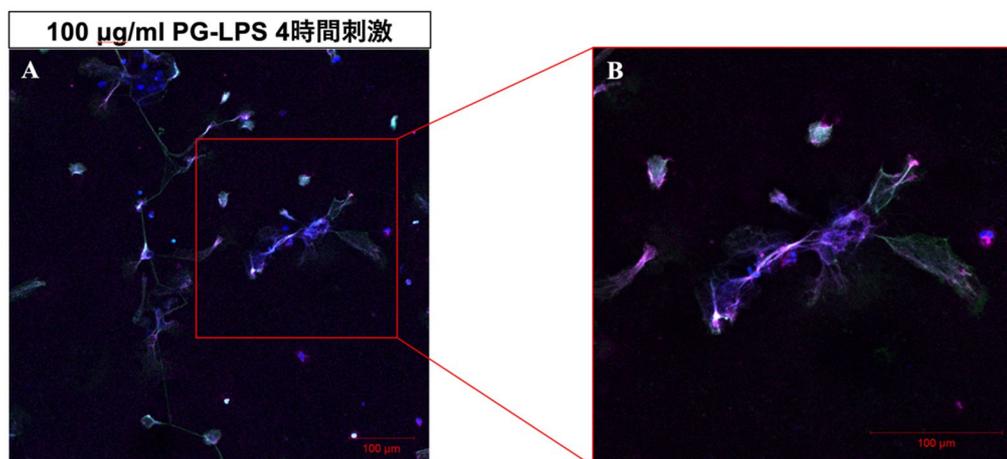


図3 GCF好中球でのLPS刺激によるNETs発現

DNA: blue, Histone: green, Neutrophil Elastase: red  
A: 倍率200倍, B: 倍率400倍

## 引用文献

- Brinkmann V et al, Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, 2004, 303 卷, 2004, 1532-1535
- Vitkov L et al, Extracellular neutrophil traps in periodontitis, *J Periodontal Res*, 44 卷, 2009, 664-672
- Zhang K et al, *Trypanosoma brucei* Lipophosphoglycan Induces the Formation of Neutrophil Extracellular Traps and Reactive Oxygen Species Burst via Toll-Like Receptor 2, Toll-Like Receptor 4, and c-Jun N-Terminal Kinase Activation, *Front Microbiol*, 12, 2021, 713531(eCollection)
- Palmer LJ et al, Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans, *Clin Exp Immunol*, 167 卷, 2012, 261-268
- 沼部 幸博, 清信 浩一, 鴨井 久一, 末梢血, 歯肉溝滲出液および唾液よりの多形核白血球(PMN)の分離法について, *歯学*, 79 卷, 1992, 1578-1587

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tominari Tsukasa, Akita Miyuki, Matsumoto Chiho, Hirata Michiko, Yoshinouchi Shosei, Tanaka Yuki, Karouji Kento, Itoh Yoshifumi, Maruyama Takayuki, Miyaura Chisato, Numabe Yukihiro, Inada Masaki	4. 巻 298
2. 論文標題 Endosomal TLR3 signaling in stromal osteoblasts induces prostaglandin E2-mediated inflammatory periodontal bone resorption	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101603 ~ 101603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101603	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 -

1. 著者名 Miyashita Yukihiro, Kuraji Ryutarō, Ito Hiroshi, Numabe Yukihiro	4. 巻 57
2. 論文標題 Wound healing in periodontal disease induces macrophage polarization characterized by different arginine metabolizing enzymes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 357 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12965	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 -

1. 著者名 Kato Tomotaka, Fujiwara Natsuki, Ogawa Tomohisa, Numabe Yukihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Risk factors for tooth loss with a mean follow-up period of 13.9 years in supportive periodontal therapy patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	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) 10.1186/s12903-021-01573-5	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 -

1. 著者名 Hiroshi Ito, Yukihiro Numabe, Shuichi Hashimoto, Sunao Uehara, Ya-Hsin Wu, Tomohisa Ogawa	4. 巻 25
2. 論文標題 Usefulness of hemoglobin examination in gingival crevicular fluid during supportive periodontal therapy to diagnose the pre-symptomatic state in periodontal disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Oral Investig .	6. 最初と最後の頁 487-495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-020-03396-0.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒寄智央, 伊藤 弘, 沼部幸博
2. 発表標題 歯周病原細菌により誘発される好中球細胞外トラップ (NETs) 発現に関する研究
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沼部幸博
2. 発表標題 好中球との対話
3. 学会等名 日本歯科大学大学院セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒寄智央, 伊藤弘, 沼部幸博, 小川智久
2. 発表標題 SPT期における臨床パラメータとGCFヘモグロビン量の推移
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤仁志, 伊藤弘, 沼部幸博, 小川智久, 上原直
2. 発表標題 GCFヘモグロビン測定とBOP検査との関連について
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

## 〔図書〕 計4件

1. 著者名 沼部 幸博, 齋藤 淳, 梅田 誠, 山本 松男, 岩田 隆紀	4. 発行年 2023年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 293
3. 書名 ザ・ペリオドントロジー (第4版)	

1. 著者名 沼部 幸博, 貴島 佐和子, 土屋 和子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 128
3. 書名 デンタルハイジーン別冊傑作選 歯周病を治すSRP	

1. 著者名 沼部 幸博, 齋藤 淳, 梅田 誠, 石黒 一美, 関野 愉, 村樫 悦子, 田中 昭男	4. 発行年 2021年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 256
3. 書名 歯科衛生士講座 歯周病学 第5版	

1. 著者名 沼部 幸博	4. 発行年 2020年
2. 出版社 学建書院	5. 総ページ数 159
3. 書名 歯周病学サイドリーダー	

## 〔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	伊藤 弘  (Ito Hiroshi)  (30184683)	日本歯科大学・生命歯学部・准教授     (32667)	

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