

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890257

研究課題名（和文） 歯周病の病態形成における酸化 LDL の関与の解析

研究課題名（英文） Involvement of OxLDL to inflammatory reaction in periodontitis

研究代表者

鈴木 一成 (SUZUKI KAZUSHIGE)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70551290

研究成果の概要（和文）：

近年、脂質異常症と歯周病とが関連することが報告されている。本研究では、GCF(歯肉溝滲出液：歯肉溝より排出される組織液)中の酸化 LDL（変性悪玉コレステロール）値と炎症性サイトカインの測定を行った。GCF 中の酸化 LDL 量と IL-8、IL-1 β 量には正の相関が認められることを明らかにした。歯肉上皮細胞において酸化 LDL は IL-8、PGE₂ 産生を上昇させることを見出した。酸化 LDL が IL-8 産生を誘導し炎症反応に寄与し歯周病の病態形成で役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recent epidemiological studies have shown a correlation between periodontitis and hyperlipidemia. The levels of OxLDL (oxidized low-density lipoproteins) and inflammatory cytokines in human GCF (gingival crevicular fluid) were measured by ELISA and cytometric bead array, respectively. The level of OxLDL is positively correlated with IL-8 and IL-1 β levels in GCF. OxLDL increased IL-8 and PGE₂ (prostaglandin E₂) production in gingival epithelial cells. OxLDL enhanced IL-8 production in gingival epithelial cells, which may contribute to the inflammatory reaction in periodontitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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

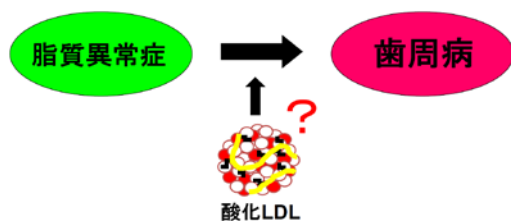
キーワード：歯周病、脂質代謝異常、酸化 LDL、歯肉上皮細胞、歯肉溝滲出液

1. 研究開始当初の背景

近年、全身疾患と歯周病の関連性が着目され、脂質異常症に関しても、幾つかの疫学的調査の報告がされている。

脂質異常症は、血液中の LDL : low density lipoprotein が 140mg 以上、中性脂肪が 150mg 以上、HDL : high density lipoprotein が 40mg 未満と定義され、これまで高脂血症と呼ばれた疾患である。LDL は全身にコレステロール

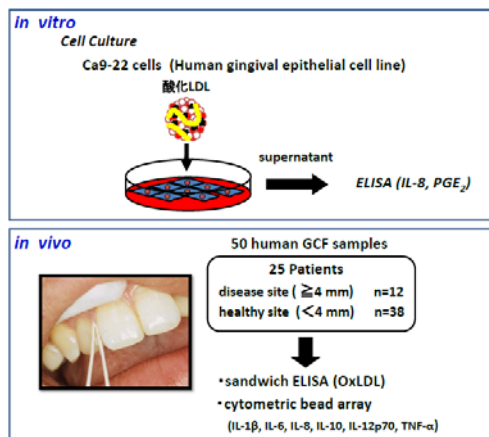
を運搬するリポタンパクであり、悪玉コレステロールと呼ばれている。現在、本邦において潜在患者まで含めると 3200 万人存在するといわれている。ほとんど自覚症状がないため、そのまま放置していることが少なくない。歯周病患者の血中 LDL 値、中性脂肪値が有意に高値を示し (Losche W *et al. J Clin Periodontol* 2000;27:537-541)、総コレステロールもまた有意に高い値が示されている (Katz J *et al. J Peridont Res* 2002;73:494-500)。このような報告より両疾患には相関があることが示唆されている。また、歯周治療によって血中の酸化 LDL 値が減少するという報告 (Montebugnoli L *et al. J Clin Periodontol* 2005;32:188-192) から酸化 LDL と歯周病との関連性が示唆できるが、酸化 LDL が歯周組織において影響を及ぼしているかについてはほぼ不明である。そこで酸化 LDL が歯周組織及び歯周病の病態形成で役割を果たしているかを解明する。



2. 研究の目的

本研究は、*in vitro*、*in vivo*の双方から歯周組織および歯周病の病態形成における酸化 LDL の関わりを検討することを目的としている。

3. 研究の方法



上記図のように歯肉上皮細胞を用いた *in vitro* 解析系と患者の歯肉溝滲出(GCF)サンプルを用いた *in vivo* 解析系にて分析、評価を行う。

(1) *in vitro*

- ①歯肉上皮細胞株 Ca9-22 を用いて酸化 LDL による IL-8 産生のシグナル経路を解析する。
- ②酸化 LDL 中に存在する各種酸化変性物質にて細胞を刺激し、酸化 LDL による歯肉上皮細胞における IL-8 産生機構の解明を行う。

(2) *in vivo*

昭和大学歯科病院歯周病科に通院中の患者 25 名より 2 部位からペーパーポイントにて GCF を採取し、酸化 LDL 値を sandwich ELISA にて、炎症性サイトカイン

(IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α) を cytometric bead array にて測定を行う。

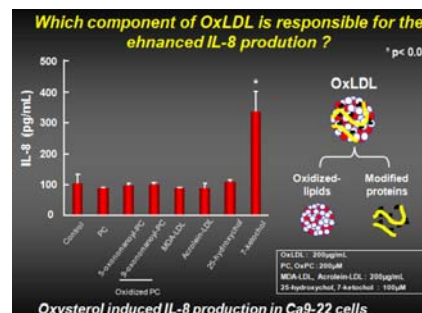
4. 研究成果

(1) *in vitro*

申請者はヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 において酸化 LDL は IL-8 産生を有意に上昇させることを見出している。本研究でその IL-8 産生誘導は MAPK(Mitogen activated proteins kinases)シグナルを介しているかどうかを検討した。p38 阻害剤(SB203580, SB20219)と ERK 阻害剤 (PD98059) にて IL-8 産生が抑制され、酸化 LDL 添加により、ERK のリン酸化がタンパク質発現にて上昇していることが確認できた。このことから酸化 LDL による IL-8 産生は MAPK シグナルの ERK を介している可能性が示唆された。

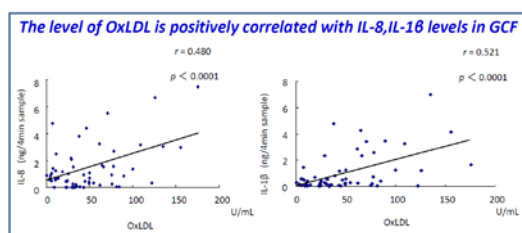
次に歯周炎進行における重要な骨吸収のファクターである Prostaglandin E₂(PGE₂)について検討した。酸化 LDL 添加においては PGE₂ 産生に変化は認められなかった。しかし炎症下を想定して IL-1 β をともに添加した際は PGE₂ 産生が有意に上昇した。このことから酸化 LDL は炎症下において PGE₂ 産生を相乗的に上昇させている可能性が示唆された。

LDL は酸化変性を受けると様々な脂質過酸化反応産物と複雑なタンパク修飾を含む不均一な粒子となる。そこで次にどの成分が IL-8 産生を上昇させているかを検討した。変性 LDL、酸化 phosphatidylcholine (PC) では IL-8 産生は上昇せず酸化コレステロールの 1 つである 7-ketocholesterol 添加において IL-8 産生が誘導された。この結果から歯肉上皮細胞における IL-8 産生誘導は、酸化 LDL 中の 7-ketocholesterol が重要である可能性が示唆された。



(2) *in vivo*

実際の患者サンプルである歯肉溝滲出液 (GCF) を用いた *in vivo* 解析系において、酸化 LDL と炎症性サイトカインとの関連性を検討した。昭和大学歯科病院歯周病科に通院中の患者 50 名より 2 部位からペーパーポイントにて GCF を採取した。その後 GCF 中の酸化 LDL と炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α) を測定した。4mm 以上の深い歯周ポケットから採取した GCF は、3mm 以下の部位から採取した GCF よりも IL-1 β 、IL-8、酸化 LDL 値が有意に高かった。また GCF 中の酸化 LDL 値と IL-1 β 、IL-8 は相関関係を示した。



本研究結果より、酸化 LDL が歯周病の病態形成において役割を果たし、酸化 LDL は、歯肉上皮細胞から IL-8 産生を誘導することで歯周疾患に関与している可能性が示唆された。近年疫学的に脂質異常症と歯周病の関連性が報告されているがメカニズムについての報告はほとんどなかったのが現状であるため、変性脂質のひとつである酸化 LDL の歯周組織への影響が解析されたことは極めて意義深いものと考えられる。

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 2 件)

① Suzuki K, Sakiyama Y, Usui M, Obama T, Kato R, Itabe H, Yamamoto M
Oxidized low-density lipoproteins increases IL-8 production in human gingival epithelial cell line Ca9-22. *Journal of Periodontal Research* 45(4):488-495,2010

② Sakiyama Y, Kato R, Inoue S, Suzuki K, Itabe H, Yamamoto M
Detection of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Gingival Crevicular Fluid from the Dental Patients. *Journal of Periodontal Research* 45(2):216-222,2010

[学会発表] (計 5 件)

① Suzuki K, Sakiyama Y, Nagahama Y, Usui M, Yamamoto M

Oxidized LDL enhances IL-8 production in gingival epithelial cell.

The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology (Oct 30-Nov 2, 2010) Honolulu, HI

② Kato R, Sakiyama Y, Inoue S, Suzuki K, Yamamoto M, Masunari T, Itabe H

LDL and oxidized LDL were secreted in human gingival crevicular fluids

第 42 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2010 年 7 月 15、16 日) 岐阜

③ 板部洋之、加藤里奈、崎山悠介、井上紳、鈴木一成、益成利幸、山本松男

酸化 LDL がヒト歯肉溝滲出液中に検出された
第 63 回 日本酸化ストレス学会 (2010 年 6 月 24、25 日) 神奈川

④ Suzuki K, Obama T, Sakiyama Y, Usui M, Kato R, Yamamoto M, Itabe H

OXIDIZED LOW-DENSITY LIPOPROTEINS ENHANCE IL-8 PRODUCTION IN HUMAN GINGIVAL EPITHELIAL CELL LINE Ca9-22

4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009) (May 25-28, 2009) Tokyo, Japan

⑤ Suzuki K, Sakiyama Y, Obama T, Usui M, Kato R, Itabe H, Yamamoto M,

Relevance of oxidized low-density lipoproteins (OxLDLs) in human gingival crevicular fluid: OxLDL-induced production of IL-8 in epithelial cell line Ca9-22

The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences BIOACTIVE LIPID MOLECULES AND TRANSPORTERS (May 25-26, 2009) Tokyo, Japan

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 一成 (SUZUKI KAZUSHIGE)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70551290