

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592225

研究課題名（和文） 歯原性上皮細胞の感染防御メカニズム解明に関する研究

研究課題名（英文） Study of the defense mechanism against infection of dental epithelial cell

研究代表者

石畑 清秀 (ISHIHATA KIYOHIDE)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：10437957

研究成果の概要（和文）：歯根嚢胞は、Malassez上皮遺残の増殖に由来する歯性感染症の一つであるが、その発症機序に関しては未だ、不明な点が多い。本研究では、根尖部病巣における、抗菌作用を解明することを目的として、根尖病巣ならびに歯原性上皮細胞株における抗菌ペプチドとE-cadherinの発現について解析・検討した。その結果、歯原性上皮細胞は細菌感染刺激に対して、抗菌ペプチドを分泌しつつ、細胞間結合を強固にする傾向を認め、歯根嚢胞は、感染防御の重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Radicular cyst is one of the periapical lesion, their formation is associated with the proliferation of epithelial cell rests of Malassez. However, little is currently known about the precise mechanisms of formation and enlargement of radicular cysts. The purpose of this study is to examine the levels of antimicrobial activities of periapical lesions, therefore, we evaluate the levels of antimicrobial peptide (AMP) and E-cadherin in periapical lesion and dental epithelial cell lines. These observations suggest that dental epithelial cells can secrete AMPs and consolidate epithelial intercellular junctions when stimulated by bacterial infection, and radicular cysts may play an important role in defense mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯原性上皮細胞, 抗菌ペプチド, 口腔外科, 感染, 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

歯原性上皮細胞とは歯胚の外胚葉成分から発生した細胞成分である。歯胚の形態や細胞の分化は、歯の形成過程において、外胚葉性組織（上皮）と外胚葉性間葉の両者の複雑

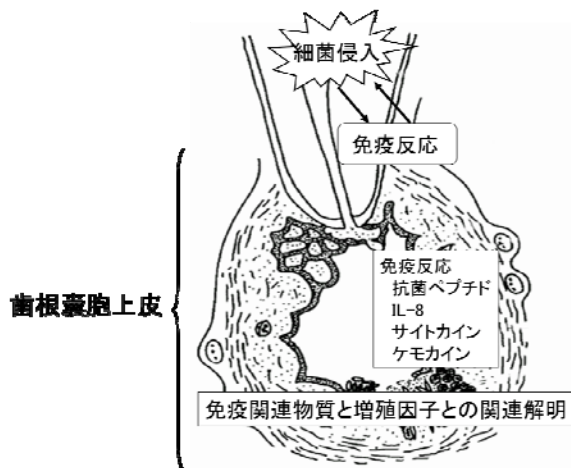
な誘導的相互作用によって制御されている。歯原性上皮細胞のなかに、歯根形成残遺歯原性上皮と呼ばれるものがある。この残遺上皮は、本来、アポトーシス抑制ならびに増殖抑制があり、死滅もしなければ増殖もしない細

胞組織である。

しかし、この残遺歯原性上皮の増殖に起因する疾患がある。炎症性刺激による上皮増殖が起こる歯根嚢胞、PTCH 遺伝子、Gli-1, 2 の関与が指摘されている角化嚢胞性歯原性腫瘍、Shh, Wnt, FGF などが増殖に関与するエナメル上皮腫などは残遺歯原性上皮細胞に由来する疾患と考えられているが、これらの疾患を示す上皮細胞の病態は未だ明らかになっていない。

歯根嚢胞は歯原性上皮（残存上皮）が増殖する疾患の中で比較的発症頻度の高い疾患である。その発生は歯原性残存上皮であるマラッセ残存上皮の増殖に由来すると考えられているが、その発症機序、増殖機構に関しては未だ不明な点が多い。また、根管治療を施しても治療困難な程増大した歯根嚢胞に関しては歯根端切除術あるいは抜歯が余儀なくされ、歯牙の予後に大きな影響を与えている。

近年、根尖性病変発症には炎症性反応物質（マクロファージ、多核白血球、サイトカイン、ケモカイン）の関与とともに、抗菌ペプチドの関連も示唆されている（下図）。抗菌ペプチドとは広範囲な抗菌活性を有する 20～40 個程度のアミノ酸からなる短いペプチドで、自然免疫の一翼としての役割を有している。このことから、歯根嚢胞上皮の増殖には自己防衛反応としての免疫反応が機能しており、細菌感染に対する歯根嚢胞上皮の増殖は感染の波及を止めようとする自己防衛的な反応であると仮説することができる。



2. 研究の目的

本研究は、歯科領域において、発症頻度の高い歯根嚢胞を対象とし、本来疾患として扱われている歯根嚢胞上皮を感染に対する防御機構の一つという概念に置き換えた。本研究から歯原性上皮の形成機構を解明できれば、歯根嚢胞が増悪して抜歯を余儀なくされていた症例に対しても、新しい治療の選択を付与できる可能性があり、学問的に重要な意

味を持つとともに社会に大きな利益をもたらすことが期待できると考えた。そこで、歯根嚢胞上皮における免疫関連物質の発現を確認し、それらの発現と嚢胞上皮形成の関連を検討し、歯原性上皮細胞の細菌感染防御メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)臨床サンプルにおける抗菌ペプチドと E-カドヘリンの発現解析。

病理組織学的に診断された歯根嚢胞(10例)と歯根肉芽腫(10例)について、抗菌ペプチド(α-ディフェンシン, LL37, β-ディフェンシン-1, -2), および E-カドヘリンに対するモノクローナル抗体(anti-human neutrophil defensin (HNP: α-defensin) (D21, HBT Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands); anti-human LL37/CAP18 (1-1C12, HBT Hycult Biotechnology); anti-beta defensin-1 (HBD-1) (M11-14b-D10, Abcam Biochemicals, Cambridge, UK); anti-beta defensin-2 (HBD-2) (C17, Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, USA); anti-E-cadherin (36, BD Biosciences, Bedford, MA, USA)を用いて免疫組織化学的に局在を観察した。200倍検鏡下において、免疫染色陽性細胞が10%未満をスコア0とし、11-25%をスコア1、26-50%をスコア2、51%以上をスコア3と判定した。歯根嚢胞と歯根肉芽腫における抗菌ペプチドならびに E-カドヘリンの免疫染色スコアの比較は Mann-Whitney U 検定を用いた。

(2)細菌感染刺激時の歯原性上皮細胞における抗菌ペプチドと E-カドヘリンの発現解析。

細胞株は、ラット由来歯原性上皮細胞株(HAT7)を用いた。細菌感染刺激として、大腸菌由来リポポリサッカライド(LPS) (50, 100, 200ng/ml), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (1×10^8 , 2×10^8 CFU/ml)ならびに *Fusobacterium nucleatum* (1×10^8 , 2×10^8 CFU/ml)を使用した。培地内に上記細菌刺激を添加し、1, 2, 4, 6, 12, 24時間後に細胞を回収し、Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen Life Technology)を用いて RNA 精製を行った。内部標準には GAPDH を用いて、リアルタイム定量 PCR 法にて遺伝子の発現解析を行った。

(3)LPS ならびに LL37 添加時の細胞増殖ならびに E-カドヘリン発現解析。

抗菌ペプチド(LL37)ならびに LPS 添加時の細胞増殖様式の解析には、MTT アッセイを用いた。96-well plate を用いて、1wellあたり 1×10^5 細胞を 1ml 培地中に播き、通常培地、LPS 添加培地(50, 100, 200ng/ml), LL37 添加培地(50, 100, 200ng/ml)にて培養を行い、1, 2, 4, 6日目に、吸光度 590nm で microplate reader

(Bio-Rad)を用いて活性細胞の解析を行った。また、E-カドヘリンのタンパクレベルでの変化を解析するために、LPS添加培地(50, 100, 200ng/ml), LL37添加培地(50, 100, 200ng/ml)にて培養を行い、48時間後に細胞免疫染色(anti-E-cadherin antibody (BD Biosciences))ならびにWestern blotを行った。

4. 研究成果

(1) 歯根肉芽腫, 歯根嚢胞における抗菌ペプチド, E-カドヘリンの発現

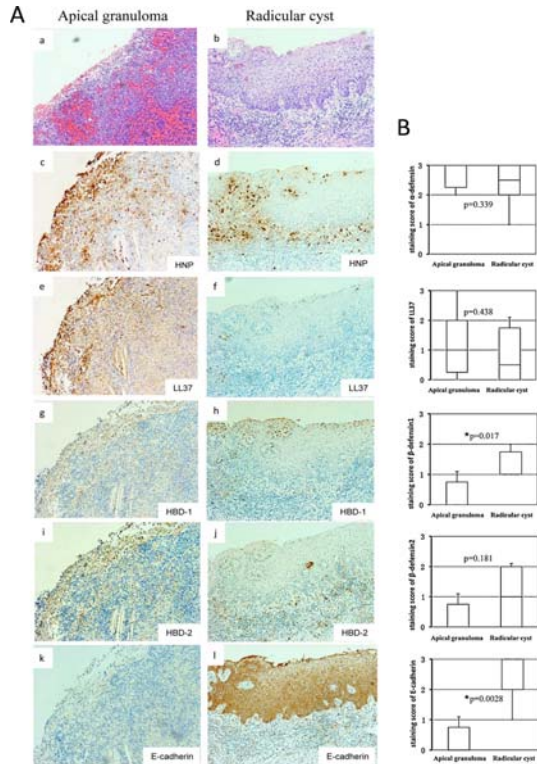


図1. 歯根肉芽腫(Apical granuloma)ならびに歯根嚢胞(Radicular cyst)における抗菌ペプチド(α -ディフェンシン:HNP, LL37, β -ディフェンシン1,2:HBD-1,2)とE-カドヘリンの免疫染色結果

α -ディフェンシンとLL37は、好中球などの間葉系細胞の細胞質に確認され、歯根肉芽腫と歯根嚢胞の比較では、 α -ディフェンシンとLL37は、歯根肉芽腫に多く認められる傾向があった。また、 β -ディフェンシン1, 2は、歯根嚢胞の上皮細胞内や上皮化組織内に確認されたものの、歯根肉芽腫の結合組織内には、ほとんど確認されなかった。さらに、E-カドヘリンは歯根嚢胞上皮細胞の細胞膜に顕著に認められた。免疫組織学的解析から、根尖病巣急性期には、抗菌ペプチドのうち、主に好中球から分泌される α -ディフェンシンとLL37が分泌され、炎症性細胞が減少し、炎症慢性期に移行するに従って、分泌される抗菌ペプチドは β -ディフェンシンへ変化しつつ、

上皮化傾向が増強することが示唆された。

(2) 歯原性上皮細胞の細菌感染環境下における抗菌ペプチドならびにE-カドヘリンの遺伝子レベルでの発現変化。

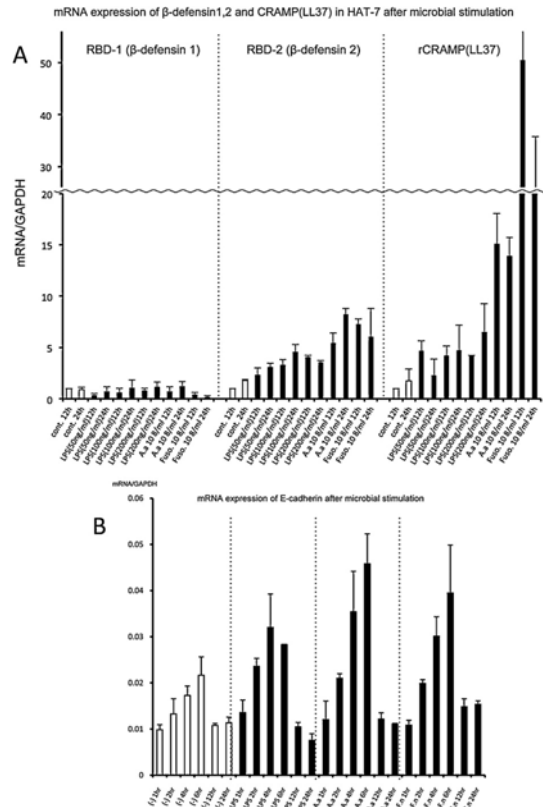


図2. 細菌感染刺激後のHAT7における抗菌ペプチド(β -ディフェンシン1, 2, LL37)ならびにE-カドヘリンのmRNA発現。

HAT7に対する細菌感染刺激で、 β -ディフェンシン1のmRNA発現量に変化は認めなかったが、LPS, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*の刺激によって、 β -ディフェンシン2のmRNAの中等度の発現増強を認めた。LL37に関しては、*A. actinomycetemcomitans*ならびに*F. nucleatum*の刺激によって、顕著な発現増強が確認された。さらに、E-カドヘリンのmRNAの発現は、LPS, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*のいずれの刺激環境下においても4, 6時間後に発現の最大値を認め、その後、12時間後移行では、徐々に減少する傾向にあった。

(3) 歯原性上皮細胞のLPSならびにLL37添加時のE-カドヘリンのタンパクレベルでの発現変化。

E-カドヘリンは、通常状態でもHAT7の細胞膜に存在しているが、LPSならびにLL37の刺激後48時間後には、いずれの濃度においても、

タンパクレベルで発現が増強していることが細胞免疫染色とWestern blotで確認された。

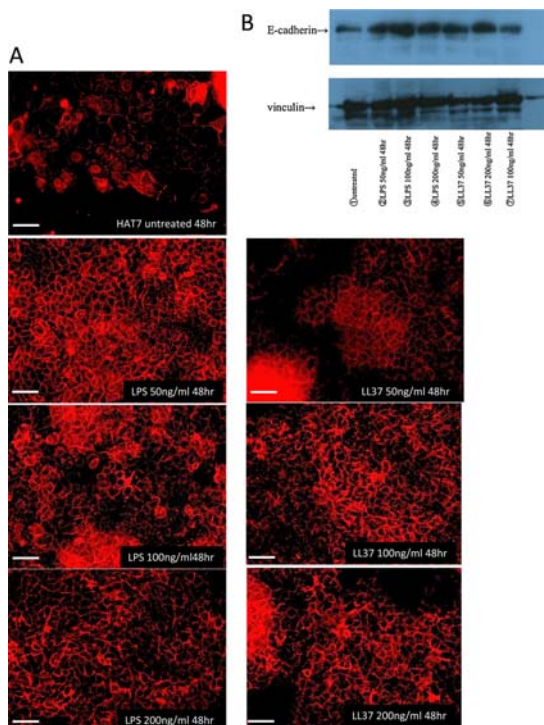


図3. HAT7のLPS, LL37刺激後のE-カドヘリンの細胞免疫染色ならびにWestern blot解析結果

培養細胞実験結果から、歯原性上皮細胞は細菌感染刺激によって、 β -ディフェンシン2ならびにLL37を分泌し、化学的抗菌作用を有しながら、E-カドヘリンの発現を増強させ、細胞間結合を強固にし、物理的抗菌作用を発揮することが示唆された。

(4)歯原性上皮細胞のLPSならびにLL37添加時の細胞増殖様式。

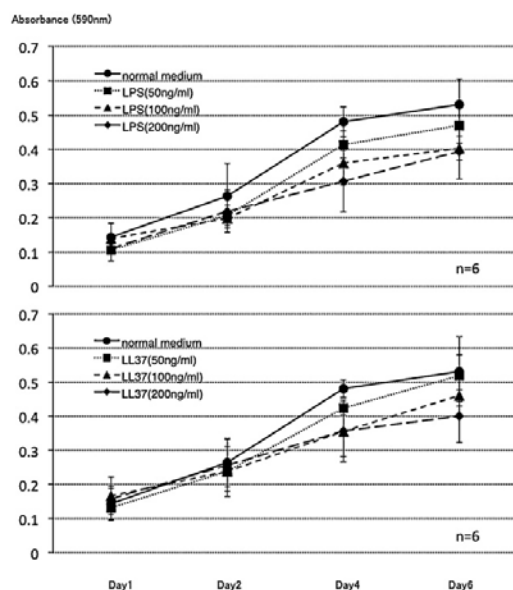


図4. LPS(50, 100, 200ng/ml), LL37 (50, 100, 200ng/ml) 添加培養後のMTTアッセイ結果

歯原性上皮細胞は、抗菌ペプチドあるいはLPSの刺激によって細胞増殖は促進されず、歯根嚢胞形成時における上皮増殖と抗菌ペプチドならびに細菌感染刺激との関連性は見出せなかった。根尖病巣形成時の上皮形成機構に関しては、さらなる検証が必要と考えられた。

本研究から、根尖病巣における急性期では主に好中球が主体となり、 α -ディフェンシンとLL37を分泌して、抗菌作用を発揮し、慢性期に移行するにつれて歯原性上皮細胞から β -ディフェンシンが分泌され、E-カドヘリンの発現を増強し、抗菌作用を発揮することが示唆された。さらに、歯根嚢胞は、エナメル質崩壊後に感染波及を予防する二次バリアとしての機能を有する可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Kiyohide Ishihata, Kenichi Kume, Hiroshi Hijioka, Toshiro Kibe, Shoko Tanaka, Hitoshi Komatsuzawa, Hidemitsu Harada, Norifumi Nakamura. Expression of antimicrobial peptides and E-cadherin in periapical lesions. Oral Science International (2013) in press. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

国際学会

- ① [oral presentation] Kiyohide Ishihata, Yuuma Yoshida, Kenichi Kume, Akihiko Miyawaki, Hitoshi Komatsuzawa, Hidemitsu Harada, Norifumi Nakamura. Analysis of expression of anti-microbial peptides and E-cadherin in radicular cysts and established dental epithelial cells. The second international joint symposium on oral and dental sciences, 2012. 3.1-3 (Yogyakarta, Indonesia)

国内学会

- ② [ポスター発表] 石畑清秀, 吉田裕真, 久米健一, 小松澤均, 原田英光, 宮脇昭彦, 中村典史. 歯根嚢胞および歯原性上皮株における抗菌ペプチドならびにE-カドヘリンの発現解析. 第66回日本口腔科学学会総会, 2012. 5. 17-18 (広島)

〔その他〕

ホームページ

http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/Omfs2/r_ishihata.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石畑 清秀 (ISHIHATA KIYOHIDE)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
助教
研究者番号：10437957

(2) 研究分担者

中村 典史 (NAKAMURA NORIFUMI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
教授
研究者番号：60217875

小松澤 均 (KOMATSUZAWA HITOSHI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：90253088