

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390478

研究課題名(和文) 歯周組織の破壊と再生におけるインフラマソーム分子基盤解析と治療への応用

研究課題名(英文) Molecular analysis of inflammasome in periodontal tissue destruction and regeneration.

研究代表者

山田 聡 (YAMADA, SATORU)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40359849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周組織の恒常性維持、歯周病の発症から組織再生までの過程におけるインフラマソームの関与を明らかにするために、歯周組織構成細胞およびマウス歯周組織におけるインフラマソームの発現分布を解析し、歯根膜関連の細胞外基質分子群とインフラマソームとの相互作用を分子レベルで解析した。その結果、歯周組織において恒常状態でのインフラマソームの発現が確認され、炎症を惹起することで同発現が上昇することが明らかとなった。さらに、歯根膜関連の細胞外基質分子は、TLR、ROS、NLRP3等との相互作用により歯周組織での恒常性維持や炎症制御に関わっている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated expression pattern of inflammasome in periodontal tissue and cells to assess the involvement of inflammasome in periodontal tissue homeostasis, destruction and regeneration. It was shown that inflammasome-associated molecules are expressed in periodontal tissues and cells in normal conditions and these expressions are up-regulated in inflammatory conditions. Periodontal ligament associated extracellular matrix (PDL-ECM) proteins show the interaction with inflammasome, suggesting the regulation of tissue-homeostasis and inflammatory responses by PDL-ECM-inflammasome pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周組織 インフラマソーム ECM分子

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、歯周組織の恒常性維持に重要なだけでなく歯周病によって破壊された歯周組織の修復・再生に必須の役割を果たしている。そのため、歯根膜の持つ細胞分化、組織修復や再生機能を分子・遺伝子レベルで理解することは次世代の歯周治療を創出する上で重要な知見を与えるものと考えられる。申請者らはこれまでに、歯根膜の機能を支える分子基盤を解明することを目的として、歯根膜の組織恒常性維持や歯周組織再生に重要な役割を果たしている分子を多数同定してきた。すなわち、新規の歯根膜特異的分子 PLAP-1 は、BMP-2 や TGF- β のアンタゴニストとして歯根膜細胞の石灰化を抑制することで歯周組織の恒常性を維持していること、Periostin の歯根膜特異的アイソフォームが歯根膜細胞分化を促進し歯周組織の再生を亢進すること（新規アイソフォームとして登録：GenBank accession AY918092）さらに、メカニカルストレスを与えた細胞モデルから DNA チップ解析により見出されたグルタミン酸関連分子群が、歯根膜細胞の石灰化を促進することで歯周組織再生を誘導することを明らかにしている。興味深いことに、歯根膜の機能に密接に関連している分子として我々がこれまでに同定・解析してきたものは、全て分泌型の細胞外基質（ECM）および ECM 関連分子であり、様々な ECM によって歯根膜の組織恒常性や再生機能が制御されていることを強く示唆している。

一方、歯周病はもとより、肥満、糖尿病、動脈硬化症などの生活習慣病、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患、組織の修復・再生過程など様々な疾患や生命反応の基盤病態として慢性炎症が注目されている。歯周病においては、歯周病原性細菌由来成分（外来性病因因子）や、咬合性外傷・喫煙などの各種ストレスによって損傷を受けた歯周組織構成細胞から自己由来成分（内因性病因因子）が放出され、それらを感知する病原体センサーが働くことにより慢性炎症が誘導される。最近、この外来性および内因性病因因子の病原体センサーとして機能するタンパク複合体が多数同定され、インフラマソームと命名された。インフラマソームは、感染のない正常状態でも ECM と絶えず相互作用し平衡状態を保っていると考えられており、組織の恒常性維持がインフラマソームを介した微弱な炎症反応により保たれていることが明らかとなっている。加えて、インフラマソームの機能不全に陥った宿主は病原体の感染に対して易感受性になる一方で、インフラマソーム活性化は過剰な炎症反応を惹起し組織の障害を引き起こすと考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、歯周組織の恒常性維持、歯周

病の発症から組織再生までの過程におけるインフラマソームの関与を明らかにし、歯周組織の破壊と再生のメカニズムをより理解するため、歯根膜の組織恒常性を担っている歯根膜関連の細胞外基質分子群（PDL-ECM）とインフラマソームとの相互作用を分子レベルで解明する。さらに、インフラマソーム制御を目的とした新規の分子標的バイオ歯周病治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織構成細胞におけるインフラマソーム複合体の発現解析

培養ヒト歯周組織構成細胞（歯根膜細胞、歯肉線維芽細胞、歯肉上皮細胞、歯槽骨由来骨芽細胞）、マウス歯根膜細胞、マウス歯肉線維芽細胞、マウス骨芽細胞におけるインフラマソーム複合体、TLR（Toll-like receptor）、自然免疫パターン認識受容体の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析した。

(2) マウス歯周組織におけるインフラマソーム複合体の発現解析

歯周組織におけるインフラマソーム複合体の発現を検討するため、マウス（C57/B6）から上顎組織を採取し、歯および歯周組織を含む凍結薄切片を作製した。そして、インフラマソーム複合体を認識する特異抗体を用いた免疫組織化学染色法により、タンパク発現を解析した。

(3) *in vitro* 歯周炎モデルおよび歯周組織再生モデルにおける解析

歯根膜細胞を TLR アゴニストあるいは各種炎症性サイトカインで刺激することにより *in vitro* 歯周炎モデルを構築した。同モデルにおけるインフラマソーム複合体の発現動態を Real-time PCR 法にて解析した。さらに、歯根膜細胞を石灰化誘導培地（10%FCS、10mM β -glycerophosphate、50ug/ml ascorbic acid 含有 α -MEM 培地）にて長期培養することにより、硬組織形成細胞への分化を誘導する *in vitro* 歯周組織再生モデルを構築した。同モデルにおけるインフラマソーム複合体の発現動態を Real-time PCR 法にて解析した。

(4) *in vivo* 歯周炎モデルにおける解析

野生型マウスの上顎大臼歯に、絹糸を結紮し、2週間留置することで実験的歯周炎を惹起させた。絹糸を除去後、経日的に μ CT 撮影を行い、画像分析による歯槽骨吸収の定量解析を行った。絹糸結紮後、経日的に標本作製、各歯周炎病態におけるインフラマソームの発現を免疫組織学的に解析した。

(5) 歯根膜関連分子とインフラマソームとの相互機能解析

歯根膜において特徴的に高い発現が認められる Ferritin、歯根膜特異的 Periostin ア

イソフォーム、歯根膜特異的分子 PLAP-1 のヒトにおける遺伝子型 (D13-PLAP-1、D14-PLAP1) について、歯根膜に発現されているサイトカインや TLR との関連性に焦点を当てて解析した。

4. 研究成果

(1) 歯周組織構成細胞におけるインフラマソーム複合体の発現解析

歯根膜細胞、歯槽骨由来骨芽細胞、歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞、歯髓細胞においてインフラマソームの発現が検出された。さらに、ヒトおよびマウス歯根膜細胞における TLR の発現を解析したところ、TLR1-9 が発現していることが明らかとなった。

(2) マウス歯周組織におけるインフラマソーム複合体の発現解析

マウス上顎歯周組織におけるインフラマソーム、ASC および CASP1 の発現を免疫組織学染色法により解析したところ、歯肉および歯根膜に高発現していることが明らかとなった。

(3) *in vitro* 歯周炎モデルおよび歯周組織再生モデルにおける解析

歯根膜細胞を TLR3 アンタゴニストである Poly(I:C) で刺激すると、インフラマソーム複合体の一つである NLRP3、P2X7、CASP1 の遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった。さらに、歯根膜細胞を石灰化誘導培地にて細胞分化誘導すると、細胞分化に伴って NLRP3、P2X7、CASP1 の遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった。

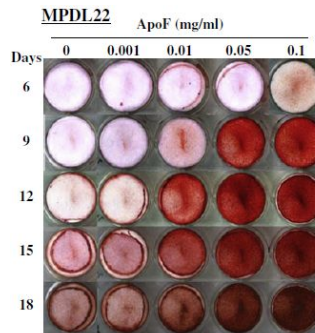
(4) *in vivo* 歯周炎モデルにおける解析

絹糸誘導性の実験的歯周炎モデルにおいて、絹糸結紮 4 日目から歯槽骨吸収が認められ、6 日目で吸収は最大となった。さらに、結紮後 10 日目では、僅かであるが歯槽骨の添加が認められた。それぞれの歯周炎ステージにおけるインフラマソームの発現を免疫組織学的に解析したところ、歯周炎の進行とともに歯周組織における ASC および CASP1 の発現が誘導され、絹糸結紮 10 日目で最大の発現を示すことが明らかとなった。

(5) 歯根膜関連分子とインフラマソームとの相互機能解析

Ferritin の歯根膜細胞分化における機能を解析したところ、Ferritin は歯根膜細胞の分化機能を促進することが明らかとなった。Ferritin は、ROS (reactive oxygen species) の代謝を介してインフラマソームによる自然炎症を制御している可能性が示唆された。

図 1 Ferritin による歯根膜細胞分化促進

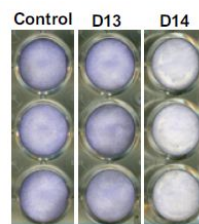


さらに、歯根膜特異的 Periostin アイソフォームである PDL-POSTN は、integrin 分子と会合することで歯根膜細胞機能を制御することが明らかとなった。integrin シグナルの下流には NLRP3 インフラマソームが存在し、活性化されることから、歯根膜において PDL-POSTN による NLRP3 制御機構が働いている可能性が示唆された。

PLAP-1 と TLR2/4 との相互作用について解析した結果、PLAP-1 は、TLR2/4 を介した炎症反応を制御することが明らかとなった。一方、ヒト PLAP-1 遺伝子多型である D13-PLAP-1 および D14-PLAP-1 の BMP-2 サイトカインに対するアンタゴニスト機能を比較検討したところ、D13 型 PLAP-1 と D14 型 PLAP-1 では、BMP-2 抑制作用に差があることが明らかとなった。このことから、PLAP-1 遺伝子型の違いによって、炎症制御機能にも差がある可能性が考えられた。

以上のように歯根膜関連の ECM 分子をターゲットとした創薬により、インフラマソームを介した炎症を制御できる可能性が示唆された。

図 2 D14-PLAP-1 による BMP-2 誘導性歯根膜細胞分化の抑制



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 4 件)

S. Yamada, T. Tauchi, T. Awata, K. Maeda, T. Kajikawa, M. Yanagita, S. Murakami. Characterization of a novel periodontal ligament specific periostin isoform. Journal of Dental Research. 2014 (in press).

T. Kajikawa, S. Yamada, T. Tauchi, T. Awata, S. Yamaba, C. Fujihara, S. Murakami. Inhibitory effects of PLAP-1/aspurin on periodontal ligament cells. *Journal of Dental Research*. 93(4):400-405, 2014. DOI: 10.1177/0022034513520549

J. Hou, S. Yamada, T. Kajikawa, N. Ozaki, T. Awata, C. Fujihara, S. Murakami.: Iron plays a key role in the cytodifferentiation of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*. (in press), 2013. DOI:10.1111/jre.12103

J. Hou, S. Yamada, T. Kajikawa, N. Ozaki, T. Awata, S. Yamaba, S. Murakami. Role of ferritin in the cytodifferentiation of periodontal ligament cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5; 426(4): 643-648. 2012.<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.008>

〔学会発表〕(計3件)

山田 聡、網羅的遺伝子解析が担う歯周病研究の未来、第135回日本歯科保存学会、招待講演、2011年10月21日、大阪市

山田 聡、歯周組織の恒常性維持と破綻の分子メカニズム、第67回日本口腔科学会、招待講演、2013年5月23日、宇都宮市

S. Yamada, Molecular basis of periodontal ligament: Identification and characterization of periodontal ligament specific molecule, PLAP-1. International scientific meeting at University Gadjah Mada, 2014年2月28日、ジョグジャカルタ、インドネシア

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 聡 (YAMADA SATORU)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：40359849

(2)研究分担者

村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号・70239490

北村 正博 (KITAMURA MASAHIRO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号・10243247

柳田 学 (YANAGITA MANABU)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号・80379081

齋藤 正寛 (SAITO MASAHIRO)
東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号・40215562

(2)連携研究者

山本 照子 (YAMAMOTO TERUKO)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号・00127250

森崎 隆幸 (MORISAKI TAKAYUKI)
国立循環器病研究センター・分子生物学部・部長
研究者番号・30174410