

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592866

研究課題名(和文) 歯根膜細胞が産生する単球走化性因子MCP-1の歯科補綴学における臨床的意義

研究課題名(英文) Prosthetic importance of monocyte chemoattractant protein-1 produced by the cells of the periodontal ligament

研究代表者

岡本 和彦 (OKAMOTO, KAZUHIKO)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：50271234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍壊死因子(TNF-)は、炎症性の骨吸収誘導因子の一つである。骨吸収局所に多くの単球系細胞が集積していることが示されているが、この集積作用の詳細は、明らかになっていない。歯根膜細胞は、骨芽細胞様の性質を持っていることから、骨芽細胞を用いた実験系で、TNF-による単球走化性因子(MCP-1)の発現を検討した。その結果、TNF-は、骨芽細胞のMCP-1発現を強く誘導することが明らかとなった。また、その誘導作用は、遺伝子レベルで制御されており、TNF-は、骨芽細胞のMCP-1遺伝子発現にあたり転写因子AP-1を介して誘導されていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The inflammatory cytokine TNF- is a potent osteotropic cytokine. Although monocytes are often observed near areas undergoing bone resorption in the periodontal ligament tissue, the mechanism of monocyte recruitment is unknown. We considered that monocyte chemoattractant MCP-1 is contributed in the monocyte recruitment. It has been showed that the periodontal ligament cells have phenotypes typical of osteoblasts, and then, we examined the effect of TNF- on expression of MCP-1 by using the osteoblastic cells. Moreover, it has been suggested a functional role of transcriptional factor AP-1 in MCP-1 gene expression induced by TNF-. TNF--induced MCP-1 gene expression is suppressed by pretreatment of SP600125, a potent inhibitor for JNK. Thus, TNF- has the ability to stimulate AP-1-mediated expression of MCP-1 after activation of JNK in osteoblastic cells.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：MCP-1 TNF- 骨芽細胞様細胞

1. 研究開始当初の背景

歯は、歯槽骨に直接結合しているのではなく、歯根膜組織を介して結合している。歯根膜は、歯と歯槽骨を結合させるだけでなく、歯に加わる力を吸収・分散させ、過剰な力による歯の破折を防ぐ働きを有している。従って、正常な咬合を保持・増進するために、歯根膜組織は、必要不可欠な存在である。

クラウン・ブリッジなどの補綴装置の装着は、支台歯における支台装置と対合歯の間に、新たな咬合接触状態を付与する。異常な咬合接触状態は、支台歯と対合歯の歯根膜組織の恒常性を失わせ、病的な状態に陥らせることが広く知られている。特に、補綴装置の咬合接触が過度である時は、過剰な力が発生し、歯根膜組織とその周辺の組織に、痛みを伴う急性症状後、歯槽骨の吸収を誘導するような強い慢性炎症が惹起され、臨床的に、「外傷性咬合」と呼ばれる病態を作り出し、大きな問題となることもある。しかし、その炎症病巣形成機構については、不明な点が多く、その点について検討することは、歯科補綴学的に意義あると考えられる。

炎症病巣に、大量の IL-1 や TNF- α の炎症サイトカインが存在し、また、その炎症性サイトカインの産生細胞である単球・マクロファージ系の細胞が、大量に浸潤し、集積していることが示されている。また、単球・マクロファージ系の細胞の浸潤・集積は、その局所で産生される走化性因子が、重要であることが報告されている。昨今、単球特異的走化性因子として明らかにされた Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) は、様々な慢性炎症性疾患の成立に密接に関係し、慢性関節リウマチ、肺線維症、慢性腎炎、ならびに歯周炎などの病態形成に強く関係することが知られている。従って、補綴装置の咬合接触が過度であるために、過剰な力が発生し、歯根膜組織とその周辺の組織に、強い慢性炎症病態が形成されるときにおいても、この MCP-1 が機能的な役割を演じている可能性が強く考えられる。

近年、歯根膜組織より out growth した歯根膜線維芽細胞を用いて、in vitro での様々な検討が行われた。本線維芽細胞は、コラーゲンなどのマトリックスたんぱく質を産生し、歯に加わる力を吸収・分散させることに積極的に関与するものと考えられている。また、本細胞の詳細な検討の結果、本線維芽細胞は、骨芽細胞の特性を有しているユニークな細胞集団であることが報告されている。さらに本細胞が、咬合圧に対し

て、積極的に反応することが、in vitro での培養細胞に、直接、様々なメカニカルストレスを与えることにより明らかにされている。すなわち、本細胞に種々のメカニカルストレスを与えると、プロスタグランジン等の起炎物質を産生し、さらに、IL-6 や OPG などの骨吸収に関与するサイトカインを誘導することが示されている。従って、in vitro で培養された歯根膜線維芽細胞を用いた実験系は、補綴装置の咬合接触が過度であるために、過剰な力が発生し、歯根膜組織とその周辺の組織に、痛みを伴う強い慢性炎症病態が形成される病態の解析を行うのに有用であると考えられる。そこで、この歯根膜線維芽細胞が単球特異的走化性因子 MCP-1 を、どのような機構で産生するかについて検討することは、意義あることと考えた。

2. 研究の目的

支台歯周囲における歯周組織の炎症は、クラウン・ブリッジあるいは部分床義歯の予後を左右する重要な問題である。従って、支台歯周囲における炎症反応を分子生物学的レベルで分析することは、歯科補綴学上重要である。

腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) は、制がん作用とともに、多くの生物活性を有し、特に歯周炎などの炎症性骨吸収疾患に重要な役割を担うサイトカインである。また、TNF- α は、骨芽細胞の単球走化性因子 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) の発現を上昇させ、炎症性細胞を集積させる可能性のあることが報告されている。

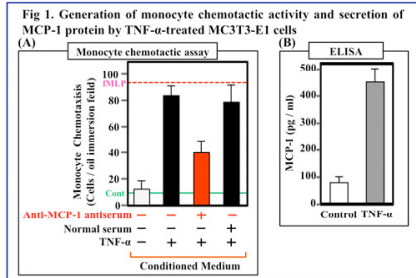
しかし、MCP-1 の発現機構については不明な点が多い。歯根膜細胞は、形質が安定している cell line 化された骨芽細胞様を用いて検討を行った。

3. 研究の方法

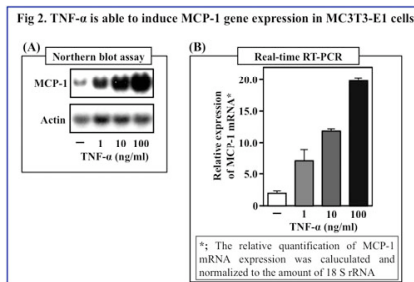
細胞には、マウスの骨芽細胞 (MC3T3-E1 cells) を、炎症性サイトカインには、リコンビナントタイプの TNF- α を用いた。単球走化性活性の測定には、48 穴マルチウェルチャンバーを、MCP-1 の定量には、ELISA 法を用いた。Northern blot assay では、MCP-1 cDNA を用いたハイブリダイゼーションを行った。Real time PCR では、TaqMan プローブを用いて、MCP-1 遺伝子発現を定量した。MAP kinase inhibitor として、SB203580 (p38 inhibitor)、PD98059 (MEK1 inhibitor) および SP600125

(JNK inhibitor) を使用した。さらに、転写因子である AP-1 と NFκ-B の各 inhibitor として Curcumin と PDTC を使用した。Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) には、AP-1 の consensus 配列 (TGACTCA) を有した合成プローブを用いた。

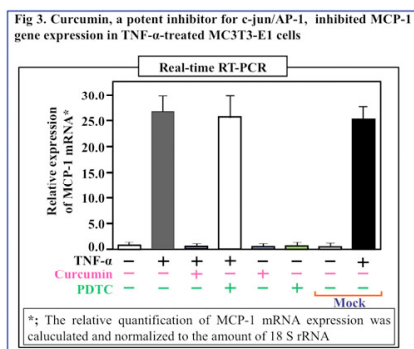
4. 研究成果



(1) TNF-α (100 ng/ml) 処理したMC3T3-E1 細胞の培養上清中の単球走化性活性は、抗 MCP-1血清によって強く阻害された (Fig 1-A). また、ELISA 法の結果から、コントロールの細胞培養上清中のMCP-1 蛋白質が、約 80 pg/ml で、TNF-α 処理群では、約 450 pg/ml であった (Fig 1-B).



(2) Northern blot assay の結果から、TNF-α を作用させた細胞において、強い MCP-1 遺伝子発現が確認できた (Fig 2-A). Real time PCR法を用いた結果は、TNF-α が誘導する MCP-1 mRNA の発現量の増加率は約 9 倍であった (Fig 2-B).



(3) TNF-α 誘導性 MCP-1遺伝子発現は、Curcuminで強く抑制されたが、PDTCで影響されなかった (Fig 3).

Fig 4. Role of JNK in TNF-α-induced MCP-1 gene expression in MC3T3-E1 cells

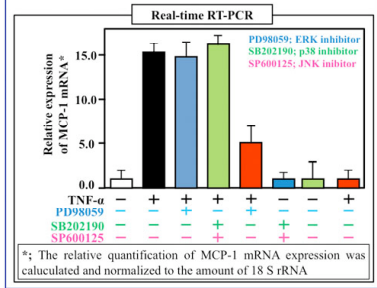
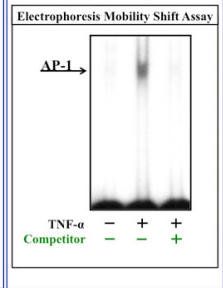


Fig 5. TRE-binding of AP-1 in TNF-α-treated MC3T3-E1 cells



(4) Fig 4に示すようにMCP-1遺伝子発現は、SP600125によって強く抑制されたが、SB203580とPD98059は抑制作用を示さなかった。EMSAの結果は、TNF-αが本細胞のAP-1のDNA結合活性を強く誘導することを示した (Fig 5).

これらのことから、TNF-αは、骨芽細胞 (MC3T3-E1 cells) の単球走化性因子 MCP-1 の発現を上昇させ、その発現上昇を mRNA レベルで確認することができた。また、本細胞のMCP-1遺伝子発現に転写因子 AP-1が強く関与していることが明らかとなった。

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 岡本和彦, 飯塚知明, 猪野照夫, 岩瀬直樹, 佐藤雅介, 藤澤政紀: ジルコニアに対するセルフアドヒーズシプレジンセメントの剪断接着強さ, 日補綴会誌 3, 32-39, 2011.
- ② Okutsu F, Akimoto T, Kurihara M, Matsui A, Okamoto K, Terada N and Ohkawa S: Construction of a Practical system Using the Sieve method and Image Analysis for Evaluation of Masticatory Performance. -Development of a new Device for Scanning Masticatory Samples-. J Meikai Dent Med 43(1), 11-17, 2013.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 竹下 玲, 末續真弓, 広瀬公治, 高野安紀子, 岡本和彦, 福浦えり子, 上田知恵, 下島孝裕, 藤澤政紀, 荒木久生, 安井利一: 単球前駆細胞様 M1 細胞のアポトーシスに関する Porphyromonas gingivalis 線毛の阻害作用における beta2-integrin・CD11/CD18 の重要性の解析. 第 60 回日本口腔衛生学会・総会 (松江市), 2011 年 10 月.
- ② 竹下 玲, 広瀬 公治, 高野安紀子, 岡本和彦, 松本 勝, 柴田 えり子, 流石 知佳, 上田 知恵, 仲筋 宣子, 下島 孝裕, 大川

周治, 安井利一: Porphyromonas gingivalis 線毛による単球様 M1 細胞のアポトーシスの阻害作用に関する情報伝達機構の検討. 第 61 回日本口腔衛生学会・総会 (横須賀市). 2012 年 5 月.

③ 竹下 玲, 広瀬公治, 高野安紀子, 岡本和彦, 松本 勝, 柴田えり子, 流石知佳, 上田知恵, 仲筋宣子, 下島孝裕, 大川周治, 安井利一: Porphyromonas gingivalis 線毛による単球様 M1 細胞のアポトーシスの阻害作用に関する tyrosine kinase の役割. 第 62 回日本口腔衛生学会・総会 (松本市). 2013 年 5 月.

④ 岡本和彦, 竹下 玲, 曾根峰世, 栗原美詠, 下川原 忍, 藤澤政紀, 安井利一, 大川周治: 骨芽細胞における TNF- α による単球走化性因子 MCP-1 の発現誘導作用について. 平成 26 年度 (社) 日本補綴歯科学会第 123 回学術大会 (仙台). 2014 年 5 月.

⑤ 竹下 玲, 広瀬公治, 岡本和彦, 高野安紀子, 末續真弓, 松本 勝, 清水良昭, 柴田えり子, 下島孝裕, 大川周治, 安井利一: 骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞における TNF- α による単球走化性因子 MCP-1 の発現誘導作用について. 第 63 回日本口腔衛生学会・総会 (熊本市). 2014 年 5 月.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(1)

岡本 和彦 (OKAMOTO Kazuhiko)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号: 50271234

(2) 研究分担者

(4)

竹下 玲 (TAKESHITA Akira)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号: 70236454,

高野 安紀子 (TAKANO Akiko)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号: 20337504,

藤澤 政紀 (FUJISAWA Masanori)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号: 00209040,

安井 利一 (YASUI Toshikazu)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号: 20146252

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号: