

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593057

研究課題名(和文) 歯周組織の炎症慢性化に及ぼすダメージ関連分子パターンとリゾリン脂質の相互作用

研究課題名(英文) Interaction between S1P and DAMPs in periodontal inflammation

研究代表者

柳田 学 (Yanagita, Manabu)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80379081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：炎症時に血小板より放出されるスフィンゴシン-1リン酸(S1P)が歯肉上皮細胞の炎症反応に及ぼす影響について検討した。歯肉上皮細胞にはS1P受容体S1P1、S1P2、S1P3が発現しており、歯肉上皮細胞はS1P刺激によりIL-8産生をS1P濃度依存的に亢進した。S1P刺激による歯肉上皮細胞からのIL-8産生は、HMGB-1、Poly(I:C)存在下で協調的に増大した。S1PによるIL-8産生誘導は、S1P2、S1P3ノックダウン株では抑制された。以上のことから、S1Pは歯肉上皮細胞に対して炎症を惹起することが明らかとなった。また、S1P受容体をターゲットとして炎症を制御する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study we have investigated the effects of S1P, bioactive lipid mediator, on inflammatory responses of gingival epithelial cells. S1P receptors, S1P2 and S1P3, are expressed in gingival epithelial cells. S1P increased to produce IL-8 from gingival epithelial cells in a dose-dependent manner. S1P-induced IL-8 production upregulated synergistically in the presence of HMGB-1 or Poly(I:C). S1P-induced IL-8 induction was suppressed in S1P2/S1P3 knockdown gingival epithelial cells. These findings suggest that S1P induce inflammation in gingival epithelial cells via S1P2/S1P3.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：歯周病 リゾリン脂質 ダメージ関連分子パターン

1. 研究開始当初の背景

死細胞が様々な生理活性を示す内因性分子群であるダメージ関連分子パターン (DAMPs) を放出して、周囲細胞や組織に影響を及ぼすことが明らかとなってきた。本研究では、歯周組織における炎症の慢性化を誘導する分子機構を明らかにするために、すでに知られている感染病原微生物特有の病原体関連パターン (PAMPs) や炎症時に血小板より産生される生理活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸とともに、DAMPs は歯周炎の発症・病態形成にどのように関与しているかを検討するとの考えに至った。

2. 研究の目的

PAMPs として歯周病原性細菌 *P. gingivalis* の LPS や TLR3 アゴニストである Poly(I:C) に着目し、これら因子が壊死細胞より放出される DAMPs と炎症巣に高濃度で存在する S1P の共存下で、歯周組織構成細胞に対してどのような機能制御を惹起するか検討することにより、包括的な歯周病態形成の解明を目的とした。

3. 研究の方法

申請者の所属研究室で確立した歯肉上皮細胞 epi4 株を実験に供した。まず、epi4 における S1P 受容体の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。比較対照としてヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC における S1P 受容体の発現を検討した。

S1P 存在下で DAMPs として HMGB-1、PAMPs として Poly(I:C) の刺激により epi4 から産生誘導される IL-8 の分泌量を ELISA 法を用いて検討した。

S1P 受容体 1-3 (S1P1、S1P2、S1P3) の knockdown 株を作成して、と同様の実験を行った。

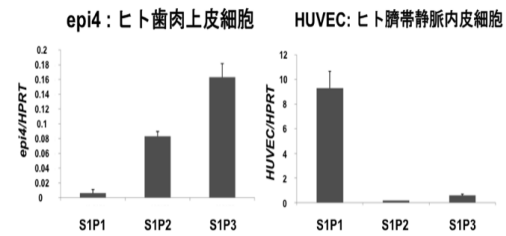
epi4 における接着分子 CD54 (ICAM-1) の発現をフローサイトメトリー法 (FACS) にて検討した。

epi4 を 5 回凍結溶解をくりかえすことで necrotic cell supernatant (NCS) を作成し、NCS が epi4 にどのような作用を及ぼすか検討した。

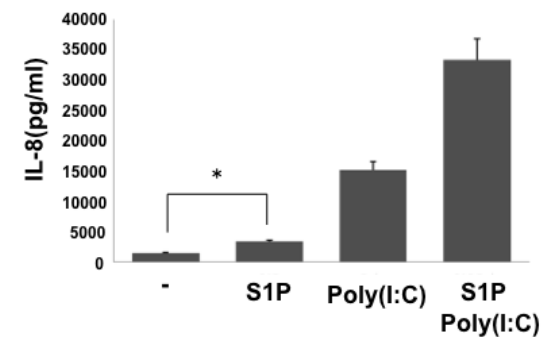
4. 研究成果

歯肉上皮細胞株 epi4 における S1P 受容体の発現をリアルタイム法にて検討した結果、S1P2、S1P3 の発現を認めた。epi4 で発現の弱い S1P1 は、ヒト血管臍帯静脈内皮細胞 HUVEC においては非常に強い発現を認めた。

S1P4、S1P5 に関してはリンパ球系細胞に強く発現しているとの報告が多いため、本研究においては特に検討しなかった。

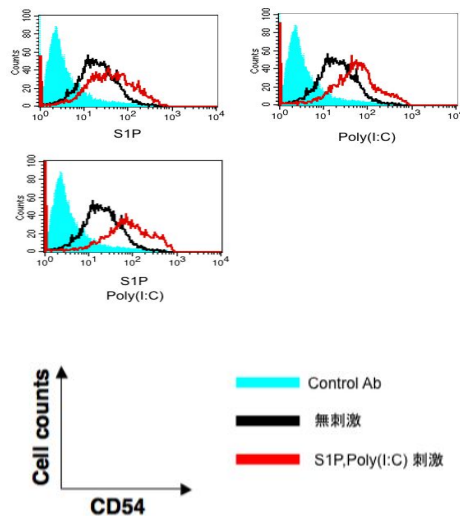


epi4 を S1P で刺激したところ刺激群と比較して有意な IL-8 産生量の増加を認めた。その IL-8 産生量は poly(I:C) 存在下でさらに増強した。HMGB-1 存在下でも同様の傾向を示した (データには示さない)。



研究成果 より epi4 には複数の S1P 受容体が mRNA レベルで発現していることが明らかとなった。そこで、どの受容体サブセットを介して S1P は炎症性サイトカインを誘導しているのかを S1P 受容体 S1P1、S1P2、S1P3 の siRNA を用いて S1P 受容体ノックダウン株を作製し、S1P 単独あるいは poly(I:C) との共刺激により誘導される IL-8 産生量を検討した。その結果 S1P2/S1P3 siRNA 群において IL-8 産生量は抑制された。一方、S1P1 siRNA 群はコントロール群と比較して IL-8 産生に変化は認められなかった。(データには示さない)。

次に炎症時に epi4 に誘導される CD54 について検討した。CD54 は S1P、poly(I:C) 単独刺激で発現が誘導され、S1P と poly(I:C) 共刺激でその発現強度は増強した。



NCS 刺激を受けた epi4 は、NCS 濃度依存的に IL-6、IL-8 の産生を誘導した(データには示さない)。

以上の結果より生理活性脂質である S1P は epi4 においては S1P2 及び S1P3 を介して IL-8 を産生誘導していることが明らかとなった。また、S1P 刺激は CD54 の発現を誘導することも明らかとなった。このことから S1P は歯肉上皮細胞に対して炎症を引き起こす炎症メディエーターである可能性が考えられる。さらに PAMPs、DAMPs と協調的に炎症反応を強めることが明らかとなった。また S1P の受容体シグナルを抑制することによる抗炎症作用を創薬のターゲットとしての可能性も示唆された。

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 5 件)

Yanagita M, Kobayashi R, Kojima Y, K Mori and Murakami S. Nicotine modulates the immunological function of dendritic cells through PPAR-gamma expression. Cellular Immunology 2012. 274: 26-33. 査読あり

Kashiwagi Y, Yanagita M, Kojima Y, Shimabukuro Y and Murakami S. Nicotine upregulates IL-8 secretion in human gingival epithelial cells following stimulation with IL-1beta or *P. gingivalis* lipopolysaccharide via nicotinic acetylcholine receptor

signaling.

Archives of Oral Biology 2012. 57: 483-490. 査読あり

Iwayama T, Yanagita M, Mori K, Ozasa M, Sawada K, Kubota M, Miki K, Kojima Y, Takedachi M, Kitamura M, Shimabukuro Y, Hashikawa T and Murakami S. Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. Journal of Periodontal Research 2012. 47:563-571. 査読あり

Yanagita M, Mori K, Kobayashi R, Kojima Y, Miki K, Kubota M, Yamada S, Kitamura M and Murakami S. Immunomodulation of Dendritic Cells Differentiated in the Presence of Nicotine with Lipopolysaccharide From *Porphyromonas gingivalis*. European Journal of Oral Sciences 2012. 120:408-414. 査読あり

Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. Journal of Dental Research 2014. 93:89-95. 査読あり

[学会発表](計 12 件)

児嶋由子、柳田学、森健太、野崎剛徳、山田聡、その他: FGF-2 により誘導される血管新生へのマウス歯根膜細胞の関与、第 54 回日本歯周病学会春季学術大会、福岡、2011/5/28.

児嶋由子、柳田学、森健太、山下元三、山田聡、その他: FGF-2 により誘導される血管新生への歯根膜細胞の関与、第 32 回日本炎症・再生医学会、京都、2011/6/3.

森健太、柳田学、児嶋由子、中村友美、山下元三、山田聡、その他: TLR2/TLR3 共刺激が歯肉上皮細胞の免疫応答に及ぼす影響、第 134 回春季日本歯科保存学会、千葉、2011/6/8.

森健太、柳田学、その他: スフィンゴシン-1-リン酸がヒト歯肉線維芽細胞の炎症反応に及ぼす影響、第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会、下関、2011.9/24

Kojima Y, Yanagita M, Mori K, Yamashita M, Nozaki T, Yamada S, その他. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF in periodontal ligament cells, 第 59 回国際歯科研究学会日本部会学術大会、広島、2011/10/8.

山羽聡子、山田聡、梶川哲宏、尾崎巨弘、

粟田敏仁、柳田学、その他：ヒト歯根膜細胞におけるインフラマゾームの発現、第55回日本歯周病学会春季学術大会、札幌、2012/5/18.

Kojima Y, Yanagita M, その他. FGF-2 induces VEGF expression by periodontal ligament cells. 90th IADR. Iguacu Falls, Brazil, 2012, 6/20-23.

三木康史、柳田学、その他：スフィンゴシン-1-リン酸がヒト歯肉上皮細胞の炎症反応に及ぼす影響、第136回春季日本歯科保存学会、宜野湾、2012/6/29.

Kojima Y, Yanagita M, Mori K, Murakami S. FGF-2 induces VEGF expression by periodontal ligament cells. 98th American Academy of Periodontology Annual Meeting. Los Angeles, USA, 2012, 9/29-10/2.

久保田実木子、柳田学、その他：FGF-2刺激による歯根膜細胞からのCXCR4の誘導、第137回秋季日本歯科保存学会、広島、2012/11/22.

Mori K, Yanagita M, Kubota M, Kojima Y, Yamaba S, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Immunological properties of murine periodontal ligament cells、第60回国際歯科研究学会日本部会学術大会、新潟、2012/12/14.

三木康史、柳田学、その他：塩化カルプロニウムが歯根膜細胞および血管内皮細胞に及ぼす影響、第56回秋季日本歯周病学会、前橋、2013/9/22.

〔図書〕(計 1件)

柳田学、村上伸也. 炎症性メディエーターと歯周疾患の関係；ザ・ペリオドントロジー 第二版、p29-32, 永末書店 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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