

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593112

研究課題名(和文) ストレスが歯周病に及ぼす病態の解析

研究課題名(英文) Analysis of the condition stress on the periodontal disease

研究代表者

牧 茂 (MAKI, SHIGERU)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20134942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：タバコ煙中のニコチンが、歯根膜線維芽細胞によるストレス反応性のタンパク質クロモグラニンA (ChgA)の産生を増強させる。特に、受動喫煙条件下において能動喫煙条件下と比較してより高いCgAの発現量を認めた。歯周組織の反応にストレスが関与している可能性を示唆した。ChgA添加群における細胞周期関連遺伝子群の機能解析を行った。添加群ではTGF-、細胞分裂促進に関わるMAPK、Smad遺伝子群発現が増大した。マウスの歯周組織に低濃度のCgAを注射し、経過を観察したが大きな組織変化は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Nicotine in a cigarette smoke makes a production of stress-responsive protein chro morganin A(CgA) due to periodontal ligament fibers blast cells increase. Particularly, expression levels of higher CgA increased under a passive smoking condition as compared with an active smoking. We suggested the possibility that stress was involved in a response of the periodontium. We conducted the functional analysis of the associated gene cluster for a cell cycle in the CgA addition group. The group additioned of CgA increased cell growth factor, MAPK and Smad gene group. We injected low-concentrated CgA into periodontal ligament, and we observed course, but the tissue changes was not found.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：クロモグラニンA ストレス 硫酸ニコチン 歯根膜線維芽細胞 TGF- Smad MAPK

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は生活習慣病の一つとして定義されている。本態は歯周病原性細菌による感染症であるが、口腔清掃、喫煙、ストレス、食習慣などの生活習慣に属する因子が大きな発症および進行リスクとなっていることは、最近の研究によって明らかとなっている。このことは、集団における発症予防、進行抑制を考慮した場合、生活習慣に関連した疾病という定義は極めて有効であり、住民の生活習慣を健康によいものへと変容することによって可能となる。また、近年、歯周病と全身の健康状態との関連が徐々に明らかにされている。歯周病が全身の健康へ及ぼす影響として心臓血管疾患、2型糖尿病、さらには低体重児出産などいわれている。しかし、歯周病と全身の健康状態や生活習慣についての報告が少なく、喫煙以外は確立されていないのが現状で、特に生活習慣においては運動習慣、食生活、ストレスについての報告は極めて少ない。国内・国外においては、口腔状態と各種全体的検査データとの関連についての疫学的研究は散見されるが、予防につながるものは得られていない。我々は、一般住民約 6,500 人を対象とした疫学研究において、肥満 (BMI 値) と歯周病の重症度 (CPI 値) との関連で、肥満の者ほど歯周病の重症度が高いこと、また、ストレス(「自由時間・ゆとりがある」、「一晩で疲れがとれる」の問診項目) と歯周病の重症度 (CPI 値) では、ストレスの少ない者ほど歯周病の重症度が低いことなどを明らかにしてきた (口腔衛生学会雑誌第 57 巻 528 頁、同 58 巻 405 頁、同 59 巻 510 頁)。これらの疫学的研究から得られた知見を裏付けるメカニズムに関する研究は少なく、特にストレスに関しては定説がない。

(2) 生体がストレスを受けると、交感神経-副腎髄質系と視床下部-副腎皮質系の活動が高まり、カテコールアミンとコルチゾールが分泌される。一方、クロモグラニン A (CgA) は、副腎髄質をはじめとする内分泌細胞や神経細胞等がストレスに反応して分泌する糖タンパク質であり、自律神経系の活動指標である。CgA は抗菌ペプチドの産生、肥満細胞の遊走や、ロイコトリエンやプロスタグランジンの産生、ヒスタミン放出に関与するなど、全身および局所の免疫調節機構と密接に関係している。疫学的に CgA は歯周病や喫煙が因子となる気道疾患との関連性が報告されており、近年唾液中にも放出されることが示され、唾液中の CgA は精神的ストレスの新しい指標として注目されている (Stress 9:127-31, 2006)。実際に、唾液中の CgA 値は、歯科診療時にストレスを受けた患者に高いことや歯周疾患の重症度と相関することが報告されている (Arch Oral Biol 55:842-7, 2010)。CgA はマクロファージのスカベンジャー受容体 SR-A に作用し iNOS (inducible nitric-oxide synthase) 産生を引き起こすと

される (Neurosci Lett 413:227-232, 2007; FEBS Lett 583:3461-3466 2009)。iNOS より作られる活性酸素種 NO は炎症性サイトカインの誘導因子である。以上より、ストレス CgA iNOS 炎症性サイトカイン 歯周組織破壊というストレスカスケードが想定される。現代人のストレスは、上記の機序で歯周病を誘発させるという仮説を立てた。本研究では、動物実験と細胞培養実験でこの仮説を証明し、歯周病予防におけるストレス軽減という保健指導を確立するという考えに至った。

2. 研究の目的

ストレスと歯周病の関連を明らかにするため、細胞培養系と生体マウスを用いたストレスタンパク質クロモグラニン A (CgA) による歯周病誘導機構の解明を行う。本研究では、現代人がストレスと感じる「受動喫煙」をはじめとするストレス因子 CgA iNOS 炎症性サイトカイン 歯周組織破壊というストレスカスケードを明らかにする。

3. 研究の方法

正常ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPDLF) を 37℃、5% CO₂ 条件下で、hFGF- β 、インシュリン、FBS、GA-1000 含有の SCBM 培地で 100mm 細胞培養プレートで Sub confluent の状態になるまで培養した。その後採取した細胞は 12-well Microplate に細胞密度 1×10^5 cells/cm² の状態になるよう播種し、Confluent に達した状態で実験に使用した。(1) 歯根膜線維芽細胞に化学的ストレスとして硫酸ニコチンを HPDLF に添加し、CgA の発現量を測定。

HPDLF に硫酸ニコチンを作用させることで分泌顆粒に局在する CgA が細胞外に分泌されているのかを検討した。硫酸ニコチンは受動喫煙及び能動喫煙時の血中濃度から算出した 10 nM および 100 nM をそれぞれ添加し、無血清培地にて 12 時間培養した。培養終了後、CgA 産生量の測定として mRNA 発現、免疫組織染色を行った。

(2) CgA を HPDLF に添加した際の細胞周期関連遺伝子群の変化を測定。

CgA を添加した際に HPDLF の細胞周期関連遺伝子群にどのような変化が見られるのかを測定した。1 ng/ml の CgA を添加した無血清培地に 12 時間培養した後、TGF- β や Smad 群の mRNA 発現量、リン酸化された Smad3/5 の発現量を測定した。

(3) CgA を注入し一定時間経過後の組織変化の観察。

実験動物として 8 週齢 ddy マウスを使用し、上顎大臼歯部近辺 1 ng/ml の CgA を添加した生理食塩水を片側に注入した。残る片側に生理食塩水を注入した。1w 経過後、歯周組織を摘出、切片を作成、HE 染色を行い両側の組織変化を観察した。

4. 研究成果

硫酸ニコチン添加時の HPDLF は CgA の分泌量が上昇し、受動喫煙を想定した 10 nM のニコ

チンを添加した CgA の産生量は約 2 倍になり、有意に上昇が認められた (Fig.1) . また、HPDLF は通常培養の Control の状態でも若干の抗 CgA 抗体に陽性を示した。ニコチンを添加すると核および周辺細胞質内に陽性を示す細胞が増加し、抗 CgA 抗体への強い陽性所見が認められた (Fig.2,3) .

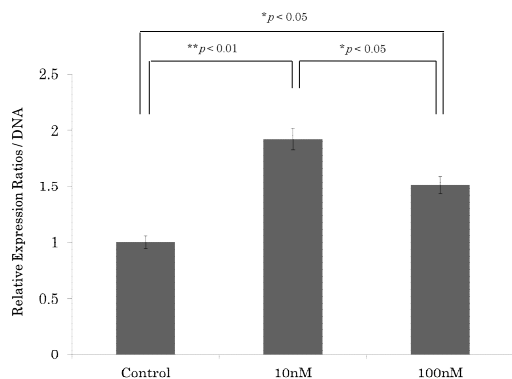


Fig.1

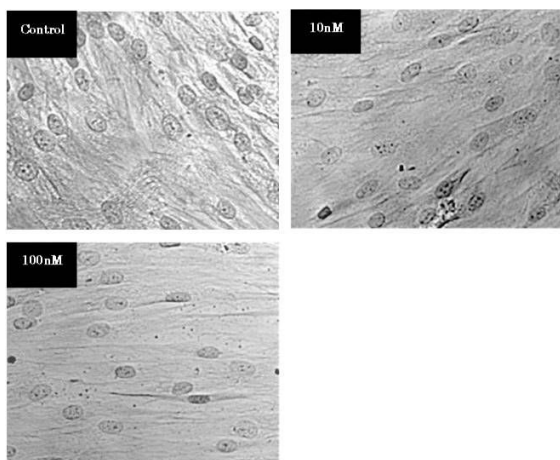


Fig.2

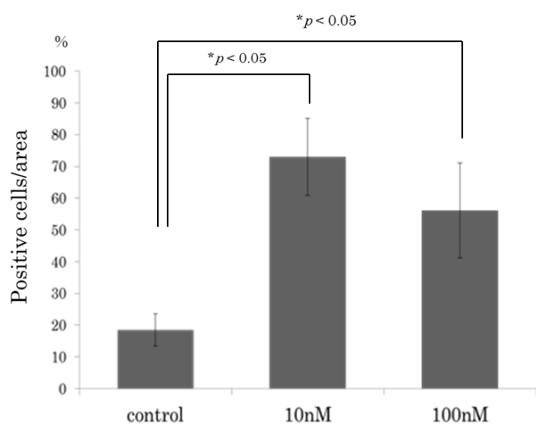


Fig.3

(2) CgA 添加群では細胞増殖因子と呼ばれる TGF- β や、細胞分裂促進に関わる MAPK の遺伝子群が増大していた。また、TGF- β や MAPK 遺伝子群の情報伝達に深く関わる Smad

遺伝子群も CgA 添加時には増大した。
(3) CgA 添加時に明確な組織変化は見られなかった。

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 1 件)

Sadaoka Sunao, Yagami Kimitoshi, Maki Shigeru. Nicotine in cigarettes promotes chromogranin A production by human periodontal ligament fibroblasts. Archives of Oral Biology, 査読有、58 巻、2013、1029-33
DOI:10.1016/j.archoralbio.2013.02.012

〔学会発表〕(計 8 件)

定岡直、八上公利、笠原香、小口久雄、川原一郎、牧茂。ストレス関連物質による歯周組織細胞の増殖因子への影響 日本口腔衛生学会総会 2013 年 5 月 17 日 松本市 キッセイ文化ホール

定岡直、八上公利、笠原香、小口久雄、川原一郎、牧茂。ストレス反応性タンパク質が歯根膜細胞に及ぼす影響。甲信越口腔保健研究会 2013 年 7 月 27 日。長岡市 アオーレ長岡

定岡直、八上公利、川原一郎、牧茂。ストレス関連物質による歯周組織細胞の増殖因子への影響 歯科基礎医学会 2013 年 9 月 15 日 岡山市 岡山市コンベンションセンター。

定岡直、八上公利、川原一郎、笠原香、中根卓、牧茂。タバコのニコチンにより歯根膜線維芽細胞の ChromograninA 産生促進について 日本口腔衛生学会総会 2012 年 5 月 27 日 横須賀市 神奈川歯科大学。

定岡直、八上公利、川原一郎、笠原香、中根卓、牧茂。化学的ストレスにより歯根膜線維芽細胞が発現するストレス反応性タンパクについて 歯科基礎医学会 2012 年 9 月 16 日 郡山市 奥羽大学。

定岡直、八上公利、川原一郎、笠原香、中根卓、牧茂。ヒト歯根膜線維芽細胞と chromogranin との関連性について。日本口腔衛生学会 2011 年 10 月 2 日 岐阜市 長良川国際会議場。

定岡直、八上公利、笠原香、小口久雄、川原一郎、牧茂。ヒト歯根膜線維芽細胞と chromogranin との関連性について。甲信越北陸口腔保健研究会 2011 年 7 月 30 日 新潟市 新潟大学歯学部

定岡直、八上公利、笠原香、小口久雄、川原一郎、牧茂。化学的ストレスにより歯根膜線維芽細胞が発現するストレス反応性タンパクについて 日本口腔衛生学会総会 2011 年 10 月 9 日 松戸市

日本大学松戸歯学部

6 . 研究組織

(1)研究代表者

牧 茂 (MAKI SHIGERU)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20134942

(2)研究分担者

八上 公利 (YAGAMI KIMITOSHI)
松本歯科大学・歯学部附属病院・准教授
研究者番号：00210211

小出 雅則 (KOIDE MASANORI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：10367617