

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月22日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792481

研究課題名（和文） MMPsの細胞接着分子破壊を基盤としたC5aによる接合上皮破壊機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the junctional epithelium destruction mechanism was based cell adhesion molecule destruction of MMPs

研究代表者

吉永 泰周（YOSHINAGA YASUNORI）

長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・助教

研究者番号：60452869

研究成果の概要（和文）：

LPSによる感作ラットの歯肉溝へLPSを24時間ごとに投与していくと、10日目からアタッチメントロスが観察された（感作群）。さらに10日以降では歯槽骨頂部の吸収も見られた。反対に非感作ラットでは、10日目まではアタッチメントロスおよび歯槽骨の吸収は認められず、20日以降では有意な増加が認められたが感作ラットと比べてその変化は少なかった（非感作群）。感作群10日目において、接合上皮及び上皮下結合組織に抗原と抗体とともに免疫複合体を形成するC1qBの発現が認められ、アタッチメントロスへの免疫複合体の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

LPS was applied daily onto the palatal gingival sulcus in rat. In the immunized group, attachment loss was observed on day 10. On day 20, bone resorption was also observed. In the non-immunized group, there was no attachment loss and bone resorption on day 10. In the immunized group, on day 10, C1qB was observed in the junctional epithelium and adjacent connective tissue. The presence of C1qB suggests that the formation of immune complexes is involved in this destruction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：歯周ポケット形成

1. 研究開始当初の背景

歯周炎の発症や進行において歯周ポケット形成は最も重要な役割を担っているが、そのメカニズムについては不明のままである。接合上皮細胞間に亀裂が生じアタッチメントロスが起こると考えられており、上皮細胞間接着の破壊がアタッチメントロスのメカニズムを解明するカギとなると思われる。またこれまでの研究により、細菌と宿主免疫系の相互作用によりアタッチメントロスを生じるラット歯周炎モデルを確立済みである。我々はアタッチメントロスに好中球の浸潤が重要な役割を担っているという所見を得

ている。補体成分であるC5aは、免疫複合体の形成により誘導され、好中球の強力な走化性因子である。また慢性歯周炎患者から採取したGCF中にC5aが増加しているという報告もあり、C5aと歯周炎の関連性も示唆されている。しかしながら補体系も含めた免疫系がどのようにアタッチメントロスに関与しているかは不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では確立済みのラット歯周炎モデルを用いて宿主補体系や上皮の接着因子に

焦点を当てて、アタッチメントロスのメカニズムの一端を証明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 免疫感作ラットの作製

9週齢のルイス系雄性ラットにフロイントのコンプリートアジュバンドと混合した *E. coli* LPS 溶液を腹腔内投与し免疫感作を行う。28日後にフロイントのインコンプリートアジュバンドと混合した LPS 溶液を腹腔内投与し、免疫系の活性化を行い(感作群)、24時間後より以下の方法により歯肉溝へ LPS 滴下による炎症の誘導を行う。LPS 溶液の代わりに PBS を腹腔内投与したラットを非感作群として用いる。

2) LPS 滴下による歯周組織の炎症の誘導

1)の方法で免疫感作を行ったラットと非感作ラットを用いて、*E. coli* LPS をルイス系雄性ラット上顎両側第一臼歯口蓋側歯肉溝内に毎日30分間滴下し、0、10、20回滴下から24時間後に屠殺し上顎骨を採取する。採取した両側上顎骨を AMeX 法に準じてパラフィン包埋により連続切片を作製する。両群ともに0日目(無滴下)を対照群として用いた。

3) 血清 IgG 抗体価の測定

LPS 0、5、10、20回滴下から24時間後に各ラットの眼窩下静脈より血液を採取、血清を分離する。その血清を用いて ELISA 法により *E. coli* LPS に対する IgG 抗体レベルを測定する。

4) 組織形態計測による分析

2)にて作製した連続切片を用いて HE 染色を行い、

①アタッチメントロス:CEJから接合上皮の根面に接している部位の歯冠側端までの距離を計測する。

②歯槽骨レベル:CEJから歯槽骨頂部までの距離を計測する。

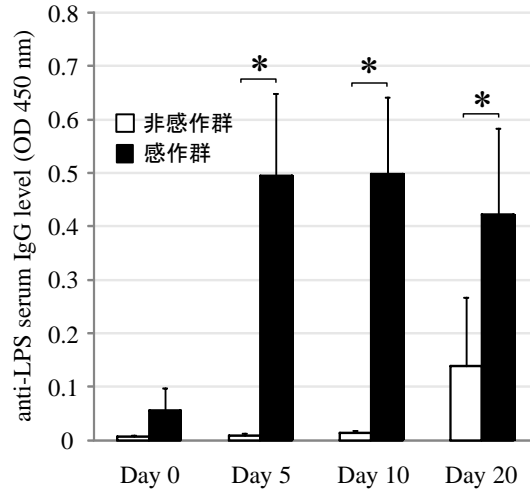
以上を光学顕微鏡下もしくはデジタルカメラにて撮影した写真を用いて image analysis software(Image J)により解析する。

5) 免疫組織化学染色

2)にて作製した連続切片を用いて RANKL や C1qB、MMP-8 に対する抗体を使用し免疫組織化学染色を行い、陽性細胞の分布や数について検索を行った。

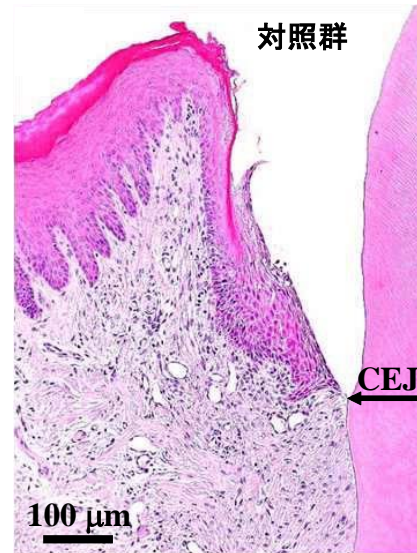
4. 研究成果

1) LPS に対する血清 IgG 抗体レベル
感作群では5日目より有意な血清 IgG レベルの上昇がみられ、20日目まで維持していた。非感作群では20日目に軽度の上昇が認められるのみであった

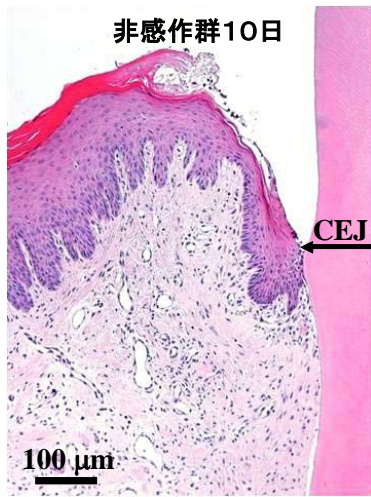


2) HE 染色像

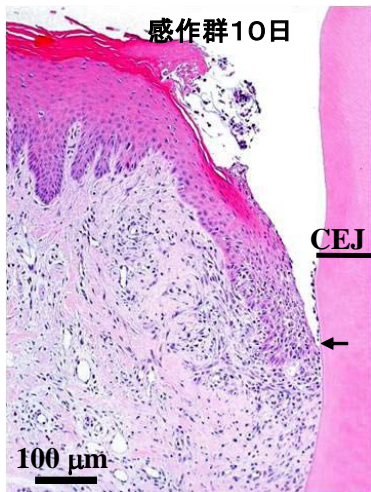
両群ともに対照群(0日目)では接合上皮根尖側端は CEJ に位置しており、炎症性細胞浸潤もほとんど見られなかった。



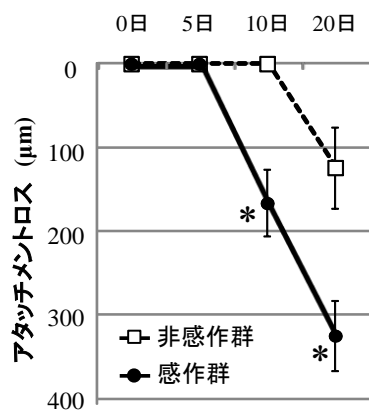
非感作群 10 日目では、軽度の炎症性細胞浸潤および接合上皮の根尖側移動が観察されたが、根面からのアタッチメントロスは見られなかった。



感作群 10 日目では、接合上皮内および上皮
下結合組織に好中球を主体とした多数の炎症
性細胞浸潤と接合上皮の根尖側移動が観
察され、さらに明らかな根面からのアタッ
チメントロスが観察された。

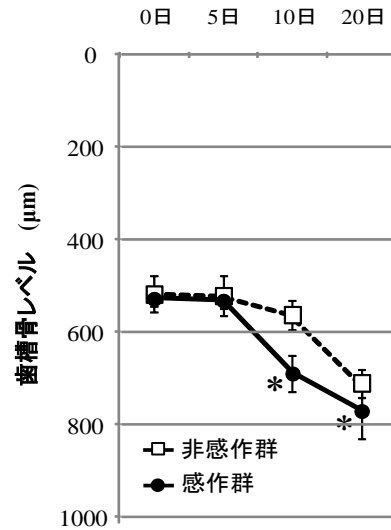


3) アタッチメントロス
感作群では 10 日目から、非感作群では抗体
レベルの上昇していた 20 日目に観察された。
しかし両群を比較すると感作群の方がより
高い値を示した



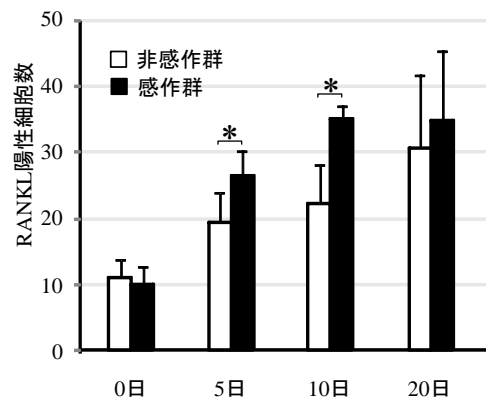
4) 歯槽骨レベル (骨吸収量)

感作群では 10 日目から、非感作群では 20 日
目から増加していた。また両群で比較すると、
感作群の方が 10 日目から有意に高い値を示
した。



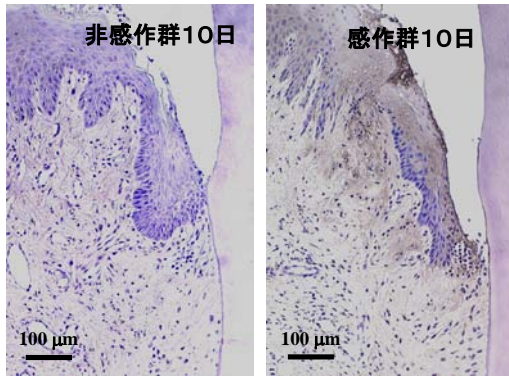
5) RANKL 陽性細胞数

両群ともに 5 日目より増加していたが、感作
群のほうが非感作群と比べて 5 日、10 日目に
有意に大きかった。



6) C1qB 発現の分布

アタッチメントロスが認められなかった非
感作群 10 日目では免疫複合体の構成成分で
ある C1qB の発現は認められなかったが、ア
タッチメントロスが認められた感作群 10 日
目では接合上皮および上皮結合組織に
C1qB の発現が認められた。



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 1 件)

- (1) Yoshinaga Y, Ukai T, Kaneko T, Nakatsu S, Shiraishi C, Kuramoto A, Oshino K, Ichimura I, Hara Y., Topical application of lipopolysaccharide into gingival sulcus promotes periodontal destruction in rats immunized with lipopolysaccharide, 査読有, J Periodontal Res. 2012 Oct;47(5):674-80, DOI: 10.1111/j.1600-0765.2012.01486.x.

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 吉永泰周, 中津 晋, 藏本明子, 鶴飼孝, 金子高士, 市村育久, 押野一志, 矢納義高, 原 宜興: LPS の全身的な感作後の LPS 歯肉溝内投与はアタッチメントロスを誘導する, 第 136 回日本歯科保存学会春季学術大会, 沖縄, 6 月

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 泰周 (Yoshinaga Yasunori)

長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・助教

研究者番号: 60452869

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし