

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890058

研究課題名（和文）歯周炎における酸化ストレス条件下でのTrx1とTxnipの役割の解析

研究課題名（英文）Analysis of the role of Trx1 and Txnip under the oxidative stress condition in periodontitis.

研究代表者

江部 典子（EBE NORIKO）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20611099

研究成果の概要（和文）：酸化ストレス（マーカーとして TRX1 抗体を使用）は歯周炎患者の歯周ポケット側に存在するという知見を得た。TRX1 発現は歯肉上皮とポケット上皮、ポケット上皮側の T 細胞に発現が見られた。特に歯周疾患の患者で健康な患者と比較して発現の上昇を確認した。In vitro では Ca9-22 細胞（歯肉上皮細胞株）で解析を進めたが、T 細胞でも解析を行う必要がある。急性炎症時の歯周ポケット側で、これらの酸化された組織が歯周炎の病原性と関連がある可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）： Oxidative stress exists in the periodontal pocket side with periodontal patients. We used TRX1 antibody as an oxidative marker. TRX1 was expressed in gingival epithelium, pocket epithelium and T cells under the periodontal pocket epithelium. Especially, TRX1 expression was increased in periodontal patients compared with healthy patients. In vitro study, we have used Ca9-22 cells (gingival epithelial cell line). Further study, it is necessary to use T cells. In the periodontal pocket side at acute inflammation, these oxidative tissues may be involved in the pathogenesis periodontal disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：歯周治療系歯学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学、酸化ストレス、TRX1(チオレドキシシン 1)、Txnip(thioredoxin interacting protein)、ポケット上皮

1. 研究開始当初の背景

歯周組織は硬組織と軟組織が混在する組織であり、他に類をみない特殊な組織である。接合上皮が歯牙を襟巻のように取り囲み、互いに疎に結合した上皮細胞の間へ免疫細胞

を送りこむことで、細菌に対して生体を防御している。健康な歯周組織の歯肉ポケットでも細菌は存在し、白血球やリンパ球が生体を防御しているが、歯周疾患に罹患した場合には、ポケット上皮が歯の根尖方向に増殖し、

深い歯周ポケットが形成されてポケット内は歯周病原細菌の温床となる。発達したポケット上皮、および結合上皮下には炎症性細胞が大量に存在し、その直下にある歯槽骨は炎症の増悪とともに急速に吸収される。進行した歯周炎組織では、最終的にポケット上皮が歯牙の根尖に到達し、歯が喪失する。ゆえにポケット上皮は歯周病の進行と発達に大きく関係しているのである。

近年、歯周疾患と酸化ストレスの影響が注目されてきている。生体における活性酸素種 (ROS) は代謝と生体防御の両面から不可欠であるが、感染局所では、外来病原体を排除する為に過剰な ROS が産生される。この生体反応は、各種炎症性メディエーターを介在し、組織を酸化する事で様々な慢性炎症性疾患を誘発する。歯周病患者の血液においても、歯周病の悪化と共に血中酸化ストレスマーカーの上昇が確認され、治療によってその値が減少する事が報告されている。(Tamaki N et al., J Periodontol. 2008 Nov;79(11):2136-42.) また、歯周病の進行度の評価にも使用されている歯肉溝浸出液中でも、歯周病患者では酸化ストレスマーカーの上昇が確認されている。しかしながら実際にポケット上皮側のヒト歯周組織を、酸化ストレスマーカーを用いて免疫組織学的に解析した論文はない。

平成 22 年度までの研究で、歯周病原細菌代謝産物の酪酸 (歯周炎患者のポケット内濃度) によって歯肉上皮細胞 (Ca9-22 細胞) の細胞死、ROS 産生と炎症性メディエーターである HMGB1 (High Mobility Group Box-1) 放出、(Ebe et al., J Dental Res. 2011.90(2):235-240.) さらに放出された HMGB1 が酸化された状態であるという知見を得た。このことから、歯周組織の炎症部では、細胞死と共に活性酸素の放出が引き起こされ、生体内タンパク質のレッドックス反応に深くかかわっている可能性を考えた。

また、2010 年には酸化ストレス条件下で Trx1 (チオレドキシン 1) と Txnip (thioredoxin interacting protein) が解離する事で、Nlrp3 inflammasome を介在した炎症性メディエーター IL-1 β の産生が報告されている。(Rongbin Zhou et al., Nature Immunology 2010 (11); 136-140.) 歯周病患者の歯肉溝浸出液でも IL-1 β の上昇が確認されているが、酸化ストレス下で Txnip を介在した IL-1 β の放出メカニズムに関しては報告がない。

そこで、歯周炎における急性炎症部において、組織が酸化ストレス状態であるかどうか、IL-1 β の放出に関わる Trx1 に着目することで免疫組織学的に解析を行う必要があると考えた。また、健康組織と歯周病組織における Trx1 の発現量を検討することで、歯周病

の進行と発症に酸化ストレスが関与しているか検討する。

2. 研究の目的

急性炎症時の歯周組織 (主に歯周病の進行にもっとも重要なポケット上皮側) を酸化ストレスマーカーでもある TRX1 抗体を用いて免疫組織学的に解析する。また、健康と歯周病患者の比較を行い TRX1 の発現量を比較する。

3. 研究の方法

(1) 重度歯周炎・健康ボランティアの歯周組織を、患者の同意を得て抜歯時、あるいは歯周外科時にポケット上皮から歯肉上皮を一塊にして採取し、ホルマリン固定後 (24 時間以内)、パラフィン包埋を行った後 5 μ m の組織切片を作成する。その後、抗 TRX 抗体を用いて免疫組織学的に解析を行う。ポケット上皮、結合組織、歯肉上皮側のそれぞれの細胞における局在を解析する。

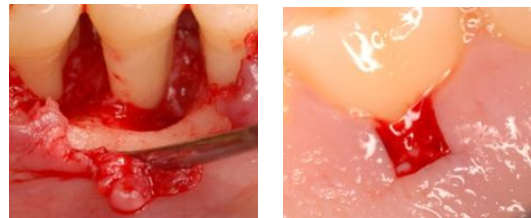


図 1 ; a) 歯周病患者 b) 健康

(2) 上記サンプルを採取時、ウェスタンブロッティング用に切り分け、抗 TRX1 抗体を用いて歯周病患者と健康患者で発現量の比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) 患者のサンプル数としては健康 ; 7 検体、歯周病患者 ; 10 検体を収集した。歯周病患者の歯周ポケット平均は 10 mm であり、急性炎症を起こしている部分を主に採取した。急性炎症を起こしている部分に関しては、主に抜歯対象歯であった。健康なもののポケット平均は 2 mm であった。健康なものは補綴物を装着するための歯肉形態修正の前処置として、不要な歯肉を一塊として採取した。

歯周組織における TRX1 の局在を確認したところ、歯肉上皮とポケット上皮で、健康と歯周病患者の両方に TRX1 の発現が認められた。上皮では両者ともに発現が認められ、有意差はなかった。これは、細菌に対する防御反応の必要性から酸化ストレスが上皮側に多いのではないかと考えた。

一方、歯周炎患者のポケット上皮直下の結合組織ではより多くの炎症性細胞が浸潤しており、それらの細胞に TRX1 の発現が多く認められた。(図 2)

(図 2;褐色 ; 抗 TRX1 抗体により染色された歯周組織)

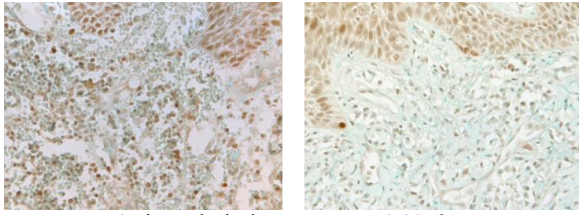
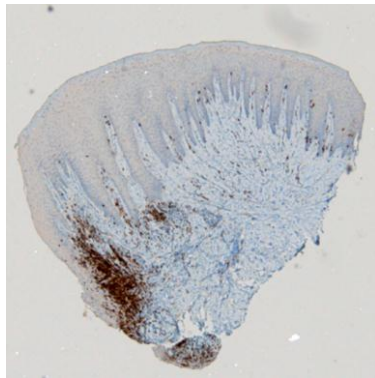


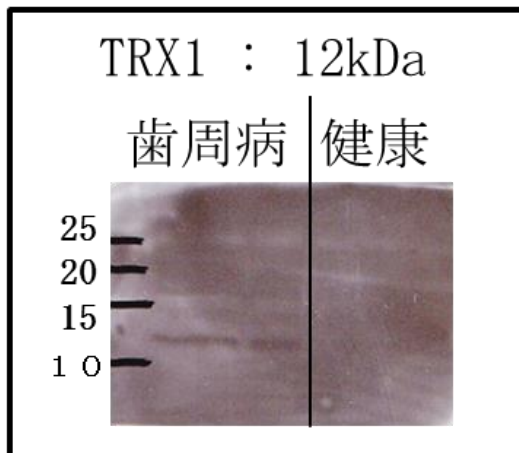
図 2 : a) 歯周病患者 健康なポケット上皮側結合組織と比較して、歯周病患者のものは発現量に有意差があった。



(図 3)

Trx1 の発現を示す炎症性細胞は T 細胞の存在する部位であったため、Trx1 の発現を示すのは T 細胞である可能性が考えられた。Ca9-22 細胞を用いた *in vitro* の解析を行ったが、T 細胞でも解析を行う必要がある。(図 3 ; ポケット上皮側の T 細胞の局在を示す)

(2) 上記で採取した歯周組織を固定前に切り分け、Western blotting を行ったところ、歯周病患者の歯肉と健康なものとの比較において、TRX1 (12kDa) の上昇が見られた。強い炎症組織では組織が酸化状態である可能性が示唆され、IL-1 β の放出に関わる可能性が考えられた。



(図 4: Western blotting 歯周病患者と健康なもの)

以上より、炎症の起きている歯周組織が酸化状態となっていることが示唆された。また今後、T 細胞における *In vitro* 実験を行い TRX1 の発現、TRXNIP 発現についても確認する必要があると考えられた。

以上より、重度歯周炎局所では酸化ストレス状態であり、生体内のタンパク質のレッドックス反応の結果、歯周病の増悪と共に歯周ポケットを介して負のスパイラルが起きている可能性が示唆された。

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 1 件)

G. Amodini Rajakaruna, Makoto Umeda, Keisuke Uchida, Asuka Furukawa, Bae Yuan, Yoshimi Suzuki, Ebe Noriko, Yuichi Izumi, and Yoshinobu Eishi. Possible Translocation of Periodontal Pathogens into the Lymph Nodes Draining the Oral Cavity. The Journal of Microbiology. 査読有 2012 Vol. 50, No. 5, pp. 827-836 doi: 10.1007/s12275-012-2030-8.

〔学会発表〕(計 1 件)

江部典子, 横山三紀, 寺澤和恵, 柳下正樹, 和泉雄一 酪酸による酸化ストレス誘導時に放出される HMGB1 の解析 第 135 回日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会, 大阪, 大阪国際交流センター, 2011.10.21

〔図書〕(計 1 件)

Noriko Ebe, Miki Hara-Yokoyama and Yuichi Izumi

Springer Science and Business Media Plus

Volume 24. Studies on Gingivitis and Periodontal Disease.

Chapter 4. Role of HMGB1 in periodontal disease

(出版予定、10 ページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江部 典子 (EBE NORIKO)

東京医科歯科大学・歯周病学分野・医員

研究者番号 : 20611099

(2) 研究協力者

横山 三紀 (YOKOYAMA MIKI)
東京医科歯科大学・大学院・医歯学総合研
究科・准教授
研究者番号：70191533

井関 祥子 (ISEKI SACHIKO)
東京医科歯科大学・大学院・医歯学総合研
究科・教授
研究者番号：80251544

R. M. A. R. Rajapakshe
東京医科歯科大学・大学院・医歯学総合研
究科・大学院生

和泉 雄一 (IZUMI YUICHI)
東京医科歯科大学・大学院・医歯学総合研
究科・教授
研究者番号：60159803