

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2月28日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890134

研究課題名（和文）ポリリン酸を用いたインプラント周囲炎治療法の確立を目指した研究

研究課題名（英文）A study for the application of inorganic polyphosphate in peri-implantitis treatment

研究代表者

原田 佳奈 (HARADA KANA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：90609744

研究成果の概要（和文）：直鎖状のリン酸ポリマーであるポリリン酸 [poly(P)] は、口腔細菌である *Porphyromonas gingivalis* に対して抗菌作用を示す他、組織再生や骨形成を促進する。インプラント周囲炎治療への応用を目指して、poly(P)の作用をさらに探索した結果、マクロファージにおいて、poly(P)はグラム陰性菌細胞壁構成成分リポポリサッカライドによる誘導型一酸化窒素合成酵素の発現を抑制し、一酸化窒素の放出量を減少させることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Inorganic polyphosphate [poly(P)], a linear polymer of orthophosphate residues, has antibacterial effects against *Porphyromonas gingivalis* and promotes tissue regeneration and bone formation. In this study, I examined effects of poly(P) in macrophages for the application of poly(P) in peri-implantitis treatment, and found that poly(P) suppresses the expression of inducible nitric oxide synthase and the release of nitric oxide in macrophages stimulated by lipopolysaccharide, a cell wall component of Gram-negative bacteria.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：ポリリン酸、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

補綴歯科治療において、より高い機能性と審美性の回復を求めてインプラント治療を希望する患者が増加している現在、オッセオインテグレーションが確立され上部構造が装着されたインプラントをいかに長期間機能させるかが、重要な課題となっている。

インプラントは天然歯と異なり、歯根膜を欠如し直接骨に結合・支持され、周囲粘膜も

新陳代謝が悪く癒痕様組織であるため、細菌感染に対する抵抗性は弱いとされる。そのため、プラーク（細菌塊）が付着するとインプラント周囲炎が進行し、インプラント周囲粘膜の炎症に続いて周囲骨の吸収が引き起こされる。インプラント周囲炎のエビデンスのある治療法はプラークの機械的な除去とクローヘキシジンによる洗浄である。しかしながら、損傷を受けたインプラント周囲組織の

治癒に時間がかかることが、再感染のリスクを高め、病態の慢性化につながっている。

そこで申請者は、インプラント周囲組織の再生を促進させることで、プラーク除去の効果が格段に向上すると考え、組織再生薬候補としてポリリン酸 [poly(P)] に着目した。poly(P) は数個から数百個のリン酸が高エネルギーリン酸結合により結合した分子であり、生体内の様々な細胞で産生されている。最近、ポリリン酸は、口腔細菌である *Porphyromonas gingivalis* に対して抗菌作用を示す他、組織再生や骨形成を促進することが明らかにされつつある。一方、炎症性骨吸収においては、細菌により活性化されたマクロファージが種々のメディエーターを産生することにより破骨細胞を活性化させ、骨吸収を亢進させるが、これに対して poly(P) がどのような影響を与えるのか不明である。

2. 研究の目的

炎症病態の形成に関与するマクロファージに対して poly(P) がどのような影響を与えるのか検討する。

3. 研究の方法

(1) マクロファージの調製

C57BL/6J マウス (8—12 週齢) の腹腔に 3 mL のチオグリコール酸培地を投与し、3 日後に腹腔滲出細胞を回収した。同細胞をプレートに播種し、1% FBS 含有 RPMI 1640 培地中、37°C、5% CO₂ 下で 2 時間培養後、非接着細胞を洗浄除去し、接着細胞をマクロファージとした。

(2) 薬物の処置

マクロファージに平均リン酸数 14、60、130 の poly(P)₁₄、poly(P)₆₀、poly(P)₁₃₀ を処置し、5 分後にリポポリサッカライド (LPS, 100 ng/mL) で刺激した。

(3) 誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現解析

LPS 処置 24 時間後に細胞を可溶化し、抗 iNOS 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより解析した。

(4) 一酸化窒素 (NO) 放出量の測定

LPS 処置 24 時間後の培養上清を回収し、NO の分解産物である NO₂⁻ の濃度をグリース法により測定した。

(5) iNOS mRNA 発現の定量

LPS 処置 6 時間後に全 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により定量した。

(6) 細胞生存能の測定

LPS 処置 24 時間後、WST-8 法により測定した。

(7) TNF 放出量の測定

LPS 処置 3 時間後に培養上清を回収し、ELISA により測定した。

4. 研究成果

(1) 誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) により産生される多量の一酸化窒素 (NO) は歯周組織の破壊に関与することが示唆されている。また、NO は破骨細胞の形成を促進することが報告されている。マクロファージにおける iNOS 発現に及ぼす poly(P) の影響を検討したところ、poly(P)₁₄、poly(P)₆₀ および poly(P)₁₃₀ [1 mM (リン酸換算濃度)] は、単独では iNOS の発現に影響を与えなかった。

(2) グラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) により活性化されたマクロファージでは、iNOS の発現が誘導され、多量の NO が放出される。poly(P)₁₄、poly(P)₆₀ および poly(P)₁₃₀ (1 mM) は、LPS で刺激したマクロファージにおける iNOS の発現を顕著に抑制することが明らかとなった (図 1)。さらに、poly(P) は、鎖長が長いほど強い iNOS 発現抑制作用を示した。リン酸 (Pi, 1 mM) は LPS 誘発性 iNOS 発現に影響を与えなかったことから、poly(P) が iNOS 発現抑制作用を発揮することが示された。

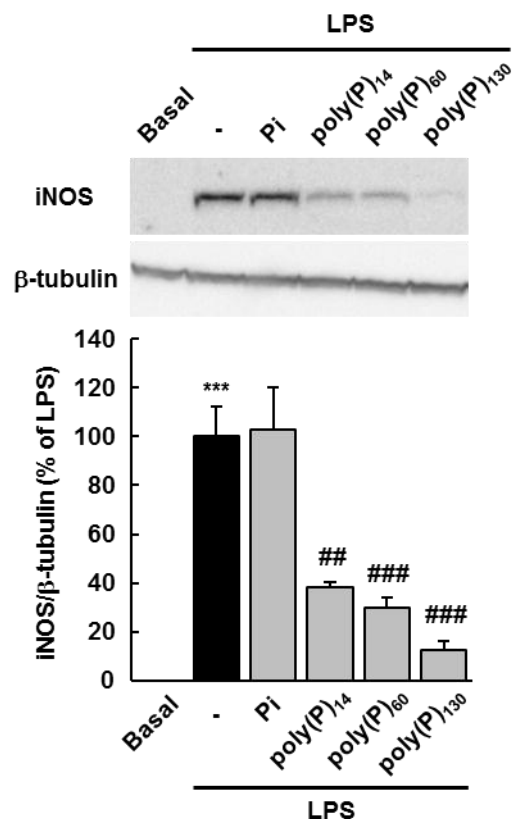


図1 LPS誘発性iNOS発現に及ぼすpoly(P)の影響

*** $p < 0.001$ vs. Basal, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. LPS (ANOVA with Bonferroni's post-test)

(3) 強い iNOS 発現抑制作用を示した長鎖長の poly(P)₁₃₀ を用いて poly(P) の作用の濃度依存性を検討したところ、100 μM の濃度で poly(P)₁₃₀ の作用を最大に達した。

(4) iNOS の発現抑制に伴い、poly(P)₁₃₀ (100 μM) は LPS 誘発性の NO 放出を抑制した (図 2)。

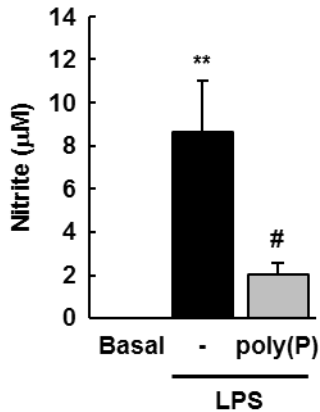


図2 LPS誘発性NO放出に及ぼすpoly(P)の影響
poly(P), poly(P)₁₃₀; ** $p < 0.01$ vs. Basal, # $p < 0.05$ vs. LPS (ANOVA with Bonferroni's post-test)

(5) poly(P)による iNOS の発現抑制は、iNOS mRNA 発現の段階で制御されるのか検討した。poly(P)₁₃₀ (100 μM) は、LPS による iNOS mRNA 発現を有意に抑制した (図 3)。したがって、poly(P)は、iNOS mRNA 発現を抑制することにより、iNOS 発現量を減少させることが示された。

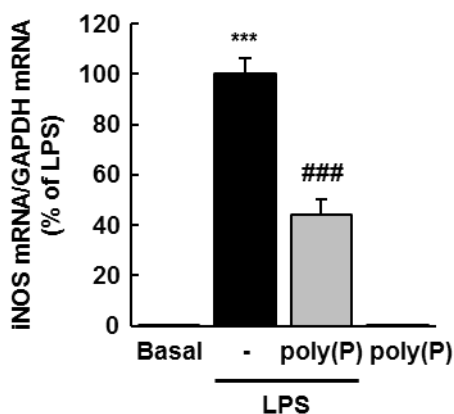


図3 LPS誘発性iNOS mRNA発現に及ぼすpoly(P)の影響
poly(P), poly(P)₁₃₀; *** $p < 0.001$ vs. Basal, ### $p < 0.001$ vs. LPS (ANOVA with Bonferroni's post-test)

(6) マクロファージの生存に与える poly(P) の影響を検討したところ、poly(P)₁₄、poly(P)₆₀ および poly(P)₁₃₀ (1 mM) の単独処置は無影響であった。さらに、LPS 処置マクロファージの生存に対しても、poly(P)₁₄、poly(P)₆₀ および poly(P)₁₃₀ (1 mM) は影響を与えなかった (図 4)。したがって、poly(P) はマクロファージの生存に影響を与えることなく、iNOS 発現を抑制することが示された。

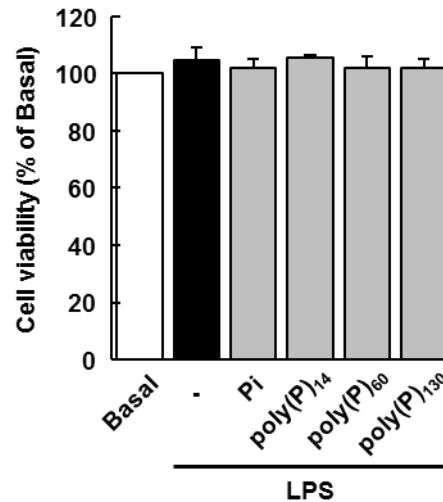


図4 LPS処置マクロファージの生存に及ぼすpoly(P)の影響

(7) LPS により活性化されたマクロファージは、iNOS の他、炎症性サイトカインである TNF を産生、放出する。poly(P)₁₄、poly(P)₆₀ あるいは poly(P)₁₃₀ (1 mM) の 5 分間の前処置は、LPS 誘発性の iNOS 発現を抑制したが、TNF 放出には大きな影響を与えなかった。また、poly(P)₁₄、poly(P)₆₀、poly(P)₁₃₀ (1 mM) を 24 時間前処置しても、LPS 誘発性 TNF 放出は抑制されなかった。したがって、poly(P) は LPS に対するマクロファージの反応をすべて抑制するわけではないことが明らかとなった。

本研究により、poly(P) は、抗菌作用、組織再生促進作用、骨形成促進作用に加えて、NO 産生を抑制することにより、インプラント周囲炎に対して有効性を示す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)

[学会発表] (計 6 件)

① Jayanthi Narasimha, Possibility of peri-implantitis treatment by using inorganic polyphosphate [poly(P)]: The

underlying mechanism of how poly(P) suppresses lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in macrophages, 40th Indian Prosthodontics Society Conference & 8th Biennial Meeting of Asian Academy of Prosthodontics, December 8, 2012, Chennai, India

②秀 和泉、ミクログリアの死細胞貪食における P2Y₂受容体の役割、第 122 回日本薬理学会近畿部会、2012 年 11 月 16 日、豊中市

③ Izumi Hide, Enhanced survival and phagocytic activity by Toll-like receptor 4 activation in rat microglia, The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, October 1-2, 2012, Kobe

④原田 佳奈、炎症病態に対するポリリン酸の効果とインプラント周囲炎治療への応用可能性、2012 年 9 月 22、23 日、大阪市

⑤ Izumi Hide, Toll-like receptor 4 activation promotes survival and phagocytic clearance in microglia: Possible involvement of purinergic receptors, Purine 2012, June 1, 2012, Fukuoka

⑥秀 和泉、ミクログリアの Toll-like 受容体 4 活性化に対する異なる細胞反応とプリン受容体を介した調節、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 佳奈 (HARADA KANA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：90609744

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：