

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463253

研究課題名(和文) 歯周病におけるレジスチンの病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological role of resistin on periodontal disease

研究代表者

林田 秀明 (HAYASHIDA, Hideaki)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：20238140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトレジスチンは、歯周病に関連し、歯周病原菌によって好中球から放出されることが既報において報告されている。本研究の目的は歯周病における病態生理学的役割を調べることである。本研究の結果において、リコンビナントヒトレジスチンはヒトの歯周組織を構成する細胞の遺伝子およびタンパク質の変化を起こさなかった。また、歯周組織を構成する細胞からレジスチンと特異的に結合する分子は同定されなかった。歯周病に対するレジスチンの役割を明らかにするためには更なる研究の必要がある。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have reported that human resistin is associated with periodontal disease and released from neutrophils stimulated by periodontal pathogens. The purpose of this study is to examine the pathophysiological role of resistin on periodontal disease. The results in this study showed recombinant human resistin do not significantly change genes and proteins in human periodontal cells and any specific receptors in human periodontal cells was not identified to interact with human resistin. Further study will be needed to clarify a role of resistin on periodontal disease.

研究分野：口腔保健学

キーワード：レジスチン 相互作用 歯周病

1. 研究開始当初の背景

レジスチンはマウスでは脂肪細胞より分泌される 12.5kDa のタンパク質で、その血中濃度と肥満度は相関し、血糖を上昇させる作用もあることから肥満とインスリン抵抗性に関連することが報告されている (Steppan et al., Nature, 2001)。一方、ヒトのレジスチンは脂肪細胞からの分泌はほとんど起こらず、単球やマクロファージといった炎症に関わる細胞から分泌されると言われている。(Kunnari et al., Regul Pept, 2009)。歯周病の特徴である歯槽骨吸収に関連して、レジスチンの影響を直接解析したものは見られないが、骨代謝におけるレジスチンの発現および制御に関する研究では、マウス由来骨芽細胞および破骨細胞ではレジスチンがそれらの分化に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、ヒト破骨細胞については十分に明らかにされていない (Thommesen et al., J Cell Biochem, 2006)。

歯周病患者と健常者の血清レジスチンレベルを比較した我々が実施した横断研究において歯周病患者の血清レジスチンは健常者よりも有意に高いことが示された (Furugen et al., J Periodontol Res, 2008; Saito et al., J Dent Res, 2008)。また、歯周病原細菌の表層タンパク質の発現の有無がヒト好中球からのレジスチンの放出に関連することを示した (Furugen et al., FEMS Microbiol Lett, 2011)。これらのことから歯周局所において、好中球由来のレジスチンが歯周病原細菌の感染に反応して上昇することが考えられ、歯周ポケット形成や歯槽骨吸収といった歯周病態形成において重要な役割を果たす可能性が考えられる。しかしながら、感染に反応して放出されるレジスチンの影響について、現在のところ明らかでない。

2. 研究の目的

歯周病態形成には、歯周病原細菌の感染、微小循環障害、過剰な免疫応答、炎症性組織破壊が関与することが知られているが、これらにレジスチンがどのような影響を与えるかについては明らかでない。本研究では、宿主因子の点からヒト由来の口腔上皮細胞、線維芽細胞等の歯周組織を構成する細胞におけるレジスチン受容体の検索・同定、レジスチンによって誘導される変動遺伝子の検出および特異的に発現するタンパク質の同定、口腔上皮細胞および線維芽細胞の細胞接着性に対する影響の有無を調べ、歯周病の直接的な病原因子の変化という点から歯周病の病原性歯周病原細菌の増殖や遺伝子レベル、タンパク質レベルでの発現に対するレジスチンの影響について調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) レジスチンの歯周病原細菌の増殖・タンパク質発現に対する影響の検討

レジスチンの最小発育阻止濃度の評価
歯周病原細菌として注目されている *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* を寒天培地に接種し滅菌ディスクに異なる濃度のレジスチンを含浸させ、寒天培地上に置き培養し、滅菌ディスク周囲に発育阻止円の評価を行った。

レジスチンを添加した培地での細菌増殖能の測定とタンパク発現量の変化の解析
異なる濃度のレジスチンが添加された液体培地に *A. actinomycetemcomitans* を接種し、経時的に吸光度を測定し、増殖に差がみられるか解析した。またレジスチンの濃度依存的にタンパク質の発現に変化がみられるかについて 2 次元電気泳動で解析した。

(2) ヒト由来口腔上皮細胞、線維芽細胞のレジスチンに対する相互作用を持つ分子の検索

細胞膜画分レジスチンとのインキュベート

コンフルエントに増殖した培養細胞を回収後、細胞膜画分を抽出し、タグ修飾されたリコンビナントヒトレジスチンとインキュベートした。プルダウン法によって親和性を有するタンパク質を分離して SDS 電気泳動を行った。

二次元電気泳動

細胞を可溶化し、遠心分離し上清をサンプルとする二次元電気泳動を行った。その後、ゲルを染色し固定後ゲルを乾燥させた。

(3) ヒト由来口腔上皮細胞、線維芽細胞におけるレジスチンによる変動遺伝子の検索・同定

標識 cDNA の調整

細胞から mRNA を抽出し、cDNA を作成後、cDNA 蛍光色素でラベルした。

DNA マイクロアレイによる発現遺伝子の変動の解析

ラベルした cDNA を DNA マイクロアレイにハイブリダイズし、スキャナでイメージを読み取り、イメージを数値化して、発現量を比較した。

(3) ヒト由来口腔上皮細胞、線維芽細胞にお

けるレジスチンによる特異的に発現するタンパク質の同定

二次元電気泳動

細胞を可溶化し、遠心分離し上清をサンプルとする二次元電気泳動を行った。その後、ゲルを染色し固定後ゲルを乾燥させた。

画像解析

スキャナでゲルのイメージを読み取り、イメージを数値化して発現量を比較した。

(4) 口腔上皮細胞および線維芽細胞の細胞接着に対するレジスチンの影響

細胞培養

基質がコートされた細胞接着プレートにの濃度の異なるレジスチンを加えて細胞を培養する。

細胞接着能の解析

非付着の細胞を洗浄除去し、プレートに付着した細胞を染色後吸光度測定し、細胞接着能を評価した。

4. 研究成果

(1) *A. actinomycetemcomitans* の増殖に対するレジスチンの影響を検討するために、ペーパーディスクに濃度の異なるレジスチンを添加して阻止円の形成の観察を行ったところ、血中濃度を超えても阻止円の形成は認められなかったため、抗菌的な働きは確認されなかった。また、増殖およびタンパク質の発現に対して顕著な変化は認められなかった。

(2) ヒト由来口腔上皮細胞、線維芽細胞を培養後、細胞膜画分を抽出し、レジスチンを磁気ビーズと修飾した合成レジスチンを用いてプルダウン法で受容体あるいはレジスチンと相互作用を持つ分子の同定を試みたが、レジスチンと親和性の非常に高い分子は同定されなかった

(3) ヒト由来口腔上皮細胞、線維芽細胞、破骨前駆細胞および破骨細胞をコントロール群（標準的な培養条件）、レジスチン処理群（レジスチン添加のみ）、およびレジスチンサイトカイン処理群（レジスチンおよび炎症性サイトカインである Interleukin-1、IL-6、Tumor Necrosis Factor ）の3条件で培養した後、細胞膜画分を抽出分離した。レジスチンに対して親和性の比較的高かったタンパク質の一次構造を決定した。既知のタンパク質であり、レジスチンに対して特異的な新規の受容体である可能性は低かった。レジスチンに対してどの部位の親和性が高いのか

について候補として残ったタンパク質の一次構造を基にペプチド断片化して部位を特定中である。

(4) 上記3条件で処理されたヒト由来口腔上皮細胞、線維芽細胞の mRNA を抽出し、逆転写酵素で cDNA を作成後蛍光色素でラベルし、DNA マイクロアレイ上のプローブ DNA とハイブリダイズさせたところ、発現に変化のある複数の遺伝子を認めた。同様に複数のタンパク質の発現変化も認めた。特異的な発現タンパク質スポットを切り出し、質量分析計で同定することで、変化のあった遺伝子およびタンパク質の関連の有無について解析している。

(5) ヒト由来口腔上皮細胞、線維芽細胞を細胞接着プレートに濃度の異なるレジスチンを加えて細胞を培養し、コートされたプレートに付着した細胞を染色し定量し、細胞接着への影響を評価した。細胞接着性に対してヒトレジスチンはやや阻害的に働く傾向があったが量反応関係は認められなかった。

(6) ヒト由来口腔上皮細胞、線維芽細胞をコントロール群（標準的培養条件）、レジスチン処理群で培養後、細胞溶解物および培養上清中の歯周病に関連するサイトカイン量を比較したところ、有意な差は認められなかった。

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 2 件)

林田 秀明、古堅 麗子、齋藤 俊行、
糖尿病関連疾患と歯周病：肥満、月刊糖尿病、査読なし、Vol. 6、No. 5、2014、
pp.78 - 83

Furugen R、Hayashida H、Saito T、
Porphyromonas gingivalis and
Escherichia coli lipopolysaccharide
causes resistin release from
neutrophils、Oral Diseases、査読有、
Vol. 19、No. 5、2013、pp.479 483、
doi: 10.1111/odi.12027.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林田 秀明 (HAYASHIDA, Hideaki)
長崎大学・病院 (歯学系)・講師
研究者番号: 20238140

(2) 研究分担者

齋藤 俊行 (SAITO, Toshiyuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・教授
研究者番号: 10170515

古堅 麗子 (FURUGEN, Reiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・助教
研究者番号: 90253674

(3) 連携研究者

なし