

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861795

研究課題名(和文) 実験的根尖性歯周炎における血管新生関連因子の局在および遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Localization and gene expression analysis of angiogenic factors in experimental periapical lesions

研究代表者

山中 裕介 (Yamanaka, Yusuke)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70649318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラット臼歯実験的根尖性歯周炎に対する血管新生関連因子の関与を追究した。NF- κ B阻害薬(NF- κ B デコイ核酸)投与下で根尖性歯周炎を誘発すると、根尖部透過像の面積とCD31陽性血管内皮細胞密度の有意な低下、およびVEGFR2、CXCL1、CXCR2 mRNAの発現低下が確認された。さらにラット血管内皮細胞とラット間葉系幹細胞をLPS存在下で共培養すると、NF- κ B デコイ核酸の添加により各細胞でのCXCL1、CXCR2 mRNAの発現低下と培養液中のVEGFの有意な減少が生じた。血管内皮細胞のNF- κ B 伝達経路が根尖性歯周炎の病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine the involvement of angiogenic factors in the development of experimental apical periodontitis in rat molars. Induction of apical periodontitis under the administration of an NF- κ B inhibitor (NF- κ B decoy) resulted in the reduction of (1) periapical radiolucent area, (2) CD31-positive endothelial cell density, and (3) mRNA expression levels of VEGFR2, CXCL1 and CXCR2. When rat endothelial cells and mesenchymal stem cells were co-cultured in the presence of LPS, addition of NF- κ B decoy resulted in the downregulation of CXCL1 and CXCR2 mRNA expression in these cells and a significant decrease of VEGF in the culture medium. These results suggest that NF- κ B signaling pathways in endothelial cells play a role in the pathogenesis of apical periodontitis.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：血管新生 根尖性歯周炎 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

血管新生とは既存の血管から新たな血管が分枝することで血管網の新たな構築が生じる現象であり、慢性炎症、創傷治癒などの過程で重要な役割を演じることが知られている。血管新生には血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial cell growth factor, VEGF)、interleukin-8 (IL-8) などのさまざまな因子が関与し、レセプターとの結合を契機として血管内皮細胞の増殖、遊走、分化等に役割を演じると考えられている。特に VEGF は最も血管内皮細胞に特異的な血管新生因子として知られている。

近年の研究から、VEGF が根尖病変において発現亢進しており²⁾、また、VEGF が血管を新生し、さらに血管透過性を亢進させることで炎症性細胞の集積を誘導し、根尖病変が成立・拡大していくとの報告がある³⁾。しかしながら、根尖性歯周炎発症過程での血管内皮細胞における VEGF/VEGF receptor (VEGFR) 2 を起点とする血管新生に関する知見は依然として限られている。

申請者は、ラット根尖性歯周炎病変部の血管内皮細胞における血管新生関連遺伝子の発現を、根尖性歯周炎の発症から成立まで経時的に検索した。その結果、根尖性歯周炎の拡大期に血管内皮細胞において、VEGFR2、B-cell lymphoma 2 (Bcl-2; 血管新生およびアポトーシス関連タンパク)、CXCL1 (ラット IL-8 関連ケモカイン)、CXCR2 (CXCL1 受容体) の mRNA 発現が有意に増加したことから、これらの因子が根尖性歯周炎の拡大に重要な役割を果たすことを示唆した。本研究計画は、以上の申請者の研究成果を進展させるべく立案されたものであり、血管内皮細胞における PI3K/Akt シグナル伝達経路の主要活性化因子である VEGF、あるいは本経路を介した血管新生への関与が知られる転写因子 NF- κ B に着目し、これらに対する阻害剤投与後の病態の変動を免疫組織化学的、分子生物学的に検索することにより、これらの血管新生関連因子のラット根尖性歯周炎の病変拡大への役割を追究することを目的とした。

2. 研究の目的

ラット臼歯実験の根尖性歯周炎の病態に対する血管新生関連因子阻害剤投与の影響を、免疫組織化学、および mRNA 発現解析 (Laser capture microdissection 法、リアルタイム PCR 法併用) にて追究し、これらの因子の関与の実態を解明することを目的とする。すなわち、転写因子 NF- κ B (血管新生関連シグナ

ル伝達経路の構成要素) に対するデコイ核酸投与で根尖性歯周炎を誘発し、以下の項目に対する阻害剤投与の影響を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 平成 25 年度:

ラット臼歯を露髄、LPS 貼付し、飼育中に血管新生関連因子阻害剤 (NF- κ B デコイ核酸) を投与しながら根尖性歯周炎を惹起させた後、以下の検索を行った。

X 線画像解析

マイクロ CT を用い、各観察期間における根尖病変の大きさを測定した。

病態に関する基礎的指標の組織学的・免疫組織化学的検索

病変組織の凍結切片を作成し、H-E 染色による病理組織学的検索を行なうとともに、免疫染色法により、Bax、Bcl-2、VEGF、免疫担当細胞関連マーカー ED1、血管内皮細胞マーカー CD31 および CD146、神経線維マーカー PGP9.5 および MAP1B 等に対する免疫染色および定量的画像解析を行なった。

血管新生関連因子への影響の検索

・血管密度の測定

CD31 (内皮細胞マーカー) に対する免疫染色後、定量的画像解析により血管密度の経時変化を解析した。

・各種血管新生関連因子の病変部内での局在

VEGF、Bcl-2 タンパクの局在を免疫組織化学的に検索した。

・血管内皮細胞における各種血管新生関連因子 mRNA 発現動態の解析

リアルタイム PCR 法にて VEGFR2、Bcl-2、Bax、CXCL1、CXCR2 の mRNA 発現レベルを解析した。

(2) 平成 26 年度:

ラット血管内皮細胞およびラット間葉系幹細胞を LPS で刺激し、3、12、24、48 時間培養した。血管内皮細胞および間葉系幹細胞それぞれの細胞増殖を細胞増殖 BrdU 発色キット用いて ELISA で定量した。またそれぞれの細胞より全 RNA を抽出し、VEGFR2、Bcl-2、CXCL1、CXCR2、VEGF、CXCL1、tumor necrosis factor (TNF)、IL-1、COX-2 の mRNA 発現の変化を検証した。さらに各培養時間経過後の培養液より培養上清を採取し、ウェスタンブロットにより VEGF のタンパク発現を解析した。

ラット血管内皮細胞およびラット間葉系幹細胞を3、12、24、48時間共培養し、LPSで刺激し、実験1と同様に細胞増殖とmRNA発現の経時的变化を検証した。さらに各培養時間経過後培養上清より、VEGFのタンパク発現をウェスタンブロットで解析した。

(3) 平成27年度：

前年度までのin vivoでの検索の再現性をin vitroで検証するために、NF- κ Bデコイ核酸を培養液に添加した状態でLPS刺激を行い実験1と同様に3、12、24、48時間培養し、細胞増殖とmRNA発現の経時的变化を検証した。さらに各培養時間経過後培養上清より、VEGFのタンパク発現をウェスタンブロットで解析した。

平成26年、平成27年度の研究結果より、NF- κ Bが根尖病変の成立に果たす役割が高いと示唆されたことより、論文を作成し、投稿準備中である。

4. 研究成果

ラットを用いたin vivoの実験的根尖性歯周炎においてNF- κ B競合的阻害薬NF- κ B decoyを投与すると、根尖部透過像の面積、CD31陽性血管内皮細胞の密度とも有意に低値を示した。遺伝子発現解析においては、根尖性歯周炎の成立期においては、NF- κ Bの発現を抑制すると、Bcl-2よりも、Baxの発現が著明に上昇することがわかった。NF- κ B阻害薬投与群においては、VEGFR2、CXCL1、CXCR2の発現の減少も観察された。

培養細胞を用いたin vitroでの実験において、ラット血管内皮細胞とラット間葉系幹細胞をNF- κ B decoyを混合した培養液にLPSを添加して共培養すると、in vivoの実験結果と同様、NF- κ B阻害薬投与群において著明な発現の上昇が観察され、それにともない、ラット血管内皮細胞とラット間葉系幹細胞のそれぞれの細胞においてCXCL1、CXCR2のmRNA発現の減少が観察された。さらにNF- κ B decoy混合群において培養液中のVEGFの有意な減少が観察された。

以上の結果から、血管内皮細胞のNF- κ B伝達経路が、実験的根尖性歯周炎の成立過程に關与している可能性が示唆された。

本研究結果は、現在論文として投稿準備中である。

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5件)

Shigetani Y, Yoshiba K, Kuratate M, Takei E, Yoshiba N, Yamanaka Y, Ohshima H, Okiji T. Temporospatial localization of dentine matrix protein 1 following direct pulp capping with calcium hydroxide in rat molars. *Int Endod J*. 2015; 48(6):573-81. doi: 10.1111/iej.12351 (査読有り).

Ito T, Kaneko T, Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshiba K, Okiji T. M2 macrophages participate in the biological tissue healing reaction to mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2014; 40(3):379-83. doi: 10.1016/j.joen.2013.11.011 (査読有り).

Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshiba K, Kaneko T, Yoshiba N, Okiji T. Evaluation of the responses of MHC class II molecule-expressing cells and macrophages to epoxy resin-based and 4-META-containing, methacrylate resin-based root canal sealers in rat subcutaneous tissue. *Dent Mater J*. 2013; 32(5):822-7. PMID: 24088840 (査読有り).

Kaneko T, Chochechanachaisakul U, Kawamura J, Yamanaka Y, Ito T, Sunakawa M, Suda H, Okiji T. Upregulation of p38 mitogen-activated protein kinase during pulp injury-induced glial cell/neuronal interaction in the rat thalamus. *J Endod*, 2013; 39(4):488-92. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.018 (査読有り).

Kaneko T, Arayatrakoollikit U, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Immunohistochemical and gene expression analysis of stem-cell-associated markers in rat dental pulp. *Cell Tissue Res*. 2013; 351, 425-32. doi: 10.1007/s00441-012-1539-9 (査読有り).

[学会発表](計12件)

Kawamura J, Kaneko T, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Suppression of astrocytic activation as antigen presenting cells in rat thalamus following dental pulp inflammation. *Dendritic*

Cell (DC) 2014. Loire Valley, France. 2014年9月14-18日.

Kaneko T, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Immune-LCM analysis of M1/M2 macrophages in engineered dental pulp tissues. IMC2014. Prague, Czech. 2014年9月7-12日

金子友厚 山中裕介, 伊藤崇史, 吉羽邦彦, 興地隆史. 再生歯髄組織内マクロファージにおける M1/M2 関連遺伝子の発現. 日本歯科保存学会. 滋賀県立芸術劇場(大津市). 2014年6月19-20日.

伊藤崇史, 金子友厚, 山中裕介, 興地隆史. ラット実験的歯髄炎における幹細胞関連遺伝子発現の経時的検索. 日本歯科保存学会. 滋賀県立芸術劇場(大津市). 2014年6月19-20日.

Ito T, Kaneko T, Yamanaka Y, Yoshida K, Shigetani Y, Okiji T. Accumulation of M2 macrophages in mineral trioxide aggregate-implanted tissue. The 15th Joint Scientific Meeting between the Japanese Society of Conservative Dentistry and the Korean Academy of Conservative Dentistry. Gyeongju, Korea. 2013年11月23-24日.

金子友厚, 山中裕介, 伊藤崇史, 吉羽邦彦, 興地隆史. 再生歯髄組織内におけるマクロファージの活性化と成熟. 日本顕微鏡学会第57回シンポジウム. 愛知県産業労働センター(名古屋市). 2013年11月15~16日.

Kawamura J, Kaneko T, Yamanaka Y, Ito T, Sunakawa M, Okiji T, Suda H. Analysis of Glial Cell-related Genes in Rat Thalamus following Pulpitis. IADR-ASIA. Bangkok, Thailand. 2013年8月21-23日.

Yamanaka Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. NF- κ B-blockade increases Bax/Bcl-2 ratio and reduces angiogenesis in periapical lesions. IADR-ASIA. Bangkok, Thailand. 2013年8月21-23日.

河村 隼, 金子友厚, 山中裕介, 伊藤崇史, 砂川光宏, 興地隆史, 須田英明. 実験的歯髄炎はラット視床におけるミクログリアを活性化させる. 日本歯科保存学会. 福岡国際会議場(福岡市). 2013年6月27-28日.

山中裕介, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史. NF- κ B の阻害はラット実験的根尖性歯周炎の拡大を抑制する. 日本歯科保存学会.

福岡国際会議場(福岡市). 2013年6月27-28日.

伊藤崇史, 金子友厚, 山中裕介, 興地隆史. ラット切歯実験的歯髄炎が幹細胞関連遺伝子の発現に与える影響. 日本歯科保存学会. 福岡国際会議場(福岡市). 2013年6月27-28日.

Kaneko T, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Immune-LCM analysis of M1/M2 macrophages in engineered dental pulp tissues The 55th Symposium of the Society for Histochemistry & Cost Nanonet. Prague, Czech. 2013年6月11-15日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 裕介 (YAMANAKA, Yusuke)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 70649318