

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463143

研究課題名(和文) 口腔内好中球ミトコンドリア機能制御による歯周治療の可能性を探る

研究課題名(英文) Explore the possibility of novel periodontal therapy by regulating mitochondrial function of oral polymorphonuclear leucocytes.

研究代表者

高橋 慶壮 (Takahashi, Keiso)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：70243475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎歯肉からアポトーシス抑制遺伝子FLIP mRNA発現の様態を調べ、約4割のサンプルから検出が可能であった。一方、口腔内好中球からはFLIP mRNAは検出されず、アポトーシス促進性のBadの発現量が高く、抑制性リン酸化Badの発現量が有意に低い結果を支持した。GCF中のIL-1beta, IL-6およびIL-17濃度上昇は歯周組織における炎症および免疫応答の結果と解釈された。酸化ストレス下における好中球は細胞内のグルタチオン濃度およびcaspase8が低下していたことから、アポトーシスに加えてネクローシスも関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The expression of the apoptosis inhibitor gene, FLIP mRNA, was examined from periodontitis gingiva by RT-PCR method, and it was possible to detect from approximately 40% of the samples. This result was consistent with the result that chronic inflammation persisted as a result of inhibition of cell death by apoptosis of lymphocytes infiltrating periodontitis gingiva. On the other hand, FLIP mRNA was not detected from the oral neutrophils, supporting the result that the expression level of pro-apoptotic Bad was high and the expression level of inhibitory phosphorylation was significantly low. The increased levels of IL-1 beta, IL-6 and IL-17 in GCF were interpreted as a result of inflammation and immune response in periodontal tissues. Both necrosis and apoptosis may be involved in the mechanism because neutrophils in oxidative stress have decreased intracellular glutathione concentration and caspase 8 activity.

研究分野：歯周病学

キーワード：口腔内好中球 活性酸素 ミトコンドリア アポトーシス オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

口腔内の感染防御が破綻すると、う蝕と歯周疾患だけでなく、菌血症や微小な慢性炎症が持続することで全身の健康を損なうことが数多くの学際研究から報告されている。とりわけ、誤嚥性肺炎、細菌性心内膜炎、2型糖尿病との双方向的な関係に関する研究が良く知られている。

申請者はこれまでの研究結果から口腔の感染防御に関わる主な細胞は好中球である可能性が高いと考え、これまでに唾液から回収した口腔内好中球について研究を行ってきた。

具体的には、「抗酸化剤を用いて口腔内好中球機能および細胞死を制御する機序に関する研究を継続して行ってきた。(〆谷暁子、高橋慶壮, Chowdhury SA. 口腔内好中球の分離方法の確立と活性化および細胞死誘導のメカニズム 明海歯科医学 36 : 90 ~ 102, 2007.) (平成 19・20 年度 科学研究費補助金により実施)

歯周炎局所で産生される活性酸素は歯周組織の破壊にも関与している可能性が高いため、強力な抗炎症および抗酸化作用を有するボスウェリン酸を歯周炎の治療にも有効に活用できる可能性は高い。これまでの研究から、口腔内好中球の活性化および細胞死誘導のメカニズムにも活性酸素が重要な役割を果たしており、過剰な活性酸素産生の抑制が歯周組織破壊の抑制に有効であろうと考えている。(平成 21~23 年度 科学研究費補助金により実施)

## 2. 研究の目的

SH 基を有する抗酸化剤を用いて酸化スト

レスを抑制し、口腔内好中球の生体防御機能を高めることで、生物学的根拠に基づく新しい歯周治療概念を構築することを目指して、口腔内好中球の細胞死およびミトコンドリア機能制御に関わるメカニズムを解析した。

## 3. 研究の方法

口腔内好中球から安定的に mRNA を回収するために RT-PCR 法で歯周炎歯肉からアポトーシス抑制遺伝子 FLIPmRNA 発現の様態を調べたところ、約 4 割のサンプルから検出が可能であった。この結果は歯周炎歯肉に浸潤したリンパ球がアポトーシスによって細胞死を抑制された結果、慢性炎症が持続する結果と矛盾しなかった。一方、口腔内好中球からは FLIPmRNA は検出されず、アポトーシス促進性の Bad の発現量が高く、抑制性リン酸化 Bad の発現量が有意に低い結果を支持した。

## 4. 研究成果

GCF 中の IL-1 $\beta$ , IL-6 および IL-17 濃度上昇は歯周組織における炎症および免疫応答の結果と解釈された。酸化ストレス下における好中球は細胞内のグルタチオン濃度および caspase8 が低下していたことから、アポトーシスに加えてネクローシスも関与していると考えられた。

ミトコンドリアの機能制御に関しては、活性酸素(ROS)による chitochrome c の産生亢進と caspase 活性の低下がみられたことから、caspase 非依存的な経路に関わる可能性があり、アポトーシスに加えて、オートファジーおよびミトコンドリアのマイトファジーに関わる分子群の検索に研究を発展させる必要がある。

## 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 6件)

1. 吉野浩正、伊東博司、高橋慶壮 ラット頭蓋骨に設置したチタンキャップ内面のハイドロキシアパタイト処理が垂直的骨増大に及ぼす効果 奥羽大学歯学誌 第44巻 第1号 p1-11 平成29年3月(査読あり)。
2. 森田 聡、遊佐淳子、高橋慶壮 Beta-リン酸三カルシウムがラット頭蓋骨に設置したチタンキャップ内面の垂直的骨増大に及ぼす効果 奥羽大学歯学誌 第44巻 第1号 p13-22 平成29年3月(査読あり)。
3. 石澤正晃、櫻井裕子、高橋慶壮 スタチンがラット頭蓋骨に設置したチタンキャップ内面の垂直的骨増大に及ぼす効果 奥羽大学歯学誌 第44巻 第1号 p23-33 平成29年3月(査読あり)。
4. Kakuta E, Nomura Y, Morozumi T, Nakagawa T, Nakamura T, Noguchi K, Yoshimura A, Hara Y, Fujise O, Nishimura F, Kono T, Umeda M, Fukuda M, Noguchi T, Yoshinari N, Fukaya C, Sekino S, Numabe Y, Sugano N, Ito K, Kobayashi H, Izumi Y, Takai H, Ogata Y, Takano S, Minabe M, Makino-Oi A, Saito A, Abe Y, Sato S, Suzuki F, Takahashi K, et al. (37名中32番) Assessing the progression of chronic periodontitis using subgingival pathogen levels: a 24-month prospective multicenter cohort study. BMC Oral Health. 17: 46, 2017. (査読あり)
5. 高橋 慶壮 歯周炎患者におけるインプラント周囲炎の病態と治療法 日本歯周病学会雑誌 58: 236-253, 2016. (査読あり)
6. Morozumi T, Nakagawa T, Nomura Y, Sugaya T, Kawanami M, Suzuki F, Takahashi K, et.al. (37名中7番) Salivary pathogen and serum antibody to assess the progression of chronic periodontitis: a 24-mo prospective multicenter cohort study. J Periodontal Res. 51: 768-778, 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計 6件)

1. 高橋慶壮 理想的な根管形成 日本顎咬合学会平成28年11月20日, コングレススクエア日本橋, 東京.
2. 山崎厚作、川西章、齋藤弘毅、鈴木幹子、高橋慶壮 セメント質剥離は歯周炎のリスク因子になり得る 日本歯周病学会 2016/10/7 朱鷺メッセ, 新潟市.

3. 川西 章 鳥居詳司 高橋慶壮 平井順 レントゲン写真上で根尖周囲透過像を有する患歯の再根管治療の予後 第37回日本歯内療法学会学術大会 平成28年7月23日(土)ウインクあいち, 名古屋市.
4. 川西 章 羽鳥智也 山崎厚作 高橋昌宏 高橋慶壮 Miller クラス I および III 歯肉退縮に対して垂直切開を行わない結合組織移植術で根面被覆を行った症例報告 平成28年5月21日(土) かがしま県民交流センター, 鹿児島市
5. 鈴木幹子, 川西章, 齋藤弘毅, 鳥居詳司, 高橋慶壮 遊離歯肉移植術を施行後の口蓋ドナー部疼痛緩和を目的としたシーネの有用性 第59回春季日本歯周病学会学術大会 平成28年5月20日(金) かがしま県民交流センター, 鹿児島市
6. 高橋慶壮 根管形成の暗黙知と形式知 日本顎咬合学会平成28年4月19日(日), JA 共済ビルカンファレンスホール, 東京.

〔図書〕(計 1件)

高橋慶壮(分担) 保存修復学専門用語集 第2版 129ページ 2017年 医歯薬出版株式会社

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

高橋慶壯、Keiso Takahashi、「奥羽大学・歯学部・教授」、70243475

(1)研究代表者  
( )

研究者番号：

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )