

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893304

研究課題名(和文) 無菌・常在菌モデルマウスによる歯周疾患発症メカニズムの形態・免疫学的解明

研究課題名(英文) Oral commensal flora accelerates age-related alveolar bone loss in mice

研究代表者

入江 浩一郎 (Koichiro, Irie)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50509594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、無菌状態のgerm-free (GF)マウスと口腔常在菌を有するspecific-pathogen-free (SPF) マウスを用いて、歯周組織の加齢変化に対する口腔常在菌の影響について検討した。SPFマウスでは、加齢に伴う歯槽骨吸収の有意な増加を認めたが、GFマウスでは歯槽骨吸収の加齢変化は小さかった。また、SPFマウスでは加齢に伴い、歯肉中のCD4⁺T細胞からのIL-17a等の炎症性サイトカインの発現の増加も認められた。口腔常在菌は、加齢に伴う顎骨吸収や炎症性反応の増加に影響を与えていると推測された。

研究成果の概要(英文)：Commensal flora has an influence on tissue homeostasis. In this study, we investigated the contribution of oral commensal flora on age-related alveolar bone loss in mice. Germ-free (GF) and conventionally reared (SPF) mice at 8 and 22 weeks old were used. The SPF mice but not GF mice showed age-related increase in alveolar bone loss, and there was a significant difference in alveolar bone loss between the two groups at 22 weeks old. The SPF mice exhibited the age-related increases in osteoclasts and CD4⁺, CD68 positive cells around the alveolar bone surface, compared to the GF mice. In addition, gene and protein expression of interleukin (IL)-17A and chemokine ligand (CCL) 5 in gingival tissues were higher at 22 weeks compared 8 weeks in SPF mice. Oral commensal flora accelerates age-related alveolar bone loss in mice. IL-17A and CCL5 released by T cells, may play an important role in commensal flora-induced bone loss during the aging.

研究分野：予防歯科学分野

キーワード：口腔常在菌 加齢 歯槽骨吸収 免疫応答

1. 研究開始当初の背景

常在菌は人の健康と密接に関係しており、宿主組織の構造や免疫応答に影響を及ぼしている。腸内のみならず口腔内にも常在菌が共存している。しかし、口腔常在菌と宿主組織である歯周組織にどのような関連があるかは不明な点が多い。近年、申請者は無菌状態の germ-free (GF) マウスと口腔常在菌を有する specific-pathogen-free (SPF) マウスの研究から、GF マウスの歯肉接合上皮の厚さや面積は、SPF マウスに比べて小さく、免疫応答細胞の遊走が不十分であることを報告した。また、GF マウスと SPF マウスとの顎骨形態の比較から、口腔常在菌は歯槽骨の代謝を促進していることも明らかにした。これらの結果は、口腔常在菌が歯周組織の免疫系を適切に制御することにより、歯周組織の健康維持に貢献していることを示唆している。

しかし、それらの結果は、断面的な評価によるものであるため、それらの現象が起こるタイミングについては不明であり、口腔常在菌によって生じる自然免疫応答についてより詳細に解明するためには、経時的な変化を把握する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、GF マウスおよび SPF マウスを用いて、歯周組織、特に歯槽骨や歯肉上皮における口腔常在菌による自然免疫機構のメカニズムを経時的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 8 週齢の GF・SPF マウスをそれぞれ 6 匹ずつ用いて、顎骨の採取を行った。下顎骨体から mRNA を抽出し、骨形成に関わる遺伝子発現を網羅的に解析した。

(2) 8 週齢と 22 週齢の GF・SPF マウスを 6 匹ずつ用いた。血清中の骨形成マーカーおよ

び骨吸収マーカーとして、osteocalcin と tartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRACP 5b) とを定量した。マイクロ CT を用いて、上顎骨のセメント・エナメル境から歯槽骨骨頂間の距離と歯槽骨密度を計測した。さらに、加齢による歯肉の遺伝子発現の変化も網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) real-time PCR 解析では、SPF マウスでは、osteocalcin やカテプシン K、といった骨のリモデリングに関与する遺伝子の発現が GF マウスと比べて有意に増加していた ($P < 0.05$)。これらの結果から、SPF マウスの方が GF マウスと比べて、歯槽骨のリモデリングが活発に行われている可能性が考えられる。

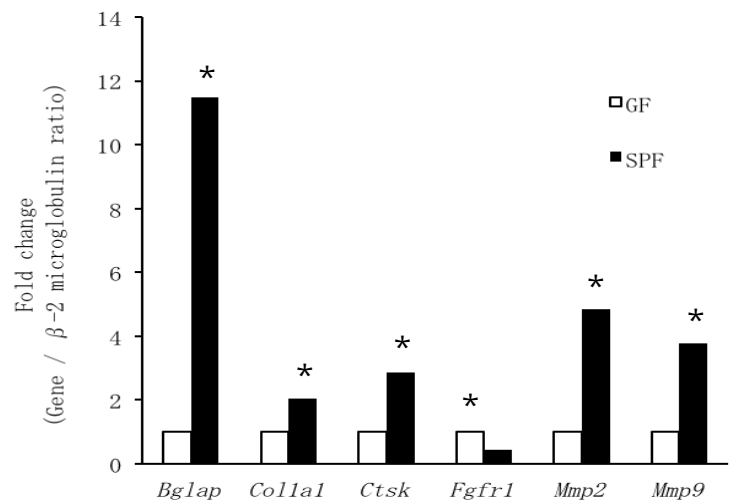


図 1 骨形成に関連した mRNA の発現の比較

(2) 22 週齢において、osteocalcin 濃度は、SPF マウスよりも GF マウスの方が有意に高くなった ($P < 0.01$)。TRACP 5b 濃度は、8 週齢と 22 週齢のいずれにおいても、GF マウスよりも SPF マウスの方が有意に高かった ($P < 0.01$)。

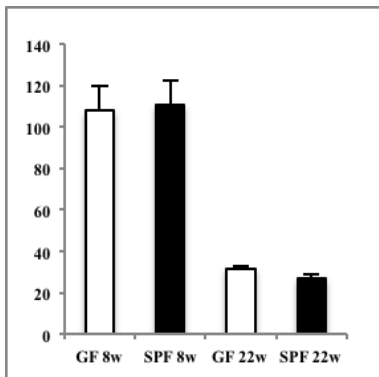


図 2 Osteocalcin 濃度の比較

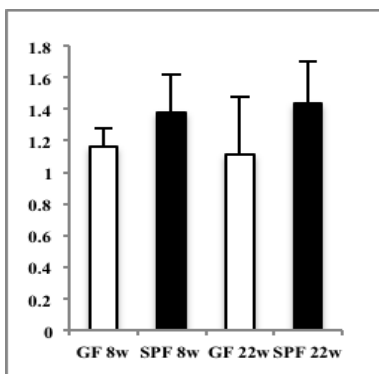


図 3 TRACP 5b 濃度の比較

歯周組織では、セメント・エナメル境から歯槽骨頂間の距離は、GF マウスよりも SPF マウスの方が、いずれの週齢においても有意に大きかった ($p < 0.01$)。さらに、SPF マウスでは、加齢に伴う歯槽骨吸収の有意な増加を認めたが ($p < 0.01$) GF マウスでは歯槽骨吸収の加齢変化は小さかった。これらの結果は、口腔常在菌を有する SPF マウスの方が無菌状態である GF マウスよりも加齢に伴う歯槽骨吸収が大きいことを示唆している。

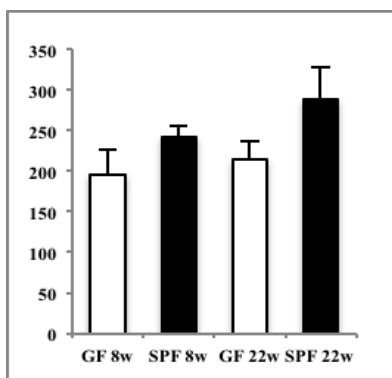


図 4 セメント・エナメル境から歯槽骨頂間の距離の比較

また、SPF マウスでは加齢による歯肉中の IL-17a の発現の増加もみられた。IL-17a は炎症性サイトカインの一つであり、常在菌のあるマウスでは加齢に伴う炎症性反応もみられたと考えられる。

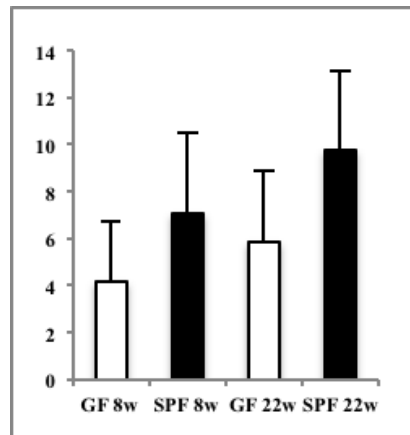


図 5 歯槽骨周囲の IL-17a 陽性細胞数の比較

以上のことから、口腔常在菌は、歯槽骨の代謝機能に活性化することが示唆された。また加齢に伴う顎骨吸収や炎症性反応の増加に影響を与えていると推測される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Greer A, Irie K, Hashim A, Leroux BG, Chang AM, Curtis MA, Darveau RP, Site-specific neutrophil migration and CXCL2 expression in periodontal tissue. J Dent Res, 査読有、in press

Irie K, Tomofuji T, Ekuni D, Morita M, Shimazaki Y, Darveau RP, Impact of Oral Commensal Bacteria on Degradation of Periodontal Connective Tissue in Mice, J Periodontol, 査読有、86巻、2015 899-905

〔学会発表〕(計 5 件)

Irie K. Oral commensal flora accelerates age-related alveolar bone loss in mice、第 63 回 JADR 総会・学術大会、2015 年 10 月 30 日、福岡

入江浩一郎、歯周組織の加齢変化に対する口腔常在菌の影響、第 58 回秋季日本歯周病学会、2015 年 9 月 12 日、浜松

Irie K. Commensal Bacteria Induces Inflammation in Periodontal Tissue、93th IADR General Session & Exhibition、2015 年 3 月 13 日、ボストン(アメリカ合衆国)

入江浩一郎、口腔常在菌に対する宿主防御機構への影響、第 63 回日本口腔衛生学会・総会、2014 年 5 月 30 日、熊本

入江浩一郎、口腔常在菌叢による歯周組織への影響、第 57 回春季日本歯周病学会学術大会、2014 年 5 月 23 日、岐阜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 浩一郎 (KOICHIRO Irie)

岡山大学病院・予防歯科・講師

研究者番号：50509594