

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 24 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592617

研究課題名（和文）：メカニカルストレス下の歯周病原因子による歯根膜線維芽細胞のシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）：Investigation of stretch-induced intracellular signal transduction in human periodontal ligament fibroblasts exposed to periodontopathic factors.

研究代表者：八木 孝和（YAGI TAKAKAZU）

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：10346166

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ヒト歯周組織構成細胞を用いて、メカニカルストレスによる細胞内シグナル伝達機構の解明と、歯周病原因子である内毒素性リポ多糖（LPS）に対する細胞応答性や、この細胞受容体に加えられたメカニカルストレスの影響について調べた結果、一軸方向に伸展的なメカニカルストレスを加えられたヒト歯根膜細胞は、MAPK シグナリングカスケードを介して炎症性サイトカインを発現すること、歯周病原因子による刺激を作用させた後に、同様のメカニカルストレスを加えると、MAP シグナリングカスケードを介した炎症性サイトカインの産生能が増強されることが分かった。以上より、LPS の病原性中心に対する細胞受容体は機械的変形による影響を受ける可能性が示唆されたが、さらなる研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the mechanism of intracellular signaling cascade with mechanical stress using the human periodontal ligament fibroblast(HPLF). And we investigated the cellular response of the active center of lipopolysaccharide (LPS) endotoxin which is a virulence factor of periodontal disease. Moreover, we researched the effect of mechanical stress against these cell receptors. As a result, we confirmed that HPLFs were expressed on the inflammatory cytokines via the MAPK signaling cascade in the uni-axial stretch. Next, we found that the expression of inflammatory cytokines through the MAPK signaling cascade was enhanced by the mechanical stress after stimulating by the virulence factors of periodontal disease.

Therefore, it is suggested that the cell receptor against the center of virulence of LPS might be affected by the mechanical deformation. Further study is required in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：メカニカルストレス, ヒト歯根膜細胞線維芽細胞, 細胞内シグナル伝達機構

1. 研究開始当初の背景

メカニカルストレスが、種々の宿主細胞に与えられると様々な化学伝達物質を産生することが知られており、心・血管系組織においては心肥大や動脈硬化などを惹起することが報告されている。また、線維芽細胞では機械的伸展刺激が細胞表面のイオンチャネルや接着因子などに作用し、細胞内シグナル伝達経路を介して細胞増殖を誘導することが明らかにされている。他方、歯根膜線維芽細胞は歯と歯槽骨の間に介在しているため、咀嚼や咬合力ならびに矯正力といったメカニカルストレスを常に受けており、メカニカルストレスが種々のサイトカインや骨基質に関する物質を誘導し、骨の吸収や添加に影響することが示唆されている。しかし、メカニカルストレスが歯根膜線維芽細胞の種々の細胞内シグナル伝達経路のいずれの経路を活性化あるいは抑制するかについては十分に解明されていない。また、細胞種や伸展刺激方法により異なったシグナル伝達系を活性化する可能性があり、矯正治療を想定した、一軸方向への伸展刺激に対する詳細な報告は少ない。一方、口腔内には歯周病原細菌が棲息し、これらの産生する病原因子が歯周組織構成細胞の細胞内シグナル伝達経路を活性化し、炎症性サイトカイン産生を誘導することが知られている。しかし、メカニカルストレスによる細胞形態変化が歯周病原因子の影響下でどのような影響を及ぼすのかについては不明な点が多い。また、近年、成人矯正治療が増えており、常在細菌叢が形成されている口腔内において、矯正的な歯の移動に伴うメカニカルストレスが、宿主細胞の歯周病原細菌に対する応答性にどのような影響を及ぼすかについて明らかにすることは臨床的にも興味深い、いまだ十分にその

メカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

宿主細胞は、伸展刺激負荷により細胞内シグナル伝達系を活性化して細胞増殖や化学伝達物質の産生を誘導することが知られている。また、歯周病原細菌が存在する口腔内で、咬合力やブラキシズム等の物理的刺激に歯周組織構成細胞は晒されるが、どのような免疫機構が上記刺激に反応するのか未解明である（図1）。そこで本研究は、歯周組織構成細胞におけるメカニカルストレスの細胞内シグナル伝達機構を探究するとともに、これらストレス負荷細胞における歯周病原因子との相互作用の一端について、免疫分子生物学的に明らかにすることを目的とした。

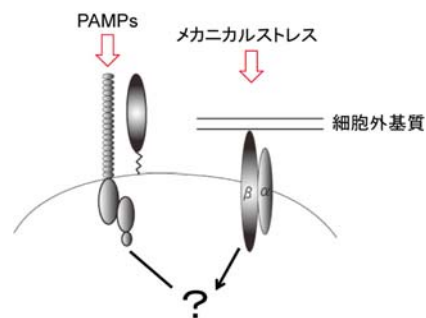


図 1

3. 研究の方法

アルカリフォスファターゼ活性によって歯肉線維芽細胞と区別され、歯肉線維芽細胞と比較して HLA MHC-DR- α と MMP-1 に強い陽性反応を示した2種類の細胞株を用いて、ヒト培養歯根膜細胞 (human periodontal ligament fibroblasts) を 5~12 代継代培養 (37°C, 5%, CO₂ 条件下で 10% FBS と 50 μ g/mL の streptomycin 含有の α -MEM) し、10% フィブロネクチンコートしたシリコンチャンバーに 1.0x10⁵ 個/ml の細胞を播種した後、次

の実験を行った。

実験 1) 伸展刺激単独で培養細胞に作用させた場合の炎症性サイトカイン産生能 (ELISA 法) と細胞内シグナル伝達経路 (ウェスタンブロットング法) を調べた。(結果 1, 2 に対応)

実験 2) 歯周病原性因子である液性成分 (Pam3CSK4) を加えた条件下で、伸展刺激を加え、炎症性サイトカインの遺伝子発現 (Real time PCR) を調べた。(図 2、結果 3 に対応)

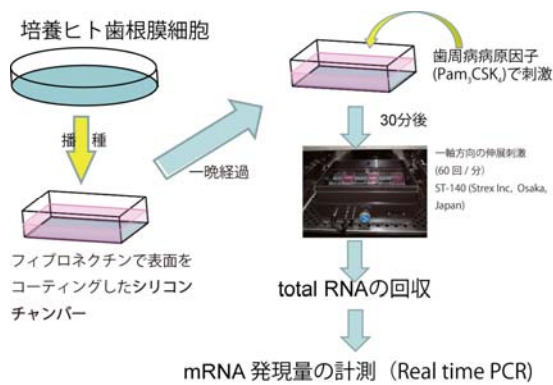


図 2

なお、統計処理は危険率 1% でステューデント t 検定 (結果 1) と ANOVA 検定 (結果 3) を行った。

4. 研究成果

結果 1. 伸展刺激 (48 時間) に対するサイトカイン産生能について

伸展刺激は炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) を有意に産生したが、MCP-1 の産生は不安定であった。(図 3)

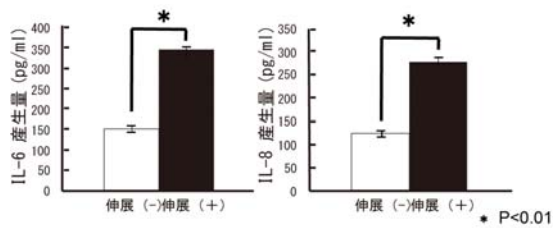


図 3

結果 2. 伸展刺激に対する MAPK ファミリーのリン酸化動態について

細胞内シグナリングカスケードはストレス性刺激に反応する MAPK 系のリン酸化反応 (刺激負荷刺激後 1 分で p38MAPK, 15 分で ERK1/2, 60 分で JNK のリン酸化) を認めた。ポジティブコントロールとした歯周病原性因子は約 30 分で其々のリン酸化を認めた。ただし、NF- κ B のリン酸化は明確に観察できなかった。(図 4)

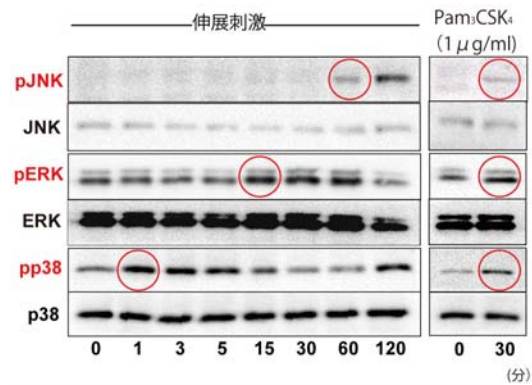


図 4

結果 3. 共刺激に対する炎症性サイトカイン遺伝子発現量について

共刺激下で IL-6, IL-8 および MCP-1 mRNA の発現が伸展刺激開始 90 分から 150 分で最大を示し、歯周病原性因子および伸展刺激それぞれ単独に比較して 150 分後も持続して高い発現を示した。(図 5)

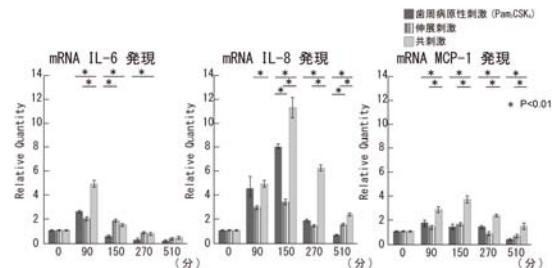


図 5

考察

本研究に用いた伸展刺激の条件下で、ヒト歯根膜線維芽細胞は、MAPK シグナリングカスケードを介して炎症性サイトカインを発現する結果を得た。(結果 1, 2) また、歯周病原性因子の影響下で物理的刺激を作用させると、同経路のシグナリングカスケードを介して炎症性サイトカインの発現が増強される可能性が示唆された。(結果 3)

特に歯周病原性因子の中核部分をなす因子との現象を調べたものはなく、結果的に、IL-8 mRNA の発現が量とともに時間的に持続的な発現に対して強く影響を受けることが示唆された。これは、相乗・相加的に一次的に作用を増強するだけではなく、伸展刺激は細胞表面性状(特に受容体)に影響を与え、液性因子に対する感受性に作用する可能性を示唆するものである。臨床的に、歯周病に罹患している歯周組織に咬合性外傷や矯正力等の過大な伸展性メカニカルストレスが加わると、持続的な炎症作用が強く作用することを示していると考えられる。しかし、更に詳細な構造のおよび免疫分子生物学的な研究が必要である。

結論

歯根膜細胞への伸展刺激は歯周病原性因子に対する炎症性サイトカインの発現能を増強する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)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Sakaguchi, K., Yagi, T., Nagata, J., Kubota, T., Sugihara, K. and Miyawaki, S., et al., Patient with oculo-facio-cardio-dental syndrome

treated with surgical orthodontics. Am J Orthod Dentofacial Orthop., 査読有, 2012 Apr;141(4 Suppl):S159-70. DOI: 10.1016/j.ajodo.2011.10.020

② Ogawa, T. and Yagi, T., Bioactive mechanism of Porphyromonas gingivalis lipid A, Periodontology 2000, 査読有, 2010 Oct;54(1):71-7. ODI:10.1111/j.1600-0757.2009.00343.x

[学会発表] (計 2 件)

① 八木孝和, 前田 綾, 植田絃貴, 菅 真由, 宮脇正一, 歯周病原性因子存在下における培養ヒト歯根膜線維芽細胞への物理的刺激による細胞内シグナル伝達系の動態検討 日本矯正歯科学会 2011 年 10 月 18 日-20 日名古屋 古屋市

[図書] (計 1 件)

① 八木孝和, 友成 博, 小山勲男, 宮脇正一, クインテッセンス出版, 矯正治療の視点(歯周-矯正治療 STOP & GO: 伊藤公一, 保田好隆 編著), 査読無, 2012, p50-66.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木孝和 (YAGI TAKAKAZU)

鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・講師

研究者番号: 10346166

(2) 研究分担者

宮脇正一 (MIYAWAKI SHOUICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 80295807

(H23~)

松口徹也 (MATSUGUCHI TETSUYA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10303629

(H23～)

引頭 毅 (INTO TAKESHI)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：10360918

(～H21)

(3)連携研究者

北井則行 (KITAI NORIYUKI)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：20271025