

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 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792101

研究課題名（和文）薬物によりポケットリダクションを図る新たな歯周薬物療法への展開

研究課題名（英文）Development of a new antimicrobial agent therapy to plan periodontal pocket reduction

研究代表者

長野 孝俊（NAGANO TAKATOSHI）

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：10386914

研究成果の概要（和文）：本研究では、アジスロマイシン（AZM）の歯肉線維芽細胞（hGFs）および歯根膜細胞（hPDLFs）に及ぼす影響について検討した。

LPS 刺激下において、hGFs のみで AZM 濃度依存的に IL-6, IL-8, MMP-1 および TIMP-1 の発現を増強させたが、hPDLFs では変化はなかった。

今回の研究により、歯肉局所において AZM が IL-6 や IL-8 を増強させて炎症の改善に寄与し、かつ MMP-1 の遺伝子発現の増強させることで結合組織のリモデリングを促進させ、歯周ポケットの減少が生じるメカニズムが存在することが考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of AZM on human gingival fibroblasts (hGFs) and human periodontal ligament cells (hPDLFs) by measuring the expression levels of the inflammatory cytokines IL-6 and IL-8, as well as MMP-1, and TIMP-1 and which are associated with connective tissue remodeling.

The mRNA expression of IL-6 and IL-8 in hGFs was upregulated by AZM dose-dependently under LPS stimulation conditions. However, hPDLFs showed no association between AZM and IL-6 or IL-8. The hGFs upregulated MMP-1 and TIMP-1 in response to AZM dose-dependently. In addition, the hPDLFs did not exhibit differences in expression of MMP-1, MMP-2, TIMP-1, or TIMP-2.

We speculate that such highly concentrated AZM would be able to suppress periodontal pathogenic bacteria, destroy an already formed biofilms and periodontal pocket reduction in short time period.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯学、細胞・組織、歯周薬物療法

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は歯肉縁下プラークに存在する複数の歯周病原性細菌によって引き起こされる混合感染性疾患である。歯肉縁下プラークには多種多様な細菌が存在し、極めて複雑な細菌叢を形成している。現在行われている一般的な歯周病治療の方法は、口腔内の徹底したプラークコントロールであり、患者自身が行うブラッシングや、歯科医師による器具を用いた感染物質の機械的除去療法（スクーリング・ルートプレーニング:以下 SRP、ポケットキュレタージ:以下 P-cur）が主流である。この方法に疑いの余地はないが、全顎的に SRP や P-cur を行う場合、1 ヶ月から 2 ヶ月以上の期間が必要となる。その期間中は口腔内には処置部位と未処置部位が混在することとなり、Sumida らの同一口腔内に存在するインプラント周囲溝と歯周炎罹患歯のポケット内から同一の遺伝型を持つ細菌が検出されたとの報告（Int J Oral Maxillfac Implants, 17: 696-702, 2002）を踏まえても、未処置部位から既に処置した部位へ口腔内細菌が伝播することによって再感染を起こす危険性があると考えられる。

これに対し、Quirynen ら（J Dent Res, 74: 1459-1467, 1995）は、歯周病原性細菌を短期間で口腔内から一気に排除することを目的として、機械的除去療法と薬物療法とを併用する Full-mouth disinfection という方法を考案した。この方法はクロルヘキシジンを用いながら 1 日で全顎の SRP を行う方法で、細菌学的に優れた結果を示した。

そこで研究代表者は、日本では高濃度で口腔粘膜への適用が認められていないクロルヘキシジンではなくマクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシン（以下:AZM）を事前に服用させ、血液中の薬剤濃度が高い状態で全顎の SRP を行う「AZM を用いた Full-mouth SRP（以下:FM-SRP）」という方法を

を考案し、劇的な臨床症状改善効果と細菌学的検索結果を報告した（J Periodontol, 78: 422-429, 2007）。

しかしながら、この報告ではアジスロマイシンには抗菌薬としての作用以外に歯周ポケットが改善され、歯肉退縮が生じる何らかの作用を有することが予想されるが、基礎研究データによる検討や客観的な分析が今後必要であると考察している。

また、最近では腎臓移植などの臓器移植治療を受けた患者が服用する免疫抑制剤（シクロスポリン A）の副作用により生じた歯肉増殖を AZM によって改善させる治療法が医科領域で行われている。この作用はマトリックスメタロプロテアーゼ-2（MMP-2）の発現が増強されるため引き起こされるとの報告がある（JY. Kim ら, J Dent Res, 87: 1075-1079, 2008）が、未だ不明な点が多い。

これらの学術的背景を踏まえ、ヒト歯肉線維芽細胞の培養系を用いて細胞・遺伝子レベルにおける治癒メカニズムについて検索し、複数種の抗菌薬（他のマクロライド系抗菌薬やペニシリン系、セフェム系、テトラサイクリン系など他系統の抗菌薬）の検討を行い、新たな歯周薬物療法の展開を図るために本研究を計画した。

2. 研究の目的

研究代表者は、重度歯周炎患者に内服抗菌薬として AZM を投与した場合、極めて有効な濃度で歯周炎罹患部位局所に集積されることを既に報告（J Periodontol, 78: 918-923, 2007）しており、この特徴的な作用を有する薬剤と FM-SRP とを併用することによって、効果的な治療結果が得られる可能性があると考えている。しかしながら、AZM が歯周炎罹患部位に集積されるメカニズムは完全に明らかとはなっていない。そこでまず、マク

ロファージの遊走に関わるインターロイキン-6 (IL-6) や、好中球の遊走に関わる IL-8 などの食細胞に関わる炎症性サイトカインの挙動をヒト歯肉線維芽細胞の培養系にて明らかにすることを目的とした。

また、AZM の影響によって起こる歯周ポケットの減少や歯肉増殖抑制のメカニズムに関する報告は少なく、抗菌薬の種類別における治療効果の相違についても検討はされていない。これらの作用機序を研究期間内に明らかにすることで、抗菌薬としての作用にばかり注目が集まっている AZM の別の可能性を引き出すことで、新たな歯周薬物療法の展開を図ることができると考え、実験を計画した。

3. 研究の方法

<平成 22 年度>

研究代表者は各種未分化間葉系細胞の培養システムと生理活性物質の影響を評価するバイオアッセイシステムを構築し、*in vitro*における炎症実験モデルを確立した。

起炎状態となったヒト歯肉線維芽細胞に AZM を添加し、その生理活性をバイオアッセイ (細胞増殖能の測定、I 型コラーゲン合成能の測定、MAPK の活性化の検討など) にて分析した。また、AZM による刺激後、経時的に RNA を抽出して RT-PCR を行い、炎症に関連し食細胞の遊走に関わる炎症性サイトカインの遺伝子 (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) や、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの代謝や分解に関わる遺伝子 (MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2) の発現を解析した。

<平成 23 年度以降>

ヒト歯根膜細胞や歯肉上皮細胞でも同様の実験系の確立を目指し、安定したデータが得られたヒト歯根膜細胞に関して、バイオアッセイを行ってヒト歯肉線維芽細胞との相違を比較した。

また、詳細な分析が必要となった炎症性マーカーに関しては、タンパクレベルでの裏付けを行うために、培養上清を用いた ELISA や培養細胞から直接タンパク質を抽出して、その資料を用いてウエスタンブロットを行い、比較検討した。

4. 研究成果

マクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシン (AZM) を併用して全顎のスクレーリング・ルートプレーニング (SRP) を行う歯周薬物療法を施術することにより、早期に患者の歯肉の炎症や腫脹が改善され、顕著な歯周ポケットの減少が引き起こされるという報告が散見されるが、その治癒のメカニズムについては詳細が不明であるため、AZM の歯周組織における影響を分子生物学的手法で検索する実験を行い、以下の知見を得た。

第一に *in vitro* におけるさらに安定した炎症実験モデルを確立するために、ヒト歯肉線維芽細胞 (hGFs) に対して LPS による刺激を行って炎症を惹起させる実験系が毎回同じ条件となるようにテストし、炎症実験モデルを確立した (図1)。

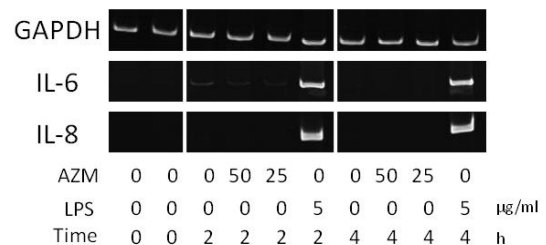


図1 : hGFs の炎症実験モデル

LPS の添加 2 時間後と 4 時間後において炎症性サイトカインである IL-6 や IL-8 の遺伝子発現が増強され、LPS の影響により歯肉線維芽細胞は炎症状態になった。

その後、起炎状態となったヒト歯肉線維芽細胞に AZM を添加し、細胞増殖能を測定した。また、AZM による刺激後、経時的にトータル RNA を抽出して RT-PCR を行い、炎症に関連し食細胞の遊走に関わる炎症性サイトカインの遺伝子 (インターロイキン-6, インターロイキン-8) や、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの代謝や分解に関わる遺伝子 (MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2) と歯周組織を構成する主要な細胞外マトリックスである I 型コラーゲンの発現を解析した。

LPS 刺激下において、ヒト歯肉線維芽細胞は AZM 濃度依存的に IL-6, -8 の遺伝子発現を増強した (図2)。

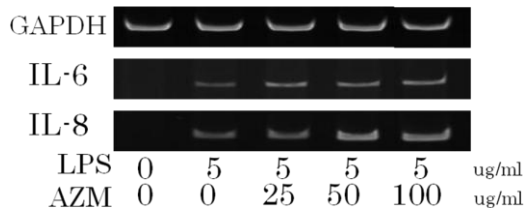


図2 :hGFsにおけるLPS刺激下でのIL-6, IL-8の発現に与えるAZMの影響

また、AZM濃度依存的にヒト歯肉線維芽細胞のMMP-1およびTIMP-1の発現を増強した。しかし、MMP-2の発現はわずかであり、TIMP-2には変化が認められなかった(図3)。

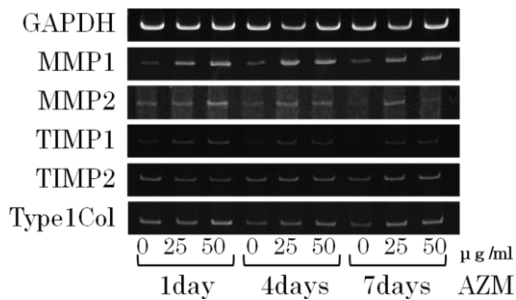


図3 :hGFsにおけるMMP-1, MMP-2, TIMP1, TIMP2の発現に与えるAZMの影響

以上のことから、ヒト歯肉線維芽細胞に対するAZMの作用の一端が初年度に明らかとなった。

平成23年度は、試料としてヒト歯根膜細胞を用い、ヒト歯根膜細胞に対するAZMの反応性を検索するために各種バイオアッセイを行って、ヒト歯肉線維芽細胞におけるAZMの影響と結果を比較した。その結果、双方において細胞増殖能には影響を与えないことが確認された。また、ヒト歯根膜細胞ではIL-6やIL-8の遺伝子発現はさほど増強されなかったため、これらの炎症性サイトカインのAZMによる増強反応は、歯肉組織に対して特徴的なものである可能性が示唆された。

また、ヒト歯肉線維芽細胞の炎症性サイトカインの亢進反応が、細胞内シグナル伝達経路の中でも、どの経路を介した反応なのかを検討するため、ウェスタンブロット法を用いてタンパクレベルでの解析を行ったところ、NF-κBのシグナルを介する反応であることが明らかになった(図4)。

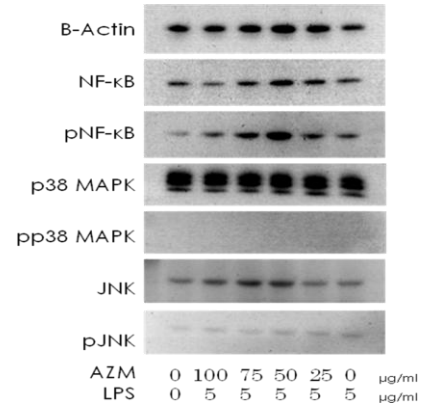


図4 :AZM存在下における各種炎症性マーカーの発現変化

平成24年度は、引き続きヒト歯肉線維芽細胞におけるAZMの炎症性サイトカインの亢進について、タンパクレベルでの解析を行った。その結果、p38MAP-KやJNKのリン酸化は関連性がないことが確認された(図4)。また、ペニシリン系抗菌薬とテトラサイクリン系抗菌薬を使用して、前述したような一連のバイオアッセイを行ったところ、AZMで生じるような炎症性サイトカインの亢進は生じなかった。

以上のことから、ヒト歯肉組織に対するAZMの作用とその概要が明らかとなった。

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)

[学会発表] (計3件)

- ① 山口貴央、長野孝俊、五味一博、桃井保子
「アジスロマイシンによる歯肉線維芽細胞の炎症性サイトカイン産生亢進」
2012. 5. 18~19 : 第55回春季日本歯周病学会学術大会 (札幌)
- ② 長野孝俊、山口貴央、近藤由佳、田村紗恵子、五味一博、新井 高
「アジスロマイシンの歯肉および歯根膜線維芽細胞に及ぼす影響」
2011. 5. 27~28 : 第54回春季日本歯周病学会学術大会 (福岡)
- ③ K. Gomi, Y. Yamaguchi, T. Nagano, Y.

Momoi, T. Arai
「Effect of Azithromycin to Gingival
and Periodontal Ligament
Fibroblasts」
2010.10.30～11.2 : AAP 96th Annual
Meeting
(Honolulu, U.S.A)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 孝俊 (NAGANO TAKATOSHI)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号 : 10386914

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし