



歯周組織破壊におけるケモカインの役割に関する
実験病理学的研究

—ケモカイン特異抗体の治療薬としての効果の基礎的検討—

(研究課題番号 12671773)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者

宮内睦美

(広島大学歯学部助教授)



はしがき

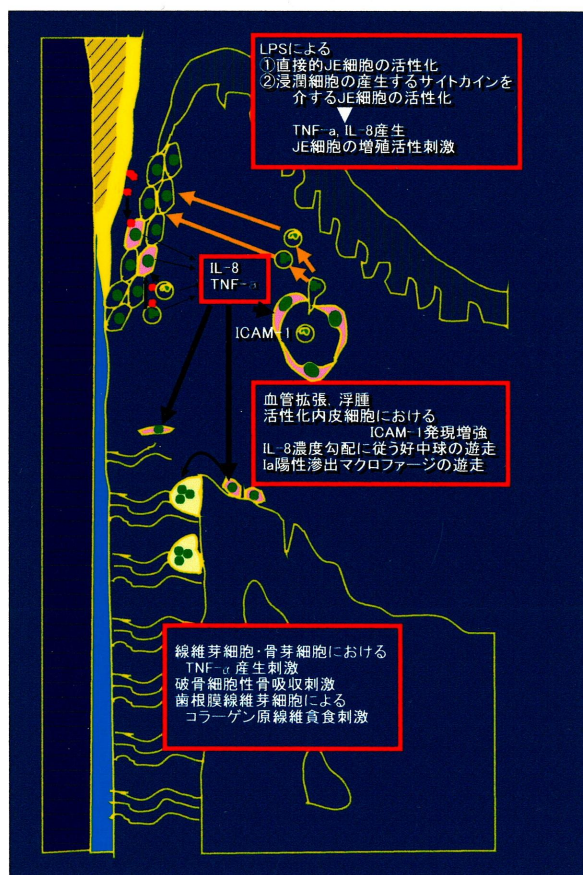
この研究報告書は、平成12～13年度の2年間に組織された基礎研究(C)(2)『歯周組織破壊におけるケモカインの役割に関する実験病理学的研究』において得られた成果に、その後1年間にわたって追加した研究結果をあわせて取りまとめたものである。

辺縁性歯周炎は、好中球・リンパ球・単球／マクロファージ等の種々の炎症細胞浸潤を伴う疾患である。近年、局所への白血球浸潤とその活性化に宿主細胞から産生される種々のケモカインが関わることを示されている。中でも macrophage chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-2 はマクロファージや好中球を局所に集簇させることによって急性炎症の際の組織障害に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかしながら、実験モデルを用い歯周炎発症過程におけるケモカイン産生状況と白血球浸潤との経時的関係やその特異抗体の治療薬としての効果を明らかにした研究は未だない。

本研究では、まず、①免疫組織化学的手法、ならびに *in situ* ハイブリダイゼーションを用い正常歯周組織におけるMCP-1, MIP-2の蛋白やmRNA発現状況を検討する。次に②LPSを歯肉溝より浸透投与することにより、MCP-1, MIP-2ケモカインの辺縁歯周組織での発現の変化や産生細胞を明らかにするとともに、③組織計測学的に検討した辺縁歯周組織への好中球やマクロファージの浸潤状況との関係を明らかにする。さらに、④LPSと同様の方法で投与したmMIP-2やケモカイン抗体の腹腔内前投与が辺縁歯周組織における好中球の浸潤に及ぼす影響を調べることにより、歯周組織破壊におけるケモカインの重要性、ならびにケモカイン抗体の歯周炎治療薬としての有用性について明らかにしたい。

歯周炎は、安定期と急性増悪期を繰り返しながら段階的に進行する慢性炎症性疾患で、結合組織破壊と歯槽骨吸収は急性増悪期に起こるとされている。

我々は、これまでラットの実験モデルを用い、右図で示すようにLPS侵襲によって *in vivo* 辺縁歯周組織に惹起される組織変化を様々な角度から検討し、5mg/ml LPS投与により接合上皮(JE)およびJE直下結合組織内への好中球浸潤、上皮下結合組織での血管拡張や浮腫、投与後2日目をピークとする滲出マクロファージの浸潤、歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン原線維貪食の増加や投与後3時間と3日目をピークとした破骨細胞数の増加が惹起されること、その際、辺縁歯周組織では、浸潤細胞だけでなくJE細胞や線維芽細胞などの組織構成細胞もTNF- α やIL-1 β などの起炎症性サイトカインの産生を一過性に過剰に産生し、LPS刺激に続く炎症反応や歯周組織破壊に重要な役割を担う可能性を *in vivo* の組織において明らかにしてきた。



広島大学図書

0130484441



我々がこれまで様々な角度から検討してきたラットの実験系は歯周炎の急性増悪期の実験モデルとして有用である。この実験モデルを用い急性増悪期に生体内で起こると考えられる様々な事象を経時的に解明し、ケモカイン抗体の治療薬としての効果を *in vivo* で評価することが本研究の特色であり、独創的な点である。

この研究の予想される結果として、①歯周組織におけるMCP-1, MIP-2蛋白やmRNAの発現状況や産生細胞が明らかになるとともに、②LPSの投与によりこれらの細胞におけるMCP-1やMIP-2の発現誘導や増強がみられること③辺縁歯周組織におけるMCI-1, MIP-2蛋白の発現はそれぞれ局所へのマクロファージや好中球の集簇と関係していること、④rMIP-2の投与が辺縁歯周組織へのマクロファージや好中球の浸潤を実際に誘導することやMIP-2の抗体がLPSによる白血球遊走とそれに引き続く組織破壊を阻止することを明らかにできると考える。

以上、歯周炎治療薬としてのケモカイン特異抗体の有用性に関する基礎的知見を得ることに意義があると考ええる。

これまで、ケモカインの作用に関する報告は生化学的あるいは培養細胞を用いたものが主で、本研究のようにラットの実験的歯周組織破壊モデルを用い *in vivo* 歯周組織でのMCP-1やMIP-2ケモカインの発現と白血球浸潤との関係を詳細に検討した研究はない。また、*in vitro* でみられた作用が種々の要因が複雑に作用しあう *in vivo* の組織において実際にどの様に発揮されているかを実験モデルを用い時間を追って総合的に明らかにしていくことは歯周病の発生過程を解明し、治療法を確立していく上で必要不可欠なことであると考ええる。なお、本実験モデルは治療効果の評価の場としても有用である。

研究組織

研究代表者:宮内 睦美 (広島大学・歯学部・助教授)
研究分担者:高田 隆 (広島大学・歯学部・教授)
研究分担者:小川 郁子 (広島大学・歯学部付属病院・講師)
研究分担者:工藤 保誠 (広島大学・歯学部・助手)
研究分担者:佐藤 淳 (広島大学・歯学部・助手)
在外研究員出張により平成13年1月30日まで参加
平成13年4月1日より工藤に代わって参加

交付決定額 (配分額)

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	1,900	0	1,900
平成13年度	1,400	0	1,400
平成 年度			
平成 年度			
平成 年度			
総計	2,300	0	2,300

研究発表

(1)学会誌発表

- 1)宮内睦美, 高田 隆, 伊東博司, 竹腰利嗣, 金田俊彦, 小川郁子, 二階宏昌: LPS投与後ラット臼歯部歯周組織におけるCXC-ケモカインの発現に関する免疫組織化学的検討: 日本歯周病学会誌41巻(春季特別号):143.
- 2)宮内睦美, 高田 隆, 竹腰利嗣, 小川郁子, 二階宏昌: LPS投与後のラット辺縁歯周組織におけるマクロファージ走化性因子の発現に関する免疫組織化学的検討: 日本歯周病学会誌42巻(春季特別号):
- 3)宮内睦美, 北川尚嗣, 平岡雅恵, 佐藤 淳, 小川郁子, 高田 隆: 辺縁歯周組織破壊におけるMIP-2の役割に関する実験病理学的研究: 日本歯周病学会誌43巻(春季特別号):162,
- 4)宮内睦美, 北川尚嗣, 平岡雅恵, 齊藤彰久, 佐藤 淳, 小川郁子, 高田 隆: LPS投与後の辺縁歯周組織変化に及ぼす抗MIP-2抗体腹腔内投与の影響: 日本歯周病学会誌43巻(春季特別号):161
- 5)高田 隆, 宮内睦美: ポケット形成のメカニズム, クインテッセンス, 21, 3-16, 2002
- 6)Mutsumi Miyauchi, Sunao Sato, Shoji Kitagawa, Masae Hiraoka, Yasusei Kudo, Ikuko Ogawa, Ming Zhao, Takashi Takata: Cytokine expression in rat molar gingival periodontal tissues after topical application of lipopolysaccharide: histochem. Cell Biol. 116: 57-62: 2001.

(2)口頭発表

- 1)LPS投与ラット歯周炎モデルにおけるサイトカイン発現と組織反応(シンポジウム: 歯周病と生体防御応答—歯周治療への展望—): 宮内睦美: 第112回日本保存学会2000年度春季大会(大阪)平成12年4月
- 1)Mutsumi Miyauchi, Akihisa Saito, Masake Hiraoka, Shoji Kitagawa, Sunao Sato, Ikuko Ogawa, Takashi Takata: Roles of CXC-chemokine in LPS-induced periodontal tissue destruction. International Bone and Mineral Society, 平成15年6月発表予定

研究成果

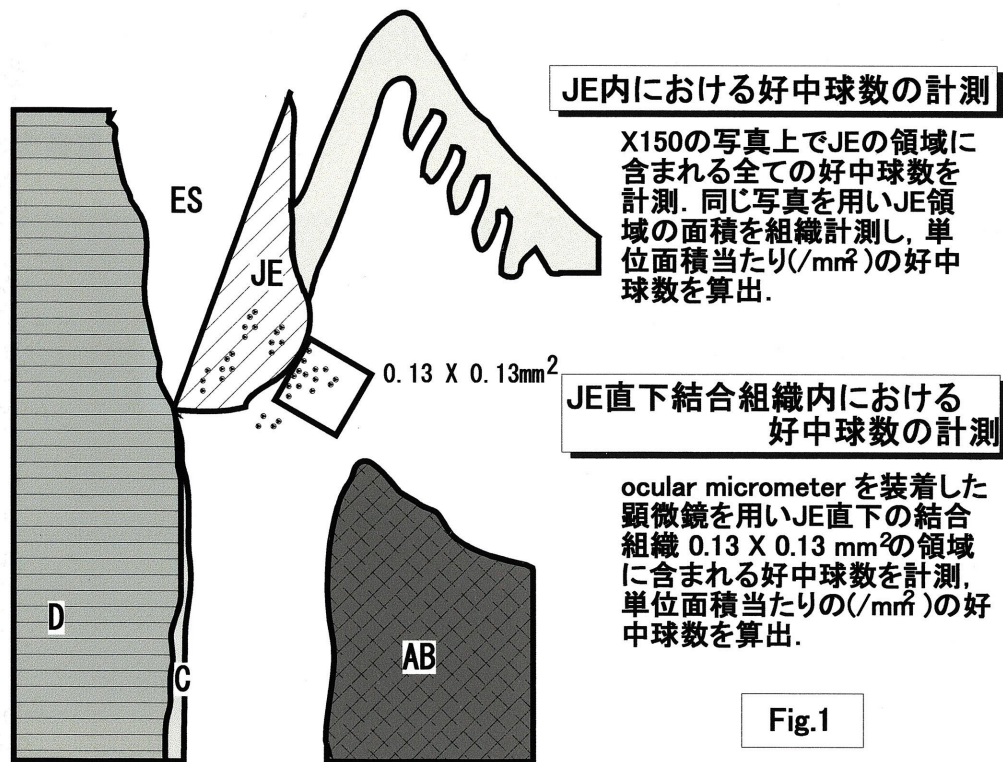
1. LPS投与後ラット臼歯部歯周組織におけるCXC-ケモカインの発現

好中球の炎症巣への浸潤と局所での機能発現にIL-8をプロトタイプとするCXC-ケモカインが関与することが示されている。げっ歯類ではIL-8が存在しないため、同じCXC-ケモカインに属する cytokine-induced neutrophil chem attractants (CINC), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) が好中球走化性因子として注目されている。両ケモカインはLPSやTNF- α 刺激によっても誘導され、LPSで惹起したラット肺の炎症モデルにおいて好中球浸潤を引き起こすばかりでなく、培養上皮細胞の増殖を活性化することが報告されている。我々はこれまでに、ラット歯肉溝からのLPS投与により投与後3時間でJE細胞におけるTNF- α の発現が一過性に増強すること、JE内およびJE直下歯肉結合組織では好中球や滲出マクロファージが増加すること、また、投与後2、3日目にJE細胞の増殖活性が高まることを報告した。そこで本研究では、LPSの惹起する歯周組織破壊過程におけるCXC-ケモカインの役割を明らかにする目的で、同様に歯肉溝からLPSを浸透投与した際の辺縁歯周組織でのCINCやMIP-2などCXC-ケモカインの産生状況を免疫組織化学的方法を用い経時的に検討した。

【材料及び方法】

7週齢ウイスター系雄性ラットの両側上顎臼歯咬合面上に5.0mg/mlの濃度で生食水に溶かしたE.coli由来のLPS溶液を浸した綿栓を1時間静置し、歯肉溝からのLPSの浸透を図った。投与開始後13時間、1235および7日後に上顎臼歯部を顎骨ごと採取し、PLP固定液で4℃、8時間固定の後、10%EDTA溶液中で5日間低温脱灰した。OCT compound包埋後、7 μ m厚の凍結切片を作成し、SAB法(ニチレイ社製)を用いCXC-ケモカインの発現状況を免疫組織化学的に検討した。

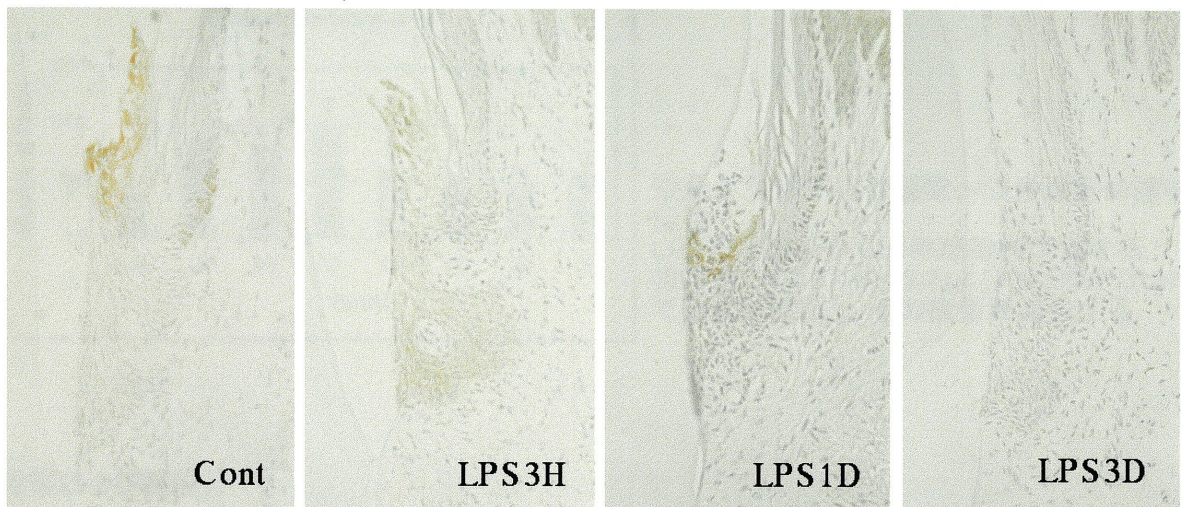
一次抗体として抗CINC-2 α 抗体(免疫抗体研究所製)および抗MIP-2抗体(CEDARLANE社製)をそれぞれ1/100、1/500の濃度で用いた。対照として、LPS非投与の材料に対しても同様の方法を施し観察した。なお、好中球の浸潤状況はHE染色標本上で観察し下図の領域における好中球数を算出し、統計学的に検討した。



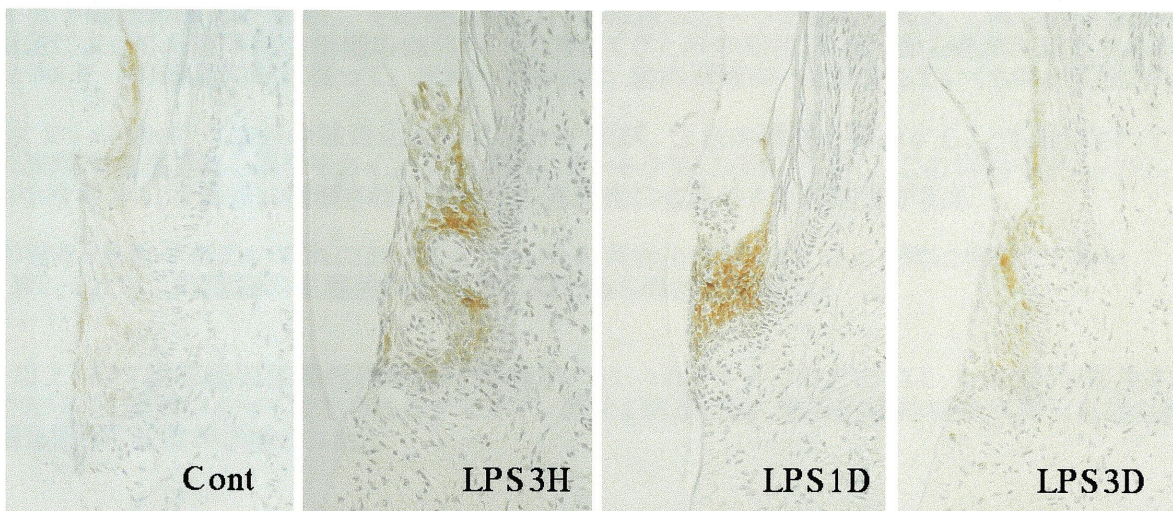
【結果】

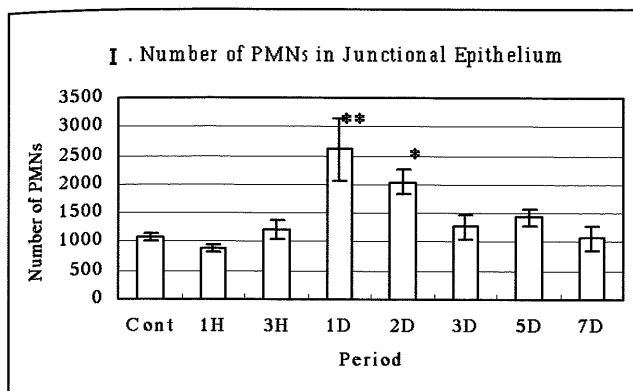
LPS非投与例では、JEの表層部、特にその歯冠側端付近の細胞がCINC-2 α 陽性を呈した。MIP-2もほぼ同様の局在パターンを示したが、その染色性は弱かった。なお、CINC-2 α はマラッセの残存上皮にも発現していた。LPS投与例では、投与1時間後に上皮の染色性が増強し始めた。特にJEでは、歯冠側端付近の細胞の染色性の増強とともに陽性範囲も拡大し、3時間後になると、JE全体が強く染色される標本もあった。1日、2日後になるとほとんどの標本でJE全体に陽性反応が観察されたが、3日目以後、JE細胞における両ケモカインの発現は徐々に減弱する傾向を示した。歯肉や歯根膜の線維芽細胞はいずれのケモカインにも陰性であった。なお、実験期間中を通しマラッセの残存上皮はCINC-2 α 陽性を呈していた。好中球は非投与例のJE内にも少なからず存在し、投与直後からJE細胞間およびJE直下結合組織において増加する傾向がみられたが、5、7日後と減少していた。

CINC-2の発現

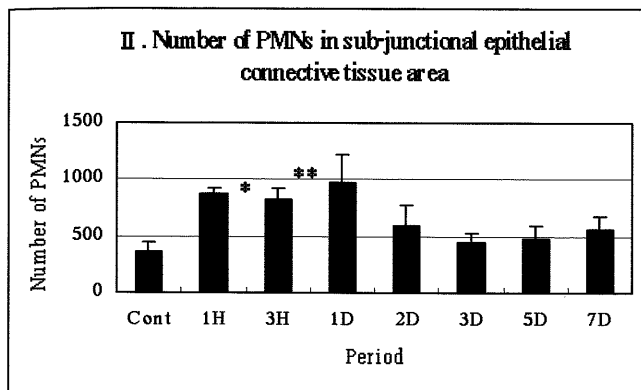


MIP-2の発現





接合上皮内の好中球数の変化
LPS投与後1日(P<0.01)および2日(P<0.05)
で有意な好中球数の増加が観察される。



接合上皮直下結合組織への浸潤好中球数の変化
LPS投与直後から好中球数が増加する。
投与後1時間(P<0.05)および3時間(P<0.01)
で有意に増加し、その後暫時減少する。

【考察および結論】

- ①LPS非投与例では歯冠側端付近のJE細胞がCINC-2 α 、MIP-2を発現しており、両ケモカインが正常時のJE内への好中球遊走に関わる可能性が窺われた。
- ②LPS投与直後、JE細胞における両ケモカインの発現が一過性に増強した。好中球は投与直後JE直下結合組織内で増加し、その後JE内の好中球数のピークが観察される。これらの結果から、LPS刺激によってJE直下結合組織の血管外へ浸潤してきた好中球はJE細胞から過剰に産生されるCINC-2やMIP-2の濃度勾配に従って、JE内へと移動し、歯肉溝液中へと遊走していくものと推察された。
- ③CINC-2やMIP-2は好中球走化性作用ばかりでなく、上皮の増殖を促進することも報告されている。JE細胞で産生される両ケモカインはJE細胞にオートクライン的に作用し、この実験モデルにおいてLPS投与後1、2日後に観察される増殖能の活性化にも関与する可能性がある。
- ④投与・非投与例のいずれにおいてもマラッセの残存上皮はCINC-2 α を常に発現しており、CINC-2 α はこの細胞の生理的代謝機構に関わるものと推察された。

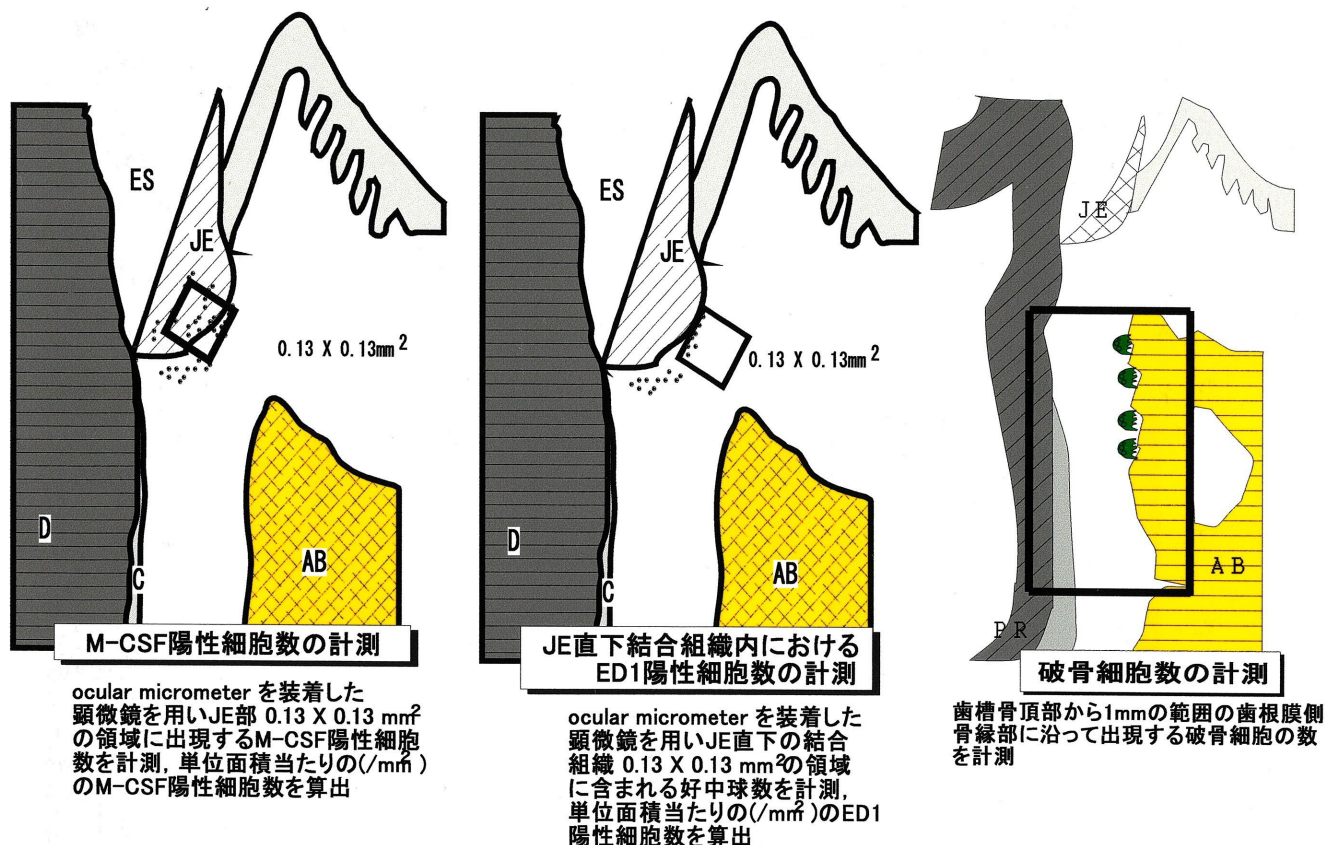
以上、LPS投与後の歯周組織ではJE細胞がCINC-2 α やMIP-2などのCXC-ケモカイン産生を営んでおり、JE細胞によって産生されるケモカインがLPS刺激に続く歯周組織破壊の誘導に重要な役割を担う可能性が示唆された。

2. LPS 投与後のラット辺縁歯周組織におけるマクロファージ走化性因子の発現

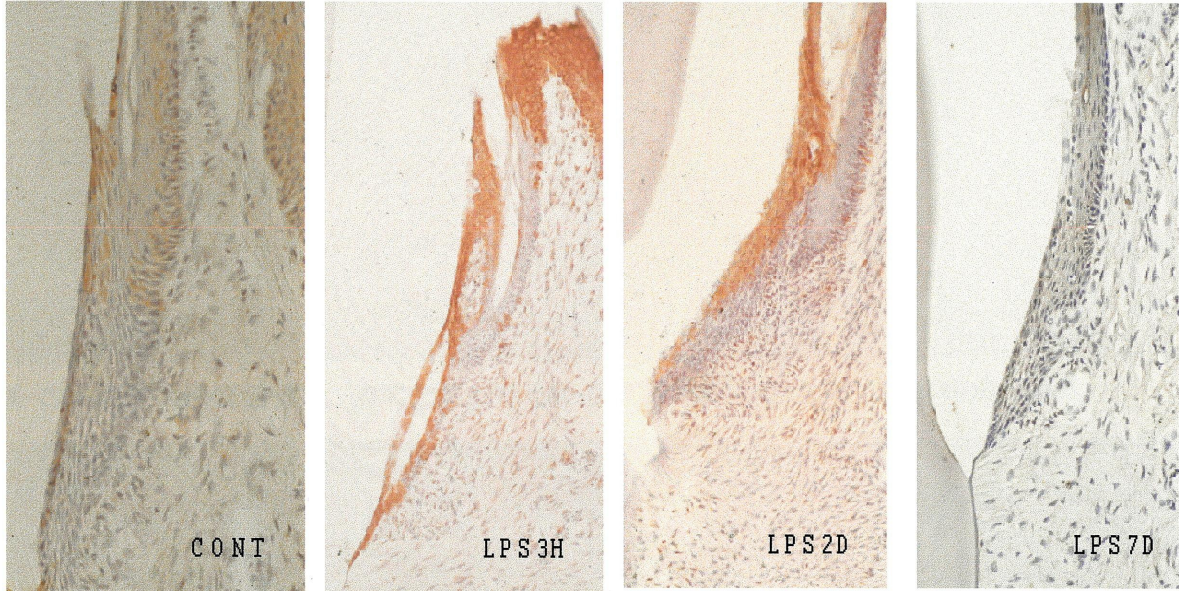
辺縁性歯周炎は、好中球・リンパ球・単球／マクロファージ等の浸潤を伴う炎症性疾患である。近年、局所への白血球浸潤とその活性化に宿主細胞から産生される種々の走化性因子が関与することが示されている。我々はラット歯肉溝からのLPS投与により、投与後3時間で接合上皮(JE)細胞におけるTNF- α の発現が一過性に増強することやJE内およびJE直下歯肉結合組織に好中球や滲出マクロファージが増加することを報告している。また、LPS投与直後から2日後にかけて、JE細胞においてCXCL-ケモカインであるCINC-2やMIP-2の発現が一過性に増強することから、JE細胞から過剰に産生されるCINC-2やMIP-2が歯肉局所への好中球の遊走に関与する可能性を示唆した。そこで、LPS投与後の歯肉組織における滲出マクロファージの増加に関わる走化性因子の役割を明らかにする目的で、同様に歯肉溝からLPSを浸透投与した際の辺縁歯周組織でのtumor necrosis factor- α (TNF- α)(ケモカインの誘導ならびにマクロファージの分化や機能の活性化), macrophage colony stimulating factor (M-CSF)(マクロファージの遊走と分化や機能の活性化), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)(マクロファージ遊走に関与するケモカイン)の発現状況を免疫組織化学的方法を用い経時的に検討し、滲出マクロファージの浸潤状況と比較検討した

【材料及び方法】

7週齢ウイスター系雄性ラットの両側上顎臼歯咬合面上に、50mg/mlの濃度で生食水に溶かした*E. coli*由来のLPS溶液を浸した綿栓を歯肉溝からのLPSの浸透を目的に1時間静置し、投与開始後1,3,5,7日後に上顎臼歯部を顎骨ごと採取した。PLP固定液で4 $^{\circ}$ C, 8時間固定の後、10% EDTA溶液中で5日間低温脱灰、OCT compound包埋後、7 μ m厚の凍結切片を作成し、免疫組織化学的にTNF- α , M-CSF, MCP-1の局在を検討した。なお、対照には、LPS非投与例から得た材料に対しても同様の方法を施し観察した。また、マクロファージや破骨細胞系細胞の浸潤状況はED1陽性細胞数を数え分析した。M-CSFおよびED1陽性細胞計測は下図に示す。

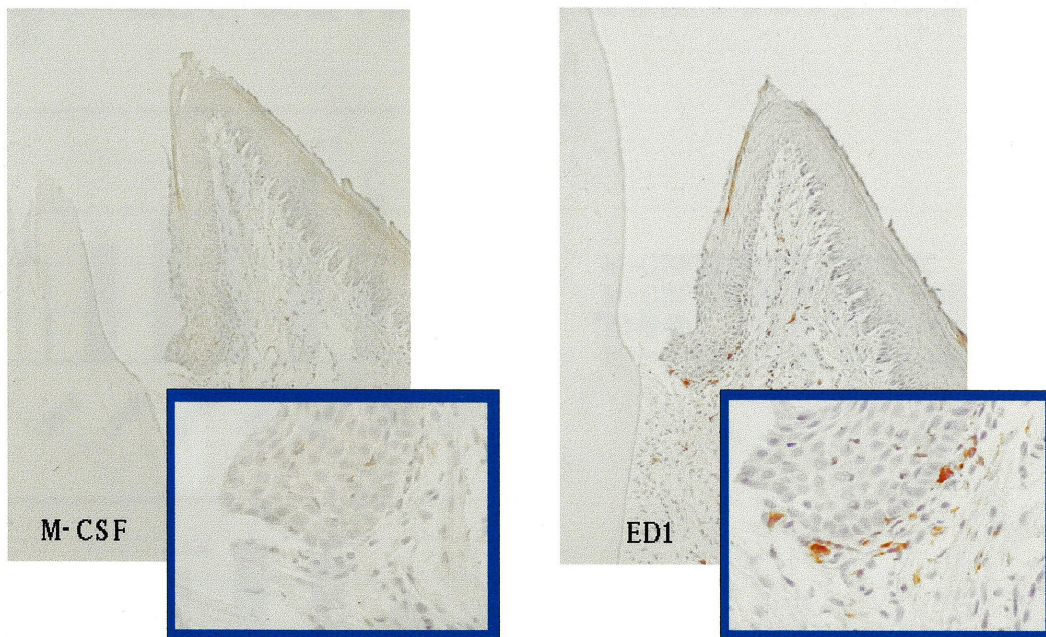


【結果および考察】



TNF- α の発現:

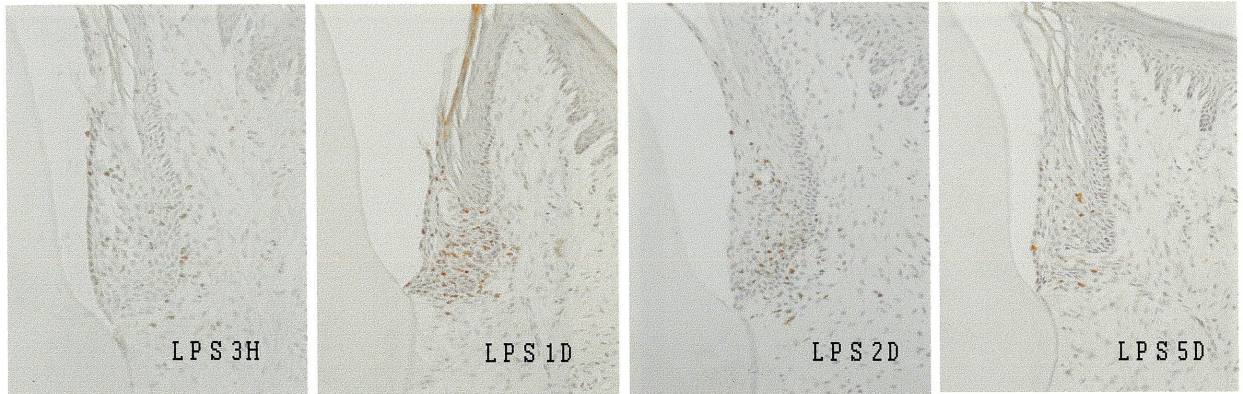
TNF- α の発現はLPS非投与ラットの接合上皮歯冠頂側端部にわずかに観察される。LPS投与によって接合上皮には投与3時間後に強いTNF- α 発現が惹起され、2日後まで持続する。投与2日後接合上皮におけるTNF- α 発現は接合上皮の基底側から徐々に消失していた。LPS投与7日目にはコントロール群と同程度に回復していた。



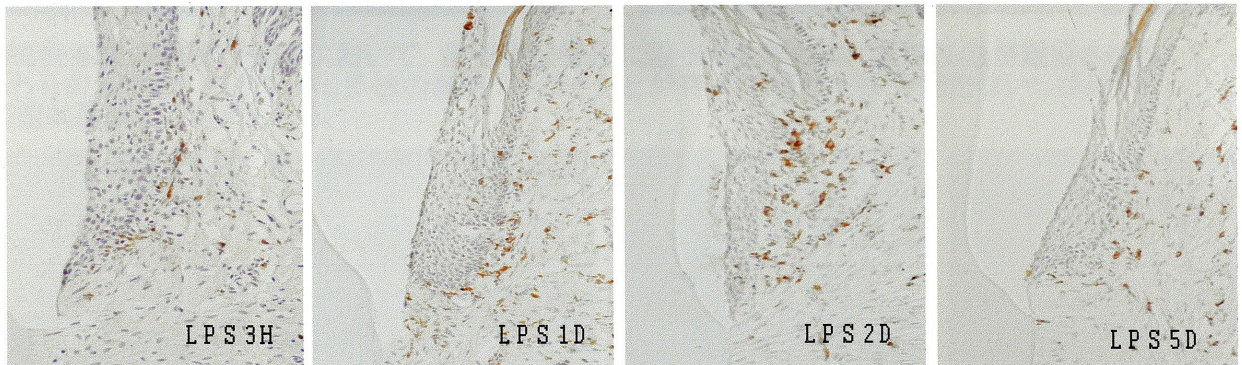
正常歯肉組織におけるM-CSFとED1陽性滲出マクロファージ

LPS非刺激ラットの歯肉組織において少数浸潤している好中球はM-CSF弱陽性を呈している。また、接合上皮直下にはED1陽性滲出マクロファージが観察される。

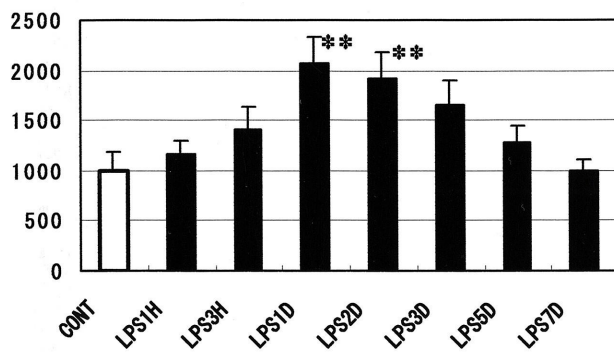
LPS投与後の歯肉組織におけるM-CSF発現と滲出マクロファージ



M-CSF発現の経時的変化: 歯肉部におけるM-CSF陽性細胞の大部分が好中球である。

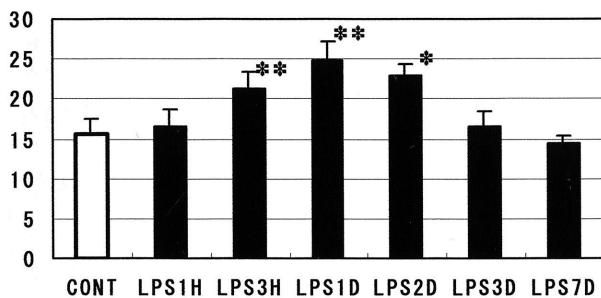


ED1陽性滲出マクロファージの経時的変化: M-CSF陽性細胞の観察される時期に一致して, JE直下結合組織には滲出マクロファージが集族している。



M-CSF陽性細胞数の変化

M-CSF陽性細胞数は, LPS投与により増加し, 投与後1, 2日目で有意な増加($P < 0.001$)のピークを示した後, 徐々に減少した。



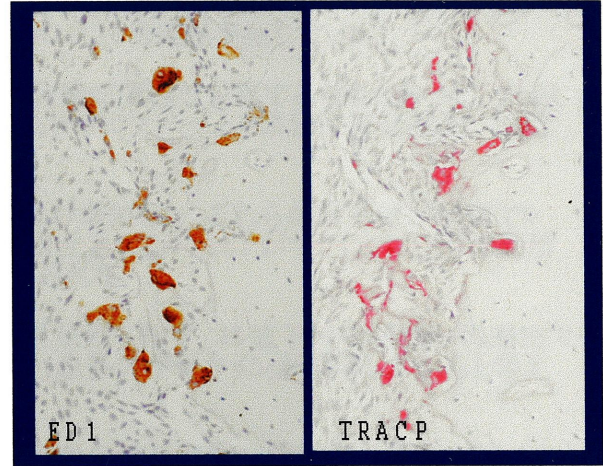
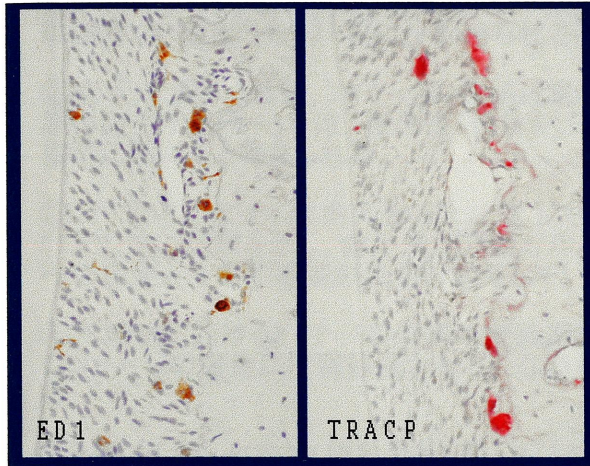
ED1陽性滲出マクロファージの変化

ED1陽性マクロファージはLPS投与3時間から2日にかけて有意な一過性の増加を示す。3時間・1日($P < 0.01$), 2日($P < 0.05$)

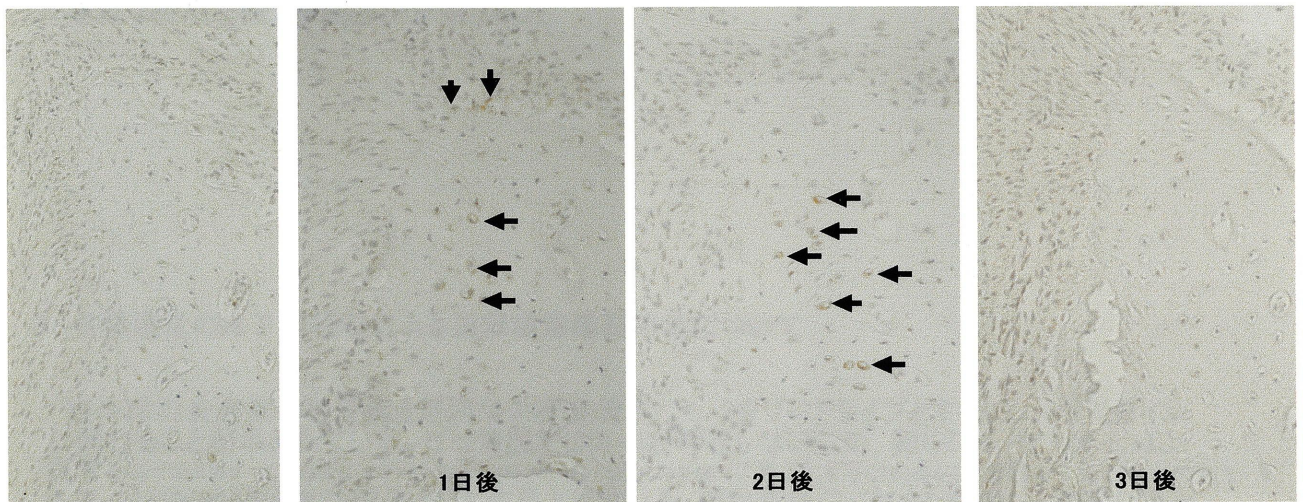
歯根膜部における変化

LPS非投与例

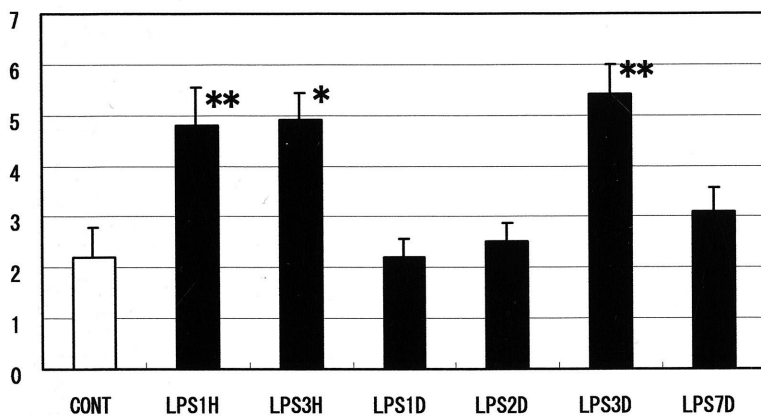
LPS投与3日後



LPS投与後の歯根膜組織において、歯槽骨骨縁部に沿って多数のED1陽性細胞が観察される。これらの細胞は、単核ないし多核の細胞で、ほとんどがTRACP陽性で破骨細胞ないしは破骨細胞前駆細胞と考えられる。



MCP-1陽性反応は歯槽骨骨小窩内に存在する骨細胞に観察される。LPS投与により骨細胞によるMCP-1発現は増強される。また、歯槽骨頂部の骨芽細胞もMCP-1陽性を示す様になる。LPSによるMCP-1発現は投与後1-2日目がピークで、3日目にはコントロールと同程度に低下している。



LPS投与後の破骨細胞数の変化
LPS投与後の破骨細胞数の変化は投与後3時間と3日後にピークをもつ2相性の増加を示す。

①LPS非投与例では歯冠側端付近のJE細胞にTNF- α が発現していたが、M-CSF、MCP-1の発現は観察されなかった。JE部に少数みられる好中球はM-CSF弱陽性を呈していた。

②投与3時間~2日後、TNF- α の発現は増強し、JE全体が強陽性を呈するものもあった。JE細胞の産生するTNF- α は、投与後2日目をピークとしたマクロファージの集簇に直接あるいは間接的に関わると考えられる。

③LPS投与によってJE内あるいはJE直下では好中球が増加した。これらの好中球は局所でM-CSFの強い発現を示し、歯周炎局所で好中球により産生されるM-CSFがマクロファージの局所への遊走と分化や機能の発現に関与していると考えられた。

④JE細胞におけるMCP-1の発現は実験期間を通して観察されず、JE直下結合組織への滲出マクロファージの遊走には直接関わっていないが、MCP-1以外のケモカインが関与していると考えられる。

⑤一方、MCP-1はLPS投与後3時間~3日の歯槽骨頂部の骨芽細胞や骨細胞に発現が認められ、同部に破骨細胞前駆細胞を誘導することにより骨破壊に関与すると推察された。

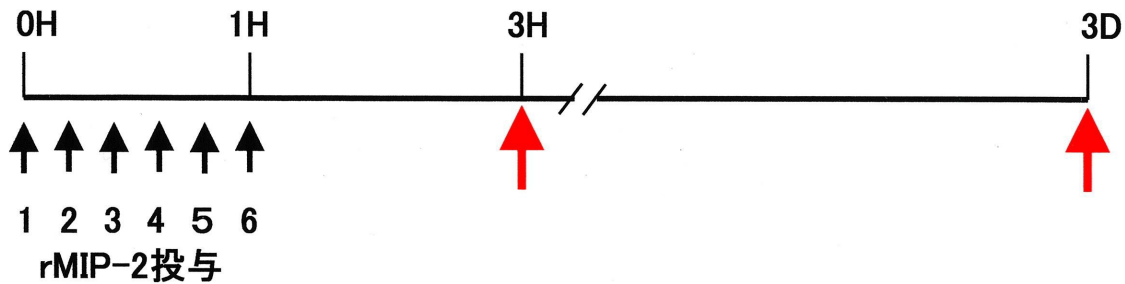
以上、LPS投与後の歯周組織では浸潤細胞に加え、JE細胞をはじめとする組織構成細胞が種々のマクロファージ走化性因子を産生することにより、LPS刺激に続く炎症の成立や組織破壊に重要な役割を担う可能性が示唆された。

3. 各種濃度のmIP-2投与による辺縁歯周組織破壊について

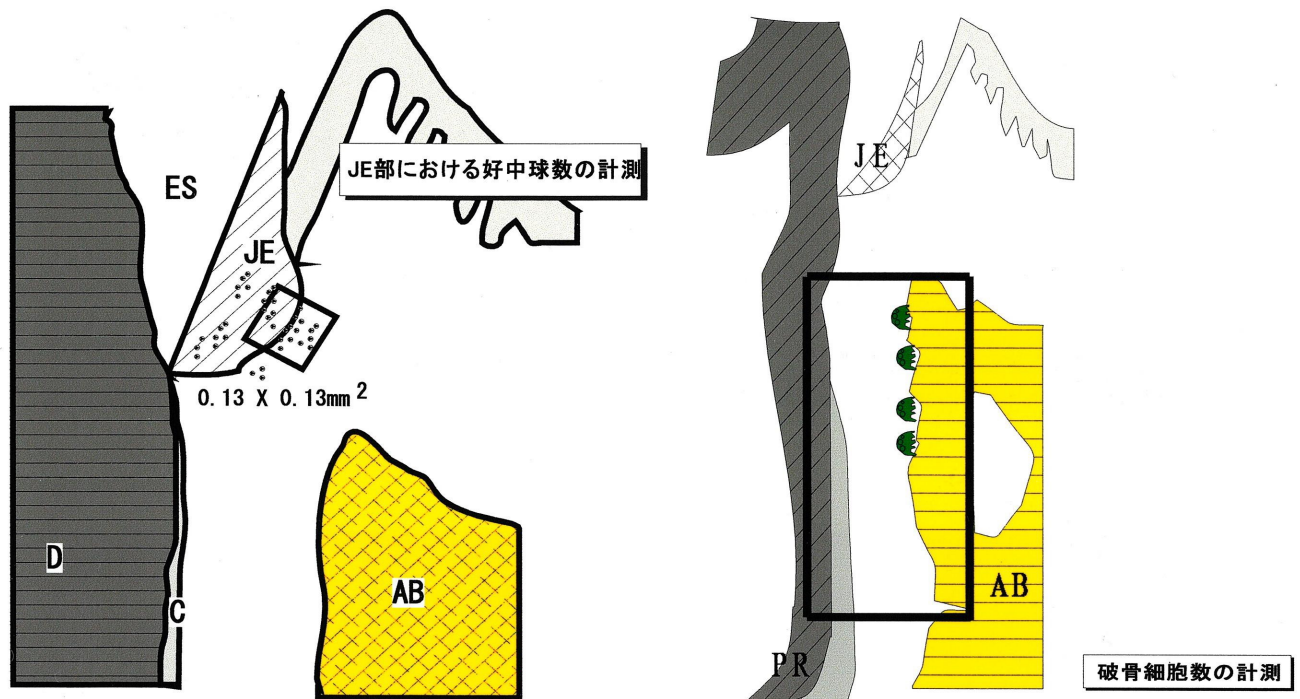
好中球の炎症巣への浸潤と局所での機能発現にIL-8をプロトタイプとするCXC-ケモカインが関わることを示されている。げっ歯類ではIL-8が存在しないため、同じCXC-ケモカインに属する cytokine-induced neutrophil chem attractants (CINC), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)が好中球走化性因子として注目されている。両ケモカインはLPSやTNF- α 刺激によっても誘導され、LPSで惹起したラット肺の炎症モデルにおいて好中球浸潤を引き起こすことが報告されている。我々は、ラット歯肉溝からLPSを投与することにより、JE細胞におけるCINCやMIP-2の発現が一過性に増強することを明らかにし、JE細胞から過剰に産生されるこれらのCXC-ケモカインがLPSによる好中球の遊走や歯周組織破壊に関与する可能性を明らかにした。そこでここでは、歯肉溝からMIP-2を直接浸透投与した際の辺縁歯周組織に惹起される組織変化について、特に好中球浸潤や破骨細胞数を中心に経時的に検討した。

【材料及び方法】

7週齢ウイスター系雄性ラットの両側上顎臼歯部歯肉溝に0.05, 0.5, 5, 50mg/mlの濃度で生水に溶かした合成ラットMIP-2(PEPRO TECH EC LTD.)溶液をマイクロピペットにて2 μ lずつ10分毎に1時間にわたって投与し、歯肉溝からのMIP-2の浸透を図った。投与開始後3時間および3日後に上顎臼歯部を顎骨ごと採取し、PLP固定液で4 $^{\circ}$ C、8時間固定の後、10%EDTA溶液中で5日間低温脱灰した。AMeX法にてパラフィン包埋後、4.5mm厚のパラフィン切片を作成し、組織学的に検討した。対照として、未処置の材料も同様に観察した。



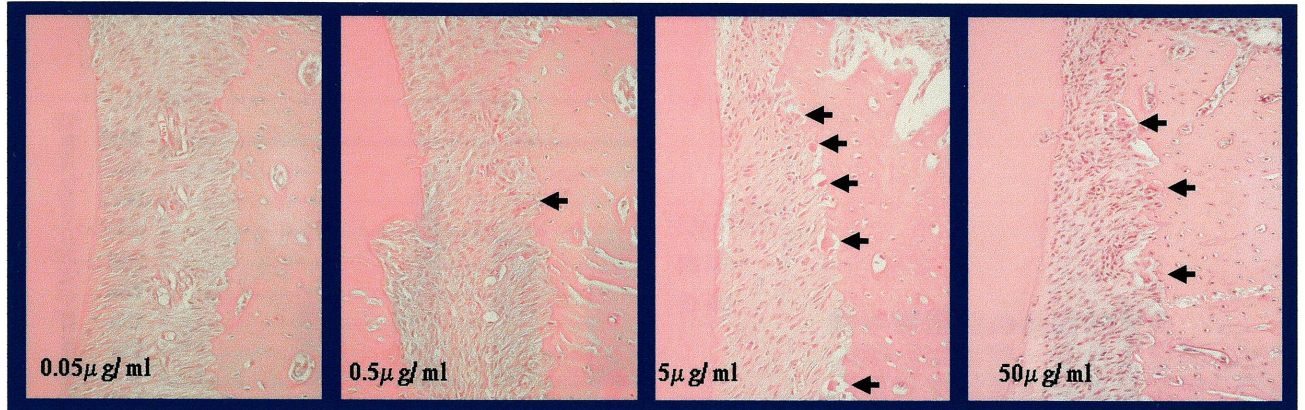
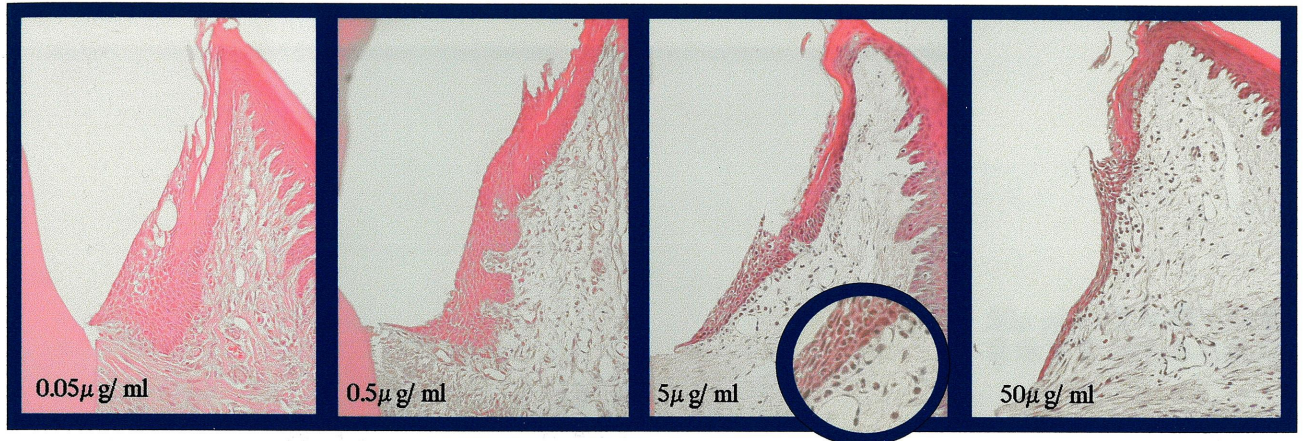
実験スケジュール



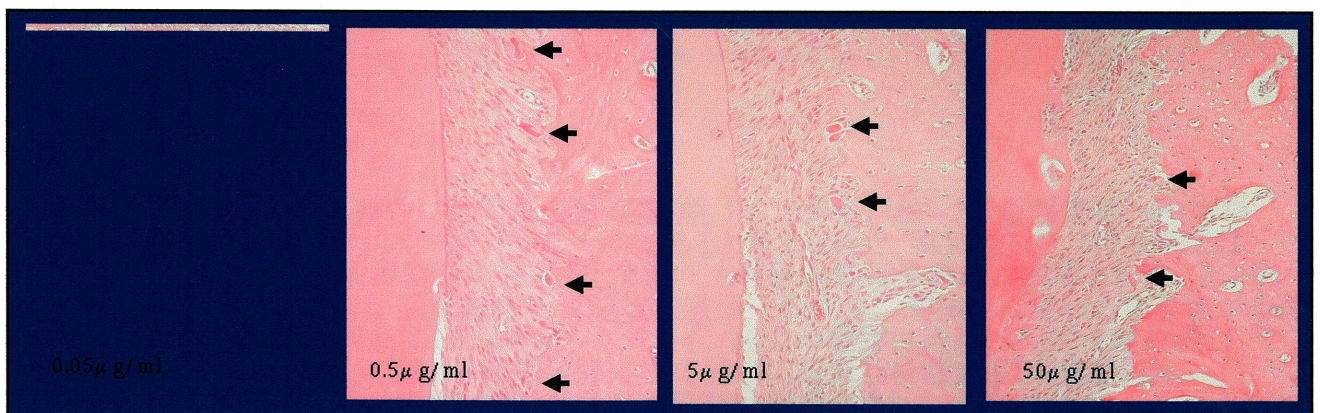
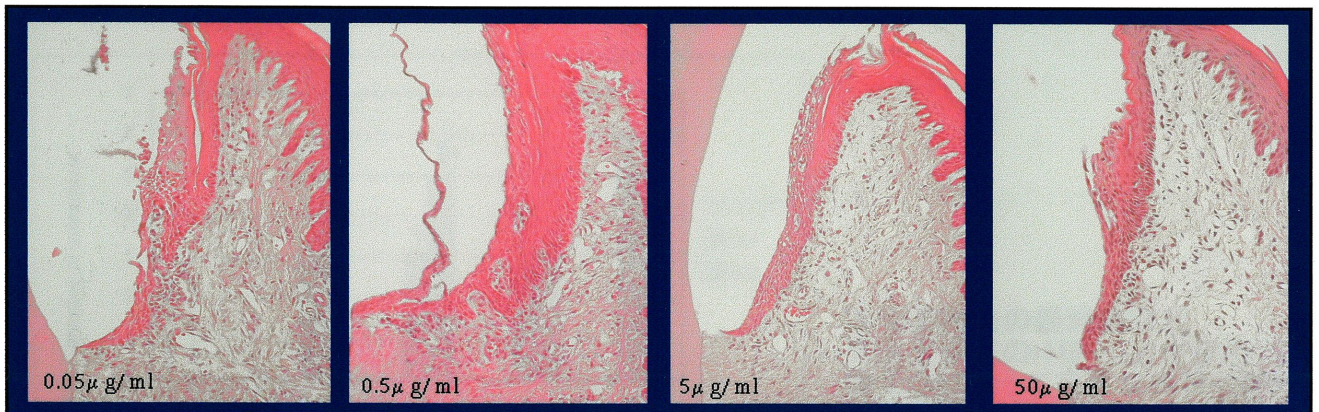
【結果】

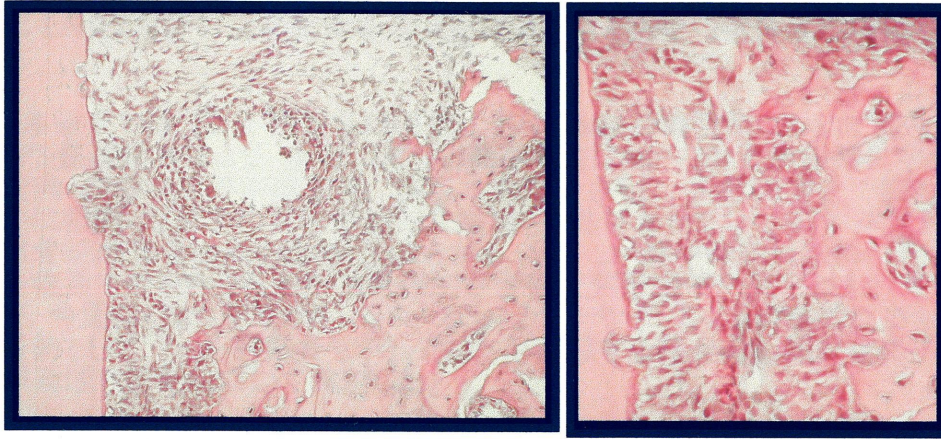
- ①MIP-2非投与例: 接合上皮内にごく少数の好中球が遊走し, 歯根膜側歯槽骨縁にはわずかに破骨細胞が観察される程度であった.
- ②投与3時間後: 0.05mg/ml投与例ではJE直下結合組織の血管拡張が観察され, 周囲に好中球の浸潤が目立つ症例もあった. 0.5mg/ml投与例では拡張した血管周囲を中心に好中球数の明らかな増加がみられた. MIP-2の濃度依存的にJE内およびJE直下結合組織における好中球数が増加するとともに, 5, 50mg/ml高濃度投与例では, 破骨細胞数の増加も観察された.
- ③投与3日後: いずれの濃度でもJE内およびJE直下結合組織に, 多数の好中球浸潤が観察されるようになり, 低濃度投与例でも破骨細胞性骨吸収を示すものが現れた. 50mg投与例では深部の結合組織内にも好中球浸潤巣が拡大し, 歯肉膿瘍を形成しているものもあった. これらの症例では著明な骨吸収も観察された.

投与開始3時間後

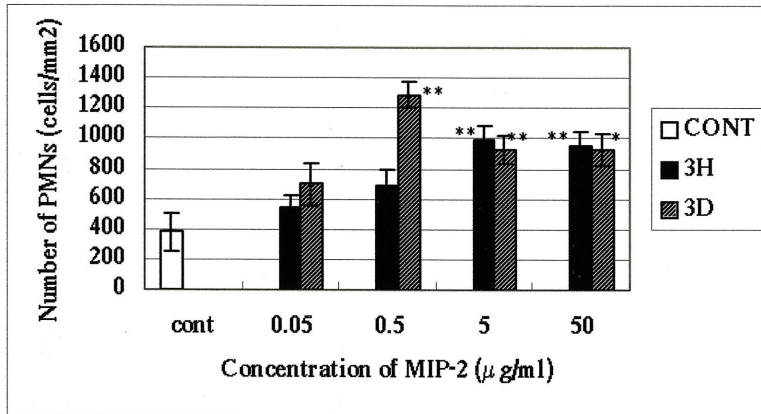


投与開始3日後

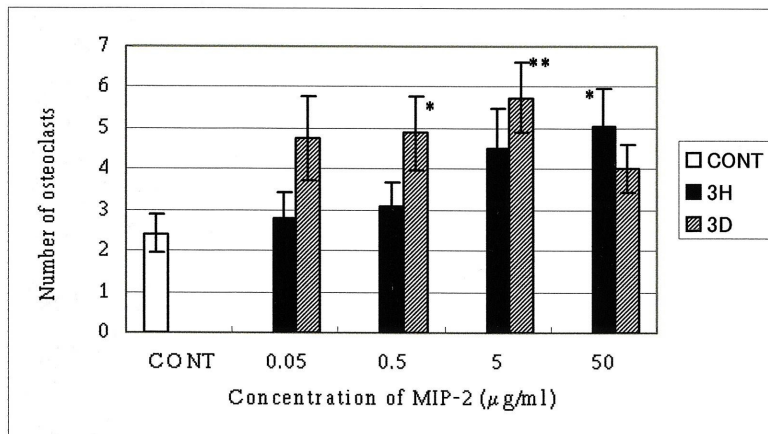




50 μ g/ml投与群では膿瘍形成を示す症例もみられた。



好中球浸潤の経時的変化
rMIP-2は歯肉-接合上皮部における浸潤好中球数の有意な増加を誘導した。 ** P<0.01, * P<0.05



破骨細胞数の経時的変化
高濃度領域のrMIP-2は歯根膜側の歯槽骨縁に沿って有意な破骨細胞増加を惹起した。 ** P<0.01, * P<0.05

【考察および結論】

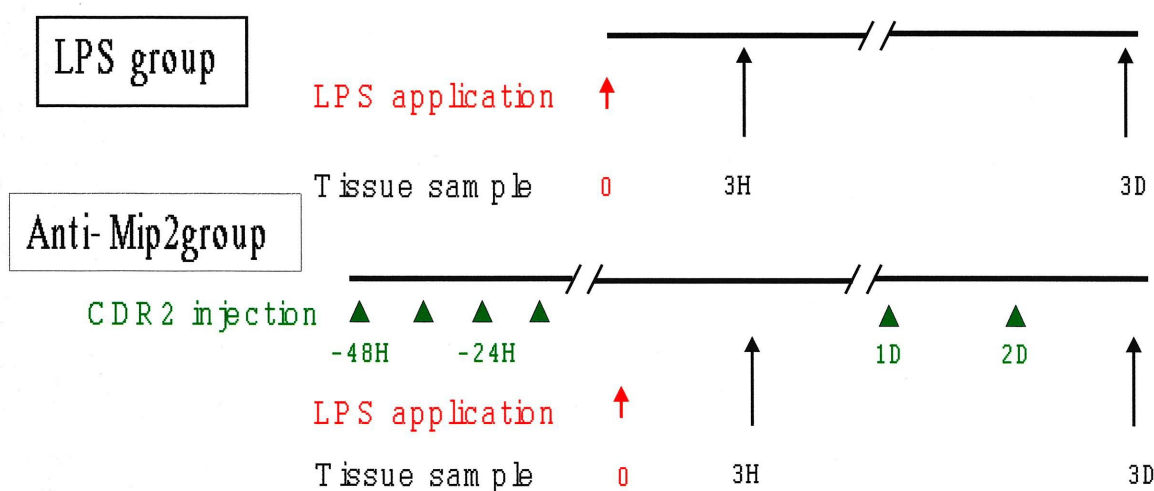
MIP-2投与により濃度依存性に好中球浸潤が増加したことから、MIP-2は歯周炎部への好中球動員に直接関わる有力なケモカインの一つであると考えられた。高濃度MIP-2投与例では好中球浸潤巣と離れた歯根膜側歯槽骨縁においても破骨細胞性骨吸収が誘導されたことより、炎症巣でのMIP-2の増加が破骨細胞性骨吸収刺激因子の産生に間接的に関わる可能性が示唆された。よって、歯周炎病巣におけるCXC-ケモカイン産生の増加は局所への好中球動員に関わるばかりでなく、続いて起こる歯周組織破壊の誘導に重要な役割を担うと推察され、CXC-ケモカインをターゲットとした歯周病治療の可能性が示唆された。

4. LPS投与後の辺縁歯周組織変化に及ぼす抗MIP-2抗体腹腔内投与の影響

本研究では、ラット歯周組織破壊におけるMIP-2の役割について種々の検討を加えてきた。LPS浸透投与により、接合上皮(JE)細胞で主にMIP-2の免疫組織化学的発現が一過性に増強し、歯肉-JE部での好中球遊走に関与すること。さらに、同様の方法で投与したrMIP-2が濃度依存性に歯肉-JE部での好中球浸潤を増加させたばかりでなく、好中球浸潤巣と離れた歯槽骨での破骨細胞性骨吸収を誘導したことから、MIP-2が好中球動員に関わるケモカインの1つであり、炎症巣でのMIP-2増加が破骨細胞性骨吸収刺激因子の産生にも関与する可能性を示唆したそこで、今回はCXC-ケモカインをターゲットとしたサイトカイン療法確立のための基礎的実験を目的として、ラット歯周炎モデルでLPSが惹起する種々の組織変化に抗MIP-2抗体腹腔内投与が及ぼす影響について検討した。

【材料及び方法】

7週齢ウイスター系雄性ラットを2群に分け、抗体投与群、LPS群とした。抗体投与群には12時間毎に4回の抗MIP-2抗体(100 μ g/200gbw/回)(OA-122:免疫生物研究所)を腹腔内に投与した。4回目の投与2時間後に、5.0mg/mlの濃度で生食水に溶かした *Eco*由来のLPS溶液を浸した綿栓を、歯肉溝からのLPSの浸透を目的として、両側上顎臼歯咬合面上に1時間静置し、投与開始後3時間および3日後に上顎臼歯部を顎骨ごと採取した。3日後群には24時間毎に同量の抗MIP-2抗体を追加投与した。一方、LPS群はLPS投与開始後3時間および3日後に組織を採取した。PLP固定-10%EDTA脱灰後、AMeX法にてパラフィン包埋、H-E標本を作製し、組織学的および組織計測学的に検討した。対照として、未処置の材料も同様に観察した。なお、用いたラットの匹数は各期間毎に3匹とした。

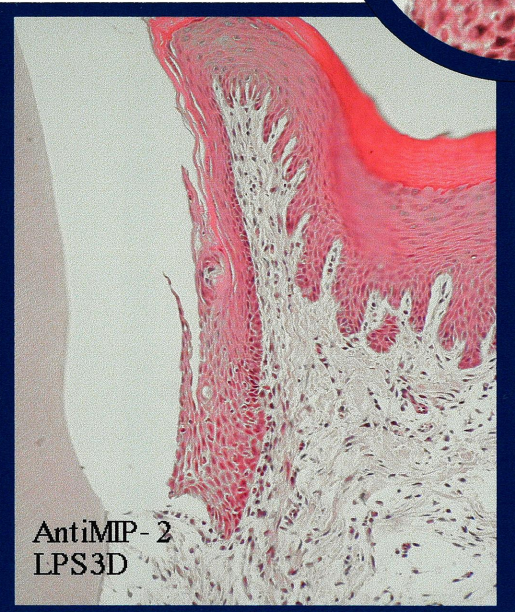
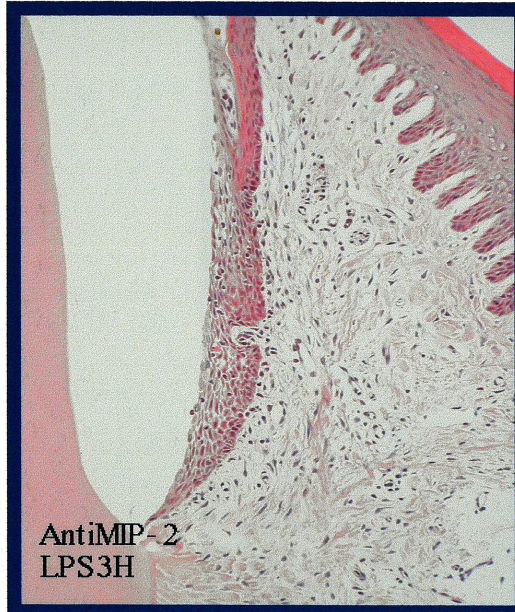
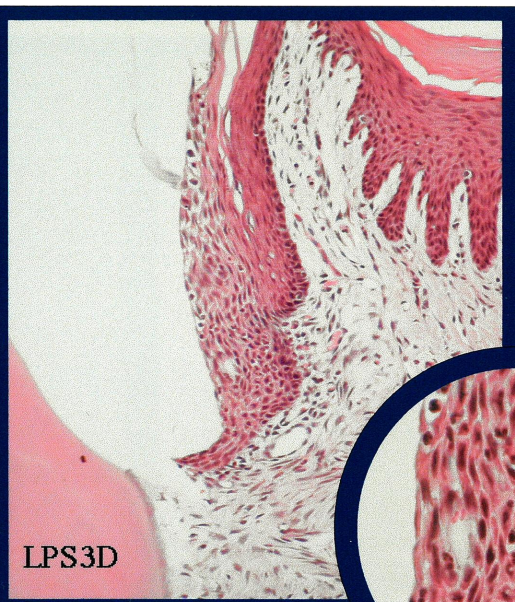
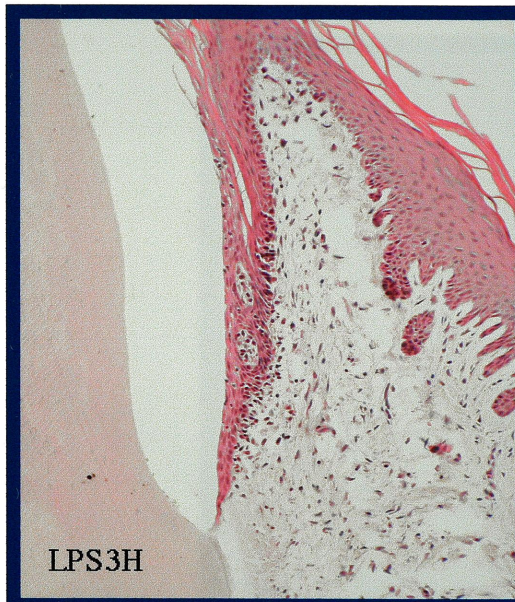


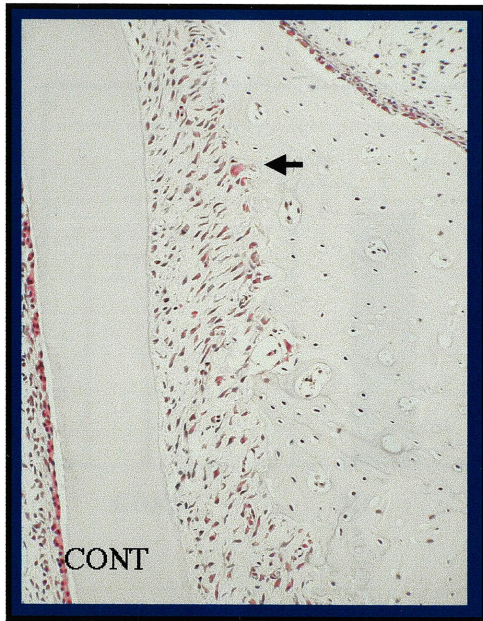
実験スケジュール



【結果】

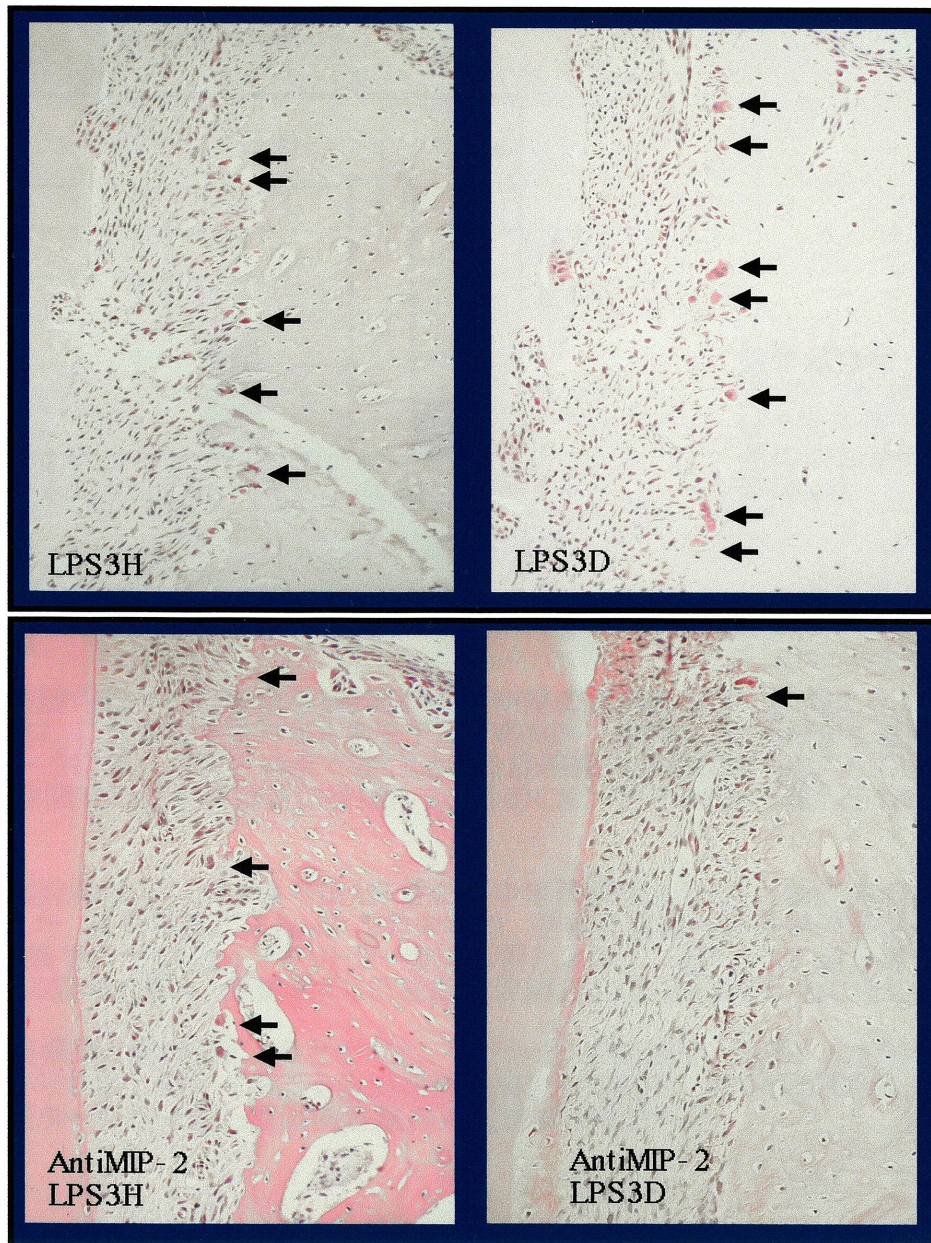
好中球数:LPS投与後の歯肉-JE部における好中球浸潤は未処置群に比べ3時間および3日後ともに有意に増加していた。抗MP-2抗体処理は投与3時間後の好中球浸潤を有意に抑制することはできなかったが、3日後の好中球数の増加は未処置群とほぼ同程度にまで抑制していた。



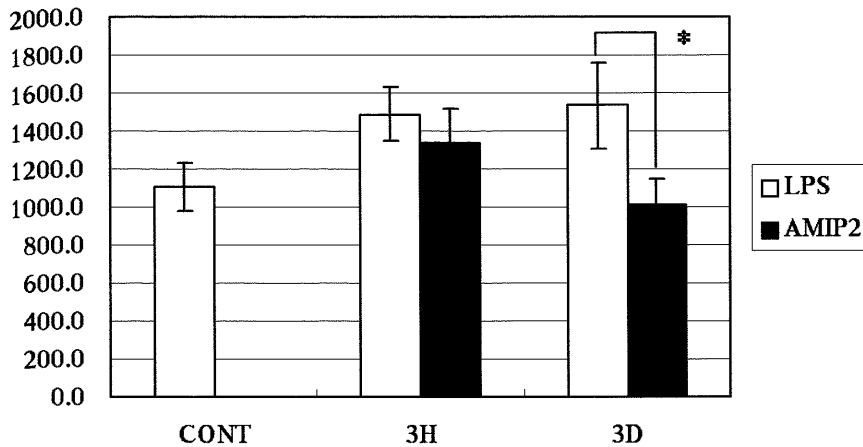


破骨細胞数:

LPS投与後の破骨細胞数は投与開始後3時間と3日後にピークを有する2相性の増加を示した。抗MIP-2抗体投与はこの2相性増加の3時間後のピークをやや減少させるとともに、3日後のピークをほぼ完全に抑制した。

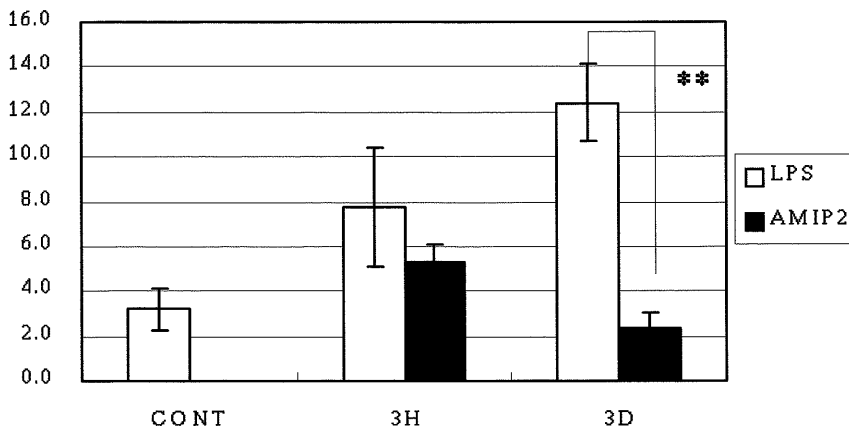


Number of PMNLs



好中球数:
抗MIP-2抗体腹腔内投与は、LPS投与後の歯周組織への好中球浸潤を有意に抑制した(P<0.05).

Number of osteoclasts



破骨細胞数:
抗MIP-2抗体腹腔内投与は、LPS投与後3日目の破骨細胞の増加を有意に抑えた(P<0.01).

【考察および結論】

①抗MIP-2抗体腹腔内投与はLPS投与3時間後の好中球の浸潤を有意には抑えることができなかった。我々は、これまでの検討から本モデルでのMIP-2発現は3時間後から増強し始め、1-2日でピークに達し、3日目頃まで続くことを免疫組織化学的に明らかにしている。LPS投与後3時間での好中球動員にはMIP-2以外のCXC-ケモカインが関わるものと推察される。

②抗MIP-2抗体腹腔内投与はLPS投与後3日目の好中球浸潤ばかりでなく破骨細胞数の増加も有意に抑制した。特異抗体によるMIP-2の中和は、歯周炎病巣への好中球浸潤の抑制を介して、炎症巣でのサイトカインネットワークに影響を及ぼすことによって破骨細胞性骨吸収因子の誘導を抑え、間接的に3日後の破骨細胞の増加を抑制したと考える。

よって、ヒト歯周炎病巣におけるIL-8などのCXC-ケモカインの抑制は、局所への好中球動員を抑えるばかりでなく、続いて起こる歯周組織破壊にも抑制的に働くと推察され、CXC-ケモカインをターゲットとした歯周病治療の可能性が示唆された。

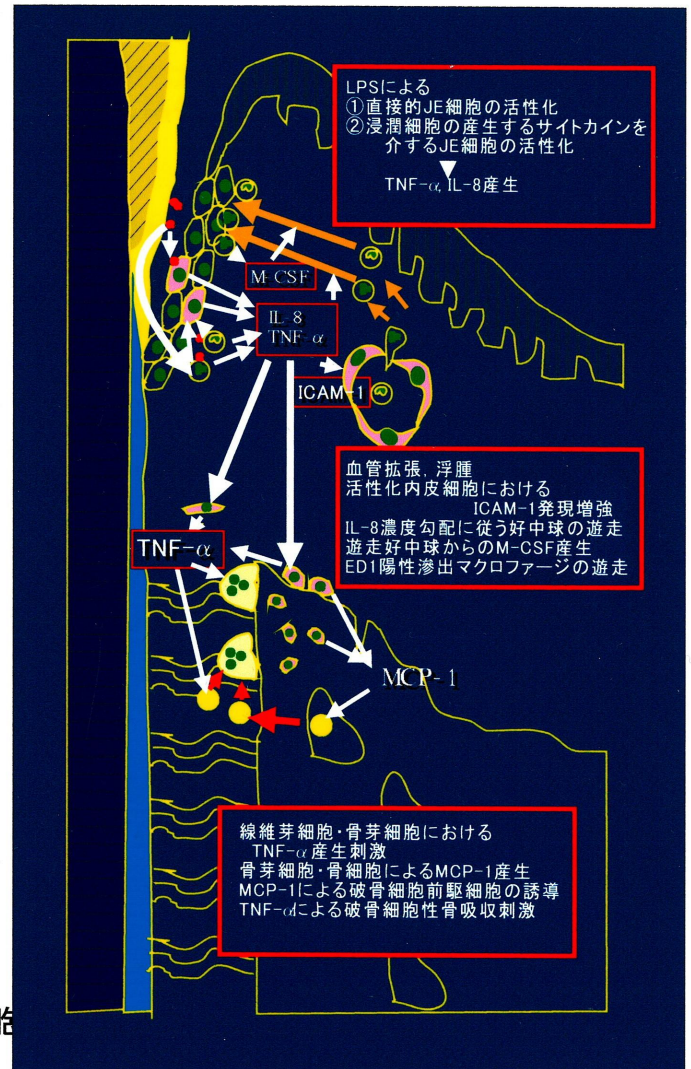
総括

右図は、このモデルで歯周組織で起こる事象をまとめた模式図である。

プラーク細菌由来のLPSは直接的に、あるいはJE直下部に常在している好中球やマクロファージからのサイトカイン産生を介して間接的にJE細胞を活性化し、JE細胞からのTNF- α やIL-8の産生を刺激するとともに、JE細胞自体の増殖活性を高めている可能性がある。このようにプラーク細菌に絶えずさらされているJEは、物理的な防御壁としてばかりでなく、サイトカインの産生を通して、局所での初期防御反応や炎症反応の開始に積極的に関わると考えられる。

次に、歯周組織でJE細胞や浸潤細胞などの宿主細胞から産生された過剰のTNF- α やIL-8は、JE直下結合組織において血管拡張や浮腫などの変化を惹起するとともに、血管内皮細胞におけるICAM-1の発現を誘導し、好中球を局所へ動員する。その後、好中球はIL-8の濃度勾配に従い歯肉溝へと遊走することになる。

さらに、TNF- α は、歯肉・歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞におけるTNF- α 産生を高め、歯根膜組織における破骨細胞性骨吸収や線維芽細胞によるコラーゲン原線維の貪食などの組織破壊に関わるものと考えられる。また、LPS投与により歯槽骨頂部歯槽骨内に存在する骨細胞におけるMCP-1発現が投与後1、2日目に増強する。MCP-1はマクロファージに対するケモカインであるとともに破骨細胞前駆細胞の局所への動員に関わることが報告されている。LPS投与後歯根膜周辺の骨組織で増加するMCP-1は歯根膜側骨縁部に出現する破骨細胞



このようなin vivoでの実験結果からTNF- α やIL-8をターゲットとした治療方法、たとえば①TNF- α やIL-8の産生阻害、②人型化抗体の開発③アンタゴニスト④受容体に対する抗体や⑤シグナル伝達物質の阻害などを応用することによって、LPS投与後の局所における両サイトカインの産生を特異的に抑えることができれば歯周炎の発症や急性増悪期への移行を効果的に阻害することができるものと考えられる。

特に、IL-8の抑制はサイトカインネットワークの下流を抑制するために副作用が少ないこと、血管透過性亢進や好中球依存性組織破壊をより効果的に抑制できることから、現在、LPS誘導性皮膚炎や関節炎、敗血症誘導性肺障害などの疾患において、IL-8をターゲットとした新しい薬剤の開発とその臨床応用への期待が高まっている。

辺縁性歯周炎は慢性の経過をたどる疾患ではあるが、歯周炎における組織破壊が急性増悪期に段階的に起こることを考えると、この急性増悪期への移行を抑えることは重要となる。

そこで、本研究ではラットのIL-8に相当するMIP-2に着目し、rMIP-2投与により歯周組織にLPS投与と同様の变化が生じるかどうかを確認した。さらに、抗MIP-2抗体腹腔内投与がLPSの惹起する組織破壊を抑制するかどうかについても検討した。

その結果、ラット歯周組織へのrMIP-2投与は接合上皮領域における好中球の遊走ばかりでなく深部歯根膜組織における破骨細胞性骨吸収をも濃度依存的に惹起することが明らかとな

った。抗MIP-2抗体腹腔内投与は抗LPS投与後3日目の好中球浸潤ばかりでなく破骨細胞数の増加も有意に抑制した。特異抗体による好中球に対するケモカイン・MIP-2の中和は、歯周炎病巣への好中球浸潤の抑制を介して、炎症巣でのサイトカインネットワークを抑制し、間接的に3日後の破骨細胞の増加を抑制した可能性がある。

このように、ヒト歯周炎病巣におけるCXC-ケモカインの抑制は、局所への好中球動員を抑えるばかりでなく、続いて起こる歯周組織破壊にも抑制的に働くと推察され、CXC-ケモカインをターゲットとした歯周病治療の可能性が示唆された。

あとがき

本研究で明らかにされた結果は、培養細胞や生化学的な手法を用いある程度示唆されてきている。しかしながら、本研究のように限りなく他の因子を排除した *in vitro* でみられた作用が *in vivo* の組織において実際にどの様に発揮されているかを実験動物モデルを用い時間を追って総合的に明らかにした実験は歯周病の発生過程の解明ならびに新しい治療法を確立していくうえで必要不可欠なことであると考える。本研究で得られた成果が基礎的研究と臨床とをつなぐ架け橋となり、新しい歯周病の治療方法が開発されることを願ってやまない。