

学位研究紹介

ラット実験的根尖性歯周炎成立過程における血管新生関連因子の発現
Expression of angiogenic factors in rat periapical lesions

新潟大学大学院医歯学総合研究科歯学分野

山中裕介

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental
Sciences

Yusuke Yamanaka

【目 的】

血管新生とは既存の血管から新たな血管が分枝することで血管網の新たな構築が生じる現象であり、慢性炎症、創傷治癒、腫瘍増大などの過程で重要な役割を演じることが知られている。根尖性歯周炎の病変部においても、Vascular endothelial growth factor (VEGF), Matrix metalloproteinases (MMPs) などの血管新生関連物質が検出され、肉芽組織形成などに関与することが推察されているが、この方面の知見は乏しい。また、根尖性歯周炎の成立過程に対する血管新生関連因子の関与の詳細はいまだ不明である。

そこで本研究では、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR2)、血管新生およびアポトーシス関連タンパクである B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2)、ラット CXCL8 関連ケモカイン (Chemokine (C-X-C motif) ligand 1; CXCL1) および CXCL1 受容体 (CXCR2) に着目し、ラット臼歯に惹起した根尖性歯周炎におけるこれらのタンパクおよびケモカイン関連分子の発現状況を組織学的・分子生物学的に検索し、病態の推移との関連を追及した。

【材料および方法】

1. 実験的根尖性歯周炎の誘発

5 週齢雄性 Wistar 系ラットの下顎第一臼歯を露髄させた後、開放のまま放置した。また、未処置の下顎第一臼歯を対照群とした (n = 4)。露髄開放後 14, 21, および 28 日経過後、灌流固定を行ない、次いで被験歯を

顎骨ごと摘出し、脱灰後凍結試料とした。Cryostat にて厚さ 8 μm (光学顕微鏡観察用) もしくは 30 μm (immune-LCM 用) の連続切片を作製した。

2. 免疫組織化学染色

CD31 (抗血管内皮細胞)、抗 Bcl-2 抗体を一次抗体として avidin-biotin-peroxidase complex 法により施した。また、各々の抗体について、根尖性歯周炎病変部における陽性染色部の面積を画像解析ソフトウェアにて定量した。

3. Immune-Laser Capture Microdissection (LCM) を用いた遺伝子発現の定量解析

CD31 に対する免疫染色後、LCM 顕微鏡を用いて、根尖性歯周炎病変部内の CD31 陽性血管内皮細胞を採取した。その後、全 RNA を抽出、cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を用いて VEGFR2, Bcl-2, CXCL1, および CXCR2 mRNA の遺伝子発現を定量した。

4. 統計学的検定

実験データは、Kruskal-Wallis 法ならびに Mann-Whitney U 検定および Bonferroni correction による多重比較検定を行い、危険率 5% とした。

【結果と考察】

CD31 陽性血管内皮細胞の密度は露髄開放 14 日以降 28 日経過後まで増加する傾向を示した。一方で Bcl-2 陽性反応物は、14 日経過後では有意に増加したが、その後は 28 日経過後まで減少する傾向を示した (図 1)。また、LCM を用いて採取した CD31 陽性血管内皮細胞における、VEGFR2, Bcl2, CXCL1 および CXCR 2 mRNA をリアルタイム PCR によって定量解析した結果、VEGFR2, Bcl2, CXCL1 および CXCR 2 ともに露髄開放

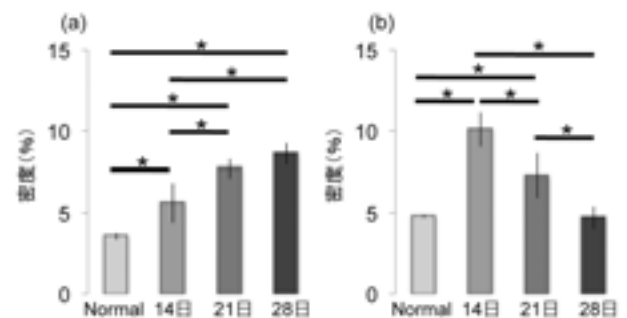


図 1 CD31 陽性血管内皮細胞 (a) および Bcl-2 陽性反応物 (b) の密度 (Yamanaka Y et al. Journal of Endodontics 38: 313-317, 2012 改編)

14日経過後に有意に mRNA の発現が増加し、以降 28日経過後まで有意に減少する傾向が示された(図2)。

本実験から、病変の拡大とともに CD31 陽性血管内皮細胞の密度が大きくなっていったが、拡大期である 14日経過例では、Bcl-2, CXCL1, CXCR2 mRNA の発現亢進が認められたことより、拡大期に置ける血管新生に Bcl-2, CXCL1, CXCR2 が関与することが示唆された。さらに、Bcl-2 が CXCL8 や CXCL1 などの血管新生関連ケモカインを nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 経路を介

して活性化することが報告されているが、本実験においても、14日経過例で Bcl-2 の発現亢進と同時に CXCL8 関連遺伝子である CXCL1 および CXCR2 の発現が亢進している。このことから、実験的根尖性歯周炎において、Bcl-2 による血管新生促進シグナルとそれに続く CXCL1 および CXCR2 の発現亢進が、血管新生の過程に関与し、病変部の拡大に何らかの役割を演じていることが示唆された。

【結 論】

血管内皮細胞における Bcl-2 タンパクおよび VEGFR2, Bcl-2, CXCL1 及び CXCR2 mRNA の発現が、CD31 陽性血管内皮細胞の密度のピークに先立ち 14日経過例で有意な増加を示したことから、血管内皮細胞におけるこれらの分子の発現亢進が血管新生と病変の拡大に関与していることが示唆された。

【文 献】

Yamanaka Y, Kaneko T, Yoshida K, Kaneko R, Yoshida N, Shigetani Y, Nör J.E, Okiji T: Expression of angiogenic factors in rat periapical lesions. *J Endod.* 38:313-317, 2011.

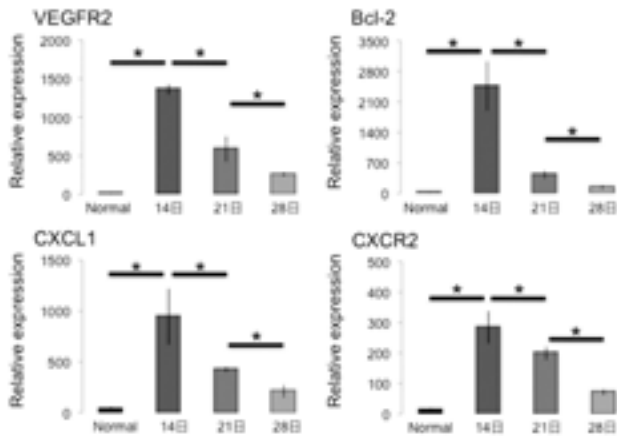


図2 血管内皮細胞における VEGFR2, Bcl-2, CXCL1 および CXCR2 mRNA の発現(Yamanaka Y et al. *Journal of Endodontics* 38. 313-317, 2012 改編)