



歯肉炎症組織における一酸化窒素産生酵素の
誘導遺伝子とアポトーシス

(研究課題番号 08672177)

平成8年度～平成10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11年3月

研究代表者 遠藤 英昭

(東北大学 歯学部 助手)

< は し が き >

歯周炎を引き起こした歯肉組織には、炎症の進行を阻止するための細胞や生体成分が集まってくる。場合によって、これらの物質は生体にとって刃となることもあり、それに対する防衛機能も存在する。その代表が活性酸素である。

最近、その一種に一酸化窒素が加わり、様々な生理活性がみつかっている。今回、「歯肉炎症組織における一酸化窒素産生酵素の誘導遺伝子とアポトーシス」というテーマで科学研究補助金を交付され、3年間にわたり研究を行ってきた。ここに、その成果をまとめ、後続の研究に一助となれば幸いである。

< 研 究 組 織 >

- 研究代表者 : 遠藤 英昭 (東北大学歯学部助手)
(研究協力者 : 飯山 正夫 (東北大学歯学部助手))
(研究協力者 : 大谷 江利子 (東北大学歯学部医員))
(研究協力者 : 加藤 清 (東北大学歯学部大学院))

< 研 究 経 費 >

平成8年度	1, 300千円
平成9年度	500千円
平成10年度	500千円

計 2, 300千円

< 研 究 発 表 >

(1) 学会誌等

H.Endo, K.Kato, E.Ohtani, and H. Horiuchi : Inducing Nitric Oxide Synthase in the Rat Inflammatory Gingival Tissue International Dental Journal, vol.48, p.343.1998

(2) 口頭発表

H. Endo, K. Kato, E. Ohtani and H. Horiuchi : Inducing Nitric Oxide Synthase in the Rat Inflammatory Gingival Tissue International Association of Periodontology 1997年9月4, 5日

Inducing Nitric Oxide Synthase in the Rat

Inflammatory Gingival Tissue

Dept. of Endodontics and Periodontics,

Tohoku University School of Dentistry

○Hideaki Endo, Kiyoshi Kato, Eriko Ohtani

and Hiroshi Horiuchi

<Introduction>

The nitric oxide synthase (NOS) exists in various mammalian cells and generally divides into 3 groups by its structure and origin. The functions of the nitric oxide (NO) are reported as a chemical mediator of endothelial cells and superoxide anion generator. It also relates to hormone function, prostaglandins, immuno-mediator, apoptosis, angiogenesis and cell-attachment. The polymorpho-nuclear leukocytes (PMNs) contain NOS, and release NO produced from L-arginine. The PMNs migrate to the inflammatory gingival tissue and produce superoxides by stimulants. In the present study, we investigated the distribution

of the 3 kinds of NOS and estimated its difference between healthy and inflamed gingiva in rats.

< Materials and Method >

Experimental Gingivitis in Rats

Three adult male Wistar rats (8 weeks old) were used. The inflamed gingiva was induced at the first molar by applying a small elastic ring around its cervix for 3 days. Rats were sacrificed with ample amount of pentobarbital sodium (Nembutal). The gingival samples were cut from the alveolar bone.

Immunocytochemical Staining

Gingival samples were fixed in 0.1M phosphate-buffered saline containing 4% paraform-aldehyde (4°C, 2hours : PBS), and were treated with 10% ~ 20% sucrose solution (4°C, 7 hours ~ overnight for 2 days). Gingival blocks were embedded in OCT compound (Tissue-Tek Miles, Illinois) and frozen in dry-ice acetone. Five um sections were cut on a cryostat(-20°C) and mounted onto silanized slideglass. The slides were dried by air for 30 min at room temperature and fixed in PBS containing 4% paraform aldehyde (4°C, 2 hours). The slides were washed by cold 0.01M PBS (5min, 2 times) followed by the 2nd wash using cold 0.01M PBS which contained 1% Triton X-100 and 0.1%

glycine (5 min, 3 times). Non-specific binding was blocked by immersing the slides in 1% bovine serum albumin (BSA) and 5% goat serum (in PBS, contained 1% Triton X-100) at room temperature for 20 min and washed by 0.01M PBS. Sections were then incubated for 1 hour with anti-NOS antibody (the Transduction Laboratories, Kentucky) at a 1:2000 ~ 3000 dilution in PBS with 0.2% BSA. IgG antibody (the Cappel Res. Pro., North Carolina) for the NOS-negative control was used at the same dilution. After washing by 0.01M PBS containing Triton X-100 (3 times, 5 min), the slides were washed in 0.01M PBS (5min). Then slides were incubated with FITC conjugated goat anti-Mouse Ig's (G+L) antibody (TAGO Immunologicals, California) for 1 hour at room temperature. The final wash was made using 0.01M PBS cotaining Triton X-100. The slide were observed with a fluorescence microscope (Nikon Optiphot, Nikon Co., Tokyo)

<Results >

In the experimental inflammatory gingiva which was in direct contact with the elastic ring, FITC-positive sites were observed. In the part of FITC-positive area, the 3 kinds of NOS antibody, i.e. anti-macrophage, anti-brain and anti-endothelial cells, were stained in 3 different width and concentration. The anti-

macrophage NOS antibody area was the widest FITC-positive area. The other 2 NOS staining areas were observed in the localized severe inflammatory gingival area.

< Discussion >

In the experimental gingivitis, PMNs and macrophages move to the stimulated inflammatory gingiva. Imai (1991) has reported that the mechanical stimulation induced by small elastic ring placed around the cervix of a molar produces a periodontal pocket by continuous pressure on the periodontium and that PMNs are observed on the surfaces of the ulcerated pocket wall. In this experiment, PMNs and macrophages were observed at ulcerated inner pocket wall in the hematoxylin-eosin staining sections.

PMNs and macrophages migrate to the bacteria induced inflammatory tissue, the stimulant such as lipopolysaccharide (LPS) induces NOS in macrophages. Bryant J.L. et al (1992) have reported that the PMNs have constitutive NOS and in the PMNs the stimulant does not induce NOS. The NOS usually demands Ca^{2+} to produce the NO. Bryant et al have purified the constitutive NOS from human PMNs and investigated regulatory factor in the reaction of NO production. The constitutive NOS purified by them from PMNs is not activated by Ca^{2+} . The role of constitutive NOS is considered as a mediator and a harmless

enzyme. The NOS in PMNs produce the high NO concentration area. The pH of acute inflammatory tissue inclines to acidic condition where the nitric oxide changes to the peroxynitrite. This has a strong injury effect in the tissues. The relationship between the NO and the other superoxide radicals is not as yet clear. It is reported that the NO has a bactericidal activity and regulates the production of the superoxide radical. It is suggested that the NOS plays an important role in the inflammatory gingiva.

In this experiment, 3 kinds of mouse-monoclonal NOS antibodies were used for immunohistochemical staining. All of the NOS antibodies reacted in the inflammatory gingiva. It was not clear whether common antigen or different antigen fragments existed among the 3 NOS monoclonal antibody. It is recognized that the NOS exists in the inflammatory gingival area because all of the NOS antibody combined with inflammatory gingiva. The blocking section which was treated by mouse IgG for preventing non-specific binding was slightly stained by FITC-conjugated goat anti-mouse Ig's (G+L) antibody. In the negative-control section, these were stained slightly by FITC-conjugated antibody. It was suggested that the each 3 NOS monoclonal antibody has a fragment match to the reacted area of PMNs.

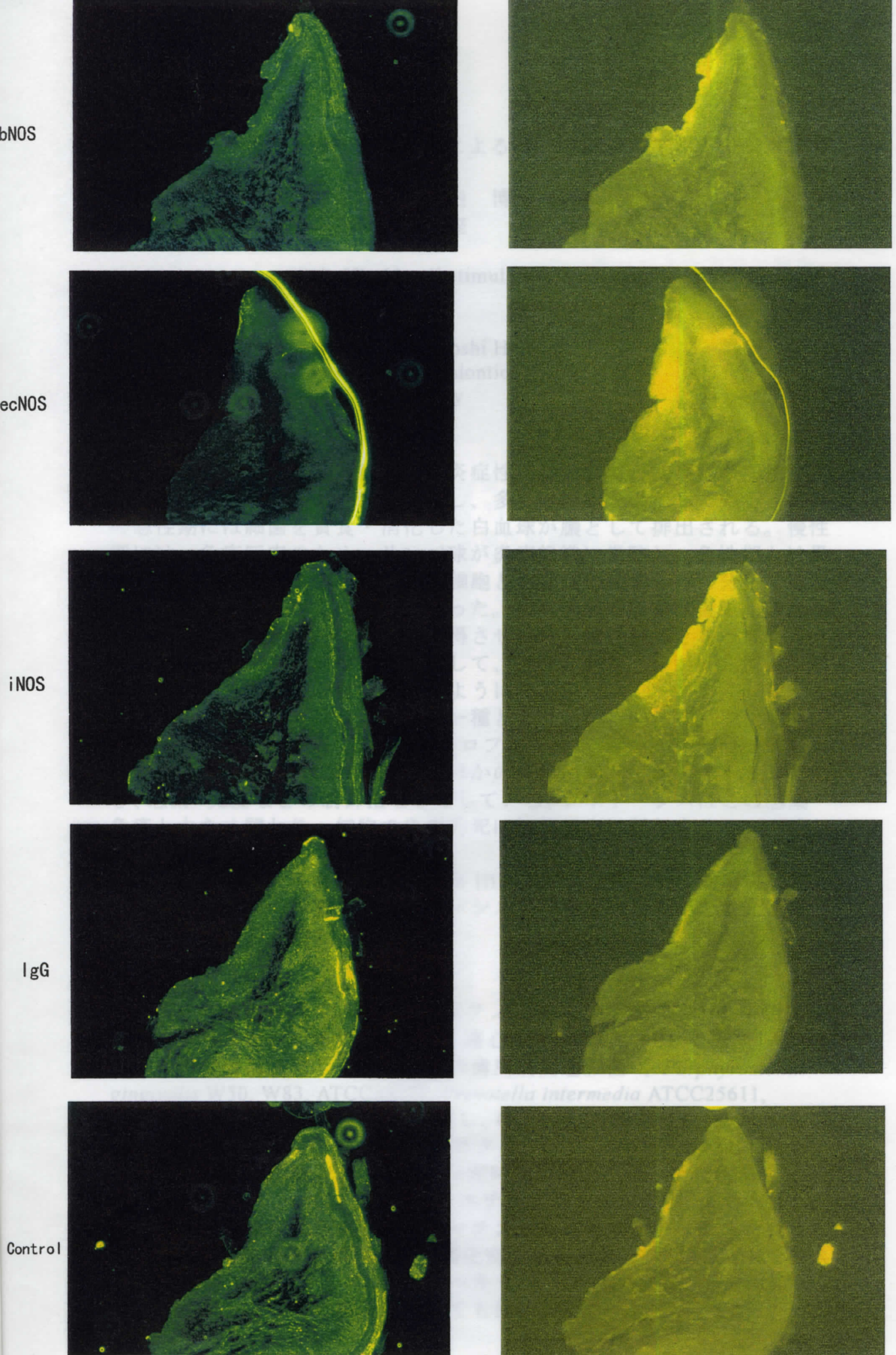


図 1. ラット実験的菌周炎歯肉における一酸化窒素産生酵素の免疫蛍光抗体染色像
 位相差顕微鏡像 蛍光顕微鏡像

歯周病関連細菌・一酸化窒素刺激による HL-60 細胞のアポトーシス誘導

遠藤 英昭、飯山 正夫、堀内 博
東北大学歯学部歯科保存学第一講座

Induction of apoptosis in HL-60 cell stimulated by periodonto-pathic bacteria and nitric oxide

Hideaki Endo, Masao Iiyama and Hiroshi Horiuchi
Department of Endodontics and Periodontics,
Tohoku University School of Dentistry

<緒論>

歯周炎を引き起こした組織には炎症性細胞として、初期に多形核白血球が、慢性期にはリンパ球が存在し、多くの機能を果たしている。炎症の急性期には細菌を貪食・消化した白血球が膿として排出される。慢性期には、免疫反応のため、リンパ球が炎症組織に常駐し、急性期とは異なる反応を引き起こす。ただ、両細胞とも骨髄由来であり、分化の過程でそれぞれの機能をもつようになった。歯周病関連細菌は歯周組織を進入経路として、全身的な免疫を獲得させるほど強い抗原となっている。それらの細菌由来抗原は血流を介して、全身を回り、やがて免疫担当細胞によってその抗体が産生されるようになる。

一方、一酸化窒素は活性酸素の一種として、いろいろな生理活性を持つことが次第にわかってきた。マクロファージが産生する一酸化窒素は、直接細菌を殺す作用だけでなく、ほかの細胞に対してシグナルとして働き、感染・免疫などの制御指令を出している。アポトーシスはこの感染・免疫と大きく関わり、細胞の自発的死亡は抗体産生に関与するリンパ球と密接な関係にある。

今回、我々は前骨髄性白血病由来 HL-60 細胞を用いて、歯周病関連細菌と一酸化窒素の刺激で、アポトーシスが誘発されるのかを蛍光色素で核染色を行って検出した。

<材料および実験方法>

HL-60 を培養面積 75cm² のプラスチック・フラスコに 10%牛胎児血清含有 RPMI1640 培地で発育させ、遠心して回収し、PBS で洗浄した後、一定の細菌数に希釈した。5 種類の歯周病関連細菌 (*Porphyromonas gingivalis* W50, W83, ATCC33277, *Prevotella intermedia* ATCC25611, ATCC25261) の菌体を、PBS で希釈し、OD を 0.1 (測定波長 550nm) に調整した。HL-60 細胞を 96 穴マイクロタイタープレートに播種し、希釈した歯周病関連細菌液で刺激した。一定時間刺激した後、蛍光色素 (ヘキスト 33342, アクリジンオレンジとエチジウム・ブロミド) で染色し、落射型蛍光顕微鏡で観察し、クロマチンの凝縮でアポトーシスを判定した。細菌の菌体刺激と同時に、一酸化窒素を自発的に放出する NOR (エチル-ヒドロキシイミノ-ニトロ-ヘキサ-イル-ピリジン) を添加した時のアポトーシスの誘導についても検討した。

歯周病関連細菌をレチノイン酸で処理した後、歯周病関連細菌と反応させて核染色した細胞観察 (ヘキスト 33342)

(ヘキスト 33342)

＜結果および考察＞ (図2~6)

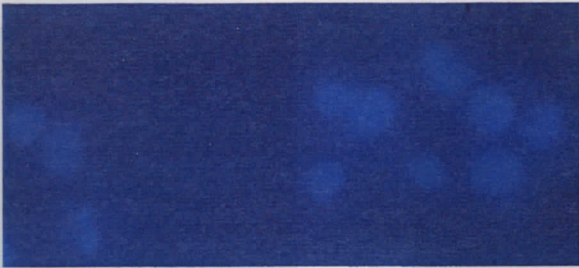
HL-60細胞のアポトーシスは各細菌間でほとんど差がなく、対照ともあまり差がなかった。これは、HL-60が未熟な細胞であり、細菌菌体・内毒素に反応するには更に他の因子、たとえばインターフェロン γ などの関与が必須であると思われる。

今回用いた一酸化窒素の自発放出物質はNOR4で、この物質は半減期が60分となっている。細菌とHL-60細胞との反応時間が最大4日であることを考慮すると、短い半減期であるが、アポトーシスがその後引き続いて起こるとすれば、この時間は細胞にとって長い反応時間と考えられる。実際の反応の場ではどのような割合で、一酸化窒素が放出されているか不明である。これは、一酸化窒素の反応時間が短くて、測定が困難であることに起因しているが、代謝産物の分析で測定している報告もある。反応の際、その他の因子(例えば、細胞数・一酸化窒素の阻止因子など)が複雑に影響を与え、実際の生態内で分析するのは困難である。今回の実験系のように、細胞数・気相・一酸化窒素放出量・使用培地などが既知であれば、分析は容易になる。一酸化窒素が細胞のアポトーシスを誘導するには、その量と標的となる細胞内の部位が問題となる。この点についても、今後検討する必要がある。

HL-60細胞を培養する際に、培地中の酸素濃度を調整することで、細胞のアポトーシスを誘導することができる。本研究では、培地中の酸素濃度を調整することで、HL-60細胞のアポトーシスを誘導した。また、培地中の酸素濃度を調整することで、HL-60細胞のアポトーシスを抑制することも確認された。これらの結果から、培地中の酸素濃度は、HL-60細胞のアポトーシスを誘導する重要な因子であることが示唆された。

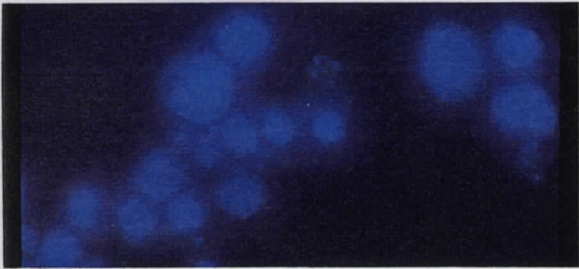
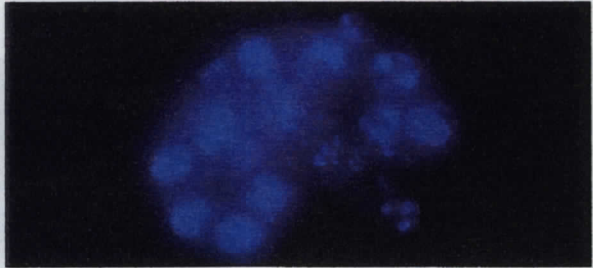
＜材料および方法＞

HL-60細胞を培養する際に、培地中の酸素濃度を調整することで、細胞のアポトーシスを誘導することができる。本研究では、培地中の酸素濃度を調整することで、HL-60細胞のアポトーシスを誘導した。また、培地中の酸素濃度を調整することで、HL-60細胞のアポトーシスを抑制することも確認された。これらの結果から、培地中の酸素濃度は、HL-60細胞のアポトーシスを誘導する重要な因子であることが示唆された。



P. g. W50
RA 処理 HL60 細胞

P. g. W83
RA 処理 HL60 細胞

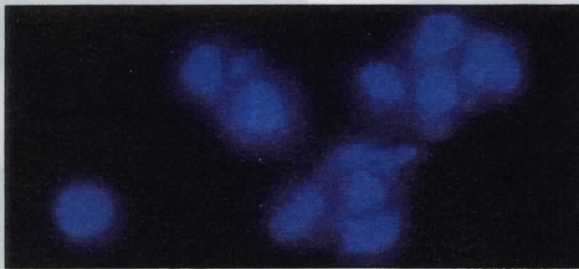


P. g. ATCC 33277
RA 処理 HL60 細胞

P. i. ATCC 25611
RA 処理 HL60 細胞



P. i. ATCC 25261
RA 処理 HL60 細胞



細菌反応なし
RA 処理 HL60 細胞



図 2. HL60 細胞をレチノイック酸で処理した後、歯周病関連細菌と反応させて
蛍光物質染色した顕微鏡像 (ヘキスト 33342)

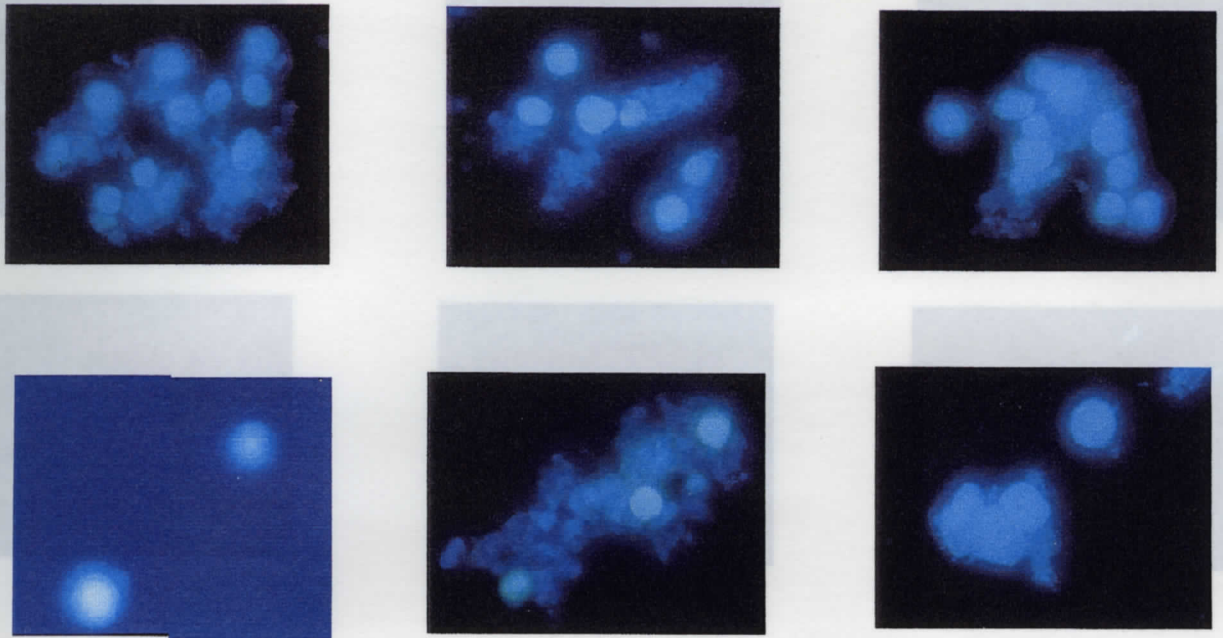


図 5. HL-60細胞にNOR4を歯周病関連細菌とともに反応させた時の蛍光色素（ヘキスト

図 3. HL-60細胞と歯周病関連細菌を反応させた後、蛍光物質（ヘキスト 33342）で染色した時の像

- a. - *Porphyromonas gingivalis* W50; b. - *P. g.* W83; c. - *P. g.* ATCC 33277;
 d. - *Prevotella intermedia* ATCC 25611; e. - *P. i.* ATCC 25261; f. - 細菌なし

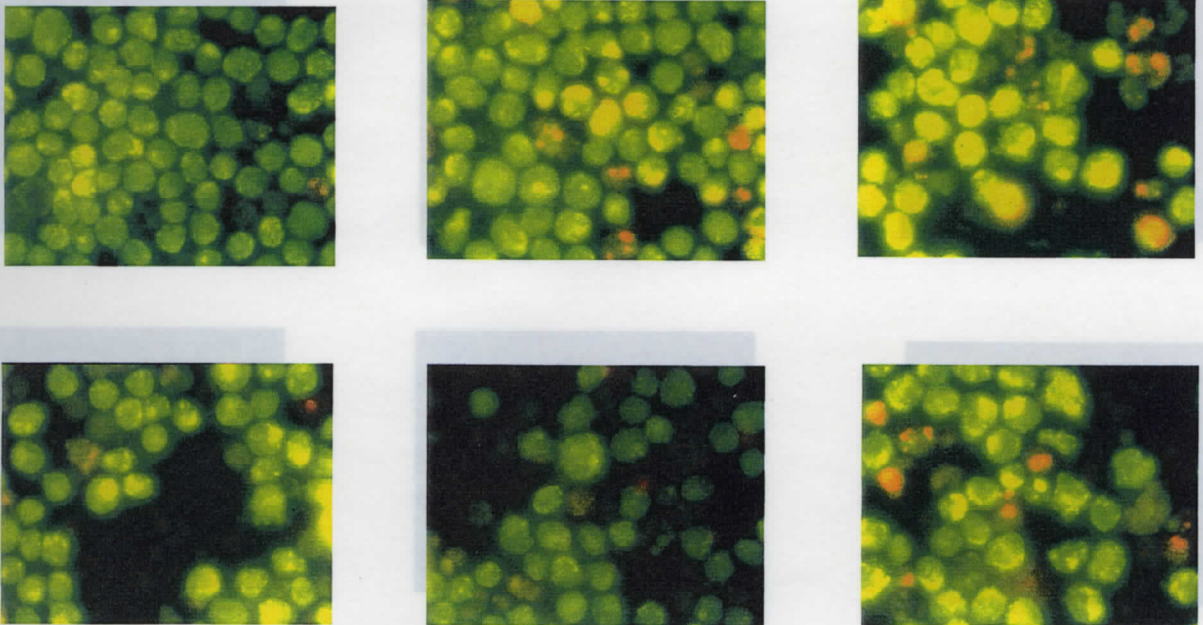


図 4. HL-60細胞と歯周病関連細菌を反応させた後、蛍光物質（アクリジン・オレンジとエチジウム・ブロミド）で二重染色した時の蛍光顕微鏡像

- a. - *P. g.* W50; b. - *P. g.* W83; c. - *P. g.* ATCC 33277;
 d. - *P. i.* ATCC 25611; e. - *P. i.* ATCC 25261; f. - 細菌なし

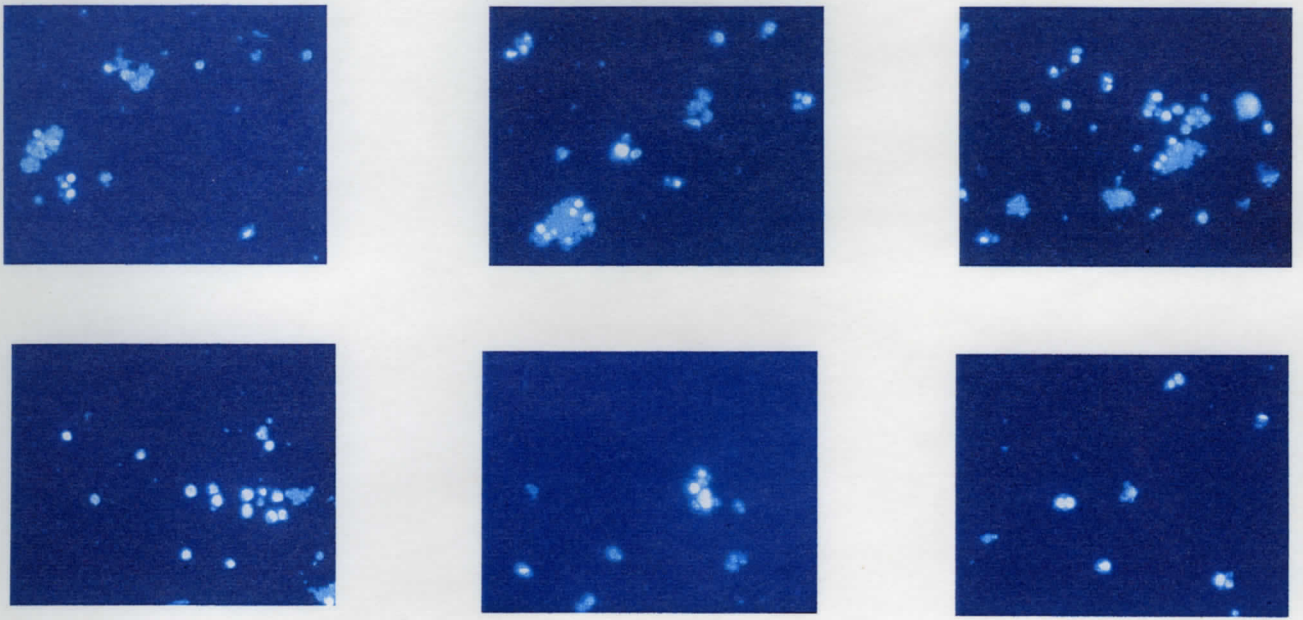


図 5. HL-60 細胞に NOR4 を歯周病関連細菌とともに反応させた時の蛍光色素（ヘキスト 33342）染色像

- a. - *Porphyromonas gingivalis* W50 株 ; b. - *P. g.* W83 株 ; c. - *P. g.* ATCC33277 ;
 d. - *Prevotella intermedia* ATCC25611; e. - *P. i.* ATCC25261; f. - 細菌なし

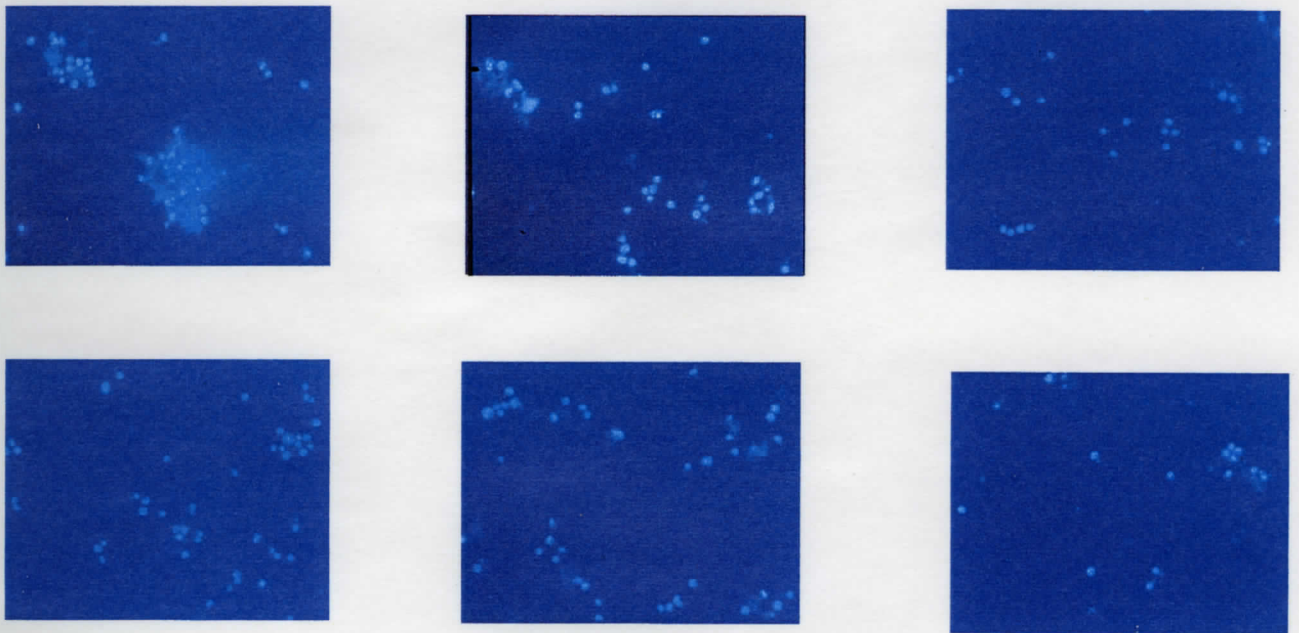


図 6. HL-60 細胞に NOR4 を歯周病関連細菌とともに反応させた時に蛍光色素（ヘキスト 33342）染色像—蛍光用封入材使用

- a. - *P. g.* W50 株 ; b. - *P. g.* W83 株 ; c. - *P. g.* ATCC 33277
 d. - *P. i.* ATCC 25611 ; e. - *P. i.* ATCC 25261 ; f. - 細菌なし