

原 著

根尖性歯周炎に見られる炎症細胞のエピジェネティクス解析

松下孝直¹⁾ 田沼順一²⁾ 日下部修介¹⁾ 小竹宏朋¹⁾
竹内宏³⁾ 堀田正人¹⁾

Epigenetic alteration of inflammatory cells in the apical periodontitis lesions

MATSUSHITA TAKANAO¹⁾, TANUMA JUN-ICHI²⁾, KUSAKABE SHUSUKE¹⁾, KOTAKE HIROTOMO¹⁾,
TAKEUCHI HIROSHI³⁾ and HOTTA MASATO¹⁾

難治性である慢性の根尖性歯周炎に対して、歯科用顕微鏡やCT画像診断を駆使した歯内療法が施行されているが、歯科臨床では依然として完全に治癒しない根尖性歯周炎に遭遇することが多い。この原因にはオーラルバイオフィルムの細菌構成の違いや根尖病巣の急速な拡大とともに症状を示すという宿主の因子も考えられる。周知の如く、慢性の根尖性歯周炎では、口腔常在菌の根管内から根尖孔外への感染に伴う根尖部歯周組織の細胞が産生する種々の炎症性サイトカインや成長因子が放出され、炎症細胞の浸潤が多く認められる。しかし、根管内の無菌化（細菌除去）後においても、完全治癒しない症例が多いのも事実であり、根尖歯周組織に持続的な炎症細胞が存在していることが考えられる。そこで、本研究では難治性の慢性根尖性歯周炎100症例における病変部の検索、根管内細菌、免疫担当細胞、炎症性サイトカイン、細胞増殖因子とそのレセプターの検出を行った。さらに、これら慢性根尖性歯周炎において炎症細胞の浸潤・増殖が見られるp16遺伝子産物（抗p16抗体と抗Ki-67抗体の陽性反応）におけるエピジェネティクスな変化、すなわち、DNAのメチル化等の化学修飾による遺伝子発現の制御伝達による可能性について、免疫組織学的に検索を行った。

まず、研究に用いた症例は難治性の慢性根尖性歯周炎100症例でHE染色による病理組織学的観察に基づく分類を行った結果、40症例が歯根肉芽腫、45症例が歯根嚢胞、15症例が慢性化膿性根尖性歯周炎で、ほとんどの病巣は幼若から成熟した肉芽組織から構成されていた。根管内からの細菌の侵襲により根尖周囲に細菌が認められた症例は、慢性化膿性根尖性歯周炎に3例、歯根嚢胞に1例だけであった。免疫担当細胞の検出ではCD68陽性のマクロファージの浸潤が最も多く見られ、リンパ球は少なかった。炎症性サイトカインの検出ではマクロファージを中心に多くの炎症細胞が認められ、これらのレセプターは主に線維芽細胞と血管内皮細胞に認められた。細胞増殖因子のbFGF、PDGF、TGF- β はマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞に発現し、これらのレセプターは線維芽細胞と血管内皮細胞に多く認められた。エピジェネティクスな変化の解析結果では幼若肉芽組織におけるマクロファージや線維芽細胞にp16陽性を多く認め、成熟または癒着化した線維組織では陰性を示した。また、歯根嚢胞では裏装上皮細胞にp16陽性が多く認められたが、細胞増殖を示すKi-67は全ての症例で陽性率が低く、これは炎症刺激による炎症細胞の反応性増殖とみなした。

以上の結果から、難治性の慢性根尖性歯周炎の病変は免疫応答を生じ、線維芽細胞と血管内皮細胞がマクロファージとの間でサイトカインネットワークを形成し、これにエピジェネティクスな変化が加わることで根尖性歯周炎に存在する肉芽組織の形成と線維化の維持に繋がることが示唆された。

キーワード：難治性根尖性歯周炎、エピジェネティクス、炎症性サイトカイン

¹⁾朝日大学歯学部口腔機能修復学講座 歯科保存学分野歯冠修復学

²⁾朝日大学歯学部口腔病態医療学講座 口腔病理学分野

³⁾朝日大学歯学部

501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

¹⁾Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation

²⁾Department of Oral Pathology, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control

Asahi University School of Dentistry

³⁾Asahi University School of Dentistry

Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

(平成27年12月4日受理)

Endodontic treatment is usually performed using dental microscopy and CT imaging, however, we have often encountered the cases of apical periodontitis that cannot be fully cured. Some factors affecting this resistance include the bacterial component ratio of the oral biofilm and host factors that show rapid progress of the symptoms. Inflammatory cells infiltration leads to the variety of cytokines production and growth factors secretion when the apical periodontal tissues have been infected by oral bacteria. There are many incurable cases even the sterilization of the root canal was fully performed because the chronic inflammation was persisting in the apical lesion. Here we investigated 100 patients of intractable chronic apical periodontitis and detected intraroot canal bacteria, immunocytes concerning with inflammatory cytokines, cellular growth factors and their receptors production. Furthermore, immunohistological investigation of the infiltrated inflammatory cells of such patients was performed to examine whether these inflammatory cells proliferation was associated with epigenetic alteration that leads to the p16 gene products (positive for anti-p16 and anti-Ki-67 antibodies) or controlled genes expression due to chemical modification such as DNA methylation.

All chronic apical periodontitis cases H-E stained samples were picked up by histopathological observation and classified into 40 cases of apical granuloma, 45 cases of radicular cyst, and 15 cases of chronic suppurative apical periodontitis, respectively. Majority of these lesions were granulation tissue composed of the variety of immatured inflammatory cells-rich and matured fibrous tissue. Intracranial bacterial colonies were observed in three cases of chronic suppurative apical periodontitis and one case of radicular cyst. There were marked CD68 positive macrophages but few lymphocytes in the radicular cyst cases. Inflammatory cytokine levels corresponded to marked inflammatory cells including macrophages, and receptors for these cytokines were observed mainly in fibroblasts and vascular endothelial cells. The cellular growth factors such as bFGF, PDGF, and TGF- β were expressed in macrophages, fibroblasts, and vascular endothelial cells, whereas, receptors of these growth factors were mainly observed in fibroblasts and vascular endothelial cells. The epigenetic alteration led to p16 positive macrophages and fibroblasts was observed in the immature granulation tissue, but not detected in the matured and/or scarred fibrous tissue. The p16 was also found in the lining epithelium of all radicular cyst cases. However Ki-67, demonstrating these cellular proliferations, revealed low positive rate in all cases, suggesting these cellular proliferation were reflected due to inflammatory reactive proliferation, not in tumorigenesis.

These results suggested that the intractable chronic apical periodontitis lesion stimulates an immune response, a cytokine network is formed among in fibroblasts, vascular endothelial cells and macrophages, besides the epigenetic alteration of inflammatory cells lead to conserve the granulation tissue formation in apical periodontitis.

Key words: refractory cases of chronic apical periodontitis, epigenetics, inflammatory cytokines

緒 言

近年、DNAの塩基配列には変化を起こさずにDNAのメチル化やヒストンのアセチル化等の化学修飾によって遺伝子の発現を制御する「エピジェネティクス」が、発生・分化、炎症およびがん化等を説明するメカニズムの一つとして注目を集めている¹⁾。このような化学修飾は発生や分化を制御する基本的な仕組みで、細胞の記憶として働くことが分かっている²⁾。胚発生、細胞分化、ゲノムインプリンティング、X染色体不活性化に関わるとともに、体細胞クローン作製時のゲノムリプログラミングにも重要である³⁾。また、発生後も、神経・免疫機能の制御に関わることが強く示唆されていると同時に、老化にも深く関わっている¹⁻³⁾。さらに、生活習慣などの環境要因によるエピジェネティクスの異常は、発がんの原因となることが知ら

れ、神経変性疾患や自己免疫病など多数の病気の原因としても示唆されている^{4,5)}。エピジェネティクス調節機構の先天異常は、重大な神経・免疫異常を誘発する。したがって、エピジェネティクスの基本的な分子機構、異常の誘発機構、また、異常の標的遺伝子の解明によってもたらされる新たな知見が、新たな作用メカニズムに基づく医薬品の開発や疾病の診断など、産業への応用に大きな影響を及ぼすことが見込まれている。世界的にも、ヒトゲノム解読後の重要な研究課題として位置づけられ、ゲノム全体に亘ってエピジェネティクスを調べる研究や、疾患との関係を探る研究等が盛んに行われており、論文数も急激に増加している状況にある。

最近になり口腔細菌を含む微生物の感染に起因する炎症性疾患においてもエピジェネティックな変化としてのDNAのメチル化を示唆する報告がいくつかな

れている⁶⁻⁸⁾。口腔領域の前癌病変や悪性腫瘍の報告は多くみられるが⁹⁻¹¹⁾、他の口腔疾患におけるエピジェネティクス関連の論文はほとんどみられない。根尖性歯周炎に分類される根尖性歯周炎の歯根嚢胞などは、マラッセの上皮遺残や線維性結合組織が炎症性サイトカインの作用により反応性に増生するものも多くみられる炎症性疾患の一つである¹²⁾が、この疾患の発症原因は、根管内の細菌が排除されずに残っているために生じるものであることが明らかにされている¹³⁾ものの、治療の困難さを左右しているのは、原因が作用した後の発症機転ならびに炎症組織の動態が未だに不明な点が多く、これが予後や治療方針にも影響している可能性が高い。すなわち、難治性症例について、エピジェネティックな変化を検証することは、予後や治療方針の決定にも大いに貢献できるものであると考えられる。

そこで本研究では難治性の慢性根尖性歯周炎のうち歯根嚢胞、歯根肉芽腫、慢性化膿性根尖性歯周炎（根尖性周囲膿瘍）の症例について、慢性炎症の特徴である肉芽組織やマラッセ上皮遺残の増生に関する発症メカニズムの一端の解明を試みた。

材料および方法

1 材料

本学附属病院にて歯科治療中にエックス線検査で根尖部にエックス線透過性病変の根尖病巣を形成するまでに至った、根尖性歯周炎（図1）で、かつ保存不可能と診断された根尖病巣の症例100例（歯根肉芽腫40症例、歯根嚢胞45症例、慢性化膿性根尖性歯周炎（根尖性周囲膿瘍）15症例）を研究対象とした。抜歯後歯頸部や歯根部に付着してきた組織や歯根端切除術によって摘出された病巣の組織塊は通法により病理組織学的診断に提供されたパラフィン包埋標本を診断後、新たにパラフィン薄切切片を作製し、ヘマトキシリン-エオ



図1 典型的な根尖性歯周炎2例のデンタルエックス線像

ジン染色（H-E染色）と炎症性組織の病態把握とエピジェネティックな様相を捉えるために、以下の免疫組織化学的検索を行った。なお、本研究対象に用いた被験材料は朝日大学歯学部附属病院で外科的に切除されたものであり、使用した病理組織標本ならびに患者等の個人情報に関わる詳細については朝日大学歯学部臨床研究倫理委員会の承認を受け実施した（許可番号27077）。

2 抗体

1) 根管細菌の検出

根尖性歯周炎患者の根管内に挿入した綿棒を brain heart infusion broth (Difco, Detroit, MI, USA) を入れた2つのフラスコに投入した。一方のフラスコは好氣的に、他方のフラスコは嫌気ジャーを用いて嫌氣的に、それぞれ37℃で1週間培養した。培養終了後、生理食塩水（生食）で洗浄し、2,000回転/分で3回遠心し、沈渣を採取した。そして、好氣的および嫌氣的に培養した沈渣を等量混合し、それを1 mg/ml の生食浮遊液とした。

次に、生食浮遊液を等量の Freund' s incomplete adjuvant (Difco, Detroit, MI, USA) と混合・乳化し、adjuvant 細菌抗原とした。adjuvant 抗原は、その1 ml を1週間ごとに計4回家兎の後肢大腿筋に注射した。最終注射から一週間後に、寒天ゲル内沈降反応によって、抗細菌抗体が産生されているのを確認し、通法により頸動脈より全採血し、試験管に分注した。分注した血液は1日静置してから、血清をピペットによって採取した。

採取した血清は affinity chromatography (Affigel Protein-A MAPS-II kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) によって IgG 分画を採取した。これに fluorescein isothiocyanate (FITC, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を活性化し、その後、PBS (0.15M, pH7.1) で一週間透析して未標識の遊離 FITC を除去し、さらに生じた沈殿物を遠心によって除去した後、DEAE-cellulose column (Brown, Berlin, NH, USA) を通過させて精製し、最大濃度の分画を蛍光抗体液として使用した。

2) 免疫細胞の検出

マクロファージの検出には抗 CD68抗体 (Dako Japan, Kyoto)、Tリンパ球の検出には抗 CD3抗体 (ニチレイバイオサイエンス、東京)、Bリンパ球検出には抗 CD79 α 抗体 (Dako Japan, Kyoto) をそれぞれ1次抗体として用いた。

3) 炎症性サイトカインの検出

1次抗体として、抗 IL-1 α 抗体 (Dako Japan,

Kyoto), 抗 IL-1 α R 抗体 (Dako Japan, Kyoto), 抗 TNF- α 抗体 (Dako Japan, Kyoto), 抗 TNF- α R 抗体 (Dako Japan, Kyoto) を用い, IL-1 α と TNF- α の 2 種類の炎症性サイトカインとそのレセプターの検出を行った。

4) 増殖因子の検出

抗 bFGF 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), 抗 bFGFR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), 抗 PDGF 抗体 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), 抗 PDGFR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), 抗 TGF- β 抗体 (Dako Japan, Kyoto), 抗 TGF- β R 抗体 (Dako Japan, Kyoto) を 1 次抗体として用いた。

5) エピジェネティックな変化と細胞の増殖の検出

DNA メチル化の検出をエピジェネティックな変化として捉えるため, p16 遺伝子に着目した。p16 遺伝子はサイクリン依存性キナーゼ阻害剤としての癌抑制遺伝子として知られている。また, ピロリ菌感染による慢性胃炎でもメチル化は密接に関係することが知られている¹⁴⁾ことから, 本研究では, そのメチル化をタンパクの産生として不活性化による活発な炎症性細胞の増殖の一面として捉えるべく, p16 遺伝子産物の検出に抗 p16 抗体 (Dako Japan, Kyoto) を用いた。一方, このメチル化異常が腫瘍性の増殖ではないことを証明するために細胞周期の促進状態を捉えることによって細胞の増殖を検出できる抗 Ki-67 抗体 (Dako Japan, Kyoto) による陽性とその単位面積あたりの陽性率 (MIB-1 index) を求めた。

3 染色および解析

1) 蛍光抗体染色法

作製した FITC 標識抗根管内細菌抗体を脱パラフィン後の切片に滴下し, 湿潤下で 3 時間反応させ, 反応後, 洗浄した。そして, 蛍光顕微鏡にて観察した。非特異反応の確認には, 未標識の抗根管内細菌抗体液を予め反応させておき, その後に標識抗体液を反応させた。

2) 免疫組織化学的検索

病理診断後のパラフィン包埋ブロックから薄切した約 4 μ m の連続切片をシランコーティングスライド (Dako, Glostrup, Denmark) に貼付した。100%キシレンで脱パラフィン後, 下降エタノールで親水, 水洗を行い, 0.14M NaCl 含 0.01M phosphate buffer saline (PBS) に浸漬した。ついで 3% 過酸化水素水に 10 分間浸漬を行い, 内因性ペルオキシターゼ活性阻害させ, 流水下で洗浄後, PBS に浸漬した。抗原賦活

処理を行った後, 非特異反応を防ぐため 1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で希釈した各種 1 次抗体を 4 $^{\circ}$ C, over night で反応させた。PBS で洗浄後, シンプルステイン MAX-PO (M) (Nichirei Bioscience, Tokyo), 発色基質は 3,3-Diaminobenzidine (DAB) (Dako, Glostrup, Denmark) を二次抗体に使用した。核対比染色はヘマトキシリンで行った。水洗後, 脱水, Mount-Quick (Daido Sangyo, Tokyo) で封入をした。

4 統計解析

各解析後のデータ間における比較検討は p16 と Ki-67 の発現量については Student の t 検定を用いて両側検定を行った。臨床病理学的特性については Fisher の直接確率法を用いて両側検定を行い, $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

結 果

1 被検材料の組織所見

被検材料の組織所見より分類を行った結果, そのうち, 歯根肉芽腫が 40 例, 慢性化膿性根尖性歯周炎 (根尖性周囲膿瘍) が 15 例, 歯根嚢胞が 45 例であった。また, 3 種類の組織所見は, それぞれに特異的な所見と共通する所見があった。共通する所見は, すべての病型の病巣の組織構成の主体が成熟または幼若な線維組織で囲まれた肉芽組織であることであった。特異的な

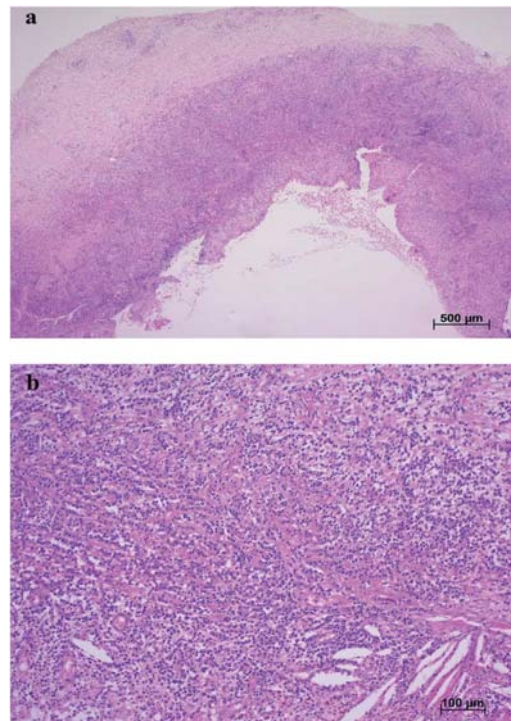


図 2 歯根肉芽腫の病理組織像
(a: 弱拡大, b: 中拡大)

組織像は、歯根肉芽腫は肉芽組織のみの形成からなり(図2)、慢性化膿性根尖性歯周炎(根尖性周囲膿瘍)は、このような肉芽組織の内部には好中球を含む膿瘍の形成を認め(図3)、歯根嚢胞は内部に嚢胞腔の形成を認め、嚢胞壁は3層構造(裏装上皮層・肉芽組織層・結合組織層)であった(図4)。なお、各病型の病巣に共通する肉芽組織の線維芽細胞や血管内皮細胞の形状は、短および長紡錘形であったが、これら細胞には、分裂像はわずかししか認められなかった。

このような炎症巣の中には炎症細胞浸潤がびまん性または限局性にマクロファージを中心として、リンパ球や形質細胞、さらに好中球などの浸潤を伴っていた。好中球の浸潤は、慢性化膿性根尖性歯周炎では極めて多く、他の症例でも、歯根肉芽腫においてもびまん性に浸潤し、化膿性歯根肉芽腫とすべきものも見られた。

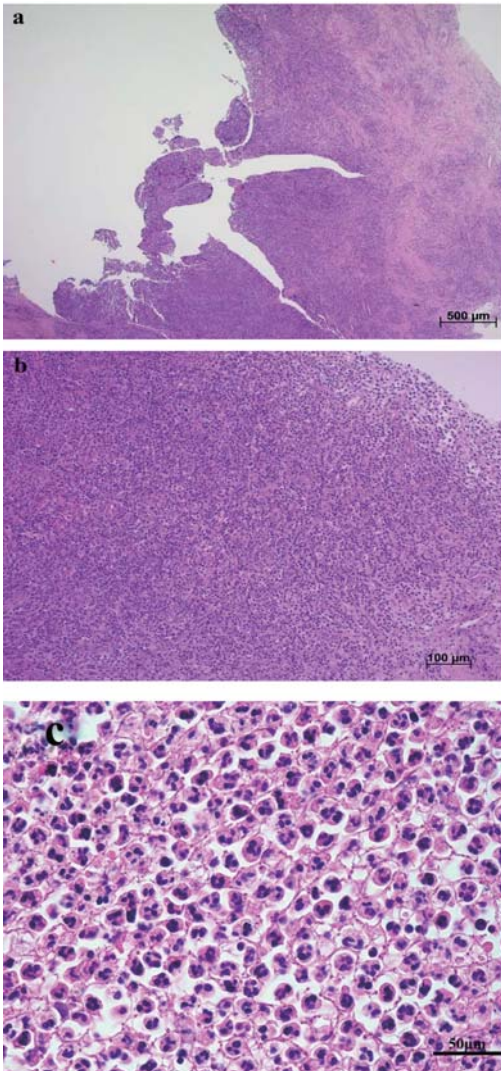


図3 慢性化膿性根尖性歯周炎の病理組織像
(a: 弱拡大, b: 中拡大, c: 膿瘍部分の強拡大)

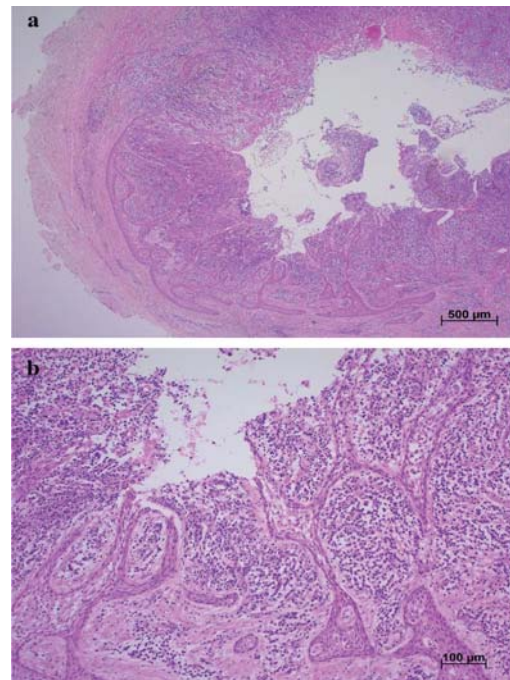


図4 歯根嚢胞の病理組織像
(a: 弱拡大, b: 中拡大)

2 根管内細菌の検出

組織像を示した各症例について、根管内細菌がどの程度の関連性を持っているのかを抗根管内細菌抗体を一次抗体として検索した。その結果、15例の慢性化膿性根尖性歯周炎(根尖性周囲膿瘍)の病巣においては、3例のみに、膿瘍腔内に菌塊状や好中球に取り込まれた状態(図5a)、あるいは膿瘍膜の肉芽組織の好中球に貪食された状態での陽性所見を得た(図5b)。歯根肉芽腫に分類されたものには、細菌そのものや貪食細胞に取り込まれた状態の細菌を認めるものはなかった。歯根嚢胞では、45例中1例の嚢胞腔内に小塊状の細菌の存在を認めた。

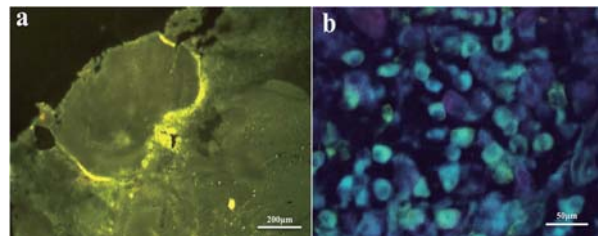


図5 根管内細菌抗体による慢性化膿性根尖性歯周炎における写真
(a: 膿瘍内細菌塊, b: 細菌を貪食した好中球)

3 免疫担当細胞の検出

1) CD68免疫染色

マクロファージのマーカーであるCD68陽性細胞は、根尖性歯周炎のすべての症例の肉芽組織中に、多数の陽性細胞がみられた。その陽性細胞数は、他のT細胞・B細胞、サイトカン、増殖因子、免疫担当細胞などよりも多く認めた(図6)。

2) CD3とCD79a免疫染色

CD3とCD79aのそれぞれの染色性は、T細胞(CD3)(図7)およびB細胞(CD79a)(図8)もすべての症例で検出された。その染色の浸潤様式は、びまん性の浸潤部分と特定の部位に集簇性に浸潤する場合がみられた。しかし、各抗体の陽性像には単クローン性が無く、それはすべての症例の病理組織・細胞に陽性を示すため、今回の疾患には有用でない抗体である。

4 炎症性サイトカインの検出

1) IL-1 α とIL-1 α R

IL-1 α はすべての症例の肉芽組織中に浸潤したマクロファージ、多数の線維芽細胞、B細胞、および血管内皮細胞に発現を認めた(図9)。IL-1 α Rはすべての線維芽細胞と血管内皮細胞、および一部のリンパ

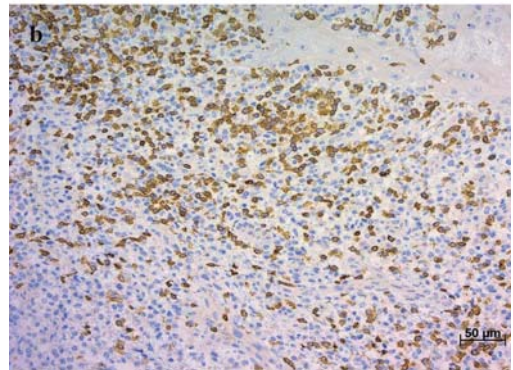
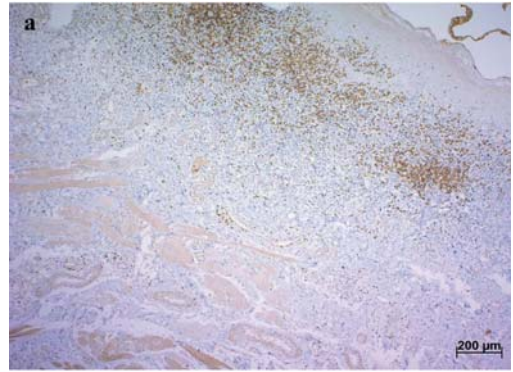


図7 CD3免疫染色像
(a:弱拡大, b:強拡大)

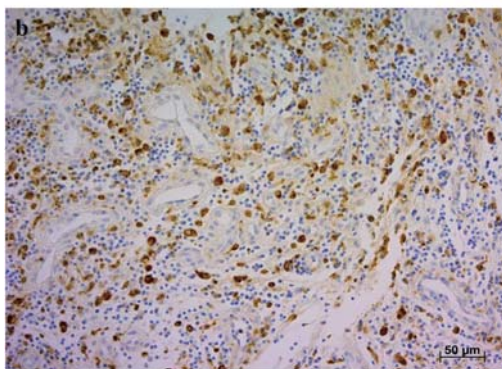
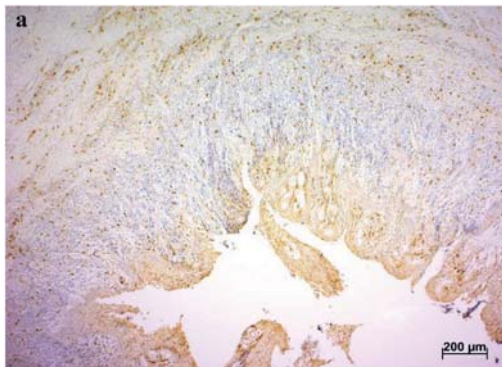


図6 CD68免疫染色像
(a:弱拡大, b:強拡大)

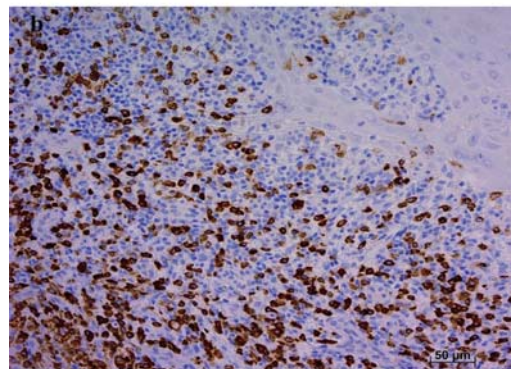
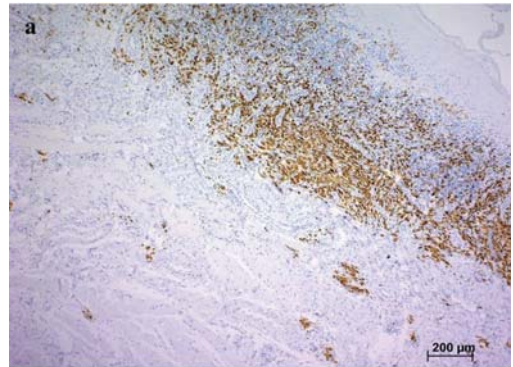


図8 CD79a免疫染色像
(a:弱拡大, b:強拡大)

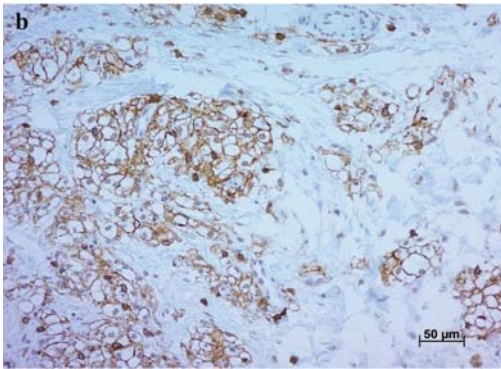
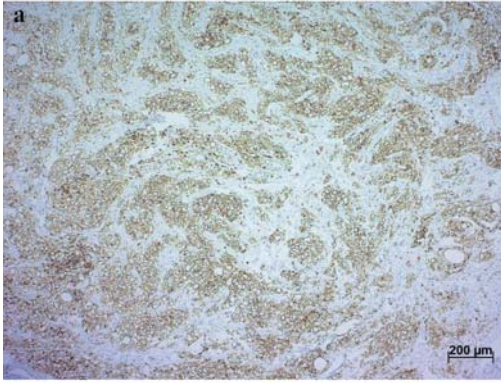


図9 IL-1 α 免疫染色像
(a:弱拡大, b:強拡大)

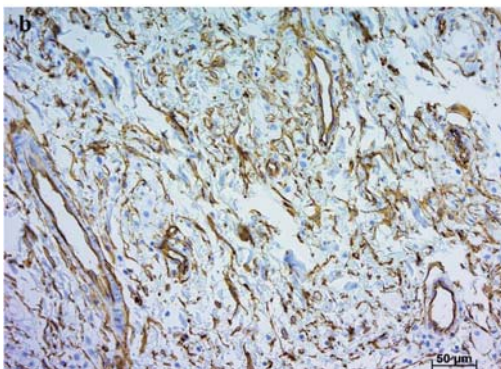
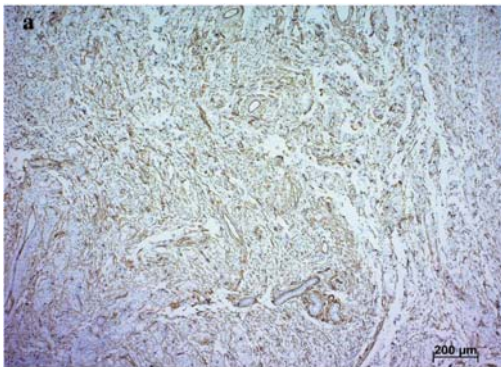


図10 IL-1 α R免疫染色像
(a:弱拡大, b:強拡大)

球やマクロファージに発現を認め、発現細胞のほとんどは線維芽細胞と血管内皮細胞であった(図10).

2) TNF- α と TNF- α R

代表的な炎症性サイトカインの TNF- α は IL-1 α と同じく、マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞に発現を認めた(図11). さらに TNF- α R も肉芽組織中のほとんどすべての細胞が発現していた(図12).

なお1)と2)の使用した抗体では、ほとんどすべての疾患の病理組織・細胞に陽性像を示すため、今回の疾患には有用でない抗体である.

5 増殖因子の検出

1) bFGF と bFGFR

bFGF, bFGFRともに、すべての症例の肉芽組織中の線維芽細胞と血管内皮細胞に発現していた(図13, 14).

2) PDGF と PDGFR

リガンド、レセプターともに、肉芽組織中のマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞に発現していた(図15, 16).

3) TGF- β と TGF- β R

TGF- β は肉芽組織中のマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞に発現していた. しかし、その発現

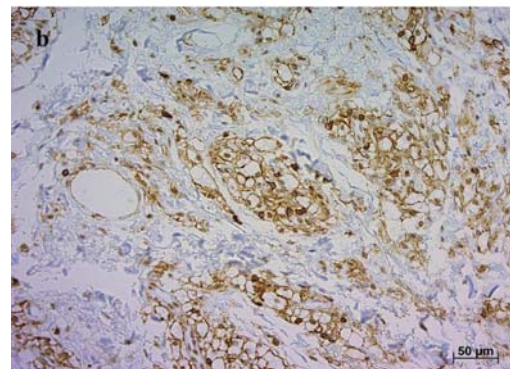
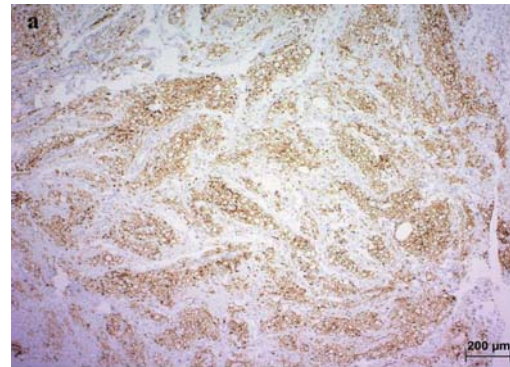


図11 TNF- α 免疫染色像
(a:弱拡大, b:強拡大)

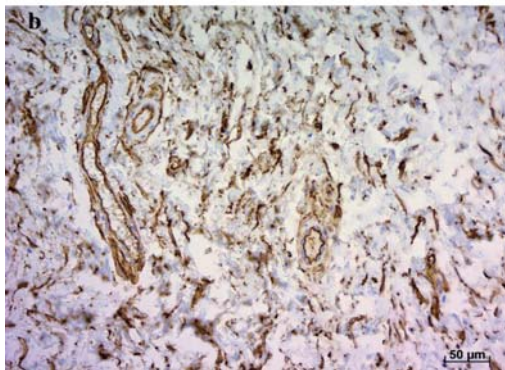
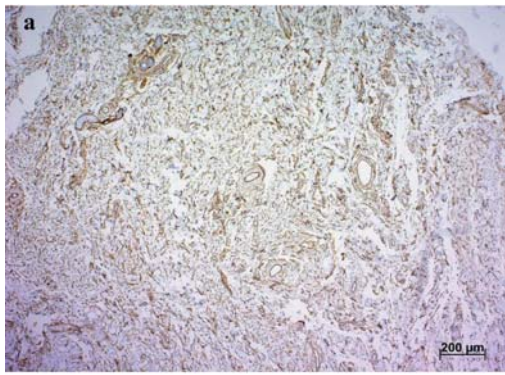


図12 TNF- α R 免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

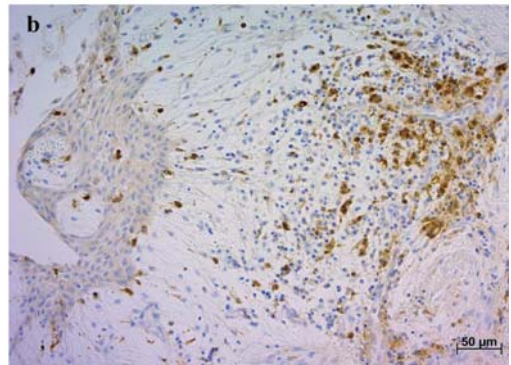


図14 bFGFR 免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

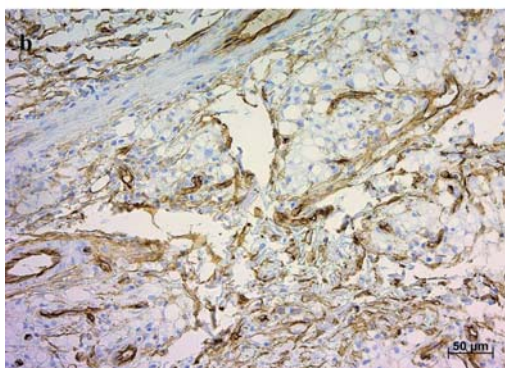
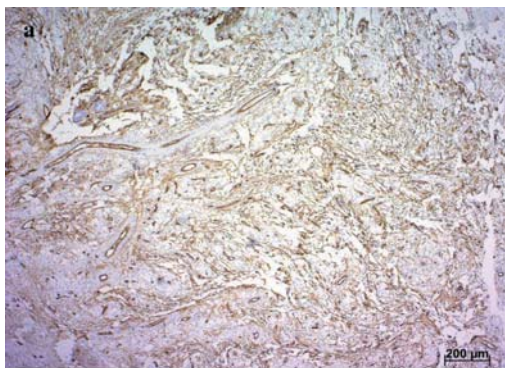


図13 bFGF 免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

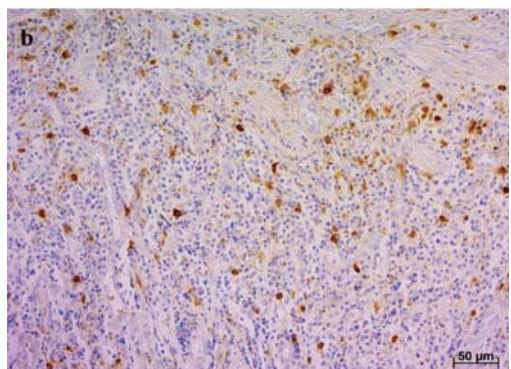
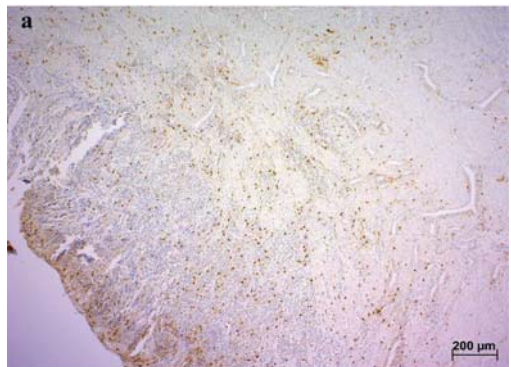


図15 PDGF 免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

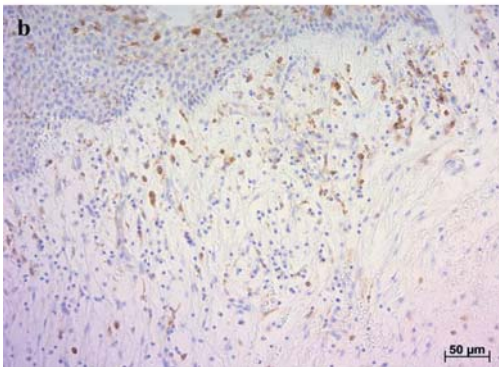
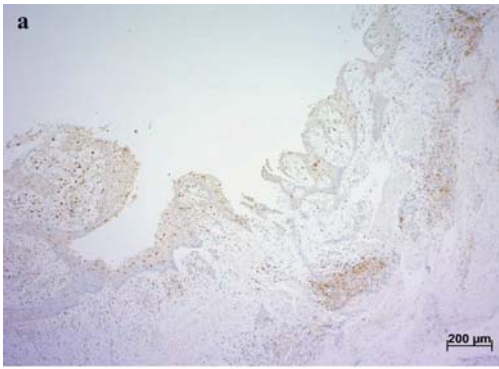


図16 PDGF-R 免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

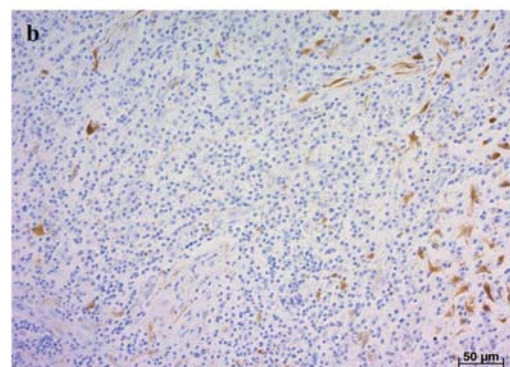
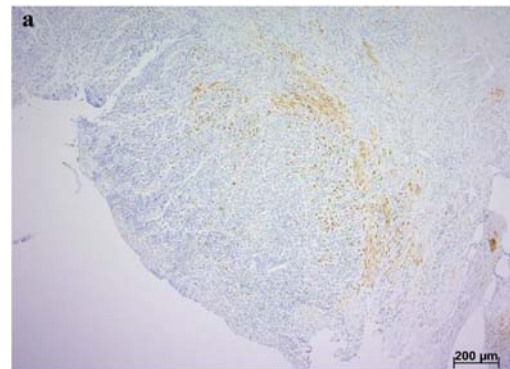


図17 TGF-β 免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

細胞数はbFGFやPDGFより少なかった。その中で、歯根肉芽腫が最も多く、歯根嚢胞は少ない傾向がみられた(図17)。TGF-βRはすべての病型の肉芽組織の線維芽細胞において僅かに発現性を示した(図18)。

6 エピジェネティックな変化の検出

1) 細胞増殖の程度を表わす MIB-1 index

Ki-67は休止期を除く細胞周期の全周期で発現する核タンパクである。この抗体は活発に細胞増殖が行われている基底細胞層や傍基底細胞層の核に陽性を示し、また正常な傍基底細胞層でも陽性を示すことが知られている。細胞増殖マーカーの抗Ki-67抗体の陽性細胞は、すべての症例で見られたが、有意な差は認められなかった(図19)。

2) 抗p16抗体によるエピジェネティックスの検出

細胞周期をG1期で停止させ細胞増殖を抑制するサイクリン依存性キナーゼ阻害の核内型タンパクとして、すべての症例の炎症性組織の細胞に陽性像がみられた。しかし、その局在分布は歯根嚢胞では裏装上皮(図20)や幼若な肉芽組織におけるマクロファージや線維芽細胞に多く陽性を示し(図21)、癒着化した線維化の部分ではむしろ陰性化する傾向を認めた。歯根肉芽腫における上皮組織と幼若肉芽組織、上皮組織と

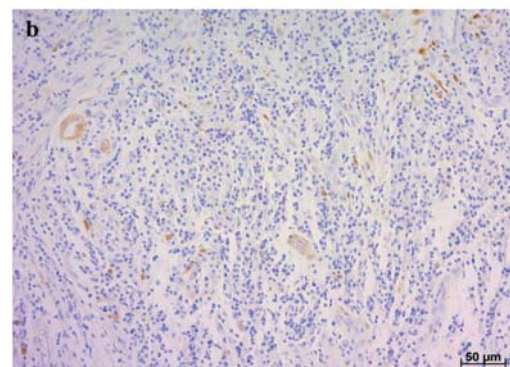
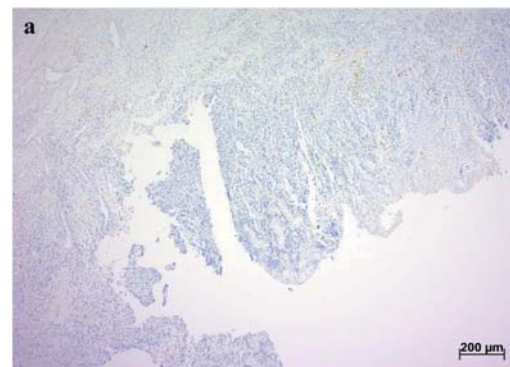


図18 TGF-βR 免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

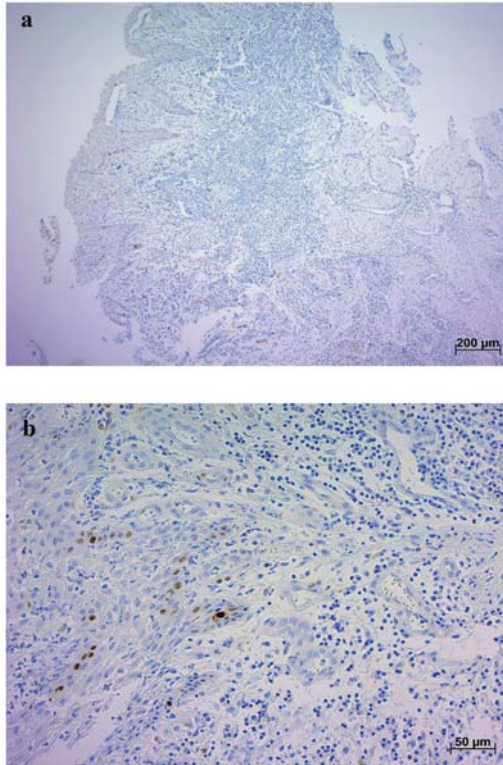


図19 Ki-67免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

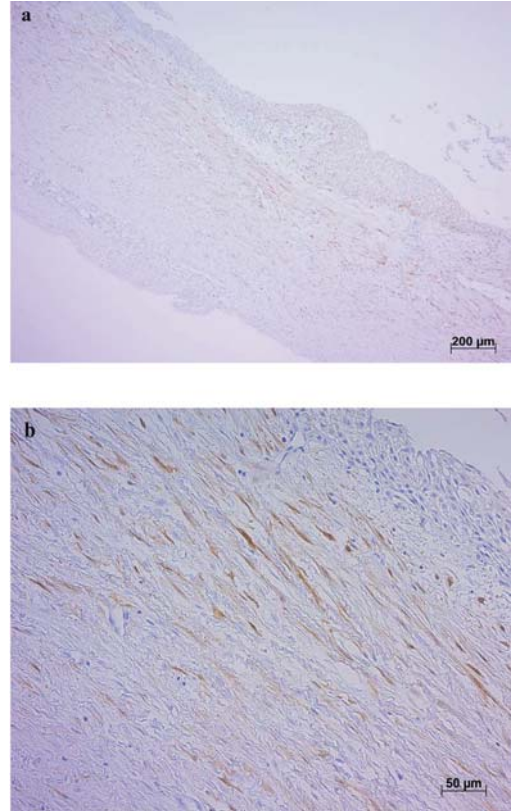


図21 歯根嚢胞の間質組織における p16免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

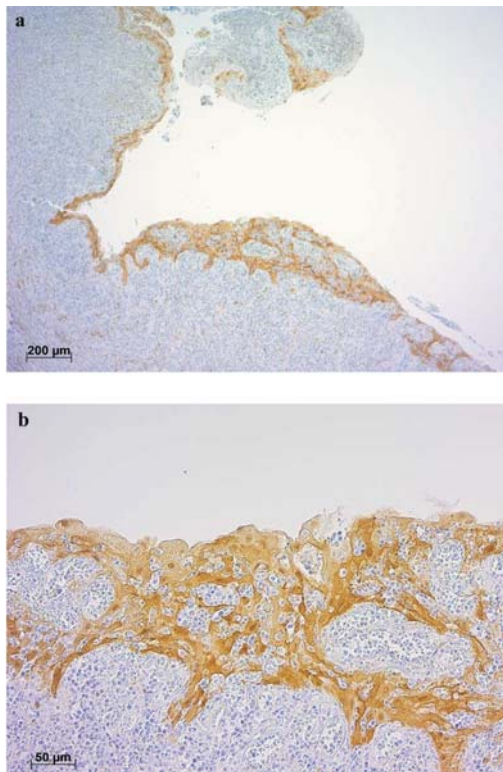


図20 歯根嚢胞の裏装上皮における p16免疫染色像
(a: 弱拡大, b: 強拡大)

癒痕化線維組織との間と、慢性化膿性根尖性歯周炎における上皮組織と幼若肉芽組織、上皮組織と癒痕化線維組織との間に統計学的な有意差を認めた。

以上の結果から得られたエピジェネティックな変化に関係した病巣成分と分子の関係を表に示す(表1)。いずれの病巣においても幼若肉芽組織におけるマクロファージや線維芽細胞では p16陽性を認め、癒痕化線維組織では陰性であった。また上皮組織は歯根嚢胞のように、裏装上皮成分として病巣を構成する場合に存在し、その裏装上皮に p16陽性を認めた。しかし、細胞増殖を示す Ki-67はいずれの病巣においても陽性率からは低く、陰性であった。

考 察

エピジェネティクスな変化、特に DNA のメチル化は、加齢や生活習慣に伴って変化することが報告されている¹⁻³⁾。例えば、遺伝子配列がほぼ同一である一卵性双生児でも加齢や生活環境の違いによりメチル化状態などのエピジェネティクス修飾に差異が生じ、個体差として現れる。統合失調症や X 連鎖性副腎白質ジストロフィーなどは、一卵性双生児での発症不一致例が報告されており、加齢に伴うメチル化状態の差など

表1 免疫染色でみたエピジェネティックな変化がみられた病巣と分子の関係

根尖病巣(症例数)	組織別免疫染色結果					
	上皮組織		幼若肉芽組織		瘢痕化線維組織	
	Ki-67	p16	Ki-67	p16	Ki-67	p16
歯根肉芽腫(40)	N/A	N/A	-	+	-	+
歯根嚢胞(45)	-	+	-	+	-	+
慢性化膿性根尖性歯周炎(15)	N/A	N/A	-	+	-	+

+ : 陽性 - : 陰性 N/A : 検出不能

抗 p16抗体は、歯根肉芽腫の上皮組織と幼若肉芽組織、上皮組織と瘢痕化線維組織との間に、慢性化膿性根尖性歯周炎の上皮組織と幼若肉芽組織、上皮組織と瘢痕化線維組織との間に統計学的な有意差を認めた。

が原因であることが示唆されている^{4,5)}。加齢によるエピジェネティクス修飾の異常、CpG配列のメチル化異常が細胞のがん化の主な原因の一つである⁶⁻⁸⁾。メチル化異常による細胞のがん化は、がん抑制遺伝子などの高メチル化による不活性化、またはゲノムDNA全体での低メチル化によるがん遺伝子の活性化などが原因とされている^{6-8,14-17)}。

最近の研究では慢性歯周炎においてTLR2やE-cadherin, COX-2など、炎症性サイトカイン産生に関連する遺伝子に高メチル化がみられたという報告がいくつかなされている¹⁸⁻²⁰⁾。また、歯根嚢胞においてE-cadherinのDNA高メチル化および遺伝子の発現低下が確認されている⁶⁻⁸⁾。これらのエピジェネティックな修飾は、同様に他の炎症性疾患でも起きているものと推測される。リンパ球の帯状浸潤がみられる扁平苔癬では、遺伝子多型によりエピジェネティクスに関連するタンパク質DNMTsの発現が増加していることから、間接的にDNAメチル化に変化を起こすと考えられており、C型肝炎ウイルスやEBウイルス、HPV、H. Pyloriや、アマルガム中の水銀により生じる異常なDNAメチル化がこれに相当するといわれている¹⁹⁻²¹⁾。前述の炎症性疾患でみられるE-cadherinやCOX-2のメチル化に関する報告は未だみられないが、口腔がんではE-cadherinやCOX-2のDNAメチル化による発現低下が確認されていることから、これらのDNAメチル化が、扁平苔癬の中でみられる悪性転化に関与する可能性がある²¹⁾。エピジェネティックな化学的修飾は、遺伝子の突然変異とは違い、可逆的な変化である。疾患で生じた可逆的な修飾を解明することによって、新たな検査法の確立や、異常な修飾を解除することをターゲットとした予防・治療法の開発に期待が集まる。すでに医療領域では、悪性腫瘍の一種である骨髄異形成症候群(MDS)に対して、DNA脱メチル化酵素阻害薬が新しい治療薬として認可、使用されており、注目が集まっている²²⁾。歯科領域においても、エピジェネティクス創薬の開発が期待され

る。

今回使用したp16遺伝子はがん抑制遺伝子で、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤であり、サイクリンDとCdk4/6複合体形成を阻害することによって細胞周期を制御している。p16遺伝子のプロモーター領域に位置するCpG配列が過剰にメチル化されると遺伝子発現が抑制され、細胞の増殖を制御・抑制することができず、細胞のがん化を導くことになる。特にメチル化異常が炎症を誘発し、発症するピロリ菌感染による慢性胃炎とも密接な関係がある¹⁴⁾。つまりピロリ菌感染により引き起こされた慢性胃炎は、胃粘膜のメチル化異常を誘発し、細胞のがん化を促進する。このように直接または間接的に、メチル化異常と細胞のがん化が関係しているケースが報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾。特定のがん抑制遺伝子をターゲットとしてメチル化状態を解析することで、乳がん・大腸がん・胃がんなどを早期発見することができるため、遺伝子のメチル化状態は、がん診断など様々な疾患において有用なマーカー分子として期待できる。

また癌以外の炎症性疾患ではp16タンパクの発現およびp16遺伝子の異常を検索したところ、半数以上の症例で陽性が認められた。つまりタンパク欠損が遺伝子異常で説明できたものは半数にしかすぎず、他の半数は翻訳部位やスプライスシグナルに異常が認められなかった。この説明として、プロモーター部位の塩基配列異常DNAのメチル化による発現の変化、p16タンパクのdegradationのメカニズムを考えていたが、最近になり肺癌、頭頸部扁平上皮癌、グリオーマにおいて、p16の不活化は翻訳部位の異常よりむしろそのプロモーターのメチル化による方が頻度は高いと報告がある¹³⁻¹⁷⁾。プロモーター部位は特異的な種々の転写因子が結合し、その下流の遺伝子の発現を抑制しているが、メチル化により転写因子との結合に変化が生じると考えられている¹⁻⁵⁾。

ところで、多くの疾患は遺伝的要因と環境要因により遺伝子損傷を受けて生じることが多い。通常は、正

常な細胞にDNA損傷が起こる刺激が加わっても、生体はその損傷を修復する能力を持っている。また、細胞はG1期から、DNA複製を行うS期を通過してG2期、そして細胞分裂を行うM期を経て再びG1期へ戻る細胞周期の存在が知られている。増殖因子による増殖シグナルがなくなると、細胞はG0期という休止期に入る。このような細胞周期関連分子でG1期、S期、G2期、M期に発現を検索できる抗体にKi-67がある。これは増殖細胞の核小体および核分裂の染色体上に発現する分子で、機能面においては不明な点も多いものの、G1期後期から発現量に変化が現れ、S期で増加して、M期で最大になると言われている。Ki-67の発現がみられた細胞は、G0期から脱してG1期以降の細胞周期に入っていることを表している。よって、Ki-67抗体は細胞増殖マーカーとして多くの疾患のジェネティックな変化における病理組織学的な予後因子の一つとして以前より用いられている¹¹⁾。しかし、今回の症例では正常組織の正常な細胞増殖の発現を認めるため鑑別が困難なことがある。これは、炎症性細胞、線維芽細胞、および血管内皮細胞が、真の腫瘍のような自立的で不可逆的な増殖ではなく、極めて緩徐な増殖を行っていることを示す所見であった。

したがって、今回の疾患においてCD68やp16が正常組織と比較して有意な差を高発現することは、エピジェネティックな関与を少なくとも示しているが、一方でKi-67の陽性率が低いことからジェネティックな変化による細胞の腫瘍性増殖とは異なり、進行性病変に分類される組織の増生が主体の増殖性炎であることが証明された。すなわち、炎症の刺激源となる細菌の感染で、根尖歯周組織に最初は滲出性炎として専ら血管内成分の滲出と好中球の遊出による急性炎症の状態から、マクロファージ主体の滲出性炎となり、同時にマクロファージからの大量の炎症性サイトカインの産生とこれに呼応するように線維芽細胞の盛んな増生の結果、厚い線維性被包化による線維層が形成され、やがて時間の経過とともに、増殖性は低下しても形成された瘢痕組織はそのまま組織中で残る²³⁾ために完全な治癒は臨まず、外科的摘出が現在の治療方針となる場合が多いといえる。翻ってこのようなサイトカインによる炎症性の組織の増生を制御可能なDNAメチル化の修復等は、がん化の目的や治療だけでなく、根尖性歯周炎を始めとする難治性の炎症性疾患に対しても早期の治療方針決定に有益な情報をもたらすことができると考えられた。

結 論

100例の根尖性歯周炎の症例に関して、病巣の組織

構造、その増殖性およびエピジェネティックな変化における検索を免疫組織学的に行った結果、以下の結論を得た。

1. 各疾患のH-E染色による病理組織的分類による根尖性歯周炎は歯根肉芽腫(40例)、慢性化膿性根尖性歯周炎(慢性根尖周囲膿瘍)(15例)、歯根嚢胞(45例)の各病巣の基本的な構成要素は、ほとんどが幼若から成熟した肉芽組織を認めた。
2. 蛍光抗体法による根管内細菌の侵襲の有無と程度を観察した結果、その侵襲を見たのは、慢性化膿性根尖性歯周炎が3例、歯根嚢胞が1例で、歯根肉芽腫では0例であった。
3. 免疫担当細胞の検索では、CD68のマクロファージの浸潤が最も多く、リンパ球は少なかった。
4. 炎症性サイトカインのIL-1 α およびTNF- α は、マクロファージを中心に多くの炎症性細胞が見られ、これらのレセプターは主に線維芽細胞と血管内皮細胞に認められた。
5. 細胞増殖因子のbFGF、PDGF、TGF- β はマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞に発現し、これらのレセプターは線維芽細胞と血管内皮細胞に多く見られた。
6. 細胞周期に関連するKi-67は、病巣の線維芽細胞や一部の炎症細胞の核が陽性像を示したが、腫瘍性増殖とはみなせず、炎症性・反応性増殖すなわち、増生であるとみなすことができた。
7. 細胞周期をG1期で停止させ細胞増殖を抑制するサイクリン依存性キナーゼ阻害の核内型タンパクとして、すべての症例の炎症性組織の細胞に陽性像がみられた。しかし、その局在分布は歯根嚢胞では裏装上皮や幼若な肉芽組織におけるマクロファージや線維芽細胞に多く陽性を示し、瘢痕化した線維化の部分ではむしろ陰性化する傾向を認めた。

したがって、根尖性歯周炎の病巣は、細菌の侵襲が常時反復しているものではないが、わずかに免疫応答が生じ、主な構成細胞の線維芽細胞と血管内皮細胞がマクロファージとの間でサイトカインネットワークを形成し、これにエピジェネティックな変化が加わることで、根尖性歯周炎にある肉芽組織の形成と増生とに繋がること示唆された。

利益相反 (COI)

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* 1999; 15: 34-37.
- 2) Jones PA and Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002; 3: 415-428.
- 3) Jones PA and Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 2001; 293: 1068-1070.
- 4) Ushijima T, Morimura K, Hosoya Y, Okonogi H, Tatematsu M, Sugimura T and Nagao M. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 2284-2289.
- 5) Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Kaneda A, Sugimura T and Miyamoto K. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res.* 2003; 13: 868-874.
- 6) Abiko Y, Uehara O, Fukumoto S and Ohta T. Epigenetics of oral infection and inflammatory diseases-DNA methylation changes in infections and inflammation diseases. *J Oral Bio Sci.* 2014; 56: 105-109.
- 7) Williams SD, Hughes TE, Adler CJ, Brook AH and Townsend GC. Epigenetics: a new frontier in dentistry. *Aust Dent J.* 2014; 59: 23-33.
- 8) Seo JY, Park YJ, Yi YA, Hwang JY, Lee IB, Cho BH, Son HH and Seo DG. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restor Dent Endod.* 2015; 40: 14-22.
- 9) Tanuma J, Hirano M, Hirayama Y, Semba I, Ogawa K, Shisa H, Hiai H and Kitano M. Genetic predisposition to 4 NQO-induced tongue carcinogenesis in the rat. *Med Princ Pract.* 2005; 14: 297-305.
- 10) Ogawa K, Tanuma J, Hirano M, Hirayama Y, Semba I, Shisa H and Kitano M. Selective loss of resistant alleles at p 15INK 4 B and p16 INK 4 A genes in chemically-induced rat tongue cancers. *Oral Oncol.* 2006; 42: 710-717.
- 11) Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, Hirano M, Tanuma J and Semba I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35: 369-375.
- 12) Sasaki H and Stashenko P. Interrelationship of the pulp and apical perioditis. In: Hargreaves KM, Goodis HE and Tay FR, eds. *Seltzer and Bender's Dental Pulp.* 2nd ed. Chicago: Quintessence Publishing; 2012: 277-299.
- 13) Kakehashi S, Stanley HR and Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 20: 340-349.
- 14) Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Ariei K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M and Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 989-995.
- 15) Jones PA and Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999; 21: 163-167.
- 16) Vallian S, Sedaghat M, Nassiri I and Frazmand A. Methylation status of p16^{INK4A} tumor suppressor gene in Iranian patients with sporadic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009; 135: 991-996.
- 17) Ayadi W, Karray-Hakim H, Khabir A, Feki L, Charfi S, Boudawara T, Ghorbel A, Daoud J, Frukha M, Busson P and Hammami A. Aberrant methylation of p16, DLEC1, BLU and E-cadherin gene promoters in nasopharyngeal carcinoma biopsies from Tunisian patients. *Anticancer Res.* 2008; 28: 2161-2168.
- 18) Lindroth AM and Park Y-J. Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis. *J Periodontal Implant Sci.* 2013; 43: 111-120.
- 19) Zhang S, Barros SP, Niculescu MD, Moretti AJ, Preiser JS and Offenbacher S. Alteration of PTGS 2 promoter methylation in chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2010; 89: 133-137.
- 20) Seo JY, Park YJ, Yi YA, Hwang JY, Lee IB, Cho BY, Son HH and Seo DG. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restor Dent Endod.* 2015; 40: 14-22.
- 21) Fonseca-Silva T, Oliveira M, Fraga CA, Farias LC, Gomes EP, Barros LO, Roy A, Santiago Gomez R, Paula AM and Guimarães AL. DNMT 3 B (C46359T) polymorphisms and immunoeexpression of DNMT 3 b and DNMT 1 proteins in oral lichen planus. *Pathobiology.* 2012; 79: 18-23.
- 22) Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O and Kitamura T. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL 1 mutations. *J Clin Invest.* 2013; 123: 4627-4640.
- 23) 下野正基. 新編治療の病理—臨床の疑問に基礎が答える. 東京: 医歯薬出版; 2011: 247-253.