

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11393

研究課題名(和文) 歯肉増殖症におけるカテプシンの役割の解明～多様なカテプシンKOマウスを用いた検討

研究課題名(英文) the unravelling of the role of cathepsin in gingival overgrowth

研究代表者

山下 明子 (Yamashita, Akiko)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70511319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々のこれまでの研究によって、歯肉増殖にはカテプシンが関与することを示してきた。そして、カテプシンLとカテプシンBを比較した場合、カテプシンLの方が、より強く歯肉増殖症に強く関与することを明らかにした。カテプシンL活性の抑制効果が特異的に高いことが近年報告された、spock1 に注目し、本分子が病変局所において過剰発現することで、歯肉増殖が惹起されるのではないかと仮説を設けた。ヒト歯肉線維芽細胞に歯肉増殖症発生の副作用をもつ代表的な薬剤を作用させると、spock1のmRNAの発現が亢進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously suggested complete loss of Cathepsin-L function promoted gingival overgrowth. SPOCK-1, belonging to proteoglycan family, is a specific inhibitor of CtsL. The aim of this study is to investigate the role of SPOCK-1 in DIGO. Human gingival fibroblasts were collected from patients who underwent flap operations. The cells were stimulated with Phenytoin (PHE), Cyclosporin A (CsA) or Nifedipine (NFE). The mRNA and protein levels of SPOCK-1 were examined by quantitative real time PCR and western blotting. As in vivo study, Spock-1 transgenic mice and wild-type littermates were generated, grown, and sacrificed. Gingival appearance was observed by microscopy. The results indicated that PHE, CsA and NFD promoted the expression of SPOCK-1 both at mRNA and protein level. The gingiva of Spock-1 transgenic mice exhibited different degree of fibrosis. SPOCK-1 upregulation was common among the three drug used, which may indicate the importance of SPOCK-1 in the pathophysiology of DIGO.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯肉増殖症

1. 研究開始当初の背景

ニフェジピン、アムロジピン、ジルチアゼム、ベラパミルといったカルシウム拮抗薬は、血管の平滑筋にあるカルシウムチャネルの機能阻害によって血管拡張作用を示す、降圧薬として第一選択される代表的な薬剤である。近年、世界的に生活習慣やファストフードの浸透による食生活の欧米化に起因して肥満や糖尿病患者の増加が著しい。それらの患者数と正比例して、高血圧の総患者数は増加の一途をたどっている。本薬剤は、高血圧患者に対しての治療としてのみだけでなく、将来的な心血管イベント発生を抑制する目的を持って用いられることも多く、処方を受ける患者数は近代では急速に高まっている。一方で、このカルシウム拮抗薬のよく知られる代表的な副作用の一つとして、歯肉組織の肥厚を呈する、薬剤性歯肉増殖症がある。様々なタイプのカルシウム拮抗薬を対象に調査をしたところ、本薬剤が歯肉増殖を引き起こす頻度は19-38%と報告されている。歯肉増殖症が問題とされるのは、単に審美的障害にのみだけでなく、既存の歯周病を難治性にするためである。とりわけ、ペリオドンタルメディシンが絡む成人以降の患者で問題となりやすい。

我々は、歯肉増殖症はカテプシンの活性低下により病変が惹起される一種のライソゾーム蓄積病の一亜型であるとの仮説のもと検証を続けてきた。これまでに①カテプシンLの活性が、薬物性歯肉増殖症の原因薬剤を作用させることで、遺伝子の転写レベルで抑制され、結果的に低下すること(Yamada H. *et al.*, *J Periodontol*, 2000)②カテプシンLのKOマウスで歯肉増殖症に類似の歯肉病変が惹起され、その組織像がヒト歯肉増殖症のものと酷似していること(Nishimura F. *et al.*, *Am J Pathol*, 2002)を報告した。

しかしながら、カテプシンLやBは分解する基質がオーバーラップしているうえに、長期培養系ではカテプシンBの活性も低下するとの報告(Yamaguchi M. *et al.*, *J Periodontal Res*, 2004)もあり、他のカテプシンの関与などはいまだ不明である。

以上から、歯肉増殖に特に関与するカテプシンを特定し、それらの活性を促すことで、歯肉増殖症発生抑制や治癒促進に繋がるとの仮説を設け、各種カテプシンの歯肉組織における機能を明らかにし、歯肉増殖症との関連を検討するという着想に至った。

本研究は、これまでの研究成果をさらに発展させ、歯肉増殖症とカテプシンの関連を解明する手段として、複数のカテプシン(D, L, B, H, S)に注目して研究を進める点に独創性がある。単独のカテプシンと歯肉増殖症との関連を解明するだけでなく、それぞれカテプシンのオーバーラップする機能なども明らかにできる可能性がある。我々は、歯肉増殖症はカテプシンの活性低下により病変が惹起される一種のライソゾーム蓄積病の一亜

型であるとの仮説のもと検証を続けてきた。つまり、本研究の成果はライソゾーム関連酵素が欠損しているために、分解されるべき物質が老廃物として体内に蓄積してしまう先天性代謝異常疾患であり、特定疾患に難病指定されているライソゾーム蓄積病の病態解明やその治療に一部貢献する可能性がある。

社会構造の高齢化や生活習慣や食生活の欧米化由来による肥満人口の増加(いわゆるメタボリックシンドローム患者の増加)に伴って、高血圧患者も増加している。そして今後、ペリオドンタルメディシンが絡む患者はより一層の増加が推測される。本申請は、歯肉増殖症の発生と治癒機序に関して、カテプシンに着目して解明しようとするものであるが、その成果は歯周病と高血圧それぞれの治療方法をより効果的なものへと導く可能性がある。

尚、申請者らはこれまでに、前述のカルシウム拮抗薬だけでなく、抗てんかん薬であるフェニトインや現代の臓器移植に不可欠な役割を果たす免疫抑制剤であるサイクロスポリンなどの薬剤にも注目し *in vitro* での解析を行ってきた。これら薬剤についても、前述のカルシウム拮抗薬と同様の結果を得ている。サイクロスポリンなどは臓器移植治療後の拒絶反応を防ぐ免疫抑制のために利用される。この際に、本薬剤の副作用で歯周炎が難治化、重症化すると歯性感染症という重大な合併症の危険因子にもなりかねない。この歯肉増殖症の発生を防ぐことは、移植治療周術期の重大な合併症のリスクを回避することにも繋がり、社会的、経済的にも大変意義深いものとなると言える。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らがこれまで継続的に検討を続けてきたカテプシン活性と薬物性歯肉増殖症の研究成果をさらに発展させ、歯肉増殖に特に関与するカテプシンを特定し、それらの活性を促すことで、歯肉増殖症発生抑制や治癒促進に繋がるとの仮説を設け各種カテプシンの歯肉組織における機能を明らかにし、歯肉増殖症との関連を検証しようとするものである。研究期間内に①各カテプシンの *loss of function* で病変が惹起されるかどうか確認し、②影響を受ける分子(コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなど)が何かを明らかにすることを目標とする。これらを明らかにし、将来的に歯肉増殖症発生抑制や治療方法確立へ繋げることを目指すものである。

3. 研究の方法

< *in vivo* >

1. カテプシンL, B欠損マウスの維持管理
各種カテプシン KO マウスは本申請の分担研究者である九州大学歯学研究院口腔機能分子科学(歯科薬理学)中西博教授の研究室で飼育された。

2. カテプシン L, B 欠損マウスの口腔内歯肉組織の解剖学的検討
6週齢カテプシン B 欠損マウスを麻酔薬奏功下により安楽死させた後に、下顎を単離、血液を可及的に除去し、歯肉増殖が惹起されているかどうか口腔内の観察を行った。実体顕微鏡で形態学的組織観察を行い、歯肉組織を4%パラホルムアルデヒドで24時間固定した後、EDTA脱灰を実施した。その後パラフィン包埋、組織切片を作製、組織形態確認を行った。

3. Spock1 過剰発現マウスの作製
カテプシン L 発現抑制機能のある spock1 に注目し、歯肉増殖モデルマウスを作製した。

<in vitro>

4. 歯肉線維芽細胞を用いた、各種遺伝子発現の解析
歯肉増殖惹起薬剤を添加した際の、歯肉増殖関連遺伝子の解析を行った。

4. 研究成果

カテプシン-B 欠損マウスではカテプシン-L 欠損マウスと比較して、口腔内の臨床所見において、明らかな歯肉増殖はなかった。また、歯肉組織像における結合組織の拡大と上皮の肥厚は明らかではなかった。カテプシン-L 欠損マウスの歯肉組織像では結合組織の拡大と、上皮の肥厚が特徴的であった。ヒト歯肉増殖症の特徴である上皮脚の結合組織内への伸長も著明であった。つまりカテプシン-L 欠損マウスにおいて、より明らかな歯肉増殖症が観察され、カテプシン-Lの活性低下が歯肉蔵相翔の発症により強く影響を及ぼしていると考えられる。

そこで、カテプシンL活性の抑制効果が特異的に高いことが近年報告された spock1 (SPARC/osteonectin, cwcv and kazal like domains proteoglycan 1) (Bocock JP. *et al.*, *Eur J Biochem*, 2003) に注目し、本分子が病変局所において過剰発現することで、歯肉増殖が惹起されるのではないかと仮説を設けた。これを受け、歯肉増殖症を惹起する薬剤が *in vitro* で spock1 の発現に及ぼす影響を調べる実験を行った。さらに、遺伝子改変 spock1 過剰発現マウスを作成し、種々の解析を行う準備を整えてきた。すでに *in vitro* における検討から、ヒト線維芽細胞に歯肉増殖症発生の副作用をもつ代表的な薬剤(シクロスポリン A, フェニトイン, ニフェジピン)を作用させると、spock1 の mRNA の発現が亢進した(図1)。

spock1 は近年発見された分子であり、細胞間、細胞と基質との相互作用に関与する。プロテアーゼ阻害作用を持ち、特にカテプシン-Lを強力に阻害する作用を有する(Bocock JP. *et al.*, *Eur J Biochem.*, 2003)ことが報告されているが、機能の大部分は未だ不明である。また、これまでに spock1 と歯肉増殖症の関連や、他の口腔疾患との関連を報告している研究成果はなく、カテプシンに加え抑制分子である本分子に着目した点

に新規性や学術的独自性がある。歯肉増殖症の発症機序を間接的なカテプシン活性の低下に求めるという創造性に富む申請でもある。spock1 はプロテオグリカンの一種でもあることから、その発現亢進はカテプシン活性の低下に伴う基質分解能の低下に加え、基質の蓄積をも促進することで病変の確立に関与する可能性が考えられる。

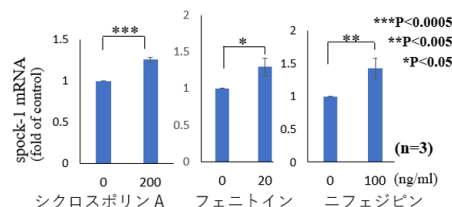


図1. 各種薬剤刺激時の歯肉線維芽細胞からの spock1 の発現量

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 15 件)

①Rehab Alshargabi, 山下明子: 薬剤性歯肉増殖症における spock-1 の役割、平成29年度日本歯周病学会60周年記念京都大会、2017年

②Yamashita A, Sano T: Epicatechin down-regulates inflammatory genes in adipocytes co-cultured with endotoxin-activated macrophages. 95th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会) 2017年

③真田大樹, 佐野朋美, 山下明子: エピカテキンは歯肉線維芽細胞-マクロファージ相互作用による過剰な炎症反応を抑制する、日本歯周病学会 60 周年記念京都大会、2017

④Sano T, Yamashita Y: Study on the mechanism of increased energy expenditure of CCR7 deficient mouse. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 2017

⑤佐野朋美, 山下明子: CCR7 欠損マウスにおけるエネルギー消費亢進機序についての検討、第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2017

⑥Sano T, Yamashita Y: Influences of energy metabolism via CCL19-CCR7 pathway on diet-induced obesity and insulin resistance. The 12th meeting of the Asian Pacific Society of Periodontology. 2017

⑦佐野朋美, 山下明子: CCL19-CCR7 経路を介したエネルギー代謝機構が肥満およびインスリン抵抗性に及ぼす影響の機序に関する検討、第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会、2017

⑧佐野朋美, 山下明子: エネルギー代謝機構が CCL19-CCR7 経路を介した肥満およびインスリン抵抗性に及ぼす影響に関する検討、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017

⑨Sano T, Yamashita A: Epicatechin Down-

regulates Adipose Tissue CCL19 Expression, Thereby Ameliorates Diet-induced Obesity and Insulin Resistance. UNC Perio 2017 EXPO. 2017

⑩ Yamashita A, Sano T: Epicatechin Down-regulates Inflammatory Genes in Adipocytes Co-cultured with Endotoxin-activated Macrophages. The 95th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会) . 2017

⑪ Sano T, Yamashita A: Epicatechin Down-regulates Adipose Tissue CCL19 Expression, Thereby Ameliorates Diet-induced Obesity. The 95th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会) . 2017

⑫ Alshargabi Rehab Yahya Fara Sallam, Yamashita A : The effect of cathepsin-B deficiency on gingival overgrowth in mice. 第59回春季日本歯周病学会学術大会, 2016, 鹿児島市

⑬ Yamashita A, Alshargabi Rehab Yahya Fara Sallam : The effect of cathepsin-B deficiency on gingival overgrowth in mice. 94th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会) , 2016年, Seoul, Republic of Korea

⑭ 佐野朋美、山下明子 : IL-17Aは 3T3-L1 脂肪細胞における TNF- α 誘導性 IL-6・CCL20産生を相乗的に増強する、第145回日本歯科保存学会秋季学術大会、2016

⑮ 佐野朋美、山下明子 : エピカテキンは脂肪細胞-マクロファージ相互作用による過剰な炎症反応を抑制する、第59回秋季日本歯周病学会学術大会、2016

〔図書〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下明子 (YAMASHITA, Akiko)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号 : 70511319

(2) 研究分担者

中西博 (NAKANISHI, Hiroshi)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号 : 201557740

西村英紀 (NISHIMURA, Fusanori)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号 : 80208222

岩下未咲 (IWASHITA, Misaki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 80611326

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし