

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15768

研究課題名(和文) 歯周炎原因遺伝子の同定をベースにする新しい分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Development of molecular targeted drug for periodontitis based on the causative genes.

研究代表者

大島 光宏 (Mitsuhiro, Ohshima)

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：30194145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎原因細胞を用いた生体外歯周炎モデルの網羅的遺伝子発現解析により、歯周炎原因候補遺伝子をリストアップした。この遺伝子産物の働きを抑える因子を使用することで、モデルのコラーゲン分解は顕著に阻害された。これにより、世界で初めての歯周炎分子標的治療が可能となる。なお、歯周炎原因細胞は通常の歯肉線維芽細胞とは明らかに異なる細胞であることを、理研FANTOM5プロジェクトの支援により証明することができ、PCRによる原因細胞の検出法も確立した。

研究成果の概要(英文)：We have made a list of candidate genes for periodontitis using gene expression profiling data of in vitro periodontitis model which includes periodontitis causative fibroblasts. Inhibiting candidate genes products, collagen degradation was significantly decreased. It will make possible to molecular targeted therapy for periodontitis for the first time. We also demonstrated that periodontitis-causative fibroblasts are clearly different from normal gingival fibroblasts supported by RIKEN FANTOM5 Project, and established a detection method by PCR.

研究分野：生化学

キーワード：歯周炎 生体外歯周炎モデル HGF miRNA

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、国民病と言われるほど罹患率が高いにもかかわらず、その治療法には決め手を欠いている。特に、歯を喪失する歯周炎については、その原因が全くと言っていいほど解明されていない。このため、歯肉炎と同じプラークコントロール以外の治療法は、一部の組織誘導法を除いて現時点では存在しない。また、歯周炎治療薬として現在使用されているものは主に抗菌薬と抗炎症薬であるため、未だに有効な原因療法が存在しない。歯周炎の原因究明が遅れている最大の理由として、適切な実験動物モデルが存在しないことが挙げられる。申請者らは、重度歯周炎罹患歯肉組織由来の線維芽細胞と上皮細胞とを三次元培養すると、コラーゲンを極度に分解することを見出し、「生体外歯周炎モデル」を確立した(Ohshima ら, J Dent Res, 2010, 特開2010-220561)。このモデルを用い、安全性が高いとされる生薬のスクリーニングを行って、いくつかの生薬に顕著なコラーゲン分解阻害効果があることを見出した(特開2011-256136)。従って、生薬中の複数の有効成分を特定し、かつ、その標的分子を明らかにすることで、安全で、臨床効果の高い歯周炎分子標的治療薬が開発できると考え、本研究を企図した。

2. 研究の目的

1) 「生体外歯周炎モデル」のトランスクリプトーム解析により、歯周炎原因候補遺伝子をリストアップする。2) リストアップされた遺伝子の遺伝子産物に対する阻害剤のコラーゲン分解阻害に及ぼす効果を、生体外歯周炎モデルを用いて調べる。3) 理研FANTOM5プロジェクトのCAGEデータから、歯周炎関連線維芽細胞に特異的に発現する遺伝子を検索する。4) 両者の結果から有効な分子標的治療薬の候補を絞り込み、生体外歯周炎モデルを用いてその効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 三次元培養法を用いた「生体外歯周炎モデル」(Ohshima ら, J Dent Res, 2010)セルマトリックスに再構成用緩衝液、濃縮培地を加えて冷却しておく。ここにトリプシンで剥離し、ウシ胎児血清に浮遊させたアグレッシブな線維芽細胞を加えて攪拌し、6穴プレート各ウェルに注入した。37℃でゲル化させた後、この上に歯肉上皮細胞を播種した。次の日、ゲルをウェルの底から浮かせて培養を継続した。5日後にゲルをメッシュ上に載せ、ゲル表面が空気に曝された状態でさらに5日間培養を行い、上皮を重層化させた。培養終了後、ゲルを固定し、パラフィンブロックを作成後、HE 標本作製して顕微鏡で観察した。なお、残存コラーゲン量を定量する場合は、空気暴露は行わなかった。

(2) 遺伝子発現プロファイルの比較(トランスクリプトーム解析)

コラーゲン分解を引き起こす歯周炎原因遺伝子をトランスクリプトーム解析により検索した。ゲルをBioMasher(ニッピ)処理してから、Trizol(Invitrogen)を用いてRNAを抽出し、GeneChip(Affymetrix)を用いて遺伝子発現プロファイルの検索を行い、コントロールと比較することで、コラーゲン分解を促進する原因候補遺伝子をリストアップした。また、同じRNAサンプルを用いてmiRNAの発現プロファイルも調べた。

(3) 遺伝子発現の定量

GeneChipおよびmiRNAプロファイリングの結果を解析し、候補となる遺伝子をreal-time qPCR(Takara)によって発現レベルを定量化した。パスウェイ解析によって抽出された興味ある関連遺伝子も定量的に解析した。

(4) 理研FANTOM5プロジェクト

理研FANTOM5プロジェクトにCAGE解析を依頼したデータから、歯肉線維芽細胞の特徴を、ついで歯周炎原因細胞の特徴を抽出し、validationのためにqPCRを行った。

(5) 分子標的治療薬の候補

得られた遺伝子発現データから治療標的候補となる分子を選び、その遺伝子産物に対する阻害剤の効果を試した。

4. 研究成果

歯周炎分子標的治療薬の開発を目指すにあたり、申請者らが歯周炎原因細胞と推定している歯周炎関連線維芽細胞を用いた「生体外歯周炎モデル」において、コラーゲン分解の進行に伴い発現が上昇する遺伝子をマイクロアレイでピックアップした。3ペアの解析で発現上昇がみられた遺伝子は42あり、さらにクローン化した細胞を用いてモデルを構築してマイクロアレイ解析し、結果を重ね合わせたところ、22遺伝子まで絞り込むことができた。これらの遺伝子の内、線維芽細胞に高発現して11種の遺伝子に関してqPCRでvalidationを行ったところ、FLT1 (VEGFR1)が歯周炎原因遺伝子の最有力候補として浮上した(図1)。VEGFRキナーゼ阻害剤によりコラーゲン分解は阻害されたが高濃度が必要であったため、FLT1のmiRNAをレンチウイルスベクターでtransfectしてRNAiを行った。その結果、明らかにコラーゲン分解が阻害されたため、FLT1が歯周炎原因遺伝子である可能性が最も高いことが判明した。

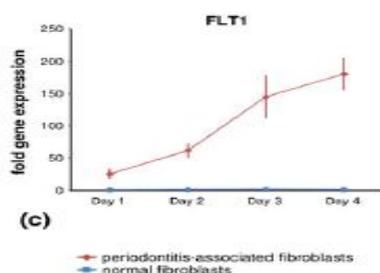


図1 生体外歯周炎モデルのコラーゲン分解に伴うFLT1発現の経日変化

VEGFRキナーゼ阻害剤はTIMPsの発現を誘導するため、コラーゲン分解阻害は主にTIMPsの働きによるものと推測された。また、免疫染色によりリン酸化FLT1が歯周炎関連線維芽細胞を埋入したゲルおよび歯周炎罹患歯

肉で観察されたことから、生体内でもFLT1のリン酸化の下流でコラーゲン分解が起こっていることが推測できた。また、二次元培養でも歯周炎関連線維芽細胞ではFLT1の発現が顕著に高いため、qPCRを用いた細胞検出方法を確立した。

これまでにGeneChip解析したモデルをpathway解析ソフトによりメタ解析を行ったところ、HGFがよりリスクの高い原因候補遺伝子である可能性が浮上した。HGFはこれまでに申請者らが歯周炎特異的かつ有用なマーカーとして歯肉溝滲出液から検出し、報告した因子である(Ohshima M, et al., J Periodontal Res, 2002)。さらにHGFは、破骨細胞の分化と活性化を担う因子あることが報告されており(Knowles and thanasou, 2009)歯周炎による骨吸収にはHGFが関与している可能性が大きいことが判明した。そこで各種の方法で「生体外歯周炎モデル」におけるHGFシグナルを阻害したところ、確かにコラーゲン分解が抑制された。この成果を「歯周炎治療薬及び歯周炎治療用組成物」として特許出願した。

また、理研FANTOM5のCAGEデータ解析から、歯周炎関連線維芽細胞ではDLX5とRunx2 p1が発現していないことを見出した(図2)。これは遺伝子ごとに転写開始点を調べられるCAGE法の特徴を活かした発見であった。これにより、歯肉線維芽細胞と、歯周炎原因細胞と考えられる歯周炎関連線維芽細胞とが明らかに異なる細胞であることが証明でき、さらにqPCRでこの細胞を検出する方法として確立できた。

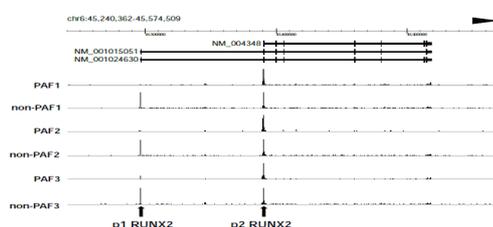


図2 PAFsとnonPAFsにおけるRunx2 p1発現の相違

これに加えて、歯周炎治療薬の効果をモニターするための歯肉溝滲出液中のmiRNAを用いた生物学的診断法を開発した(図3)。

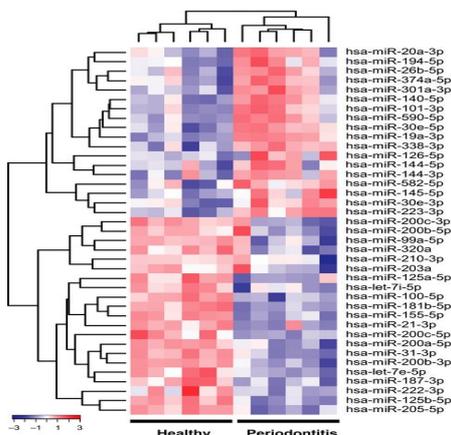


図3 歯周炎罹患部位と健常部位におけるGCF中のmiRNA発現パターンの相違

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)

[雑誌論文](計 3件)

Akira Saito, Masafumi Horie, Kenichiro Ejiri, Akira Aoki, Sayaka Katagiri, Shogo Maekawa, Shinta Suzuki, Sophannary Kong, Tsuneto Yamauchi, Yoko Yamaguchi, Yuichi Izumi, Mitsuhiro Ohshima, MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis: a pilot study, FEBS Open Bio, 査読有, 2017

DOI: 10.1002/2211-5463.12238

Horie M, Yamaguchi Y, Saito A, Nagase T, Lizio M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Forrest AR, Hayashizaki Y, Suzutani T, Kappert K, Micke P, Ohshima M, Transcriptome analysis of periodontitis-associated fibroblasts by CAGE sequencing identified DLX5 and RUNX2 long variant as novel regulators involved in periodontitis. Sci Rep, 査読有, 6巻, 2016, 33666

DOI: 10.1038/srep33666.

Mitsuhiro Ohshima, Yoko Yamaguchi, Kimiharu Ambe, Masafumi Horie, Akira Saito, Takahide Nagase, Keisuke Nakashima, Hidero Ohki, Toshihisa Kawai, Yoshimitsu Abiko, Patrick Micke, Kai Kappert, Fibroblast VEGF-receptor 1 expression as molecular target in periodontitis, J Clin Periodontol, 査読有, 43巻, 2016, 128-137
DOI: 10.1111/jcpe.12495.

[学会発表](計 4件)

大島光宏, 歯周炎診断・治療のパラダイムシフト, 平成28年度東京都歯科医師会学術講演会(ランチョンセミナー), 2017年1月29日, 歯科医師会館(東京都・千代田区)(招待講演)

齋藤朗, 堀江真史, 江尻健一郎, 青木章, 鈴木伸太, 前川省吾, 片桐さやか, Sophannary Kong, 山内恒人, 山口洋子, 和泉雄一, 大島光宏, 歯肉溝滲出液miRNAによる新しい歯周炎診断法, 第69回東北地区歯科医学会, 2016年11月5日, 宮城県歯科医師会館(宮城県・仙台市)

大島光宏, 生物学的根拠に基づく新規歯周炎診断法・治療法の確立に向けて, 第9回日本口腔検査学会総会・学術大会 特別講演, 2016年10月1日, 奥羽大学(福島県・郡山市)(招待講演)

大島光宏, 生物学的根拠に基づく歯周炎の診断と治療に向けて, 平成28年度先進歯科医療学会(福島県歯科医師会), 2016年5月15日, 福島県歯科医師会館(福島県・福島市)(招待講演)

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称: 歯周炎治療薬及び歯周炎治療用組成物
発明者: 山口洋子, 大島光宏
権利者: 日本大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-146593
出願年月日: 2016年7月26日

国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大島 光宏 (OHSIMA Mitsuhiro)

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：30194145

(2)研究分担者

山口 洋子 (YAMAGUCHI Yoko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：00239922