

令和元年5月31日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11843

研究課題名(和文) 歯肉上皮細胞の特殊性に基づいた新規歯周炎治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel drug for periodontitis based on the characteristics of gingival epithelial cells

研究代表者

山口 洋子 (YAMAGUCHI, Yoko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：00239922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎に対する治療薬、とくに歯肉上皮に塗ることで効果を発揮する薬剤の探索を、私どもが見つけた歯周炎原因細胞を含む培養モデルを用いて行った。しかし、上皮に作用させるだけで歯と骨を繋ぐコラーゲンが溶けるのを止められる物質は見つけれなかった。そこで、歯周炎原因細胞を調べ直したところ、肝細胞増殖因子(HGF)という物質が大量に出て来てコラーゲンを壊していることがわかった。このHGFの働きを止める抗体を使ったところ、モデルではコラーゲンの分解を阻害し、歯周炎を自然発症したサルでは臨床的な指標を改善させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細菌が原因と勘違いされてきた歯周炎において、コラーゲン分解能力が極端に高い原因細胞とみられる細胞を取り出すとともに、三次元培養モデルを用いて原因候補となる遺伝子のひとつが肝細胞増殖因子(HGF)であることを突き止めた。このHGFの働きを止める中和抗体の効果をモデルで証明したのち、歯周炎を自然発症したサルの歯肉に注射したところ、その症状が改善した。これらのことから、本研究では世界で初めて歯周炎を抗体によって治療できる可能性を示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic agent for periodontitis, in particular, a drug that exerts an effect by applying to gingival epithelium, was searched using periodontitis-causing fibroblasts-containing culture model that we have established. However, no candidate was found that could inhibit the degradation of collagen which connects teeth and bone only by acting on the epithelium. Therefore, we have re-examined the periodontitis-causing fibroblasts, and found highly expression of hepatocyte growth factor (HGF) during collagen degradation. Using neutralizing antibody to inhibit HGF activity, it was found that the collagen degradation was inhibited in the model and furthermore, improved the clinical indices in monkeys that have naturally-occurred periodontitis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：初代培養 生体外歯周炎モデル 歯周炎治療薬 HGF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの身体の表面はすべて上皮というバリアによって覆われており、外界との境界を成すのみならず、感染防御の最前線を担っている。口腔から始まって肛門までの消化管もその例に漏れずすべて上皮によって覆われているため、呼吸器系や泌尿生殖器系と同様に口腔内も体外ととらえることができる。この生体表面の上皮の連続性を唯一破る硬組織が歯であり、歯肉上皮細胞と歯との接着が、外来異物に対するバリアとなっている。このバリアが歯周炎などで破綻すると、歯磨きの度に菌血症となり、心疾患や血管疾患のリスクを上昇させることが指摘されている。

ところで近年、申請者らは、歯周炎罹患歯肉から、歯肉上皮細胞と組み合わせてコラーゲンゲル三次元培養すると、コラーゲンを極度に分解する線維芽細胞(歯周炎関連線維芽細胞, PAFs)が分離できたことから、これが歯周炎原因細胞ではないかと考え「生体外歯周炎モデル」を確立した(Ohshimaら, 2010; 大島, 山口, 2014)。

### 2. 研究の目的

前述したとおり申請者らは、コラーゲンゲル三次元培養法により、世界で初めてコラーゲンを極度に分解する歯周炎関連線維芽細胞(PAFs)を分離し、これが歯周炎原因細胞ではないかと判断して「生体外歯周炎モデル」を確立した。このゲル上に播種する上皮細胞は、たとえ由来する個体が変わっても初代培養したヒト歯肉上皮細胞であれば、ゲル内に埋入するPAFsとの相互作用で必ず極度のコラーゲン分解が起こる。その反面、初代培養した歯肉上皮細胞の代わりにヒト皮膚由来表皮ケラチノサイトを播種しても、コラーゲン分解は起こらない。また、株化した口腔がん細胞を播種した場合、がん細胞のゲル内への浸潤は起こるがコラーゲン分解は起こらない。すなわち、PAFsが極度のコラーゲン分解能を発揮するためには、初代培養歯肉上皮細胞とPAFsとの相互作用が必須であることが判明した。

そこで予備調査として、申請者らが理化学研究所 FANTOM5 プロジェクトに提供した初代培養ヒト歯肉上皮細胞およびヒトマラッセの上皮遺残由来細胞と、表皮ケラチノサイトをはじめとする数種の上皮細胞とで、CAGE法による解析データの比較を行った。その結果、DKK4やCD47等、数多くの遺伝子が歯肉上皮細胞で特異的ともいえる発現パターンを示していることが判明した。また主成分分析の結果、歯肉上皮細胞は第一成分、第二成分ともに、他の上皮細胞とは大きく異なるクラスターに属することもすでに判明している(データ示さず)。これらの予備データをもとに定量PCRを行い、さらにタンパクレベルで確認することで、PAFsによるコラーゲン分解にGOサインを出す因子が判明すれば、その因子を阻害する薬剤をスクリーニングすることが可能となり、歯肉上皮細胞を標的とした新規歯周炎治療薬の開発につながると考え、本研究を企図した。

### 3. 研究の方法

FANTOM5のCAGEデータ(ZENBU, <http://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/>)を再分析し、歯肉上皮細胞に特異的に発現している遺伝子を抽出した。定量的PCRによってvalidationを行った後、タンパクレベルでの確認を行った。三次元培養ゲルならびに歯肉組織の免疫染色も併せて行い、歯周炎病変局所における、歯肉上皮細胞由来のPAFsによるコラーゲン分解促進候補タンパク分子の存在を検索した。三次元培養を用いて候補タンパクに対する中和抗体を作用させ、またmiRNAによるノックダウンを行って、機能レベルでの確認を行った。得られた結果を元にIPAを行い、低分子薬のターゲットとなりうるシグナル分子を検索した。定量的PCR、続けて三次元培養により候補薬剤のコラーゲンゲル分解阻害効果を*in vitro*で確認し、歯肉上皮細胞の特殊性に基づく歯周炎治療薬の開発を目指した。

#### (1) ターゲット分子の再抽出

予備調査で得られている理化学研究所 FANTOM5 プロジェクトのCAGEデータ解析の範囲を広げ、プロジェクトで入手できる限りの情報収集を行い、heatmapおよび主成分分析図を再作成して、歯肉上皮細胞の特徴を抽出した。歯肉上皮細胞で高発現もしくは低発現していることが判明した遺伝子に関して文献検索を行い、歯周炎関連線維芽細胞(PAFs)に受容体が発現している分泌タンパク遺伝子を優先的にリストアップした。なお、PAFsに関してもFANTOM5プロジェクトのCAGEデータがあるため、受容体遺伝子発現レベルの検索を行った。

#### (2) 定量的PCRによるvalidation

これらの候補遺伝子ならびに受容体遺伝子に対するPCR用primerを合成した。二次元培養した歯肉上皮細胞および、コラーゲンゲル三次元培養した歯肉上皮細胞からRNAを回収し、RT-qPCR法を用いて遺伝子発現を定量的に調べた。同時に、市販のヒト成人表皮角化細胞も同様に培養し、同じ操作を行って、遺伝子発現レベルの差を求めた。

翻って、PAFsにおける分泌タンパク受容体の遺伝子発現レベルのチェックを同様にRT-qPCRで行う。また、GeneChip等のmicroarray用サンプルを調製し、外部に解析を委託した。

#### (3) タンパクレベルでの確認

候補となった歯肉上皮細胞由来の分泌タンパクをウェスタン・ブロット法やELISA法などを用いてタンパクレベルで確認した。同時に抗体を購入し、三次元培養ゲルの免疫染色を行って、上皮細胞におけるタンパク発現を確認した。また、歯周外科処置時に不要となった歯肉組織を

入手して、同様に免疫染色を行い、候補タンパクが実際に病変歯肉上皮で発現しているかどうかを調べた。また、候補タンパクに対応する PAFs 側の受容体に対する抗体も購入し、コラーゲンゲルおよび歯肉組織の免疫染色を行う。免疫染色など業務の一部を外部業者に委託した。

#### (4) Functional assay

さらに、三次元培養ゲルに候補タンパクの中和抗体を作用させ、コラーゲンゲルの分解が抑制されるかどうかを確認した。また、東大呼吸器内科・堀江の協力を得て、遺伝子ノックダウン実験用 miRNA を設計し、レンチウイルスを用いた系で細胞に miRNA を導入して候補遺伝子のノックダウン実験を行った。また、線維芽細胞側の候補タンパク受容体にアンタゴニストまたは受容体キナーゼ阻害薬を作用させ、同様にコラーゲン分解阻害作用が見られるかどうかを調べた。

#### 4. 研究成果

申請者らは、歯周炎罹患歯肉からコラーゲンゲル三次元培養法により、コラーゲンを極度に分解する歯肉線維芽細胞（歯周炎関連線維芽細胞、PAFs）を分離し、「生体外歯周炎モデル」を確立した（J Dent Res 2010）。さらに、マイクロアレイ解析により FLT1（VEGFR1）が高リスク遺伝子であることを報告した（J Clin Periodontol 2016）。しかしながら、コラーゲン分解の実行役となる遺伝子は、依然として不明のままであった。そこで本研究では、三次元培養ゲルを経日的に回収してマイクロアレイ解析することで、コラーゲン分解に直接かかわる遺伝子をリストアップするとともに、上皮細胞側の PAFs に対する刺激因子を調べることが目的とした。このモデルのマイクロアレイ解析の結果から、歯肉上皮細胞で高発現する遺伝子の候補として エンドセリン受容体（EDNRB）が浮上した。そこで、EDNRB のアンタゴニストであるボセンタンを用いて三次元培養を行ったが、予想に反してコラーゲン分解は抑制されなかった。そこで、治療薬探索のターゲットを歯周炎原因細胞の候補である歯周炎関連線維芽細胞（PAF）に戻してマイクロアレイ解析データを iPathway Guide でメタ解析したところ、意外なことに肝細胞増殖因子（HGF）の遺伝子発現上昇が著しく、HGF のコラーゲン分解への関与が疑われた。そこで、治療薬探索のターゲットを歯周炎原因細胞の候補である歯周炎関連線維芽細胞（PAF）に戻してマイクロアレイ解析したところ、コラーゲン分解に伴って HGF も高発現していることが判明した。そこで、ゲルに HGF 標品または抗ヒト HGF 中和抗体（ヤギポリクローナル）を添加する実験を行った。その結果、標品の添加ではコラーゲン分解がさらに促進され、中和抗体の添加ではコラーゲン分解は顕著に抑制された。併せて、HGF の受容体 c-Met に対する低分子キナーゼ阻害剤（Tivantinib）の効果も試したところ、モデルのコラーゲン分解を阻害したが、有効濃度範囲が狭いため（高濃度で細胞死を誘導）副作用のコントロールが難しいと思われた。次に、この中和抗体を添加したゲルのマイクロアレイ解析を行ったところ、コラーゲン分解を促進することが知られている因子の高発現が判明し、これら因子の発現を顕著に抑制する中和抗体は、歯周炎治療薬となる可能性が見出された。

この仮説を in vivo で試験するために、歯周炎を自然発症したカニクイザルの安楽殺個体から歯肉を採取してコラーゲンゲル三次元培養を行ったところ、サル歯肉にも PAFs が存在することが明らかとなり、かつ抗ヒト HGF 中和抗体でコラーゲン分解が顕著に抑制されることがわかった。この歯周炎を自然発症したカニクイザルの歯肉に、抗 HGF 中和抗体を注射により局所投与したところ、歯周炎の臨床指標（ポケット深さとプロービング時の出血）が一部改善した。当初目的とした、上皮に塗布するだけで有効となる歯周炎治療薬を探索することは出来なかったが、代わりに歯周炎の抗体治療に向けた世界初の取り組みを行うことができた。

以前の申請者らの研究では、HGF が歯周炎局所の歯肉溝滲出液中に多量に検出されるため、歯周炎の特異的マーカーとして位置づけて来た（J Periodontal Res 2002）。さらに、洗口吐出液中の HGF を検出することで、歯周炎患者をスクリーニングする試験紙も開発中である（Suzuki ら, J Oral Sci, 印刷中）。しかし本研究の進展により、図らずも HGF が歯周炎を進行させる実行役であることが判明したことから、HGF の歯周炎特異的マーカーとしての有用性も揺るぎないものとなった。

歯周炎に対する治療薬、とくに歯肉上皮に塗ることで効果を発揮する薬剤の探索を、申請者らが発見した歯周炎原因細胞を含む培養モデルを用いて行ったが、上皮に作用させるだけで歯と骨を繋ぐコラーゲンが溶けるのを止められる物質は見つけられなかった。しかし、歯周炎治療薬の標的分子を HGF と定め、抗ヒト HGF 中和抗体のコラーゲン分解阻害効果を「生体外歯周炎モデル」で試験し、コラーゲン分解抑制効果が確認できた。さらに幸運なことに、歯周炎を自然発症したカニクイザル個体が飼育されている世界的にも貴重なフィールドである霊長類医学研究センターと出会うことで、世界で初めての抗体を用いた歯周炎治療の pilot study を行うことができた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Akira Saito, Masafumi Horie, Kenichiro Ejiri, Akira Aoki, Sayaka Katagiri, Shogo Maekawa, Shinta Suzuki, Sophannary Kong, Tsuneto Yamauchi, Yoko Yamaguchi, Yuichi Izumi and Mitsuhiro Ohshima (2017) MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis - a pilot study. FEBS Open Bio(査読あり) 7, 981-994. doi:10.1002/2211-5463.12238

Horie M, Kaczkowski B, Ohshima M, Matsuzaki H, Noguchi S, Mikami Y, Lizio M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest ARR, Takai D, Yamaguchi Y, Micke P, Saito A, Nagase T (2017) Integrative CAGE and DNA Methylation Profiling Identify Epigenetically Regulated Genes in NSCLC, Mol Cancer Res (査読あり) 15, 1354-1365. doi: 10.1158/1541-7786

Derek de Rie, Imad Abugessaisa, Tanvir Alam, Erik Arner, Peter Arner, Haitham Ashoor, Gaby Åström, Magda Babina, Nicolas Bertin, A. Maxwell Burroughs, Ailsa J. Carlisle, Carsten O. Daub, Michael Detmar, Ruslan Deviatiiarov, Alexandre Fort, Claudia Gebhard, Daniel Goldowitz, Sven Guhl, Thomas J. Ha, Jayson Harshbarger, Akira Hasegawa, Kosuke Hashimoto, Meenhard Herlyn, Peter Heutink, Kelly J. Hitchens, Chung Chau Hon, Edward Huang, Yuri Ishizu, Chieko Kai, Takeya Kasukawa, Peter Klincken, Timo Lassmann, Charles-Henri Lecellier, Weonju Lee, Marina Lizio, Vsevolod Makeev, Anthony Mathelier, Yulia A. Medvedeva, Niklas Mejhert, Christopher J. Mungall, Shohei Noma, Mitsuhiro Ohshima, Mariko Okada-Hatakeyama, Helena Persson, Patrizia Rizzu, Filip Roudnický, Pål Sætrom, Hiroki Sato, Jessica Severin, Jay W. Shin, Rolf K. Swoboda, Hiroshi Tarui, Hiroo Toyoda, Kristoffer Vitting-Seerup, Louise Winteringham, Yoko Yamaguchi, Kayoko Yasuzawa, Misako Yoneda, Noriko Yumoto, Susan Zabierowski, Peter G. Zhang, Christine A. Wells, Kim M. Summers, Hideya Kawaji, Albin Sandelin, Michael Rehli, the FANTOM consortium, Yoshihide Hayashizaki, Piero Carninci, Alistair R. R. Forrest, Michiel J. L. de Hoon, (2017) An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. Nat Biotechnol. (査読あり) 35, 872–878. doi: 10.1038/nbt.3947

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 (2016) Transcriptome analysis of periodontitis-associated fibroblasts by CAGE sequencing identified DLX5 and RUNX2 long variant as novel regulators involved in periodontitis. Sci Rep (査読あり) 6, 33666 doi: 10.1038/srep33666

〔学会発表〕(計 7 件)

Yamaguchi Y, Ohshima M (2018) Targeting Hepatocyte growth factor as novel therapeutic approach for periodontitis treatment. EuroPerio9, AMS, NED

Ohshima M, Saito A, Horie M, Ejiri K, Aoki A, Katagiri S, Suzuki S, Kong S, Yamauchi T, Yamaguchi Y, Izumi Y (2018) MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis patients. EuroPerio9, AMS, NED

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 6 件)

名称：インプラント周囲炎の予防、及び/又は治療に使用する物質のスクリーニング方法、及びインプラント周囲炎の予防用、及び/又は治療用組成

発明者：山口洋子、大島光宏、深田一剛、巽一憲

権利者：日本大学、ロート製薬株式会社

種類：特許

番号：特願 2018-148587

出願年：2018

国内外の別：国内

名称：歯周炎治療薬および歯周炎治療用組成

発明者：山口洋子、大島光宏

権利者：日本大学、東京大学

種類：特許

番号：PTC/JP2017/026481

出願年：2017

国内外の別：国外

名称：歯周炎治療薬

発明者：山口洋子、大島光宏、堀江真史、齋藤朗、長瀬隆英

権利者：日本大学、東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-101501  
出願年：2017  
国内外の別： 国内

名称：歯周炎治療薬および歯周炎治療用組成  
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 2016-479893  
出願年：2016  
国内外の別： 国内

名称：miRNA をマーカーとする歯周炎検査キット、および検査方法  
発明者：山口洋子、大島光宏、齋藤朗、堀江真史、長瀬隆英、岩本久美  
権利者：日本大学、IC エレクトロニクス  
種類：特許  
番号：PTC/JP2016/063846  
出願年：2016  
国内外の別： 国外

取得状況（計 1 件）

名称：miRNA をマーカーとする歯周炎検査キット、および検査方法  
発明者：山口洋子、大島光宏、齋藤朗、堀江真史、長瀬隆英、岩本久美  
権利者：日本大学、IC エレクトロニクス  
種類：特許  
番号：W02017/195268  
取得年：2016  
国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：大島 光宏

ローマ字氏名：OHSHIMA, Mitsuhiro

所属研究機関名：奥羽大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：30194145

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：堀江 真史

ローマ字氏名：HORIE, Masafumi

研究協力者氏名：齋藤 朗

ローマ字氏名：SAITO, Akira

研究協力者氏名：Kai KAPPART

ローマ字氏名：Kai, KAPPART

研究協力者氏名：Patrick MICKE

ローマ字氏名：Patrick, MICKE

研究協力者氏名：Arne ÖSTMAN

ローマ字氏名：Arne, ÖSTMAN

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。