

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20657

研究課題名(和文) ダウン症候群における免疫応答の個体差に着目した歯周病のオーダーメイド医療の可能性

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of onset and progression of periodontitis in Down syndrome

研究代表者

矢口 学 (YAGUCHI, Manabu)

日本大学・松戸歯学部・専修医

研究者番号：90732181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Down症候群(DS)はその特徴的な遺伝的背景により免疫応答の異常が認められ、重篤な歯周病が持続しやすいが、その機序は未だ不明な点が多い。本研究では歯肉線維芽細胞(GF)を用いた実験系により、転写因子NF- κ Bをユビキチン化・分解することにより炎症反応を負に制御するユビキチンリガーゼE3であるPDZ and LIM domain protein-2(PDLIM2)の遺伝子発現が、健常者由来GFに比べDS由来GFでは恒常的に低い傾向にあることが示された。従って、DSの重篤な歯周病病態にPDLIM2が深く関与している可能性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患の病態解明のために、その疾患特有の遺伝子に欠損もしくは変異が生じている遺伝性疾患を利用する手法が用いられている。なかでも近年、早老症であるDown症候群(DS)由来細胞を用いたアルツハイマー病の病態解明が大きな成果をあげている。本研究ではDS由来歯肉線維芽細胞において健常者と比較して炎症を負に制御するPDLIM2の遺伝子発現が恒常的に低い傾向にあることが明らかになった。さらに、その多くが小児DS由来の試料であるため、経過を追うことで将来的な歯周病発症の有無を検討し、DSにおける免疫応答性の個体差を明らかにすることができれば、健常者における歯周病の病態解明にも応用できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Individuals with Down syndrome (DS) have a high prevalence of severe periodontitis, which develops early and proceeds rapidly, in comparison with healthy controls (non DS). The abnormal factors in their host responses has been considered to result in severe periodontal disease in individuals with DS. However, the mechanisms of development and procedure of periodontal inflammation in DS have not been fully understood. The nuclear PDZ and LIM domain protein 2 (PDLIM2) is an ubiquitin E3 ligase that targets the p65 subunit of NF- κ B, thus terminating NF- κ B-mediated inflammation. In this study, we examined the level of PDLIM2 mRNA in the gingival fibroblasts from individuals with DS (DGF) and non DS (NGF). The level of PDLIM2 mRNA expression in DGF was constitutively lower than that in NGF. These data indicate that low level expression of PDLIM2 in DGF may be responsible for the severe periodontal disease in DS patients.

研究分野：歯学

キーワード：Down症候群 歯周病 NF- κ B ユビキチンリガーゼ PDLIM2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Down 症候群 (DS) は、常染色体 21 番目のトリソミーを伴う遺伝性疾患であり、近年高齢出産の増加に伴い増加傾向にある。DS における染色体異常は様々な全身症状を引き起こし、歯科領域では歯周病の罹患率が高く、早期に発症し進行が速く重篤であることが知られており、これらは DS 患者の QOL を低下させる原因となっている。このような背景から DS における重篤な歯周病の病態解明は急務であると考えられる。しかしながら、現在までに DS の歯周病病態解明に向けた基礎研究は国内外においてほとんど認められておらず、未だ病態解明には至っていない。これまでに申請者らは、DS 由来歯肉線維芽細胞 (DGF) における歯周病原菌 LPS に対する宿主反応に注目し、健常者由来歯肉線維芽細胞 (NGF) と比較して、炎症の進行に関与する plasminogen activator の活性亢進 (J Oral Sci. 2001) PGE2, Cox-2 (Mech Ageing Dev. 2002), IL-6, IL-8 の産生量や遺伝子発現の増大 (障害者歯科学会. 2008, 2009), 転写因子 NF- κ B p65 のリン酸化亢進 (医学と生物学 2013) などの研究成果を得ている。従って、DS の宿主反応が健常者と異なることは明らかであり、さらなる解析を行うことが必要との考えに至った。一方、これまで行ってきた基礎研究において DS の宿主反応の個体差が大きいことを経験してきた。興味深いことに、臨床経験からも DS 患者における歯周病の病態に個人差があることを強く認識している。これらのことから、DS 個体間における免疫機能の差が歯周病の病態形成に大きく影響しているものと予想された。

2. 研究の目的

Down 症候群 (DS) は、多形核白血球、単球およびリンパ球などの免疫担当細胞の機能異常が報告されており、これらが DS における重篤な歯周病の病態形成あるいは病態の違いに深く関与しているのではないかと考えられる。なかでも、T リンパ球は抗原の認識、それに伴うサイトカインの産生を通して免疫応答を調節し、歯周病の成立に深く関与している。そこで、本研究では DS における歯周病原菌に対する T リンパ球応答性に注目することで、DS における歯周病の発症と進行のメカニズムの解明を目指す。さらに、これらの結果より得られた知見は健常者における歯周病の病態解明にも応用できるものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究課題の申請時は、先行研究において見過ごされてきた Down 症候群 (DS) における歯周病の病態の個体差に焦点を当て、歯周病原菌に対する末梢血 T リンパ球の免疫応答性について検討し、DS における歯周病の病態形成に T リンパ球がどのように関わっているかを明らかにすることを旨とした。すなわち、DS における歯周病の有無あるいは重症度と免疫異常の関連性について調査し、DS 由来歯肉線維芽細胞および末梢血 T リンパ球における歯周病原菌 *P. gingivalis* に対する応答性について *in vitro* で検討する予定であった。しかしながら、臨床サンプル採取や末梢血 T リンパ球の分離培養に困難を要し、研究計画を予定通り遂行できなかった。そこで、申請時の研究計画に加えて、分離培養が比較的容易な歯肉線維芽細胞を用いた実験系を検討した。これまでに申請者らは、炎症反応に必須の転写因子 NF- κ B p65 サブユニットについて検討し、歯周病原菌 LPS 刺激によって DS 由来歯肉線維芽細胞では健常者と比較して異常に活性化していることを明らかにしている。近年、NF- κ B の活性化を抑制する分子機構について注目されている。なかでもユビキチンリガーゼ E3 である PDZ and LIM domain protein-2 (PDLIM2) は、核内に移行した NF- κ B に結合してユビキチンを付加し、プロテアソームによる NF- κ B の分解を誘導することで炎症反応を抑制することが報告されている。これらのことから、DS における歯周病の病態形成に PDLIM2 が関与している可能性が推察される。しかしながら、これまでに歯肉線維芽細胞において PDLIM2 の存在を明らかにした報告はない。従って、ヒト歯肉線維芽細胞株 HGF-1 (ATCC® CRL-2014™) を用いて LPS に対する PDLIM2 の発現変動をリアルタイム PCR 法ならびにウェスタンブロット法で検討することで本研究を遂行するための足がかりとし、さらに DS と健常者より分離培養した歯肉線維芽細胞を用いて PDLIM2 の遺伝子発現の違いがあるかを比較検討した。

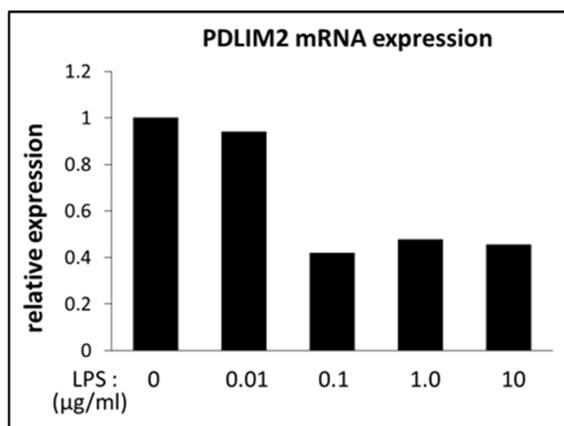
4. 研究成果

当初の研究計画では、フローサイトメトリー法を用いて Down 症候群 (DS) 患者の末梢血中における免疫担当細胞の分画解析、また分離培養した末梢血 T リンパ球を用いた *in vitro* の実験系を行う予定であったが、研究方法の頁で説明したようにサンプル採取や末梢血 T リンパ球の分離培養に困難を要したため、これらは実験方法の検討にとどまった。従って、新たに検討を加えた歯肉線維芽細胞を用いた実験系の研究成果を以下に示す。

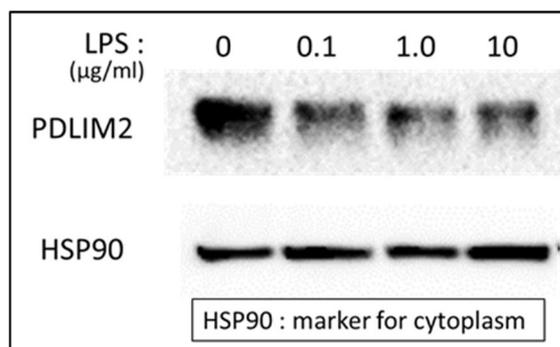
本研究の結果、ヒト歯肉線維芽細胞株である HGF-1 において恒常的に PDLIM2 が発現していることが明らかになった。一方、歯周病原菌 LPS 刺激によって IL-8 遺伝子発現は有意に上昇したのに対し、PDLIM2 遺伝子発現およびタンパク発現は濃度依存的に有意に減少した (図 1, 2)。また、転写因子 NF- κ B p65 の核移行は濃度依存的に歯周病原菌 LPS によって誘導された。以上のことから、ヒト歯肉線維芽細胞においても PDLIM2 が歯周病原菌 LPS によって誘導される炎症応答を抑制的に制御している可能性が考えられた。さらに興味深いことに、健常者由来歯肉線維芽細胞 (NGF) と比較して DS 由来歯肉線維芽細胞 (DGF) では恒常的に PDLIM2 遺伝子発現が低い傾向を示すことが明らかになった (図 3)。従って、DS における重篤な歯周病

の病態形成には、炎症反応に対して抑制的に働く PDLIM2 の低発現が深く関与している可能性が高く、そのことが慢性炎症の遷延化を引き起こしているのではないかと考えられる。また、本研究で用いた臨床サンプルは小児 DS 由来であるため、経過を追うことで将来的な歯周病発症の有無を検証し、DS における免疫応答性の個体差を明らかにすることができれば、健常者における歯周病の病態解明にも応用できるものと考えられる。

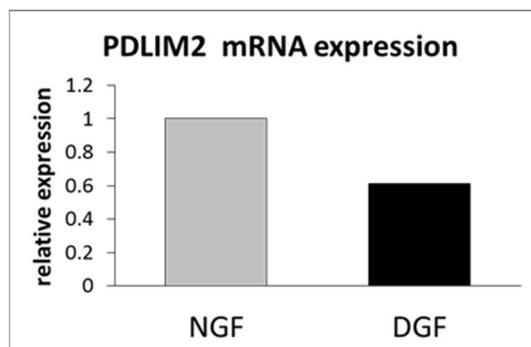
(図 1) HGF-1 における LPS 刺激による PDLIM2 遺伝子発現



(図 2) HGF-1 における LPS 刺激による PDLIM2 タンパク発現



(図 3) 健常者および DS 由来歯肉線維芽細胞における無刺激時の PDLIM2 遺伝子発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 矢口学, 佐久間圭, 市川勝一, 菱沼光恵, 根岸浩二, 小野晃弘, 田中陽子	4. 巻 41
2. 論文標題 一卵性双生児のMarfan症候群由来歯肉線維芽細胞にみられた炎症関連物質における遺伝子発現の違い	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本障害者歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 16-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoichi Ichikawa, Manabu Yaguchi, Yoko Tanaka	4. 巻 18
2. 論文標題 A GGT Inhibitor Suppresses IL-6 and IL-8 Expressions Enhanced by LPS in Gingival Fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 183-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.5466/ijoms.18.183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 K. Sakuma, Y.O. Tanaka, M. Yaguchi, M. Hishinuma, K. Ichikawa, T. Nomoto,
2. 発表標題 Abnormal response in gingival fibroblasts derived from Marfan syndrome
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐久間圭, 田中陽子, 矢口学, 菱沼光恵, 市川勝一, 根岸浩二, 市川一國, 野本たかと
2. 発表標題 Marfan症候群由来歯肉線維芽細胞におけるサイトカインの発現変動
3. 学会等名 第34回 日本障害者歯科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢口学, 田中陽子, 菱沼光恵, 佐久間圭, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるHMGB1発現低下と細胞遊走能の関連性
3. 学会等名 第36回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yaguchi M, Tanaka Y, Sakuma K, Hishinuma M, Ichikawa K, Nomoto T
2. 発表標題 Low level expression of HMGB1 in human gingival fibroblasts from individuals with Down syndrome
3. 学会等名 第1回 アジア障害者歯科学会 (AADOH) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manabu Yaguchi, Yoko Tanaka, Kei Sakuma, Mitsue Hishinuma, Kazukuni Ichikawa, Takashi Tanaka, Takato Nomoto
2. 発表標題 Expression of PDLIM2 in human gingival fibroblasts
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢口学, 田中陽子, 佐久間圭, 市川一國, 菱沼光恵, 根岸浩二, 市川勝一, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるHMGB1発現の低下
3. 学会等名 第35回 日本障害者歯科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢口学, 田中陽子, 佐久間圭, 菱沼光恵, 市川一國, 根岸浩二, 市川勝一, 野本たかと
2. 発表標題 ヒト歯肉線維芽細胞におけるGGT阻害剤の創傷治癒に与える影響
3. 学会等名 第34回 日本障害者歯科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢口学, 田中陽子, 菱沼光恵, 市川勝一, 三枝優子, 小野晃弘, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群歯肉線維芽細胞におけるfimA 型P. gingivalis由来LPSに対する応答性
3. 学会等名 第33回 日本障害者歯科学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----