

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 B
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390538
 研究課題名（和文） エキソサイトーシス制御を基盤とした新しい歯周病治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of new therapy for periodontal disease based on regulating exocytosis
 研究代表者
 松下 健二（MATSUSHITA KENJI）
 国立長寿医療センター研究所口腔疾患研究部・部長
 研究者番号：90253898

研究成果の概要（和文）：歯周病の病因におけるエキソサイトーシスの意義とその制御の可能性について検討した。その結果、歯周病原細菌の種々の刺激は、歯周組織を構成する上皮細胞、免疫細胞、血管内皮細胞にエキソサイトーシスを誘導すること、またそれが一酸化窒素（NO）によって際御されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We explored meaning of exocytosis on pathogenesis of periodontal disease and possibility of that regulation. We found that various stimulants from periodontopathic bacteria induced exocytosis in keratinocytes, immune cells, and endothelial cells in periodontal tissue and it was regulated nitric oxide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008年度	4,700,000	1,890,000	6,590,000
2009年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：免疫・感染・炎症、サイトカイン、高血圧、歯周病、開口放出

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化と同様に、歯周病もまた慢性進行性の炎症性疾患であり、その発症・進展にエキソサイトーシスが深く関わっている。したがって、歯周組織におけるエキソサイトーシス機序の解明は、歯周病の発症病理と創傷治癒過程を理解するうえできわめて重要である。さらに、その制御は歯周病の予防と治療の新しい戦略として極めて有用である

2. 研究の目的

本研究では、口腔粘膜におけるエキソサイトーシスの役割についてその詳細を明らかにするとともに、エキソサイトーシス制御を基盤とした新しい歯周病予防、治療法の可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

（1）歯肉上皮細胞培養系において、同細胞からエキソサイトーシスされる Secretory Leucocyte Protease Inhibitor（SLPI）量を、ELISA で測定した。また、P. gingivalis

gingipain の添加による SLPI の分解を western blot 法で解析した。

(2) 細菌の内毒素であるリポ多糖 (LPS) やリポタイコ酸 (LTA) を、血管内皮細胞培養系に添加し、同細胞からの IL-8 あるいは vWF のエキソサイトーシスレベルを ELISA あるいは Western blot 法で検討した。また、一酸化窒素 NO によるエキソサイトーシス制御機序を Biotin switch 法によって検討した。

(3) 血管内皮細胞培養系における interleukin-4 (IL-4) によるエキソサイトーシス制御機構を、RT-PCR 法、ELISA、および免疫組織学的解析によって解析した。

(4) アルドステロンによるエキソサイトーシス制御の可能性を検討するために、血管内皮細胞培養系に同分子を添加し、vWF の放出を ELISA あるいは Western blot 法によって解析するとともに、同細胞への単球細胞株 THP-1 の付着増強を *in vitro* において検討した。

4. 研究成果

(1) 歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (P.g) が歯肉上皮細胞の分泌する抗菌ペプチド SLPI のエキソサイトーシスおよび SLPI の活性にどのような影響を及ぼすか、また歯周病原細菌の重要な病原因子である LTA および LPS による宿主細胞からのエキソサイトーシス誘導が、どのように制御されているかを検討した。その結果、P.g. 全菌体を歯肉上皮細胞に添加すると、用量依存性に歯肉上皮細胞からエキソサイトーシスされる SLPI 量が減少することが明らかになった。また、その抑制効果は、P.g. 菌体を熱処理すること、あるいはプロテアーゼ阻害剤と同時投与することにより減弱したことから、P.g. 菌体中のプロテアーゼがその効果をもたらしていることが明らかになった。その後の詳細な検討からその分子は P.g. 菌の産生するトリプシン様酵素 gingipain であることが明らかになった。

(2) LTA や LPS は炎症性サイトカインの一種である IL-8 のエキソサイトーシスを誘導するが、それが一酸化窒素で制御されていることが明らかになった Into T, Matsushita K, J Biol Chem 282:8134-8141, 2007.)。また、その作用は、LTA および LPS の共通のシグナル伝達分子である MyD88 分子が NO によって S-ニトロシル化されることによる可能性が示唆された Into T, Matsushita K. Mol Cell Biol 28:1338-1347, 2008.)。

(3) サイトカインおよびホルモンによるエキソサイトーシス制御の可能性について検討した。まず、T 細胞のサブセットの一種である TH2 細胞の産生する Interleukin (IL)-4 の影響を調べた。その結果、IL-4 は血管内皮細胞における P-selectin や eotaxin-3 の分泌を増強したが、その一方、IL-8 と Angiopoietin-2 の分泌は、強力に抑制された。siRNA を用いた実験結果から、IL-4 によるエキソサイトーシスの抑制は、STAT-6 - SOCS-1 シグナルの活性化によることが明らかになった (Inomata M, Into T, ... Matsushita K Mol Immunol 46:2080-2089, 2009.)。以上の結果は、慢性歯周炎の組織に有意に多く認められる TH2 細胞がエキソサイトーシスを修飾することによって、歯周炎の病態をコントロールしている可能性を示唆している。

(4) 高血圧によるエキソサイトーシス亢進の機序を明らかにした。すなわち昇圧性ホルモンとして知られるアルドステロンがエキソサイトーシスを亢進すること、またそれがミネラルコルチコイド受容体 (MR) を介して起こることを明らかにした。次に、アルドステロンの刺激によって血管内皮細胞への白血球の付着が亢進することを明らかにした [§] Jeong Y, Matsushita K, et al. Proc Natl Acad Sci USA 106:3782-3787, 2009.)。

。以上の結果は、アルドステロンの上昇によって炎症反応が惹起されることを示している。昨今、歯周病と高血圧の関連性が指摘されてきているが、本研究の結果は両者の因果関係の一端を明らかにしたものである。

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 23 件)

1. Meng X, Kawahara KI, Matsushita K, Nawa Y, Shrestha B, Kikuchi K, Sameshima H, Hashiguchi T, Maruyama I: Attenuation of LPS-induced iNOS expression by 1,5-anhydro-D-fructose. **Biochem Biophys Res Commun** 387:42-46, 2009.
2. Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M: Matrix Metalloproteinase-3 Accelerates Wound Healing Following Dental Pulp Injury. **Am J Pathol** 175:1905-1914,

- 2009.
3. Inomata M, Ishihara Y, Matsuyama T, Imamura T, Maruyama I, Noguchi T, **Matsushita K**: Degradation of vascular endothelial thrombomodulin by arginine and lysine-specific cysteine proteases from *Porphyromonas gingivalis*. **J Periodontol** 80:1511-1517, 2009.
 4. Inomata M, Into T, Nakashima M, Noguchi T, **Matsushita K**: IL-4 alters expression patterns of storage components of vascular endothelial cell-specific granules through STAT6-and SOCS-1-dependent mechanisms. **Mol Immunol** 46:2080-2089, 2009.
 5. [§]Jeong Y, Chaupin DF, [§]**Matsushita K**, Yamakuchi M, Cameron S, Morell CN, Lowenstein CJ: Aldosterone activates endothelial exocytosis. **Proc Natl Acad Sci USA** 106:3782-3787, 2009.
 6. Iohara K, Zheng L, Ito M, Ishizaka R, Nakamura H, Into T, **Matsushita K**, Nakashima M: Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. **Regen Med** 4:377-385, 2009.
 7. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, **Matsushita K**, Nakashima M. A Novel Stem Cell Source for Vasculogenesis in Ischemia: Subfraction of Side Population Cells from Dental Pulp. **Stem Cells** 26:2408-2418, 2008.
 8. Tancharoen S, Matsuyama T, Abeyama K, **Matsushita K**, Kawahara K, Sangalungkarn V, Tokuda M, Hashiguchi T, Maruyama I & Izumi Y: The Role of Water Channel Aquaporin 3 in the Mechanism of TNF-Mediated Proinflammatory Events: Implication in Periodontal Inflammation. **J Cell Physiol** 217:338-349, 2008.
 9. Into T, Inomata M, Nakashima M, Shibata K, Häcker H, **Matsushita K**: Regulation of MyD88-dependent signaling events by S nitrosylation retards toll-like receptor signal transduction and initiation of acute-phase immune responses. **Mol Cell Biol** 28:1338-1347, 2008.
 10. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, **Matsushita K**: Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- signaling. **Cardiovasc Res** 77:221-730, 2008.
 11. Inomata M, Into T, Ishihara Y, Nakashima M, Noguchi T, and **Matsushita K** Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. **Microbes Infect** 9: 1500-1506, 2007.
 12. Oyama T, **Matsushita K**, Sakuta T, Tokuda M, Tatsuyama S, Nagaoka S, Torii M: Roxithromycin inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced matrix metalloproteinase-1 expression through regulating mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Ets-1 expression. **J Periodontal Res** 42:53-61, 2007.
 13. Into T, Kanno Y, Dohkan JI, Nakashima M, Inomata M, Shibata KI, Lowenstein CJ, **Matsushita K**. Pathogen recognition by Toll-like receptor 2 activates Weibel-Palade body exocytosis in human aortic endothelial cells. **J Biol Chem** 282:8134-8141, 2007.
 14. Zheng L, Iohara K, Ishikawa M, Into T, Takano-Yamamoto T, **Matsushita K**, Nakashima M. Runx3 negatively regulates Osterix expression in dental pulp cells. **Biochem J** 405:69-75, 2007.
 15. Into T, Dohkan J, Inomata M, Nakashima M, Shibata K, **Matsushita K**: Synthesis and characterization of a dipalmitoylated lipopeptide derived from paralogous lipoproteins of *Mycoplasma pneumoniae*. **Infect Immun** 27:2253-2259, 2007.
- [学会発表] (計 5 2 件)
国際学会
1. Abiko Y, Sato T, **Matsushita K**, Sakashita R, Takahashi N: *Porphyromonas gingivalis* is widely distributed in subgingival plaque biofilm of elderly people. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science. Jan 15, 2009, Sendai, Miyagi.
 2. Jeong Y, Chaupin DF, **Matsushita K**, Yamakuchi M, Cameron S, Morell CN, Lowenstein CJ: Aldosterone

- activates endothelial exocytosis. The ATVB 2009 Annual Conference, April 29, 2009, Washington DC, USA.
3. Amano K, Nakashima M, Zheng L, Iohara K, Matsui H, Yamasaki M, **Matsushita K**, Nakamura H: Japanese Association for Dental Research Nov. 30, 2008. Nagoya,
 4. Inomata M, **Into T**, Ishihara Y, **Matsushita K**, Noguchi T: Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. The 94th annual meeting of the American Academy of Periodontology, September 8th, 2008, Seattle, USA,
 5. **Into T**, Inomata M, Nakashima M, Shibata K, **Matsushita K**: Nitric oxide controls Toll-like receptor signal transduction through a redox-sensitive modification of MyD88. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity Sep 4, 2007 Awaji, Japan
 6. Inomata M, **Into T**, Nakashima M, Noguchi T, **Matsushita K**: Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity Sep 4, 2007 Awaji, Japan,
 7. Nakashima M, Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Wakita H, Nabekura J, Nakamura H, **Into T**, **Matsushita K**: A Potential New Cell Source for Vasculogenesis in Ischemia, CD31⁻;CD146⁻ Side Population Cells from Dental Pulp. The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting. Dec. 4, 2007. Washington, DC, USA,
- 国内学会
1. 坂下玲子、桑原未代子、**松下健二**、佐藤拓一、安彦友希、三重幸恵、井上昌一：高齢者の様々な口腔保健行動が口腔状態に及ぼす影響。第58回日本口腔衛生学会・総会 2009年10月10日、岐阜
 2. 小松寿明、江口傑徳、杉浦進介、猪俣 恵、古市保志、**松下健二**：E-selectin の新機能：感染の制御 日本歯科保存学会 2009年度春季学術大会 2009年6月11日、札幌
 3. 位田毅彦、二ノ宮真之、額 守、**松下健二**、丸山征郎：たまねぎ外皮抽出物の調製とその抗動脈硬化・抗血栓作用 第63回日本栄養・食糧学会大会 2009年5月20日、長崎
 4. 猪俣 恵、引頭 毅、石原 裕一、**松下健二**、野口 俊英：Th2由来サイトカインはSTAT6を介して血管内皮細胞特異的な分泌顆粒の構成因子の発現量を変化させる 第52回日本歯周病学会春季学術大会 2009年5月15日、岡山
 5. 杉浦 進介、江口 傑徳、猪俣 恵、小松 寿明、野口 俊英、**松下健二**：新規炎症性サイトカインHMGB1のアセチル化制御薬による放出制御 第52回日本歯周病学会春季学術大会 2009年5月15日、岡山
 6. 安田雅晴、越川兼行、**松下健二**、額 守：イチゴ品種"濃姫"と"美濃娘"の抗血栓作用 園芸学会平成21年度春季大会 2009年3月19日、東京
 7. 杉浦進介、江口傑徳、猪俣恵、小松寿明、野口俊英、**松下健二**：ヒストンアセチル化制御薬による新規炎症性サイトカインHMGB1の放出制御 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008年12月12日、神戸、
 8. 江口傑徳、小松寿明、杉浦進介、猪俣恵、**松下健二**：可溶性セレクチンによる菌体成分排除 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008年12月12日、神戸、
 9. 猪俣恵、江口傑徳、杉浦進介、小松寿明、**松下健二**：Th1およびTh2由来サイトカインはSTATの活性化を介して Weibel-Palade Body の構成因子の発現を変化させる BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 2008年12月9日、神戸、
 10. 庵原耕一郎、杉山昌彦、中村さやか、山田陽一、上田実、**松下健二**

- 二、中村洋、中島美砂子: 乳歯由来歯髓細胞は血管新生・神経再生を促進する 第129回日本歯科保存学会 2008年11月6日、富山、
11. 杉浦進介、江口傑徳、猪俣恵、小松寿明、松下健二: エンドトキシンショック制御を目的とした HMGB1 のアセチル化・放出の制御 第14回日本エンドトキシンショック研究会、2008年10月25日、仙台、
12. 庵原耕一郎、鄭力、和気弘明、伊藤正孝、鍋倉淳一、脇田英明、中村洋、引頭毅、松下健二、中島美砂子: 高い血管新生能を有する歯髓 CD31 陰性 SP 細胞による歯髓再生 第7回日本再生医療学会総会 2008年3月13日、名古屋、
13. 庵原耕一郎、中村洋、松下健二、中島美砂子: 高い血管新生能を有する歯髓 CD31 陰性 SP 細胞を用いた歯髓再生 日本歯科保存学会 2007年度秋季大会 2007年11月8日、岡山、
14. 猪俣恵、引頭毅、中島美砂子、野口俊英、松下健二: Gingipain は protease-activated receptor の活性化を介して Weibel-Palade 小体のエキソサイトシスを誘導し、血管内皮細胞の炎症応答を増強する 第49回歯科基礎医学会学術大会 2007年8月30日、札幌、
15. 鄭力、庵原耕一郎、松下健二、中島美砂子: Runx3 は歯髓細胞において Osterix の発現を抑制する 日本歯科保存学会 2007年度春季大会 2007年6月8日、埼玉、
16. 猪俣恵、引頭毅、中島美砂子、野口俊英、松下健二: Gingipain は protease-activated receptor の活性化を介して Weibel-Palade 小体のエキソサイトシスを誘導し、血管内皮細胞の炎症応答を増強する 第50回日本歯周病学会 春季学術大会 2007年5月18日、横須賀、

[図書] (計4件)
英文著書

1. Abiko Y, Sato T, Matsushita K, Sakashita R, Takahashi N: Porphyromonas gingivalis is widely distributed in subgingival plaque biofilm of elderly subjects, Ed. Sasano

T, Suzuki O in: **Interface Oral Health Science** 2009 3:240-242, 2010.

2. Yamakuchi M, Ferlito M, Morrell CN, Matsushita K, Fletcher CA, Cao W, and Lowenstein CJ: Exocytosis of Endothelial Cells is Regulated by N-ethylmaleimide Sensitive Factor, Ed. Andrei Ivanov in: **Methods in Molecular Biology** 40:203-216, 2008.

和文図書

1. 松下健二 (分担執筆): 高齢者の口腔・歯科疾患と免疫能 高齢者の口腔機能とケア Advances in Aging and Health Research 2009, p79-87, 財団法人長寿科学振興財団, 2010.
2. 松下健二 (分担執筆): Xa 阻害剤のすべて Xa 因子の細胞生理活性, p33-38, 先端医学社, 2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/department/odr/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 健二 (MATSUSHITA KENJI)

国立長寿医療センター研究所口腔疾患研究部・部長

研究者番号: 90253898

(2) 研究分担者

引頭 毅 (INTO TAKESHI)

国立長寿医療センター研究所口腔疾患研究部・室長

研究者番号: 1036918

(3) 連携研究者

特になし