

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791615
 研究課題名（和文） カルシウム結合タンパク S100 発現制御による歯周炎予防法の開発
 研究課題名（英文） Development of preventative medicine for periodontitis by inhibiting the S100 calcium binding protein
 研究代表者
 内田 雄士（UCHIDA YUSHI）
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：40363080

研究成果の概要：

S100 ファミリーの歯周組織における発現には細胞特異性が認められた。そのレセプターである RAGE も歯肉上皮細胞では発現が認められたが、歯周靭帯由来線維芽細胞では認められなかった。歯周病原細菌（A.a）は歯肉上皮細胞の一部の S100 タンパク質の mRNA 発現を誘導した。また、S100 タンパク質は歯肉上皮細胞の IL-8 mRNA 発現を誘導した。A.a に誘導された S100 タンパク質の mRNA 発現は、マレイン酸イルソグラジンのことによって抑制された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：マレイン酸イルソグラジン、S100 タンパク質、歯肉上皮細胞、歯周靭帯由来線維芽細胞 *A.actinomycetemcomitans*

1. 研究開始当初の背景

S100 ファミリーはカルシウム結合タンパクとして 1980 年代に発見されたが、近年生体内において炎症状態の初期に S100 タンパク質の過剰な産生が確認されている。S100 ファミリーの中で、S00A8 と S100A9 は歯周炎患者の歯肉溝滲出液や唾液中で健常者と比較して多く検出されている。このことから、炎

症状の歯周組織では過剰の S100 タンパク質が産生されていることが推測される。また、防御系の胃潰瘍治療薬として市販されているマレイン酸イルソグラジンが歯肉上皮細胞に対して抗炎症作用および細胞間コミュニケーション強化作用があることを明らかにしている。

2. 研究の目的

S100 ファミリーが歯周炎の惹起に深く関与し、S100 発現の制御によって歯周炎の予防が可能になるということ、および糖尿病患者の歯周炎は、糖尿病でない患者の歯周炎と比較して悪化する傾向にあるが、この悪化に過剰に発現した S100 ファミリーが関与するのではないかということ、さらに、マレイン酸イルソグラジンが S100 タンパク質発現を制御し、歯周炎の予防に対して有効であることをたしかめるため。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織構成細胞におけるS100およびRAGE発現

① ヒト歯周組織構成細胞

歯肉上皮細胞：上皮用の培地を用い培養し、3～4代目の細胞を用いる。

歯周靭帯由来線維芽細胞：10%DMEM培地で培養し、6～8代目の細胞を用いる。

② 歯周病原性細菌による刺激

: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a)

③ S100およびRAGE発現

S100ファミリー (S100-B, -P, -A1, -A3, -A7, -A8, -A9, -A12 と -A13) の発現：コンベンションPCR法

RAGEの発現 タンパク質レベル：ウエスタンブロット法

(2) マレイン酸イルソグラジンがS100発現とS100の機能に及ぼす効果

S100発現に及ぼす効果

マレイン酸イルソグラジンをA.a刺激下歯肉上皮細胞に作用させる。

S100ファミリー (S100-B, -P, -A1, -A3, -A7, -A8, -A9, -A12 と -A13) の発現：コンベンションPCR法

(3) 実験的歯周炎マウス：

マウスの歯牙にA.aを塗布し歯周炎実験モデルを作成する。

(4) マレイン酸イルソグラジンの影響

① A.aをマウスの歯肉に塗布する1時間前にマレイン酸イルソグラジンを腹腔内に投与し、3時間後の歯肉の状態を調べる。

HE染色とS100タンパク質の抗体を用い免疫染色を行う。

4. 研究成果

(1) 培養歯肉上皮細胞および培養歯肉線維芽細胞の無刺激対する S100 タンパク質の mRNA 発現および A.a 刺激に対する mRNA 発言誘導は、以下に示すとおりである。

①歯肉上皮細胞

S100	無刺激	A.a
A1	+	→
A3	+	→
A7	+	↑
A8	+	→
A9	+	→
A12	+	→
A13	+	→
B	-	-
P	+	↑

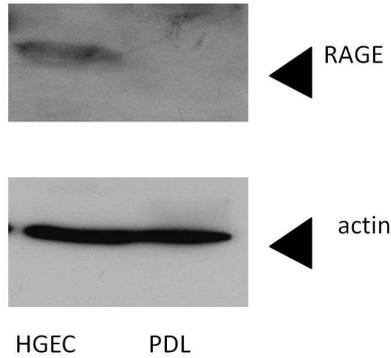
②歯周靭帯細胞

S100	無刺激	A.a
A1	+	↑
A3	+	→
A7	-	-
A8	+	↓
A9	-	↑
A12	-	-
A13	+	→
B	-	-
P	+	→

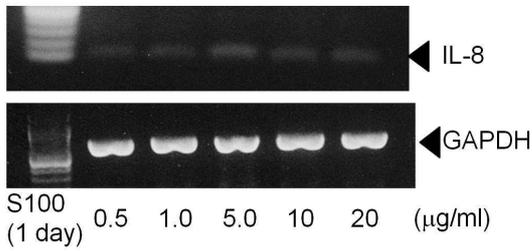
+: 発現あり、-: 発現なし、→: 変化なし

↑: 誘導、↓: 抑制

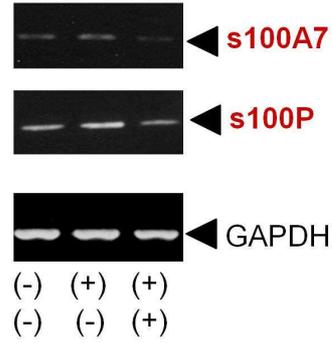
(2) S100 タンパク質のレセプターである Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)の発現が歯肉上皮細胞では確認できたが、歯根膜由来線維芽細胞ではできなかった。



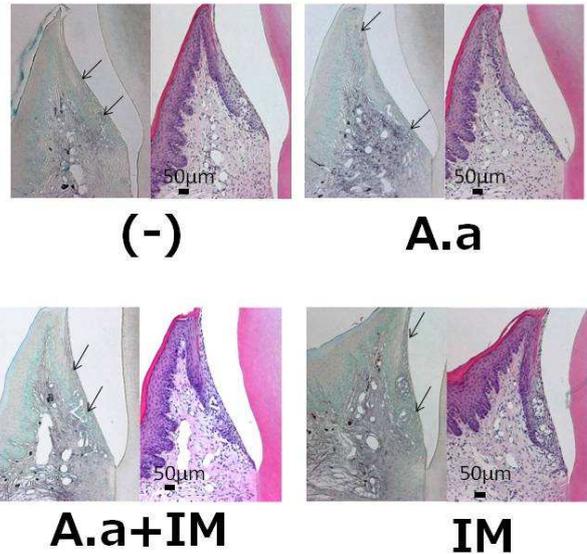
(3) S100 タンパク質が歯周組織由来細胞の炎症性サイトカイン産生へ及ぼす影響では、S100 タンパク質を歯肉上皮細胞に作用させると IL-8 mRNA の発現が誘導された。



(4) IM は HGEC において A.a.刺激で誘導される S100 タンパク質 mRNA 発現を抑制した。



(5) 健常ラットおよび歯周炎モデルを用いた S100 タンパク質産生の比較では、歯周病モデルラットでは S100 タンパク質の発現が健常ラットと比較して増加していた。また、その誘導は IM を投与（腹腔内に）することによって抑制された。



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 1 件)

① Omori K, Ohira T, Uchida Y, 他 8 名
Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase.

J Leukoc Biol. 査読有り、84(1)、2008 年
292-301

[学会発表] (計 1 件)

① 内田雄士

Irsogladine maleate inhibits S100 protein expression in gingival epithelial cells
The International Association for Dental Research

平成 20 年 7 月 3 日 トロント(カナダ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 雄士 (UCHIDA YUSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40363080

(2)研究分担者

(3)連携研究者