

機関番号：31201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592428
 研究課題名（和文） MMP-3 を標的とした糖尿病患者における歯周病悪化メカニズムの分子生物学的解明
 研究課題名（英文） Possible Mechanisms of Progression of Periodontitis by MMP-3 in Diabetic Patients
 研究代表者
 成石 浩司（NARUISHI KOJI）
 岩手医科大学・歯学部・准教授
 研究者番号：00346446

研究成果の概要（和文）：糖尿病患者の歯周病が重篤化することが知られる。本研究において、高血糖状態で培養した歯肉線維芽細胞の MMP-3 産生量は有意に増加した。しかし、sIL-6R の産生性は著明に亢進しなかった。さらに THP-1 細胞において、MMP-3 阻害剤の添加によって sIL-6R の産生量が有意に抑制された。以上の事から、MMP-3 産生の亢進が糖尿病患者における歯周病悪化を誘導する可能性が示唆された。さらに MMP-3 が THP-1 細胞の sIL-6R 産生性を亢進させることを考え合わせて、糖尿病患者における歯周病の悪化メカニズムには、歯肉線維芽細胞とマクロファージの相互作用に IL-6 シグナル伝達系が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Diabetic patients are susceptible to severe inflammatory periodontitis. In the present study, we found that high glucose increased MMP-3, but not sIL-6R production in gingival fibroblasts. In addition, sIL-6R production was suppressed by MMP-3 inhibitor in THP-1 macrophages. These results suggest that MMP-3 has a key role in developing severe periodontitis in diabetic patients. Furthermore, it has been considered that IL-6 signals are very important factor surrounding gingival fibroblasts/macrophage interaction in severe periodontitis seen in diabetic patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	320,000	1,560,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,010,000	4,510,000

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：糖尿病, MMP-3, 歯周病悪化

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は眼、腎臓、そして血管・神経などの多臓器に合併症を発症することが知られている。昨今、医学領域では高血糖による各臓

器由来細胞の反応（網膜細胞における血管内皮増殖因子 VEGF の発現誘導など）に関する研究が進んでおり、合併症発症のメカニズムが明らかにされつつある。一方、糖尿病患者

の歯周病が増悪傾向を示すことは経験的に知られているものの、そのメカニズムは不明である。糖尿病の多彩な病態を考慮すると、従来、我々が知り得なかった不特定の因子によって歯周病が悪化する可能性がある。そこで、我々はこれらの因子を特定するため、遺伝子マイクロアレイ解析法を用いて、歯周組織の主な構築細胞である歯肉線維芽細胞において高血糖によって変動する遺伝子群を網羅的に解析する手段が有効であるという発想をもち研究を進め、以下の興味ある知見を得た（成石らの報告：Omori *et al*, *J Biol Chem*, 2004 に基づく培養実験系による）。すなわち標的遺伝子の mRNA 発現量は、Human Genome U133A Array (Affymetrix: 14,400 遺伝子) を用いて調べ、データを GeneChip Expression Analysis Software (Affymetrix) および GeneSpring Software (Silicone Genetics) を用いて解析した。高血糖状態における歯肉線維芽細胞において発現量が増加あるいは減少した遺伝子群の中で、その変化の程度が大きい遺伝子から、それぞれ 250 遺伝子ずつ計 500 遺伝子を解析したところ、比較的、代謝酵素や転写制御に関わる分子が多いという結果を得たところ、とりわけ蛋白分解酵素に関わる分子の動態に着目した。この研究成果は、高血糖状態によって歯肉線維芽細胞の MMP-3 遺伝子発現が著明に亢進する可能性が示唆されるものだった。重要なことに、MMP-3 の特異的インヒビターである TIMP-3 の遺伝子発現は、高血糖によって左右されないという結果も得たので、高血糖下の MMP-3 は、より一層強力な効果を発揮し得る環境にあると示唆される。以上の結果から、我々は、糖尿病患者に見られる歯周病悪化の病態形成に、高血糖による歯肉線維芽細胞の MMP-3 遺伝子の発現亢進が重要な役割を果たすという着想を得た。そこで我々は、高血糖

によって線維芽細胞の MMP-3 産生が亢進するので、糖尿病患者の歯周組織には炎症の有無に関わらず、潜在的に MMP-3 が存在するというコンセプトをベースに、MMP-3 を中心とした糖尿病患者の歯周病病態の悪化メカニズムの仮説を立てた。MMP-3 は、III 型コラーゲン（軟骨組織の主なコラーゲン線維）の分解酵素として知られているが、もう一つの重要な役割として前駆体 MMP-1 を活性型 MMP-1 にコンバートする作用をもつ。歯周組織は I 型コラーゲンが主な構築線維なので、高血糖状態で想定される MMP-3 の潜在的な増加は、炎症性サイトカイン IL-1 や IL-6 などによって誘導される前駆体 MMP-1 の産生亢進を介して、結果的に歯周炎症組織の活性型 MMP-1 の増加を誘導すると考えられる。このことは、高血糖のみ、すなわち、MMP-3 の作用のみでは著明な歯周組織の破壊を引き起こさないものの、歯周病菌の感染によって炎症性サイトカインネットワークが形成されることで、急速に歯周病が進行するという病態形成の可能性を説明し得る。

すなわち、糖尿病患者における潜在的な MMP-3 の増加が、歯周病悪化のリスク因子になり得ると想定した上で、本研究が立案された。

2. 研究の目的

糖尿病患者において、しばしば歯周病が重篤化する傾向があることが臨床的に知られている。この歯周病の悪化は、従来、我々が知り得なかった不特定の因子が原因となる可能性がある。これらの因子を把握するために、我々は歯周組織の主細胞である歯肉線維芽細胞において、高血糖によって変動する遺伝子群を遺伝子マイクロアレイ法によって網羅的に解析した結果、MMP-3 の産生性が亢進することを見出した。そこで、高血糖による

歯肉線維芽細胞の作用をさらに検討することとした。すなわち、IL-6 は様々な細胞に作用して、歯周病の病態形成に関与する炎症性サイトカインである。IL-6 が標的細胞の膜型 IL-6 受容体 (IL-6R) と結合した後、そのシグナル伝達分子 gp130 の下流域の細胞内シグナル伝達系が活性化する (IL-6 classical-signaling)。一方、可溶型 IL-6R は IL-6 シグナルのアゴニスト作用を有することが知られ、細胞外領域において IL-6 と二量体を形成した後 gp130 と結合する (IL-6 trans-signaling)。すなわち、可溶型 IL-6R は IL-6 によって惹起される様々な炎症反応を増強する。したがって歯周炎組織における可溶型 IL-6R の産生を制御できれば、歯周炎症制御の新たな治療戦略の確立に繋がる可能性がある。MMP-3 は、MMP-1 を前駆型から活性型に変換する作用を持つプロテアーゼとして、歯周病悪化の一翼を担うことが知られている。しかしながら、MMP-3 が炎症性細胞の膜型 IL-6R のシェディングを誘導して、可溶型 IL-6R の産生を促進するかどうかは不明である。

3. 研究の方法

細胞はヒトの歯肉から分離した歯肉線維芽細胞およびヒト単球系細胞株 THP-1 を用いた。培地中のグルコース濃度は、25 mM (高血糖) あるいは 5.5 mM (健常血糖) に設定した。なお、5.5 mM グルコース含有 DMEM に 19.5 mM マンニトールを加えた実験系を高血糖状態の浸透圧対照として用いた。細胞の MMP-3 産生および sIL-6R 産生量は、市販の ELISA キット (R&D) を用いて定量した。一方、可溶型 IL-6R の産生機序を調べるために、MMP-3 のシェディング機能に着目し、ヒト単球系細胞株 THP-1 による可溶型 IL-6R の産生性を検討した。

4. 研究成果

高血糖状態で培養した歯肉線維芽細胞の MMP-3 産生量は、その遺伝子マイクロアレイ解析の結果に相応して有意に増加した (Student' s *t*-test, $P < 0.05$)。しかし、sIL-6R の産生性に著明な亢進は見られなかった。さらに、マクロファージ様 THP-1 細胞において、膜型 IL-6R および可溶型 IL-6R は遺伝子レベルで発現すること、MMP-3 阻害剤 (100 nM) の添加によって、可溶型 IL-6R の産生量が有意に抑制されることを見出した。高血糖によって歯肉線維芽細胞の複数の遺伝子発現の様態が変動し、とりわけ MMP-3 の発現が亢進したことは、MMP-3 産生の亢進が糖尿病患者に見られる歯周病悪化を誘導する可能性が示唆される。さらに MMP-3 がマクロファージ様 THP-1 細胞からの sIL-6R 産生性を亢進させることが分かったので、これらを考え合わせると、糖尿病患者における歯周病の悪化メカニズムにおいて、歯肉線維芽細胞とマクロファージは相互に IL-6 シグナル伝達系を介して作用することが示唆された。

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 2 件)

1. Osamu Murai, Koji Naruishi, Satoshi Ogihara, Nagisa Suwa, Satomi Kanazawa, Takashi Yaegashi, Yasunori Takeda, Kazushi Kunimatsu. Cathepsin B, D, and L Regulation in Cyclosporin A-mediated Gingival Hyperplasia of a Patient with Sarcoidosis. Clin. Lab. (2011) *in Press*
2. 村井治, 成石浩司, 佐々木大輔, 大川義人, 八重柏隆, 國松和司: 医科歯科連携医療における歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価検査の導入 日本口腔検査学会雑誌, 第 3 巻 1 号, 36-41, 2011.

[学会発表] (計 17 件)

1. Tomoko Yamaguchi, Koji Naruishi, Kazuhiro Omori, Hiroshi Maeda, Shogo Takashiba. Inhibition of IL-6/sIL-6R-induced VEGF production by sgp130 in gingival fibroblasts. 88th International Association for Dental Research, General Session & Exhibition, 2010, Barcelona, Spain.
2. Shogo Takashiba, Chieko Kudo, Koji Naruishi, Hiroshi Maeda. Evaluation of Periodontitis by a Blood Test. 88th International Association for Dental Research, General Session & Exhibition, 2010, Barcelona, Spain.
3. 成石浩司: 「歯周組織への感染とそれに対する免疫応答の特異性とは？」歯周病態における体液性免疫応答の成立と意義—IgG抗体産生性に着目して— 第 53 回日本歯周病学会春期学術大会, 5 月, 盛岡(2010), シンポジウム
4. 成石浩司, 園井教裕, 大森一弘, 前田博史, 高柴正悟, 國松和司: 歯周病原細菌の感染による全身性炎症性反応に抗する免疫応答の意義 第 133 回日本歯科保存学会秋期学術大会, 10 月, 岐阜, (2010)
5. 藤原英明, 成石浩司, 澤田俊輔, 伊東俊太郎, 八重柏隆, 國松和司: IL-6 によるヒト歯髓細胞の VEGF 産生誘導 第 133 回日本歯科保存学会秋期学術大会, 10 月, 岐阜, (2010)
6. 安田多賀子, 成石浩司, 犬伏順也, 畑中加珠, 前田博史, 高柴正悟: 塗布用ブラシ一体型一般用歯周病薬が SPT 期患者の歯肉溝滲出液中サイトカイン量に与える影響 第 53 回日本歯周病学会秋期学術大会, 9 月, 高松, (2010)
7. 園井教裕, 前田博史, 成石浩司, 苔口進, 大森一弘, 石井真由美, 平井公人, 山部こころ, 谷本一郎, 高柴正悟: nrdD 様遺伝子の存在は血中移行した Porphyromonas gingivalis の病原性を決定する 第 53 回日本歯周病学会秋期学術大会, 9 月, 高松, (2010)
8. 工藤値英子, 成石浩司, 三橋千代子, 米田哲, 永田俊彦, 佐藤勉, 前田博, 高柴正悟: 企業内定期健康診断における歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価検査を用いた歯周病スクリーニング効果の統計学的検討 第 132 回日本歯科保存学会春期学術大会, 6 月, 熊本, (2010)
9. 小林寛也, 大森一弘, 成石浩司, 山口知子, 富山高史, 久保克行, 前田博史, 高柴正悟: MMP-3 によるヒト単球系細胞株 THP-1 からの可溶性 IL-6 受容体の産生亢進 第 132 回日本歯科保存学会春期学術大会, 6 月, 熊本, (2010)
10. 畑中加珠, 成石浩司, 前田博史, 高柴正悟, 犬伏順也, 安田多賀子, 西田美恵子: SPT 期における歯周組織の維持・改善に対する塗布用ブラシ一体型歯周病薬の効果 第 53 回日本歯周病学会春期学術大会, 5 月, 盛岡, (2010)
11. 犬伏順也, 安田多賀子, 西田美恵子, 畑中加珠, 成石浩司, 前田博史, 高柴正悟: 塗布用ブラシ一体型歯周病薬によるプラークコントロールが SPT 期の歯周組織の病状安定に与える影響 第 53 回日本歯周病学会春期学術大会, 5 月, 盛岡, (2010)
12. 久保克行, 大森一弘, 成石浩司, 富山高史, 小林寛也, 山口知子, 前田博史, 高柴正悟: IL-1ra によるマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 における IL-1 誘導性 OPG および IL-6 の産生制御 第 53 回日本歯周病学会春期学術大会, 5 月, 盛岡, (2010)

13. 成石浩司：歯周疾患を標的とした臨床研究と細胞生物学的アプローチ 第 70 回岩手医科大学歯学会例会，7 月，盛岡（2010），特別講演
14. 成石浩司：「間葉系幹細胞による歯髄・歯周再生医療の現状と展望～免疫と組織再生の観点から～」歯周組織におけるサイトカインネットワークと再生への展開 岩手医科大学歯学部オープンリサーチ・プロジェクト 研究成果発表会，8 月，盛岡（2010），シンポジウム
15. 澤田俊輔，成石浩司：高血糖状態で培養したヒト歯肉線維芽細胞の網羅的な遺伝子解析 岩手医科大学歯学会第 72 回例会，2 月，盛岡（2011）
16. Koji Naruishi. Perspective Basic and Clinical Research for Periodontal Diseases. Association for Dental Sciences of the Republic of China, 2009, Kaohsiung.
17. 山口知子，成石浩司，大森一弘，新井英雄，高柴正悟 歯肉線維芽細胞を標的としたカベオリン-1 および可溶性 gp130 による IL-6 誘導性 VEGF 産生の抑制制御，第 130 回日本歯科保存学会春期学術大会，札幌（2009）

[図書] (計 0 件)

[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

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成石 浩司(NARUISHI KOJI)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：00346446

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

畑中 加珠(HATANAKA KAZU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：50362992

高柴 正悟(TAKASHIBA SYOUGO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50226768

峯柴 淳二(MINESHIBA JUNJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00509383

大森 一弘(OMORI KAZUHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20549860