

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2012 年度

課題番号：21592637

研究課題名（和文） 歯周炎分子標的治療薬のスクリーニングに有効な三次元培養モデルの作成

研究課題名（英文） Establishment of an effective three dimensional culture model for screening of molecular targeted drug for periodontitis

研究代表者

大島 光宏（OHSHIMA MITSUHIRO）

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：30194145

研究成果の概要（和文）：初代培養歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞を組み合わせ、コラーゲンゲル三次元培養法による「生体外歯周炎モデル」を確立した。このモデルをトランスクリプトーム解析することにより、歯周炎原因候補遺伝子をリストアップすることができた。さらに、歯周炎原因候補遺伝子産物のうちのひとつである FLT-1 の活性を、低分子キナーゼ阻害薬で抑制することによりコラーゲン分解が阻害できたことから、この阻害薬が歯周炎分子標的治療薬となり得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：“In vitro periodontitis model” using collagen gel three-dimensional culture was established combining primary cultured gingival epithelial cells and gingival fibroblasts. Transcriptome analyses revealed several candidate genes for periodontitis. Furthermore, inhibition of activity of FLT-1, one of the products of candidate genes for periodontitis, using small molecule kinase inhibitor successfully controlled collagen gel degradation, suggested a possibility to use this kinase inhibitor as a molecular-targeted drug for periodontitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：歯周免疫機能学

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病はギネスブック収載の、世界で最も罹患者の多い病気である。歯周病は歯を磨けば治る歯肉炎と最終的に歯が抜け落ちる歯周炎に分けられ、問題となるのは歯周炎（歯槽膿漏）である。

ところが、歯周炎の治療法は決め手を欠いており、その理由は原因が未だ不明であることにある。社会通念上、歯周炎は細菌が原因と言われてきたが、細菌だけでは説明できない病態であると考えた。

私たちは、重度歯周炎罹患歯肉から、上皮細胞と組み合わせると極度に

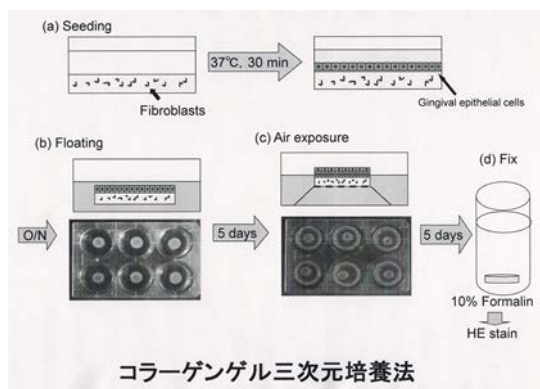
コラーゲンを分解するアグレッシブ線維芽細胞を分離し、「生体外歯周炎モデル」を確立した。歯と歯を支える歯槽骨の結合はコラーゲンでできていることから、コラーゲンを極度に分解するアグレッシブ線維芽細胞こそが、歯周炎の原因ではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

私たちは歯周炎と癌との類似性、すなわちどちらの疾患も過剰な上皮の増殖や結合組織内への浸潤が起こることに着目し、これらの現象を支える結合組織、なかでも線維芽細胞の表現形質の変化を様々な手法を用いて解析を試みてきた。その結果、三次元培養法でコラーゲンを顕著に分解する“アグレッシブ線維芽細胞”を分離でき、「生体外歯周炎モデル」確立した。またこの“アグレッシブ線維芽細胞”は、三次元培養法で口腔癌細胞の浸潤を顕著に促進することを明らかにした。すなわち、歯周炎と口腔癌では、同じ表現型をもつ線維芽細胞が関与する可能性が示唆された。本研究では、歯周炎と口腔癌の病態形成と進展に関与する線維芽細胞を中心として、上皮-間葉の相互作用に関して解析を加えることにより原因候補遺伝子を明らかにし、分子標的治療薬の候補をスクリーニングすることであった。

## 3. 研究の方法

歯周炎罹患歯肉から線維芽細胞を分離し、また歯肉上皮細胞の初代培養を行った。コラーゲングルに線維芽細胞を埋入培養し、その上に歯肉上皮細胞を播種して、三次元培養を開始した。この系に治療薬の候補を加え、一定日数経過後に残存コラーゲン量を測定してコラーゲン分解阻害程度を評価した。

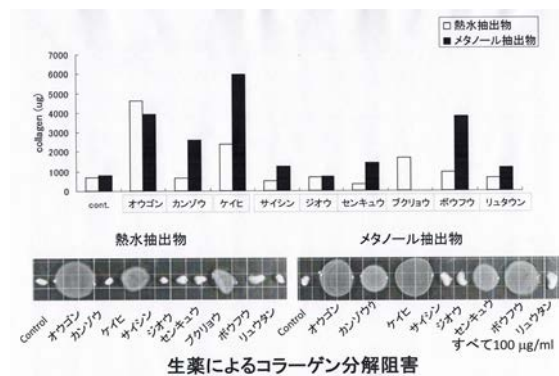


また、極度のコラーゲン分解が起こっているゲルから RNA を抽出して、cDNA マイクロアレイ解析し、続けて Real-time qPCR を行って定量的に解析し、歯周炎原因候補遺伝子のリストアップも試みた。並行して、三次元培養癌細胞浸潤モデルも行い、口腔癌細胞の浸潤を抑制する治療薬の候

補もスクリーニングした。

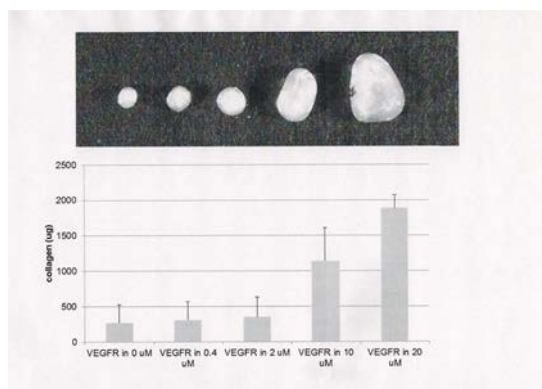
## 4. 研究成果

すべての成人性歯周炎ならびに侵襲性歯周炎罹患歯肉から、アグレッシブ線維芽細胞を分離することができた。「生体外歯周炎モデル」において極度のコラーゲン分解を示した場合、上皮細胞ではなく、線維芽細胞依存性であったことから、コラーゲン分解はアグレッシブ線維芽細胞が初代培養した歯肉上皮細胞との相互作用によることが判明した。次いで「生体外歯周炎モデル」を用いて、治療薬候補のスクリーニングを行ったところ、TGF- $\beta$  I 型受容体キナーゼ阻害薬が最初の分子標的治療薬候補として上がった。しかし、TGF- $\beta$  は、ほとんどすべての細胞で発現し、ほとんどすべての細胞に受容体があるため、強力な副作用が懸念された。このため、使用歴が長く、安全性がある程度知られている生薬を試すことにした。有効成分の熱水抽出およびメタノール抽出による、述べ 60 種類の生薬を試したところ、オウゴン、ブクリョウ、ケイヒなど、23 種類の生薬にコラーゲン分解阻害効果が見られた。



歯周炎原因候補遺伝子探索のため、コラーゲン分解が進行している「生体外歯周炎モデル」のゲルから RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、歯周炎原因候補遺伝子が 22 種類リストアップできた。このうち、線維芽細胞で高発現している遺伝子を Real-time qPCR を行って定量的に解析したところ、11 遺伝子がリストアップできた。これらのうち、コラーゲン分解の進行に伴って発現が上昇する遺伝子に、FLT-1 があった。低分子 FLT-1 (VEGFR1) キナーゼ阻害剤によって、コラーゲン分解が抑制されるかどうかを試したところ、濃度依存的に抑制されることが判明した。さらに確認のため、レンチウイルスベクターにより、アグレッシブ線維芽細胞に FLT-1 miRNA を transfect して RNAi 実験を行った。この実験系においても、コラーゲン分解阻害が確認できたことから、FLT-1 が歯周炎原因候補遺伝子のひとつである可能性が高くなった。また、低分子 VEGFR1

キナーゼ阻害剤によりコラーゲン分解が抑制されたことから(血管新生はおもに VEGFR2 経路のシグナルによるため、副作用が少ないと予想される)、この低分子阻害薬が分子標的治療薬の候補となる可能性が見出された。



Dose dependency of VEGFR kinase inhibitor

また、ある種の生薬は、アグレッシブ線維芽細胞を用いた三次元培養癌細胞浸潤モデルにおいて、癌細胞の浸潤を顕著に阻害することが判明した。この実験系においても cDNA マイクロアレイ解析を行っているが、データ量が膨大であるため、引き続き解析を継続している。

以上の成果を元に、歯周炎分子標的治療薬の開発や、癌細胞浸潤阻害剤の開発など、将来の臨床応用を目指した研究を継続していきたい。

#### 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 6 件)

- ① 大島光宏、山口洋子：歯周炎薬物治療のパラダイムシフト(総説)．査読有、日薬理誌 141、314-320、2013
- ② Kenichiro Ejiri, Akira Aoki, Yoko Yamaguchi, Mitsuhiro Ohshima, Yuichi Izumi: High-frequency low-level diode laser irradiation promotes proliferation and migration of primary cultured human gingival epithelial cells. 査読有、Lasers Med Sci 2013, 印刷中
- ③ Akira Saito, Hiroshi I Iizuka, Masafumi Horie, Mitsuhiro Ohshima, Yasuyuki Morishita, Yoshimitsu Abiko, Takahide Nagase: An integrated expression profiling reveals target genes of TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. 査読有、PLoS ONE 8, e56587, 2013 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.104.
- ④ Masafumi Horie, Akira Saito, Mitsuhiro

Ohshima, Yasuyuki Morishita, Jun Nakajima, Tadashi Kohyama, Takahide Nagase: Characterization of human lung cancer-associated fibroblasts in three dimensional in vitro co-culture model. 査読有、Biochem Biophys Res Commun 423, 158-163, 2012

doi: 10.1371/journal.pone.0056587.

- ⑤ Takenouchi Y, Ohshima M, Yamaguchi Y, Nishida T, Senda N, Idesawa M, Otsuka K, Ito K: Insulin-like growth factor-binding protein-2 and -3 in gingival crevicular fluid. 査読有、J Periodontal Res 45, 803-808, 2010 doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01309.x.
  - ⑥ M. Ohshima, Y. Yamaguchi, M. Matsumoto, P. Micke, T. Takenouchi, N. Nishida, M. Kato, K. Komiyama, Y. Abiko, K. Ito, K. Otsuka, K. Kappert: TGF- $\beta$  signaling in gingival fibroblast-epithelial interaction. 査読有、J Dent Res 89, 1315-1321, 2010 doi: 10.1177/0022034510378423.
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Kenichiro Ejiri, Akira Aoki, Yoko Yamaguchi, Mitsuhiro Ohshima, Yuichi Izumi: Super-pulsed low-level diode Laser stimulates cultured human gingival epithelial cells. 91<sup>st</sup> IADR, 2013年3月、Seattle, USA
  - ② 江尻健一郎、青木 章、山口洋子、大島光宏、和泉雄一：低出力半導体レーザー照射が初代培養ヒト歯肉上皮細胞に及ぼす効果、第 24 回日本レーザー歯学会総会・学術大会、2012年12月、神戸
  - ③ 大島光宏、山口洋子、安孫子宜光：FLT-1 は歯周炎治療の標的分子となり得るか、第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012年9月、郡山
  - ④ 大島光宏、山口洋子、張 月琳、佐久間淳、2012年度日本機能学会年次大会、2012年9月、金沢
  - ⑤ 江尻健一郎、青木 章、山口洋子、大島光宏、和泉雄一：低出力半導体レーザー照射が培養ヒト歯肉上皮細胞に及ぼす効果、第 136 回日本歯科保存学会春季学術大会、2012年6月、沖縄
  - ⑥ 大島光宏、山口洋子、石井輝彦、大木秀郎：受容体チロシンキナーゼ阻害剤による非外科的顎嚢胞治療法の開発、第 83 回日本生化学会大会、2011年9月、京都
  - ⑦ Mitsuhiro Ohshima, Yoko Yamaguchi, Yoshimitsu Abiko: FLT-1 represents a potential therapeutic target in human periodontitis. GRC in Periodontal

Diseases, 2011年7月, Davidson College, Davidson, NC, USA

- ⑧ 山口洋子、鳥居塚和生、大島光宏：生体外歯周炎モデルによる生薬のスクリーニング、第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月、神戸
- ⑨ 山口洋子、鳥居塚和生、大島光宏：生薬による生体外歯周炎モデルのコラーゲン分解阻害、第49回日本薬学会東北支部大会、2010年10月、郡山
- ⑩ 山口洋子、大島光宏：三次元培養法を用いた新規歯周炎治療薬のスクリーニング、第42回日本結合組織学会・第57回マトリックス研究会合同学術集会、2010年8月、秋田
- ⑪ Ohshima M, Yamaguchi Y, Abiko Y, A novel drug screening system for periodontitis using 3D culture. GRC in Periodontal Diseases, 2010年8月, Colby-Sawyer College, New London, NH, USA,

[産業財産権]

○出願状況 (計7件)

名称：歯周炎治療薬  
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 2012-086327  
出願年月日：2012年4月5日  
国内外の別：国内

名称：口腔癌細胞浸潤阻害剤  
発明者：山口洋子、大島光宏、鳥居塚和生  
権利者：日本大学、昭和大学  
種類：特許  
番号：特願 2011-220423  
出願年月日：2011年10月4日  
国内外の別：国内

名称：顎嚢胞治療剤  
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 2010-152872  
出願年月日：2010年7月5日  
国内外の別：国内

名称：コラーゲン分解阻害剤  
発明者：大島光宏、山口洋子、鳥居塚和生  
権利者：日本大学、昭和大学  
種類：特許  
番号：特願 2010-132206  
出願年月日：2010年6月9日  
国内外の別：国内

名称：歯周炎治療薬  
発明者：大島光宏、山口洋子  
権利者：日本大学  
種類：特許  
番号：特願 2010-024339  
出願年月日：2010年2月5日  
国内外の別：国内

名称：歯肉上皮細胞の培養方法  
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 2009-231339  
出願年月日：2009年10月5日  
国内外の別：国内

名称：生体外創傷治療試験用器具または創傷作製方法  
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 2009-212903  
出願年月日：2009年9月15日  
国内外の別：国内

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.ohu-u.ac.jp/newinfo/2010/20100924.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島 光宏 (OHSHIMA MITSUHIRO)  
奥羽大学・薬学部・教授  
研究者番号：30194145

### (2) 研究分担者

山口 洋子 (YAMAGUCHI YOKO)  
日本大学・歯学部・助手  
研究者番号：00239922

### (3) 連携研究者

安孫子 宜光 (ABIKO YOSHIMITSU)  
日本大学・松戸歯学部・教授  
研究者番号：70050086

加藤 光保 (KATO MITSUYASU)  
筑波大学・人間総合科学研究科・教授  
研究者番号：70050086