

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21058

研究課題名（和文）エラスターゼを標的とした歯周炎重症化機序の探索とその分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Exploration of the Mechanisms Underlying the Exacerbation of Periodontitis Targeting Elastase

研究代表者

日吉 巧 (Hiyoshi, Takumi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80911437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：歯周炎は、好中球の過剰な集積を特徴とする炎症性疾患である。好中球に内在するプロテアーゼであるエラスターゼは、歯周炎の重症化に働く可能性が長年報告されてきたが、その詳細なメカニズムは未だ不明なままであった。本研究では、エラスターゼがヒト細胞接着分子を分解することで、歯肉上皮のバリア機能を傷害し、歯周炎を重症化することを明らかにした。さらに、エラスターゼ阻害剤を投与した歯周炎モデルマウスでは、歯槽骨の吸収が抑制されたことから、エラスターゼ阻害剤が新規歯周炎治療薬となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで不明であったエラスターゼによる歯周炎重症化機序を明らかにした点において学術的意義が高い。また、歯周組織中のエラスターゼを阻害することが歯周炎の重症化を抑制することも示唆された。近年薬剤耐性菌の進行が世界的な問題となっているが、エラスターゼ阻害剤を用いた歯周炎治療へのアプローチは、薬剤耐性菌を生じない新規歯周炎治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Periodontitis is an inflammatory disease characterized by an excessive accumulation of neutrophils. Elastase, a protease intrinsic to neutrophils, has been reported to contribute to the exacerbation of periodontitis, but the detailed mechanism has remained unclear. In this study, we demonstrated that elastase damages the barrier function of the gingival epithelium by degrading human cell adhesion molecules, exacerbating periodontitis. Furthermore, in the mouse model of periodontitis treated with an elastase inhibitor, alveolar bone loss was suppressed, suggesting the potential of the elastase inhibitor as a novel periodontitis therapeutic.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯周炎 好中球 エラスターゼ エラスターゼ阻害剤 歯肉上皮バリア

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、好中球の過剰な集積を特徴とする炎症性疾患である。好中球は歯周ポケットに遊走する白血球の95%以上を占め、感染防御に重要な役割を果たす。一方で、好中球の過剰集積により、細胞に内在するタンパク質分解酵素であるエラスターゼが組織破壊を引き起こす可能性が報告されている。申請者らにおいても、歯周炎と同じく炎症性疾患である肺炎において、エラスターゼが宿主生体分子を分解することで、疾患の重症化を誘導することを明らかにしている (Domon H., et al., *Front. Immunol.*, 2018)。歯周病原細菌由来毒素や好中球細胞外トラップ形成等により、細胞内に局在するエラスターゼは細胞外に漏出するが、通常、漏出したエラスターゼは、血漿中のプロテアーゼ阻害成分によって制御される。一方、歯周炎患者においては、過剰な炎症反応により制御範囲を超えた歯肉溝浸出液中のエラスターゼ活性の上昇が認められ、歯周炎の進行、重症化に関連する。実際に、長年にわたり、エラスターゼと歯周炎の重症化との関係が臨床的に報告されてきたが、その病態形成におけるエラスターゼの動態および組織破壊への作用機序は明らかにされていない。

2. 研究の目的

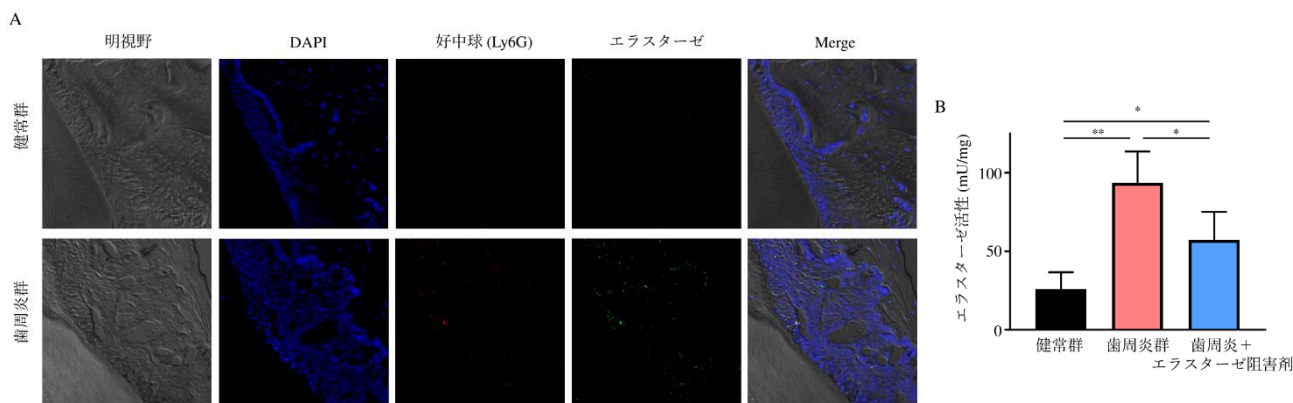
本申請研究では、「歯周炎の病態形成におけるエラスターゼの作用機序」を明らかにすることを第一の目的と定めた。また、これまでにない歯周炎治療法の確立を念頭に置き、「エラスターゼの阻害による歯周治療の可能性」を探索することを第二の目標とした。

3. 研究の方法

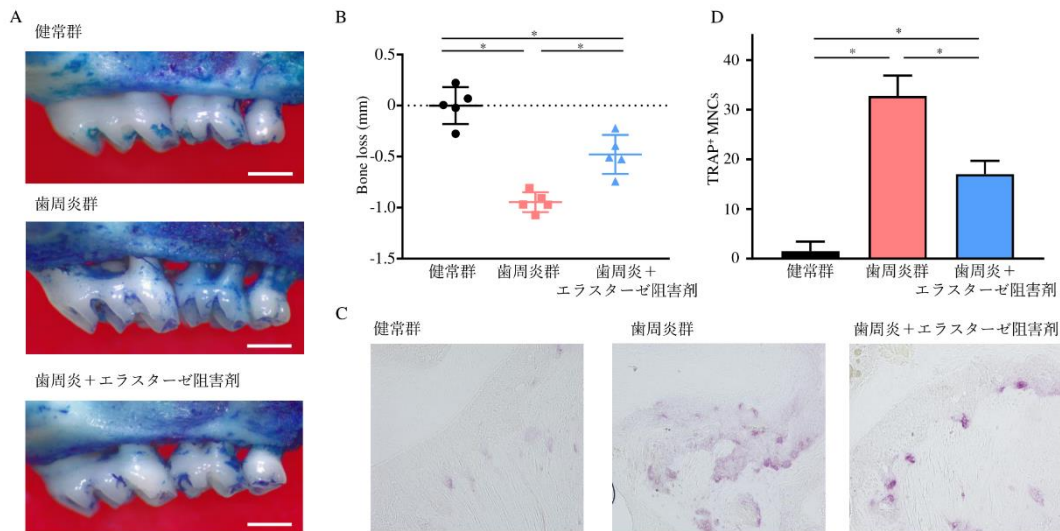
8週齢 Balb/c マウスの上顎第二臼歯に絹糸を結紮し、歯周炎を誘導した(歯周炎モデルマウス)。結紮後8日目に歯周組織を採取し、好中球およびエラスターゼの局在を蛍光免疫染色法にて解析した。また、同モデルマウスにエラスターゼ阻害剤を局所投与し、歯肉中のエラスターゼ活性を試験した。合わせて、同マウスの歯槽骨周囲破骨細胞数および歯槽骨吸収量を測定した。次に、三次元ヒト歯肉上皮モデルを用いて、エラスターゼが歯周組織および歯肉上皮バリアに及ぼす影響を、組織切片および細胞透過試験にて解析した。また、ヒト細胞接着分子に対するエラスターゼの分解作用を、免疫染色法およびタンパク質ゲル染色法にて解析した。

4. 研究成果

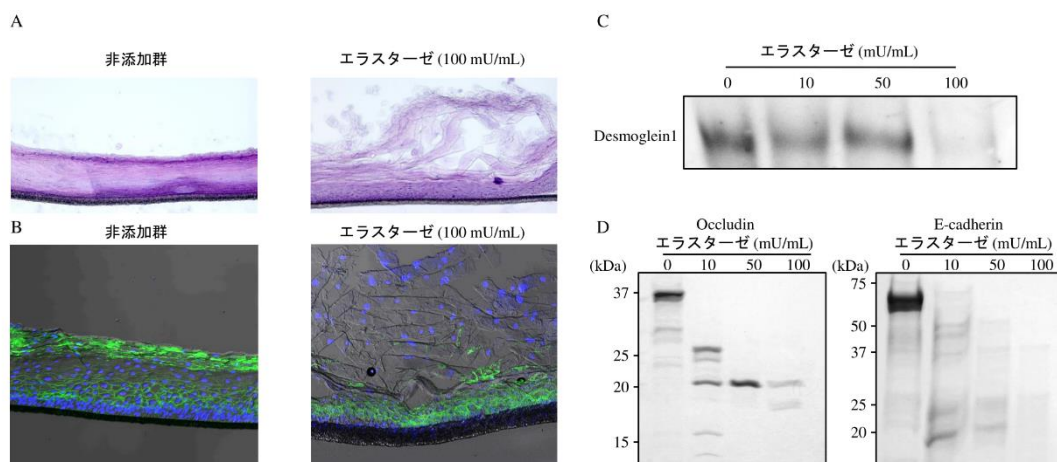
健常群マウスと比較して、歯周炎を誘導されたマウスでは、歯周組織中における好中球の浸潤 (Ly6G;赤) およびエラスターゼ (緑) が増加していた (A)。さらに、結紮を行ったマウス歯肉中のエラスターゼ活性は、健常群と比較して有意に上昇し、エラスターゼ阻害剤を局所投与したマウスではその活性が有意に減少した。



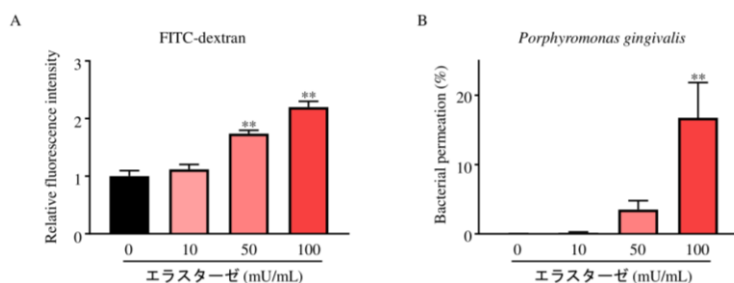
次に、歯槽骨吸収に対するエラスターゼ阻害剤の効果を検討した。健常群と比較して、結紮により歯周炎を誘導した群では有意な骨吸収が生じ、エラスターゼ阻害剤を投与した群では歯槽骨吸収が有意に抑制されることが明らかになった (A および B)。C および D に示すように、歯周炎群における歯槽骨表面の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性破骨細胞数は、健常群よりも増加した。また、エラスターゼ阻害剤の投与により、破骨細胞の数は減少した。これは、歯槽骨吸収の測定結果とも一致していた。



歯肉上皮細胞は、物理的な障壁として作用することにより、歯周炎の重症化予防に重要な役割を果たす。そこで、三次元ヒト歯肉上皮モデルを用いて、エラスターゼが歯肉上皮バリアを傷害するかどうかを検証した。その結果、エラスターゼを添加した歯肉上皮は細胞層の剥離が誘導された (A)。さらに、B に示すように、非添加群では細胞接着分子デスモグレイン 1 (緑) の発現を認める一方、エラスターゼ添加群では剥離した細胞層に一致してデスモグレイン 1 の発現が減少していた。また、デスモグレイン 1 に加えて (C)、他の細胞接着分子であるオクルーディンおよび E-カドヘリンもエラスターゼ濃度依存的に分解されることが明らかとなった (C~D)。



エラスターゼによる歯肉上皮バリア障害作用を解析するために、歯肉上皮由来 Ca9-22 細胞単層にエラスターゼを添加し、FITC-dextran および代表的な歯周病減細菌である *Porphyromonas gingivalis* の細胞層透過率を試験した。その結果、エラスターゼの添加によって細胞層を通過する FITC-dextran (A) および *Porphyromonas gingivalis* (B) は濃度依存的に増加した。



以上の研究結果から、エラスターゼは歯肉上皮バリアを傷害し、歯周組織深部へと感染拡大を誘導することで、歯周炎を重症化するというメカニズムを明らかにした。また、エラスターゼの阻害により歯周炎の重症化が抑制されたため、エラスターゼ阻害剤が新規歯周炎治療薬となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiyoshi Takumi, Domon Hisanori, Maekawa Tomoki, Tamura Hikaru, Isono Toshihito, Hirayama Satoru, Sasagawa Karin, Takizawa Fumio, Tabeta Koichi, Terao Yutaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Neutrophil elastase aggravates periodontitis by disrupting gingival epithelial barrier via cleaving cell adhesion molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12358-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日吉 巧
2. 発表標題 好中球エラスターゼの歯肉上皮バリア傷害作用による歯周炎重症化メカニズム解析
3. 学会等名 第64回秋季歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日吉 巧, 土門久哲, 前川知樹, 田村 光, 笹川花梨, 多部田康一
2. 発表標題 エラスターゼの歯肉上皮バリア傷害作用を介した歯周組織破壊機序の解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会2021年度秋季学術大会（第155回）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日吉 巧
2. 発表標題 好中球エラスターゼによる歯周炎重症化機序と新規治療法の探索
3. 学会等名 第四回オーラルサイエンス研究会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------