

## 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3月31日現在

機関番号：15301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22792083  
 研究課題名(和文) TACE-Timp3を標的とした糖尿病患者における歯周病悪化機序の解明  
 研究課題名(英文) Possible Mechanisms of Progression of Periodontal Disease by TACE-Timp3 Interaction in Patients with Diabetes Mellitus  
 研究代表者  
 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

研究成果の概要(和文)：血糖コントロールが悪い糖尿病患者の歯周病は重篤化しやすいことが知られている。本研究において、高血糖状態で培養した歯肉線維芽細胞における TACE の活性および MMP-3 の産生が亢進した。さらにマクロファージ様細胞株 THP-1 において、リコンビナント活性化型 MMP-3 を作用させると可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) の産生が有意に亢進した。以上の結果から、高血糖状態による TACE の活性亢進および MMP-3 の産生亢進は膜タンパクのシェディングを亢進し、糖尿病患者における炎症の重篤化に関与する可能性が示唆された。さらに、高血糖状態における歯肉線維芽細胞およびマクロファージ等の炎症性細胞との相互作用が IL-6 シグナル伝達系の活性化に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease in poor controlled-diabetic patients has very severe inflammation. In the present study, hyperglycemia enhanced TACE activity and MMP-3 production in human gingival fibroblasts. In addition, recombinant activated MMP-3 enhanced the shedding of soluble IL-6 receptor in macrophage-like differentiated THP-1. These results suggest that hyperglycemia-induced facilitation of TACE and MMP-3 in gingival fibroblasts/macrophage interaction induce severe periodontal inflammation through enhancement of IL-6 signaling in the patients with poor controlled-diabetic mellitus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：歯周病，糖尿病，慢性炎症，シェディング

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病罹患患者において、血糖コントロールが悪いと歯周病が重篤化しやすいことがよく知られている。近年、口腔内の慢

性炎症性疾患である歯周病が糖尿病の病態に影響を及ぼすことが分かりはじめ、今日では歯周病は糖尿病の第6番目の合併症と提唱されるようになった。しかし、糖尿病患者における歯周病悪化メカニズムは

未だ不明な点が多い。

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリーの一つである TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme, 別名 ADAM17) は、膜型前駆体として産生される炎症性サイトカインの一つである腫瘍壊死因子 TNF- $\alpha$  を可溶性タンパク質に変換する酵素として同定されたタンパク質である。近年、TNF- $\alpha$  以外にも多くの膜タンパク質が TACE によりシェディングされることが報告されている。慢性関節リウマチや歯周病の進行に深く関与している炎症性サイトカイン interleukin-6 (IL-6) のレセプターである IL-6 受容体 (IL-6R) もシェディングされる膜タンパク質の一つである (Briso EM *et al*, *J Immunol*, 2008)。これらの報告は、TACE が炎症病巣における細胞間ネットワークを制御する重要な役割を果たす可能性を示唆するものであり、とりわけ、慢性関節リウマチ、クローン病、敗血症性ショックなどの全身性疾患の病態解明の一助になっている (Blobel CP, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005)。このような学術的背景から、研究代表者は歯周組織局所の炎症性疾患である“歯周病の病態形成”において、TACE が歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts; HGFs) および炎症性細胞の膜上に発現する膜タンパク質をシェディングすることで、何らかの細胞反応を誘導すると考えた。また、近年、歯周病罹患患者の歯肉溝滲出液中の TACE 濃度が有意に亢進し、RANKL 濃度が亢進することが報告された (Bostanci N *et al*, *J Dent Res*, 2008)。研究代表者は、以前の研究にて HGFs が TACE を恒常的に発現していることを確認しており、高血糖状態が TACE の活性を亢進し、各種膜タンパク質をシェディングすることによって炎症悪化を誘導するのではないかと考えた。昨今、TACE の生体特異的 inhibitor である Timp3 欠損マウスにおいて、糖尿病の状態が悪化し、血管炎症を誘導するという興味ある知見が報告されている (Federici M *et al*, *J Clin Invest*, 2005)。このことは、糖尿病およびその合併症の病態形成において、TACE-Timp3 が関与する分子であることを

示唆するものの、その分子メカニズムは依然として不明である。したがって、本研究の領域である歯周病悪化メカニズムにおける TACE の役割を明らかにすることができれば、他の合併症を含めた本関連領域の全容を知るための道標になるかもしれない。

研究代表者は、糖尿病患者における歯周病悪化メカニズムを明らかにするために、自ら確立した *in vitro* 糖尿病モデルを用いて、高血糖状態で培養した HGFs において、IL-6 が血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の産生を亢進し、結果的に歯周炎症組織に毛細血管浸潤をきたすという病態理論を提唱している (Omori K *et al*, *J Biol Chem*, 2004)。このことは、高血糖状態が HGFs の細胞反応性に少なからぬ影響を及ぼすことを示唆するものである。また、研究代表者が所属する研究は、高血糖状態が HGFs における matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) の mRNA 発現を亢進する知見を得ている。MMP-3 は近年、Fas リガンド等の膜タンパクのシェディングに関与することが報告されており (Matsuno *et al*, *J Rheumatol*, 2001)、MMP-3 の産生亢進がシェディングに及ぼす影響も考慮する必要がある。さらに、II 型糖尿病患者の骨格筋細胞において TACE-Timp3 の相互作用の障害が TNF- $\alpha$  および IL-6R のシェディングを亢進し、インシュリン抵抗性を惹起するという報告がある (Monrov A *et al*, *Diabetologia*, 2009)。

以上のような背景から、研究代表者は高血糖状態が HGFs における TACE-Timp3 相互作用の障害を誘因することによって糖尿病患者の歯周病の悪化を招くのではないかという仮説を立て、糖尿病患者における歯周病悪化をきたすエビデンスが得られると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、糖尿病患者に頻発する歯周病悪化メカニズムを解明して、糖尿病-歯周病の相互作用の病態理論を構築

することである。本研究においては、歯周組織の構築細胞である HGFs および炎症性細胞 THP-1 の動態に着目し、近年、炎症や腫瘍の領域で注目されている膜タンパク質のシェディングに関与する ADAM ファミリーの一つである TACE (別名 ADAM17) と MMP-3 を標的分子とし、その生体特異的 inhibitor である Timp3 との相互作用を含め、一連の細胞反応に及ぼす“高血糖”の影響を検討することとした。

### 3. 研究の方法

細胞は、ヒト歯周組織から分離培養した HGFs を用いた。高血糖状態の再現は研究代表者が確立した実験系を用いた (Omori *et al*, *J Biol Chem*, 2004)。すなわち、培地中のグルコース濃度を高血糖群 (25 mM, 血糖値 450 mg/dL に相当) または健常血糖群 (5.5 mM, 血糖値 100 mg/dL に相当) に設定し、5.5 mM グルコース含有培地に 19.5 mM の mannitol を加えた実験系を浸透圧対照群として用いた。細胞培養上清中の MMP-3 の産生量は、市販の ELISA キット (R&D) を用いて定量した。TACE の活性は市販の測定キット (コスモバイオ株式会社) を用いて測定した。

さらに、TACE および MMP-3 によるシェディングが可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) の産生に及ぼす影響は、マクロファージ様に分化させた THP-1 を用いて調べた。すなわち、TACE の特異的阻害剤 (TAPI-1, Calbiochem), MMP-3 阻害剤 (MMP-3 Inhibitor II, Calbiochem), リコンビナント活性型 MMP-3 (Calbiochem) を THP-1 に作用させた。膜型 IL-6 受容体 (mIL-6R) および sIL-6R の mRNA 発現に及ぼす影響は real-time PCR 法を用いて定量した。膜上の mIL-6R のタンパク質発現は flowcytometry 法を用いて定量した。細胞培養上清中の sIL-6R の産生量は、市販の ELISA キット (R&D) を用いて定量した。

### 4. 研究成果

高血糖状態で培養した HGFs における TACE

の活性は有意に亢進した (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ )。さらに、培養上清中の MMP-3 産生も有意に亢進した ( $P < 0.05$ )。一方、マクロファージ様に分化させた THP-1 において、TACE 阻害剤 (TAPI-1, 10  $\mu$ M), MMP-3 阻害剤 (MMP-3 Inhibitor, 100 nM) は TACE, mIL-6R および sIL-6R の mRNA 発現に影響を及ぼさなかった。一方、細胞上清中の sIL-6R 産生は MMP-3 阻害剤を添加すると有意に抑制し、リコンビナント活性型 MMP-3 を添加すると有意に亢進した ( $P < 0.05$ )。細胞膜上の mIL-6R のタンパク質発現は、MMP-3 阻害剤でおよび TAPI-1 では抑制されず、リコンビナント活性型 MMP-3 を作用させるとその発現は抑制された。さらに、HGFs に IL-6/sIL-6R を作用させると細胞上清中の MMP-3 産生が有意に亢進した ( $P < 0.05$ )。

高血糖状態による HGFs における MMP-3 および TACE の活性亢進は、血糖コントロールが悪い糖尿病患者に見られる歯周炎症の重篤化に関与する可能性が示唆された。さらに、MMP-3 が TACE 同様、マクロファージ様に分化させた THP-1 における sIL-6R の産生亢進に関することから、高血糖状態における HGFs およびマクロファージ等の炎症性細胞が相互に作用しあうことによって、IL-6 シグナル伝達系をさらに活性化させ炎症の重篤化を引き起こす可能性が示唆された。

### 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 1 件)

- (1) 高柴正悟, 大森一弘, 岡山市医師会・疾患別検査と診断の手引き疾患別シリーズ⑤歯周病「歯周病と生活習慣病」岡山市医師会雑誌, 115-122, 2010. (査読無)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Hiroya Kobayashi, Kazuhiro Omori, Koji Naruishi, Tomoko Yamaguchi, Hiroshi Maeda, Shogo Takashiba,

Activated MMP-3 enhances sIL-6R production in macrophage like differentiated THP-1 cells, 90<sup>th</sup> International Association for Dental Research, 6/22/2012, Iguacu falls, Brazil

- (2) Hiroya Kobayashi, Kazuhiro Omori, Koji Naruishi, Tomoko Yamaguchi, Hiroshi Maeda, Shogo Takashiba, Activated MMP-3 enhances sIL-6R production in macrophage like differentiated THP-1 cells, 59<sup>th</sup> Japanese Association for Dental Research, 10/8/2011, Hiroshima, Japan
- (3) 小林寛也, 大森一弘, 成石浩司, 山口知子, 富山高史, 久保克行, 山本大介, 前田博史, 高柴正悟, 活性型 MMP-3 がマクロファージ様 THP-1 細胞の膜型 IL-6 受容体の発現に及ぼす影響, 第 133 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2011 年 6 月 10 日, 東京
- (4) 小林寛也, 大森一弘, 成石浩司, 富山高史, 久保克行, 山口知子, 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季学術大会, 2010 年 6 月 4 日, 熊本

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし