

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592906

研究課題名(和文) 軟組織損傷治療・再生医療を目指した唾液蛋白質ヒスタチンの作用機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of action in salivary protein histatin aimed at soft tissue injury treatment and regenerative medicine

研究代表者

今村 泰弘 (Imamura, Yasuhiro)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00339136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：唾液蛋白質ヒスタチンは抗菌作用があり、口腔内組織を病原体(例えば、歯周病原菌やカンジダ菌)から守っている。しかし、宿主細胞に及ぼすヒスタチンの機能は、殆ど明らかにされていない。本研究は、ヒスタチンによるヒト歯肉繊維芽細胞の増殖促進メカニズムの一端を示した。また、ヒスタチンは新たな細胞周期制御に関与する可能性が示唆された。更に、ヒスタチンによる抗炎症の作用メカニズムを示した。これらは、唾液蛋白質の新たな生理的機能を提唱し、再生医療や抗炎症薬の開発に結び付く結果である。

研究成果の概要(英文)：Salivary protein histatins have antimicrobial properties and protect oral tissues from pathogens (e.g., periodontal pathogens and *Candida albicans*). However, very little is known about the function of histatins against host cells. In this study, we showed a part of mechanism enhancing cell proliferation by histatin in human gingival fibroblasts. It has also been suggested the possibility that histatin is concerned with other cell cycle regulatory functions. In addition, we showed the mechanism of anti-inflammatory action by histatin. These observations are advocated as new physiological function of salivary protein. These results are connected with regenerative medicine (and tissue engineering) and with development of anti-inflammatory agent.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：唾液蛋白質 ヒスタチン

1. 研究開始当初の背景

歯周病の原因には環境要因があり、特に歯周病原菌の刺激は、硬・軟組織破壊を誘導する。これらは歯周組織細胞間の複雑な相互作用により惹起され、慢性炎症疾患となる。歯周病は心臓血管疾患、糖尿病等の全身疾患と密接に関与することが知られている。我々は、歯周病原菌リポポリサッカライドによるヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs: 歯周組織の主な構成細胞) の炎症性サイトカイン産生亢進を示唆した。また、炎症局所の B 細胞の機能を調べるために、その抗原受容体を介したシグナル伝達系を解析した (Imamura *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279, 26425-26432, 2004)。

唾液は一日に 1~1.5 l 分泌され、口腔内の恒常性維持や嚥下、咀嚼等と関係する。また、唾液は各種口腔疾患 (歯周病、う蝕、口腔乾燥症、カンジダ症、ウイルス感染、癌等) 発症と高い相関性がある。唾液中に存在する蛋白質の 1 つであるヒスタチンは、極めて重要な生理活性物質である。ヒスタチンは、カンジダ菌や歯周病原菌 *P. gingivalis* などに対する抗菌作用や歯周病原菌由来プロテアーゼ活性阻害、う蝕原因菌の増殖抑制作用を有する。また、HIV 感染者はヒスタチン量が顕著に減少しているため、各種日和見感染症を発症することが示唆されている。ヒスタチンは唾液腺で特異的に発現していることから、非常に重要な生理機能を果していることが示唆される。しかし、これまでにヒスタチンの唾液腺における特異的発現制御は不明であった。そこで、我々は、ヒスタチン遺伝子プロモーターが唾液腺由来細胞において特異的に発現・制御されることを明らかにした

(Imamura *et al.*, *J. Biochem.*, 145, 279-288, 2009)。これは、ヒスタチン遺伝子を用いた遺伝子治療に応用可能な結果である。更に我々は、口腔細胞が絶えず唾液中に曝されていることや、ヒスタチンは唾液中に比較的多く存在することに注目し、宿主細胞に与えるヒスタチンの機能解明を目指してきた。その結果、ヒスタチンは宿主の熱ショック蛋白質 (HSP) の 1 つである HSC70 と結合し、この複合体と負の細胞周期制御因子 p27^{Kip1} が結合することで、HGFs の G1/S 期の移行を促進させ、増殖や生存に関わることを明らかにした (Imamura *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 284, 14316-14325, 2009)。これは、口腔細胞が他の体細胞と比べ、細胞増殖・生存促進効果があることを示唆する。しかし、その詳細な分子機構は明らかにされていない。

これまでのヒスタチンに関する機能は、抗菌作用といった自然免疫に関するものが殆どであった。宿主に及ぼす唾液蛋白質の未知なる生理機能解明は、漸く始まった状況であり、重要な課題である。

2. 研究の目的

口腔内で特異的に発現している唾液蛋白質

質ヒスタチンの抗菌作用は、これまで世界的に研究されてきた。しかし、ヒスタチンの宿主に及ぼす生理的意義は殆ど解明されていない。我々は、ヒスタチンが口腔細胞の増殖促進効果や抗炎症作用を有する生理活性物質であることを明らかにしつつある。しかし、その詳細な分子メカニズム解明には、まだ至っていない。そこで、本研究課題は、上記におけるヒスタチンの生理的機能を分子レベルで詳細に解明する。また、炎症などによって生ずる軟組織損傷の治療、及び再生医療への応用に向けたヒスタチンの基礎的知見の取得を目的とし、更なる唾液蛋白質の機能解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究課題の主な成果の研究方法は以下となる。

(1) ヒスタチン 3 に依存した細胞増殖・生存とこれに関わる蛋白質分解系の解析

①ヒスタチン 3 とその変異体存在下における G1/S 期移行時の HSC70/p27^{Kip1} 複合体形成

HGFs を 0.1% 血清培地で 24 時間以上培養後、ヒスタチン 3 とその変異体 M(5-8) (ヒスタチン 3 の 5~8 番目のアミノ酸 Lys, Arg, His, His をそれぞれ Glu, Glu, Asp, Asp に変換) を 30 μM 添加した。8 時間培養後、細胞を回収し、細胞抽出液を調製した。これを用いて抗 p27^{Kip1} 抗体で免疫沈降後、抗 HSC70 抗体、抗 p27^{Kip1} 抗体を使用し、ウェスタンブロット法にて解析した。

②ヒスタチン 3/HSC70 複合体に結合する p27^{Kip1} のユビキチン化解析

V5 タグ融合ヒスタチン 3 (V5-ヒスタチン 3) 発現ベクターを構築後、T7 タグ融合 HSC70 (T7-HSC70)、FLAG 融合 p27^{Kip1} (FLAG-p27^{Kip1}) 蛋白質発現ベクターと共に HEK293 細胞に導入し、1 日培養した。その後、プロテアソーム阻害剤である MG132 で 5 時間処理し、細胞を回収後、細胞抽出液を調製した。この細胞抽出液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、抗ユビキチン抗体及び抗 p27^{Kip1} 抗体を使用してウェスタンブロット法にて解析した。

③ヒスタチン 3/HSC70/p27^{Kip1} 複合体における HSC70 のユビキチン化解析

上記 (1) ②で調製した細胞抽出液を用い、抗 T7 抗体で免疫沈降を行なった。その後、抗ユビキチン抗体及び抗 HSC70 抗体を使用し、ウェスタンブロット法にて解析した。

(2) HSC70 による Toll 様受容体 (TLR) 活性化に及ぼすヒスタチン 3 の影響

①ヒスタチン 3 存在下における HSC70 の高次

構造変化の解析

ヒスタチン 3 を HSC70 と混合後、V8 プロテアーゼで消化して限定分解させ、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、クマシーブリリアントブルーでゲルを染色した (V8 プロテアーゼ限定分解法)。

(3) ヒスタチン 3/HSC70 複合体に結合する新規細胞性因子の解析

①ヒスタチン 3/HSC70 複合体に結合する新規細胞性因子の cDNA スクリーニング

ヒスタチン 3 と HSC70 を発現させるためのベクターを構築し、これを酵母に導入後、Three-Hybrid System によりヒト cDNA ライブラリー (1.2 × 10⁶ cfu) からスクリーニングした。

②ヒスタチン 3/HSC70/ε-チューブリン (TUBE1) の相互作用解析

HGFs にヒスタチン 3 を 25 μM 添加し、24 時間培養した。その後、細胞抽出液を調製し、抗 TUBE1 抗体及び抗 HSC70 抗体で免疫沈降を行った。抗 TUBE1 抗体、抗 HSC70 抗体及び抗ヒスタチン 3 抗体を使用し、ウェスタンブロッティング法にて解析した。

4. 研究成果

(1) ヒスタチン 3 に依存した細胞増殖・生存とこれに関わる蛋白質分解系の解析

①ヒスタチン 3 とその変異体存在下における G1/S 期移行時の HSC70/p27^{Kip1} 複合体形成

ヒスタチン 3 とその変異体 M(5-8) を G0/G1 期の HGFs にそれぞれ添加し、細胞内 HSC70 との結合能を免疫沈降法で解析した。その結果、野生型ヒスタチン 3 は変異体 M(5-8) や無添加の場合と比べ、HSC70 と p27^{Kip1} の結合が増加した (図 1)。このことは、ヒスタチン 3 が HSC70 に結合することにより、HSC70 の構造に影響を及ぼし、HSC70 の p27^{Kip1} への親和性が増したものと考えられる。

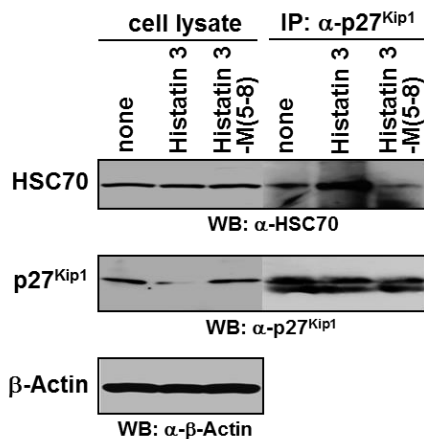


図 1 G1/S 期移行時の HGFs におけるヒスタチン 3 とその変異体存在下での HSC70 と p27^{Kip1} の相互作用

用

②ヒスタチン 3/HSC70 複合体に結合する p27^{Kip1} のユビキチン化解析

ヒスタチン 3/HSC70/p27^{Kip1} 複合体形成は、G1 期から S 期移行時に増加し、G1/S 期移行を促進する。一般的に、この時期において、p27^{Kip1} はユビキチン/プロテアソーム系により分解されるため、ヒスタチン 3/HSC70/p27^{Kip1} 複合体の p27^{Kip1} のユビキチン化について検討した。ヒスタチン 3、HSC70、p27^{Kip1} 蛋白質を HEK293 に強発現させ、p27^{Kip1} を免疫沈降後、抗ユビキチン抗体によるウェスタンブロッティング法にて解析した。その結果、p27^{Kip1} のユビキチン化はヒスタチン 3 の発現量依存的に促進され、ヒスタチン 3 非発現下と比べ、促進されることが明らかとなった (図 2)。また、ヒスタチン 3 変異体 M(5-8) 発現下では、野生型ヒスタチン 3 発現下よりも p27^{Kip1} のユビキチン化は低下していた。以上から、ヒスタチン 3 は HSC70 と相互作用することにより、この複合体に結合した p27^{Kip1} のユビキチン化促進とプロテアソームによる分解を進行させることが示唆される。

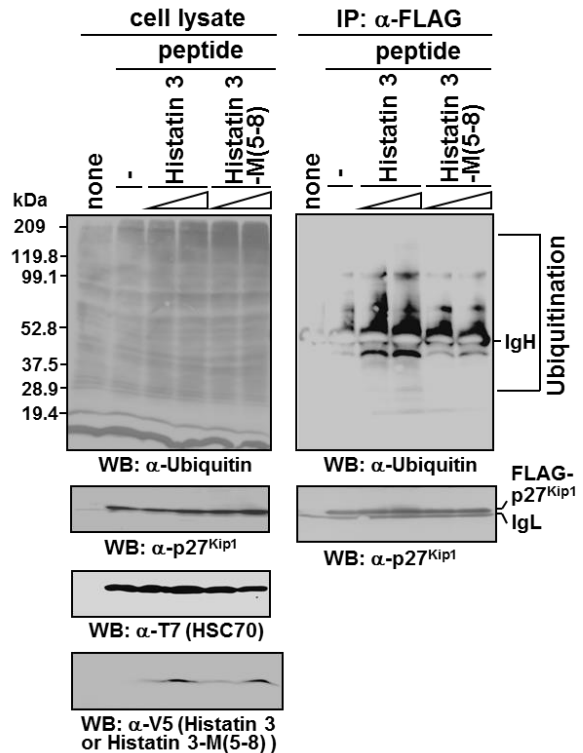


図 2 ヒスタチン 3 及び HSC70 発現下における p27^{Kip1} のユビキチン化

③ヒスタチン 3/HSC70/p27^{Kip1} 複合体における HSC70 のユビキチン化解析

ヒスタチン 3/HSC70/p27^{Kip1} 複合体の p27^{Kip1} はユビキチン化の促進が認められたが、HSC70 についても上記 (1) ②と同様に解析した。免疫沈降では抗 T7 抗体を用いた。その結果、HSC70 も p27^{Kip1} と同様、ユビキチン

化の促進が認められた。従って、ヒスタチン3/HSC70/p27^{Kip1}複合体は、少なくともHSC70、p27^{Kip1}がユビキチン/プロテアソーム系による分解を受ける可能性が示唆された。このことは、ヒスタチン3/HSC70複合体がp27^{Kip1}を捕獲し、効率よく分解させるための作用メカニズムである可能性が考えられる。

(2) HSC70 による TLR 活性化に及ぼすヒスタチン3の影響

①ヒスタチン3存在下におけるHSC70の高次構造変化の解析

これまでに、HSC70によるTLR2、TLR4シグナルの活性化、HGFsの炎症性サイトカイン産生促進作用について明らかにしてきた。また、ヒスタチン3はHSC70に結合することにより、HSC70の上記作用を抑制することが示唆された。そこで、ヒスタチン3はHSC70にどのような影響を与えているのかを調べるために、V8プロテアーゼ限定分解法で解析した。その結果、ヒスタチン3存在下では、HSC70はV8プロテアーゼで消化されにくいことが明らかとなった(図3)。一方、コントロールペプチド(cont. pep., P3a(HSC70のATP加水分解活性を誘導するクラスリン軽鎖由来ペプチド))存在下では、何も存在しない場合(-)と同様に消化された。尚、ヒスタチン3はV8プロテアーゼを阻害しなかった。これらのことから、ヒスタチン3は、HSC70に結合することにより、HSC70の高次構造に影響を及ぼすことが示唆された。

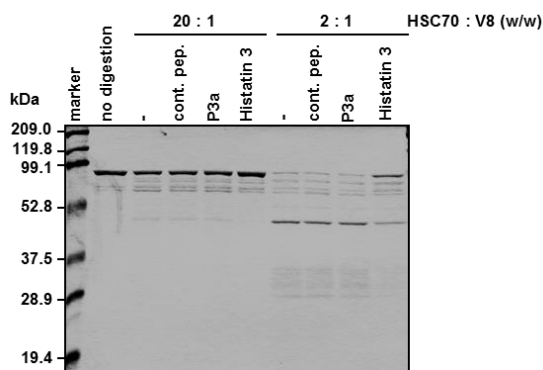


図3 ヒスタチン3存在下におけるHSC70の構造解析

(3) ヒスタチン3/HSC70複合体に結合する新規細胞性因子の解析

①ヒスタチン3/HSC70複合体に結合する新規細胞性因子のcDNAスクリーニング

酵母を使用したThree-Hybrid Systemにより、ヒスタチン3/HSC70複合体に結合する蛋白質のcDNAをスクリーニングしたところ、TUBE1の一部(212~393アミノ酸領域)が得られた。そこで、唾液腺cDNAライブラリーを鋳型として、PCRにより完全長のTUBE1

cDNAを増幅し、クローニングした。

②ヒスタチン3/HSC70/TUBE1の相互作用解析

ヒスタチン3処理したHGFsの細胞抽出液を抗TUBE1抗体及び抗HSC70抗体で免疫沈降し、抗TUBE1抗体、抗HSC70抗体及び抗ヒスタチン3抗体でウェスタンブロッティングを行った。その結果、ヒスタチン3存在下では、TUBE1とHSC70との結合は強く認められ、ヒスタチン3非存在下では、それらの結合が弱いことが判明した(図4)。これらのことから、ヒスタチン3はHSC70と相互作用することにより、TUBE1のHSC70への結合が増強されることが示唆される。

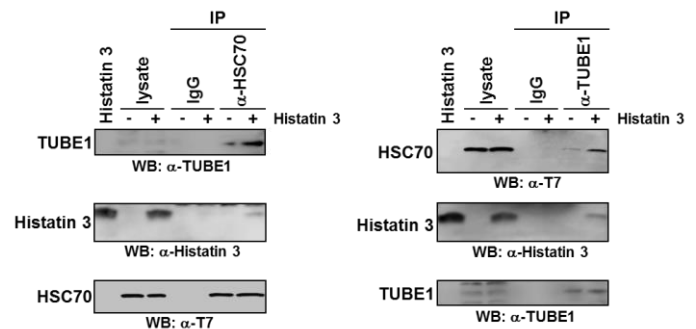


図4 HGFsにおけるヒスタチン3、HSC70、TUBE1間の相互作用

以上をまとめると、ヒスタチン3は細胞周期G0/G1期からS期への移行に関与し、その作用メカニズムは、ヒスタチン3/HSC70/p27^{Kip1}複合体(特に、p27^{Kip1}、HSC70)のユビキチン化が促進され、その結果としてプロテアソームで分解されるものと考えられる。口腔内におけるヒスタチンの機能は抗菌作用だけではなく、細胞増殖・生存作用を促すことから、口腔内細胞の再生・損傷治癒能を持つことが示唆される。現に、口腔内の損傷治癒効果は他の組織・臓器の場合と比較し、高いことが知られている。今回の結果はこのことを裏付け、更に、分子レベルで明らかにした。また、細胞分裂期の中心体に存在するTUBE1は、ヒスタチン3/HSC70複合体に結合する新規因子としてクローニングされたことから、ヒスタチンの新たな細胞周期制御への関与が示唆される。

これまでに我々は、ヒスタチンがHSC70によるTLR2、TLR4のシグナル活性化及びHGFsの炎症性サイトカイン(IL-6、IL-8)産生を抑制することについて示唆してきた。しかしながら、ヒスタチンはどのようにしてHSC70のTLRに対するリガンド効果を抑制しているのか明らかではなかった。今回、ヒスタチンがHSC70に結合することにより、HSC70の高次構造を変化させる可能性が示唆された。以上の結果から、ヒスタチンは口腔内の抗菌作用のみならず、歯周病といった口腔内疾患や損傷によって発症する炎症を

抑制（抗炎症作用）する唾液生理活性物質であることが提唱される。このことは、ヒスタチンによる抗炎症薬への開発に繋がる可能性が示唆される。

以上の結果は、これまでにない唾液蛋白質の宿主に与える生理的機能と意義を解明しつつあり、世界に先駆けて行われた研究成果である。今後、更に唾液蛋白質の宿主に及ぼす影響や新しい生理的機能の解明を目指す必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

- ① Imamura, Y. and Wang, P.-L. Salivary histatin 3 inhibits heat shock cognate protein 70-mediated inflammatory cytokine production through toll-like receptors in human gingival fibroblasts. *J. Inflamm.*, 査読有, 2014, Vol. 11, 4

〔学会発表〕（計4件）

- ① 今村泰弘, 唾液ヒスタチンによる熱ショック蛋白質の Toll 様受容体リガンド効果抑制機序. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2013 年 9 月 22 日, 岡山県岡山市 岡山コンベンションセンター
- ② 今村泰弘, 唾液タンパク質ヒスタチンによる細胞周期制御機構 (Cell cycle control mechanisms by salivary protein histatin). 第 35 回日本分子生物学会, 2012 年 12 月 11 日, 福岡県福岡市 福岡国際会議場・マリメッセ福岡
- ③ 今村泰弘, 熱ショック蛋白質による炎症性サイトカイン産生に対するヒスタチンとその変異体の影響. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2012 年 9 月 16 日, 福島県郡山市 奥羽大学
- ④ 今村泰弘, 唾液ヒスタチンによる熱ショック蛋白質の TLR2 シグナル活性化抑制. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2011 年 10 月 2 日, 岐阜県岐阜市 長良川国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

今村 泰弘 (IMAMURA, Yasuhiro)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：00339136

(2)研究分担者

雪田 聡 (YUKITA, Akira)
静岡大学・教育学部・講師
研究者番号：80401214

藤波 義明 (FUJINAMI, Yoshiaki)
松本歯科大学・歯学部・助手
研究者番号：80392801

高橋 直之 (TAKAHASHI, Naoyuki)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号：90119222

(3)連携研究者

王 宝禮 (WANG, Pao-Li)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20213613