

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 10 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：2011 年 ～2012 年

課題番号：23890062

研究課題名（和文）歯肉増殖症歯肉における TNF- α 変換酵素とそのインヒビターの役割研究課題名（英文）Gene and protein location of Tumour Necrosis Factor (TNF)- α converting enzyme in gingival tissues from periodontitis with drug-induced gingival overgrowth.

研究代表者 阿部 大輔 (Abe Daisuke)

新潟大学 医歯学総合病院・医員

研究者番号：30609110

研究成果の概要（和文）：カルシウム拮抗薬剤性歯肉増殖症罹患歯肉中（における、TNF- α converting enzyme (TACE)と、その特異的インヒビターである TIMP-3 のタンパク質発現解析、遺伝子発現解析を分子生物学的に解明する。また、その組織内局在について免疫組織化学にて明らかにし、薬剤性歯肉増殖症における TACE および TIMP-3 の関与を究明することを目的として研究を行った。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to analyse mRNA expression of TACE and TIMP-3, and protein location of TACE in gingival tissue removed from drug-(calcium-channel blocker) induced GO and periodontitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,300,000	690,000	1,990,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：医療・福祉、歯学、歯周病学、分子生物学、免疫組織化学、酵素

キーワード：カルシウム拮抗薬剤性歯肉増殖症、TACE、TIMP-3、タンパク質発現解析、遺伝子発現解析、免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯肉増殖症についての動向および位置づけ

薬剤性歯肉増殖症とは、降圧剤（カルシウム拮抗薬）、免疫抑制剤（サイクロスポリン A）、抗てんかん薬（フェニトイン）などの副作用で生じる、歯肉の線維性増殖と炎症を伴う疾患である(Tackman and Kantarci., Crit Rev Oral Biol, 2004)。その中でも、日本では高血圧症の有病者が多く、降圧剤を服用している割合が高い。しかも、高血圧症の有病者は高齢者が多く、歯周病有病者も 40 代以降で多

くなるため、歯周病有病者が高血圧症にも罹患していることが多い。したがって、カルシウム拮抗薬による歯肉増殖症について、歯周病分野で研究されるべきである。

これまで、歯肉増殖症については、in vitro での報告(Salo et al., J Oral Pathol Med, 1990)、動物実験での報告(Kataoka et al., J Periodontol, 2001)、遺伝子異常や遺伝子多型(Häkkinen and Csiszar., J Dent Res, 2007, Ogino et al., J Dent Res, 2005)、といった報告がされているが、いまだに原因究明はされていないのが現状である。

歯肉増殖症の病態は、歯周結合組織中での細胞外基質の増大である。細胞外基質の合成・分解には、分解酵素である Matrix metalloproteinases (MMPs)と、そのインヒビターである、Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)の発現及びバランスが関与しているとされており、応募者らもそれについて検証を行ってきた(Nakasone et al., Arch Oral Biol, 2009, Kubota et al., Oral Med and Pathol, 2008)。肝臓の線維化、慢性関節リウマチ、癌などでも MMPs, TIMPs, ADAMs (A disintegrin and metalloproteinases)の関与が報告されているので(Hemmam et al., J Hepathol, 2007, Malemud et al., Front Biosci, 2006)、これら MMPs ファミリーは、同じように線維化の病態を示す歯肉増殖症にも関与しているはずである。

(2) 歯周病においては MMPs および TIMPs は付着の喪失および歯槽骨吸収の進行と抑制に深く関与することが知られている。応募者の所属する講座では、これまで歯周炎罹患歯肉における MMPs と TIMPs の遺伝子発現を報告してきた (Kubota et al., Arch Oral Biol, 1996; Kubota et al., J Periodontal Res, 1997; Kubota et al., J Periodontol, 2008; Abe et al., J Periodontal Res, 2011)。さらに、歯周病患者での MMPs の遺伝子多型について、歯周炎との関与を研究してきた (Itagaki et al., J Clin Periodontol, 2004)。また、カルシウム拮抗薬剤性歯肉増殖症歯肉組織中において特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析し、quantitative reverse transcription real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 解析にて検証した (Shimizu et al., Arch Oral Biol, 2010)。近年、特に癌の分野で、MMPs の遺伝子ファミリーとして、ADAMs が注目を浴びてきている。これは、MMPs と共通のドメインをもち、細胞膜表面でのサイトカインや増殖因子の代謝に関与するといわれている (Edwards et al., Mol aspects Med, 2009)。特に、ADAMs の中でも TNF- α converting enzyme (TACE, ADAM-17)は、炎症性サイトカインである TNF- α の分泌に関与する酵素である。また TACE は、TIMP-3 特異的に阻害されることが報告されているので (Amour et al., FEBS Letters, 1998)、応募者は、TIMP-3 及び TACE の歯周組織での発現に着目した。歯科領域で TACE が歯周病患者の歯肉溝浸出液 (GCF) 中で上昇している報告があるが (Bostanci et al., J Dent Res, 2007)、歯肉増殖症歯肉を含めた、歯周組織での発現はいまだ報告されていない。

2. 研究の目的

カルシウム拮抗薬剤性歯肉増殖症罹患歯肉

中 (における、TNF- α converting enzyme (TACE)と、その特異的インヒビターである TIMP-3 のタンパク質発現解析、遺伝子発現解析を分子生物学的に解明する。また、その組織内局在について免疫組織化学にて明らかにし、薬剤性歯肉増殖症における TACE および TIMP-3 の関与を究明することを目的とする。

(1) 酵素免疫測定法 (ELISA) を用いてヒト歯肉増殖症 GCF 中における TIMP-3 と TACE のタンパク質発現レベルを、歯周病患者の GCF 中におけるタンパク質発現レベルと比較検討する。

(2) 分子生物学的手法 (qRT-PCR) を用いてヒト歯肉増殖症歯肉における TIMP-3 と TACE の遺伝子発現レベルを、歯周病患者の歯肉における遺伝子発現レベルと比較検討する。TACE の発現と TIMP-3 の遺伝子発現を比較検討する。

(3) 免疫組織化学的手法を用いてヒト歯肉増殖症歯肉中の TIMP-3 と TACE のタンパク質の局在を解析する。

3. 研究の方法

慢性歯周炎歯肉組織、及びカルシウム拮抗薬剤性歯肉増殖症歯肉組織中の TACE, TIMP-3 について

(1) GCF 中のタンパク質発現レベルの合計量を、ELISA 法を用いて定量する。

(2) mRNA 遺伝子発現レベルを、qRT-PCR 法を用いて定量する。

(3) タンパク質レベルでの組織局在、および産性細胞、を免疫組織化学的手法で同定する。

(4) 得られた結果を慢性歯周炎及び歯肉増殖症との間で比較検討し、統計学的に解析する。

① 対象者

新潟大学医歯学総合病院 歯周病診療室を受診し、慢性歯周炎、及び薬剤性歯肉増殖症と診

断され、インフォームドコンセントの得られた患者各々10名、計20名を対象とする。

② 試料採取

歯肉溝内に Perio-paper ® (Harco Electronics) を10秒間3本挿入し GCF を採取する。各 Perio-paper の GCF 液量を Periotron 8000 (Harco Electronics) にて定量する。PBS バッファーに浸漬・溶解させ、遠心分離により上清を回収し、-80℃にて凍結保存する。また、歯周外科手術時に、歯周ポケット及び結合組織を含むように歯肉組織を採取する。得られた組織を生理食塩水で洗浄し、メスで二分する。PCR 用試料は RNA 安定化試薬 (RNA later® RNA stabilization reagent, QUIAGEN) に24時間浸漬保存後、-80℃にて凍結保存する。組織解析用試料は4%パラホルムアルデヒドに24時間浸漬固定

後、パラフィン包埋する。

③ 酵素免疫測定法(ELISA)

human-specific ELISA kit を用いて GCF 中における TACE, TIMP-3 の合計量を測定する。

④ qRT-PCR 解析

凍結しておいた歯肉は、ホモジナイザーにて均質化した後、RNA iso® (TaKaRa)を用いて、total

RNA を抽出する。PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa)を用いた逆転写酵素反応により cDNA

を合成する。cDNA は、PCR 反応を行うまでは、-20℃にて凍結保存する。試料の数が十分に確保された後、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystem Inc)を用いて、TACE, TIMP-3 について、特異的プライマーを用いて qRT-PCR を行う。得られた結果は β -actin で補正し、comparative threshold cycles(Ct 法)にて定量する。

⑤ 免疫組織学的解析

パラフィン包埋された組織をミクロトームにて 5 μ m の厚さに薄切し、パラフィン連続切片を 10 枚ずつ作成する。1 枚はヘマトキシリン-エオジン染色を行い、残りの連続切片を免疫組織化学に用いる。免疫組織化学には、Envision® / HRP Kit(DAKO)を用い、Envision 法にて TIMP-3, TACE の組織局在を検索する。免疫組織化学の 1 次抗体には、Anti-human TACE Cytosolic Domain Antibody(R&D systems)及び Rabbit Anti-TIMP-3 ポリクローナル抗体 (CHEMICON)を用いる。

⑥ 結果の評価、解析

・酵素免疫測定法(ELISA)法について
慢性歯周炎群と歯肉増殖症群との群間比較を行う。

群間比較については Kruskal-Wallis test の後に多重比較を行う。

統計解析は SPSS 16.0 を用いて行う。

・分子生物学的解析(qRT-PCR)について
TACE, TIMP-3 の Ct 値を β -actin 補正し、各々の相対定量値を算出する。
それらについて、慢性歯周炎群と歯肉増殖症群との群間比較を行う。

群間比較については Kruskal-Wallis test の後に多重比較を行う。

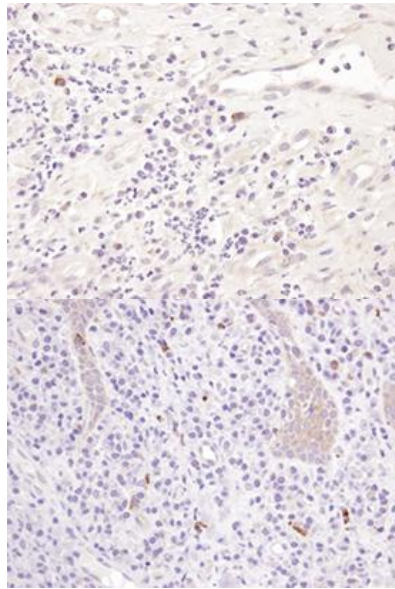
統計解析は SPSS 16.0 を用いて行う。また、各検定の有意水準は 5%に設定する。

・免疫組織化学的解析について
ヘマトキシリン-エオジン染色により炎症状態の評価を行う。
免疫組織化学にて、TIMP-3, 及び TACE の組織局在を同定し、連続切片上で写真を撮影

し、評価を行う。

4. 研究成果

TACE mRNA レベルは慢性歯周炎患者に比較して歯肉増殖症患者で有意に上昇していた。また、TIMP-3 mRNA レベルも同様に慢性歯周炎患者に比較して歯肉増殖症患者で有意に上昇していた。



・歯肉結合組織での TACE 免疫組織染色
上図はヒト歯肉増殖症歯肉組織中、下図では、歯周炎歯肉組織中においてマクロファージ様細胞の細胞質内に、免疫陽性が認められる。

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. Takayuki Tomita, Takehiko Kubota, Naohiro Nakasone, Toshiya Morozumi, Daisuke Abe, Satoshi Maruyama, Taro Shimizu, Makoto Horimizu, Takashi Saku and Hiromasa Yoshie. Gene and protein location of Tumour Necrosis Factor(TNF)- α converting enzyme in gingival tissues from periodontitis with drug-induced gingival overgrowth. Archives of Oral Biology. 査読(有り) in press.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Takayuki Tomita, Takehiko Kubota, Naohiro Nakasone, Toshiya Morozumi, Daisuke Abe, Satoshi Maruyama, Taro Shimizu, Makoto Horimizu, Takashi Saku and Hiromasa Yoshie. Gene and protein location of Tumour Necrosis Factor(TNF)- α converting enzyme in gingival tissues

from periodontitis with drug-induced gingival overgrowth. EUROPERIO7. 2012 年 06 月 06 日～2012 年 06 月 09 日. Messe Wien Exhibition & Conference Center(ウィーン).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 大輔 (Abe Daisuke)
新潟大学. 医歯学総合病院・医員

研究者番号：30609110

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：