

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670885

研究課題名(和文)ペリオスチンに着目した歯周病分子標的予防法の開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Preventive method for periodontal disease by regulation of periostin

研究代表者

栗原 英見 (KURIHARA, HIDEMI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：40161765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ペリオスチンは培養ヒト歯肉上皮細胞においてE-cadherinのタンパク発現を低下させた。このことからペリオスチンは歯肉上皮組織のバリア機能を低下させることが示唆された。Th2サイトカイン刺激下の上皮細胞が分泌するペリオスチンがTGFシグナルを活性化することが報告されている。そこでTGF-betaの歯肉上皮細胞に対する作用について検討したところ、TGF-betaはsmad2を介してミトコンドリア依存性アポトーシスを誘導した。アポトーシスは細胞間接着の低下を引き起こすことから、ペリオスチンによる上皮細胞バリア低下にTGF/sm2シグナルおよびアポトーシスが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periostin suppressed the expression of E-cadherin in human gingival epithelial cells, suggesting that periostin down-regulate the barrier function of gingival epithelium. Since it has been reported that periostin secreted from epithelial cells activates TGF signaling, we examined the effect of TGF-beta on apoptosis of epithelial cells. The results showed TGF-beta induced mitochondria-dependent apoptosis in huma gingival epithelail cells. As apoptosis is known to induce the reduction of epithelail barrier, it may be suggested that TGF-beta/sm2 signaling and apoptosis are involved in the periostin-indueeced suppression of epithelial barrier.

研究分野：歯周病学

キーワード：ペリオスチン 歯肉上皮 E-cadherin アポトーシス smad2 TGF-beta

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えるに当たり、高齢者の健康を守るには歯周病を含めた口腔内の感染症の予防は不可欠である。高齢者においては、身体的・精神的理由によるセルフケア能力の低下、また介護労力不足という社会的理由から、ブラッシング等による細菌バイオフィルムの機械的な細菌除去に加えて、宿主機能を制御する方法を組み合わせた予防法は高齢者の歯周病予防に必要であると考えられる。近年、アトピー性皮膚炎の慢性化において、Th2 サイトカインが線維芽細胞のペリオスチンの産生を誘導し、産生されたペリオスチンが再び上皮細胞に作用することで、上皮の炎症が進行、Th2 サイトカインの発現を増加させるというスパイラルが慢性炎症を持続させることが解明された。ペリオスチンは歯周靭帯のマーカーとして知られているがその役割に関しては未知である。

2. 研究の目的

歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞によるペリオスチンを中心とした歯周炎慢性化スパイラルの解明を目的とし、ペリオスチンをターゲットとした分子標的治療法の開発を目的とする。本研究では、ペリオスチンが慢性炎症のキーファクターである Th2 の活性化に関与していくメカニズムについて解明することを目的とし、特に歯肉上皮細胞に着目して以下の研究を行った。

3. 研究の方法

動物実験モデルを用いて炎症歯肉におけるペリオスチンの発現を検討した。マウスの臼歯部に絹糸を結紮し炎症性歯周組織破壊モデルを作成し、ペリオスチンの発現を免疫染色によって分析した。

一方、*in vitro*において、リコンビナントペリオスチンを作用させた培養ヒト歯肉上皮細胞を用いて、細胞間接着因子 E-cadherin のタンパク発現をウエスタンブロットで検討した。さらに歯肉上皮細胞のアポトーシスは上皮細胞のバリア低下に深く関わることから、アポトーシスを誘導するシグナルとして TGF-beta/sm α 2 シグナルに着目して解析した。リン酸化 sm α 2、抗アポトーシス遺伝子、アポトーシス促進遺伝子、cleaved caspase-3、-9 をウエスタンブロット法によって評価した。アポトーシスは TUNEL 法を用いて分析した。

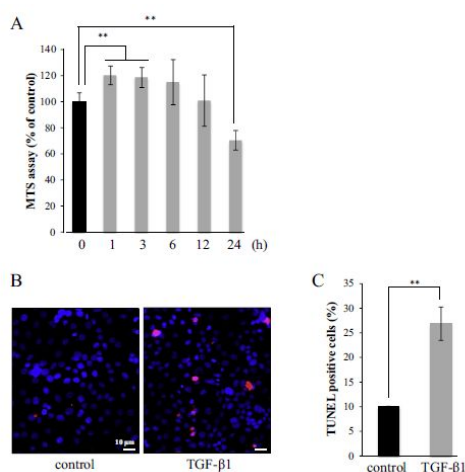
4. 研究成果

*in vitro*の実験では、リコンビナントペリオスチンを作用させた培養ヒト歯肉上皮細胞において、細胞間接着因子である E-cadherin のタンパク発現が低下した。このことからペリオスチンが歯肉上皮に作用し、歯肉上皮組織のバリア機能を低下させることが示唆された。

次に、ペリオスチンがバリア機能を低下させるメカニズムの解析を行った。Th2 サイトカイン刺激下の上皮細胞が分泌するペリオスチンが TGF シグナルを活性化することが報告されている。そこで TGF-beta の歯肉上皮細胞に対する作用について検討したところ、TGF-beta は sm α 2 シグナルを介してミトコンドリア依存性のアポトーシスを誘導した(図1)。さらに TGF-beta レセプター-siRNA 導入、TGF-beta レセプターI インヒビター(SB431542)を用いた抑制実験によって TGF-beta 刺激によるアポトーシスは TGF-beta レセプターリン酸化を介していることが示唆された。この結果から、ペリオスチンによる上皮細胞バリア低下に TGF/sm α 2 シグナルおよびアポトーシスが関与すること可能性が示唆された。

一方で、このペリオスチンが炎症歯肉線維

芽細胞から誘導されるかどうかを検討するため、炎症性サイトカイン IL-1beta を歯肉線維芽細胞に作用させたが、mRNA での発現の変化、さらにスプライシングバリエーションにも差が認められなかった。また、マウス臼歯結紮歯周炎モデルで、ペリオスチン抗体を用いた免疫染色を行ったところ、結合組織において、コントロール群、歯周炎群ともに歯根膜組織から連続した陽性細胞が認められたが、両群間において顕著な差は認められなかった。これらのことから、炎症歯肉結合組織においてはペリオスチンの誘導は確認されなかった。



(図1) TGF-beta 刺激は歯肉上皮細胞のアポトーシスを誘導した。A) MTS assay (TGF-beta 作用時間の影響) B, C) TUNEL assay

以上の結果から、ペリオスチンによる上皮細胞のバリア機能の低下には TGF-beta/smard2 シグナルが関与する可能性が示唆されたが、ペリオスチンの由来に関しては更なる検討が必要とされる。

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. Yoshimoto T., Fujita T., Kajiya M., Matsuda S., Ouhara K., Shiba H., Kurihara H. Involvement of smad2 and Erk/Akt cascade in TGF-β1-induced apoptosis in human gingival epithelial cells. *Cytokine*. (査読有) 印刷中.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Yoshimoto T., Fujita T., Kajiya M., Shiba H., Kurihara H. TGF-beta1 induces mitochondria-dependent apoptosis in human gingival epithelial cells. 92nd General Session & Exhibition of International Association of Dental Research, 25-28th June 2014, Capetown (Republic of South Africa)
2. 吉本哲也, 藤田 剛, 應原一久, 内田雄士, 松田真司, 宮川剛史, 今井遙香, 柴 秀樹, 河口浩之, 栗原英見. Aggregatibacter actinomycetemcomitans の outer membrane protein-29 はヒト歯肉上皮細胞において smad2 を介してアポトーシスシグナルを誘導し、E-cadherin の発現を減少させる, 日本歯科保存学会第 136 回春季学術大会, 2012 年 6 月 28 日, 沖縄コンベンションセンター

〔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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
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

栗原英見 (KURIHARA HIDEMI)
広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授
研究者番号：40161765

(2) 研究分担者

内田雄士 (UCHIDA YUUSHI)
広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教
研究者番号：40363080

藤田 剛 (FUJITA TSUYOSHI)
広島大学・病院・講師
研究者番号：80379883

(3) 連携研究者

()

研究者番号：