

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893158

研究課題名(和文) 歯周病変局所におけるTh17細胞に対するAdrenomedullinの影響

研究課題名(英文) The effect of adrenomedullin on Th17 cells in periodontal disease.

研究代表者

細川 育子 (HOSOKAWA, Ikuko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50707908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯周組織構成細胞の一つであるヒト歯肉線維芽細胞(HGFs)を用い、歯周炎の進行に参与しているTh1細胞浸潤に関わるケモカインであるCXCL10産生に及ぼす新規ペプチドのAdrenomedullin(AM)の影響を明らかとすることを目的とし実験を行った。その結果、AMIはTNF- α が誘導したHGFsのCXCL10産生を抑制することが明らかとなった。これらのことより、AMIは歯周炎病変局所でTh1細胞浸潤を抑制し、歯周炎の進行を抑えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of adrenomedullin (AM) on CXCL10, which is related with Th1 cells migration, production from TNF- α -stimulated human gingival fibroblasts (HGFs) in this study. We found that AM could inhibit CXCL10 production from TNF- α -stimulated HGFs. Therefore, AM could decrease the number of Th1 cells in periodontal lesion to inhibit CXCL10 production from HGFs. These results might explain that we might use AM for periodontal disease treatment because AM could inhibit inflammatory mediator expression, such as CXCL10, from periodontal resident cells.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎 Th1 Adrenomedullin 繊維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周炎はデンタルプラーク中に含まれる細菌により惹起される慢性炎症疾患であり、宿主の免疫応答が関与していることが明らかとされている。

免疫担当細胞の中でもヘルパー T 細胞の一種である Th1 細胞が歯周炎の歯槽骨吸収に関与していることが示唆されている。Kawai らはラットの歯周炎モデルにおいて Th1 細胞が Th2 細胞と比較し有意に歯槽骨吸収を誘導したことを報告している (Kawai et.al. J.Immunol. 164(4); 2102-2109, 2000)。また、Th1 細胞は CXCR3 と呼ばれるケモカインレセプターを発現しており、そのリガンドである CXCL10 が Th1 細胞の炎症局所への浸潤・集積に関与していることが明らかとなっている (Patel et.al. Clin Immunol. 98(1); 39-45, 2001)。歯周炎においても CXCL10 が発現しており、歯周組織構成細胞の一つであるヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) を炎症性サイトカインで刺激すると CXCL10 産生が誘導されることも明らかとなっている (Hosokawa et.al. J Periodontal Res. 44(2); 225-231, 2009)。

Adrenomedullin (AM) はヒト褐色細胞腫から同定されたペプチドであるが、多くの組織で発現していることが明らかとされている。また、当初は血管に作用し降圧作用を示すのが主な作用であると考えられていたが、近年は免疫担当細胞に作用し免疫調節作用があることも報告されている。しかしながら、歯周炎で AM が発現しているという報告はある (Turkoglu et.al. J Periodontol. 81(2); 284-291, 2010) が、その役割に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、AM の免疫調節作用に着目し、Th1 細胞浸潤に関与する CXCL10 の HGFs からの産生に与える AM の影響を明らかとすることを目的とし研究を行った。また、AM が HGFs の CXCL10 産生に関与するシグナル伝達経路に与える影響に関しても明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯肉組織試料の採取および HGFs の調整: 矯正治療のための便宜抜歯を行う患者において、抜歯部位のポケット深さが 3mm 以下で BOP を認めないことを確認した後、抜歯時に得られた歯肉片を正常歯肉組織として採取した。採取した正常歯肉組織から outgrowth 法を用い、HGFs を得た。

(2) 歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に与える AM の影響の解析: (1) の条件で採取した HGFs を AM (1, 10, 100 nM) 存在下あるいは非存在下で TNF- (10 ng/ml) で 24 時間刺激した。その後、培養上清を採取し、ELISA

法にて CXCL10 濃度を解析した。

(3) 歯肉線維芽細胞の cAMP 産生に与える AM および TNF- の影響の解析: (1) の条件で採取した HGFs を AM (100 nM) 存在下あるいは非存在下で TNF- (10 ng/ml) で 24 時間刺激した。その後、培養上清を採取し、酵素免疫測定法にて cAMP 濃度を解析した。

(4) 歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に与える PKA 経路および cAMP の影響の解析: (1) の条件で採取した HGFs を Folskolin (0.1, 1, 10 μ M: PKA activator) あるいは cAMP (0.1, 1, 10 μ M) 存在下あるいは非存在下で TNF- (10 ng/ml) で 24 時間刺激した。その後、培養上清を採取し、ELISA 法にて CXCL10 濃度を解析した。また、PKA 経路の役割を確認するために AM および TNF- 存在下で H-89 (0.01, 0.1, 1 μ M: PKA inhibitor) を添加し、CXCL10 濃度を ELISA 法で解析した。

(5) 歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に与える PI3K 経路の影響の解析: (1) の条件で採取した HGFs を LY294002 (0.2, 2, 20 μ M: PI3K inhibitor) 存在下あるいは非存在下で TNF- (10 ng/ml) で 24 時間刺激した。その後、培養上清を採取し、ELISA 法にて CXCL10 濃度を解析した。

(6) AM および PKA 経路が歯肉線維芽細胞の Akt リン酸化に及ぼす影響の解析: (1) の条件で採取した HGFs を AM (100 nM) および H-89 (1 μ M: PKA inhibitor) で前処理後、TNF- (10 ng/ml) で 15 分、30 分あるいは 60 分刺激した後、タンパクを回収した。その後、western blot 法を用い、Akt のリン酸化を解析した。

4. 研究成果

(1) AM が TNF- が誘導する HGFs の CXCL10 産生に与える影響: TNF- (10 ng/ml) は HGFs の CXCL10 産生を誘導したが、AM (100 nM) は HGFs の CXCL10 産生を誘導しなかった。しかしながら、AM は TNF- が誘導した CXCL10 産生を濃度依存的に有意に抑制した。

(2) AM が HGFs の cAMP 産生に及ぼす影響: AM が HGFs 以外の細胞において cAMP 産生に影響を与えることが報告されている (Shimekake et.al. J Biol Chem. 270(9); 4412-4417, 1995)。ゆえに HGFs においても cAMP 産生を調べた。TNF- は無刺激 HGFs の cAMP 産生を有意に抑制した。AM は TNF- が抑制した cAMP 産生を元のレベルまで回復させた。

(3) cAMP および PKA 経路が TNF- が誘導する CXCL10 産生に与える影響: (2) の結果より AM は cAMP 産生を上昇させることが明らかとなった。次に cAMP および cAMP が活性化する PKA 経路に関して検討を行った。その結果、cAMP および Forskolin (PKA activator) は TNF- が誘導する CXCL10 産生を有意に抑制した。

(4) AM の CXCL10 抑制作用に PKA 経路が関与するか?: (2) の結果より AM が cAMP を上昇させることから PKA 経路が活性化されることが考えられる。次に活性化された PKA 経路が AM の CXCL10 産生抑制作用に関与しているか否かを調べるために H89 (PKA inhibitor) を用いて検討した。その結果、H89 は AM が抑制した TNF- 刺激 HGFs の CXCL10 産生を元に戻した。

(5) TNF- が誘導する HGFs の CXCL10 産生に与える PI3K-Akt 経路の影響: PKA 経路は Akt リン酸化に影響を与えることが報告されている (Rebecca et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 303(1); E1-E17, 2012)。ゆえに PI3K-Akt 経路が CXCL10 産生に関与している可能性が考えられる。最初に TNF- が誘導する CXCL10 産生に PI3K-Akt 経路が関与しているか LY294002 (PI3K inhibitor) を用いて検討した。その結果、LY294002 は TNF- が誘導した CXCL10 産生を有意に抑制した。

(6) AM が TNF- が誘導する HGFs の Akt リン酸化に与える影響: (5) の結果より Akt が正に CXCL10 産生を制御している事より、AM がその経路を抑制している可能性が考えられた。その仮説を確認するために western blot 法にて TNF- が誘導した Akt リン酸化に与える AM の影響を見た。その結果、TNF- が誘導した Akt リン酸化を AM は抑制した。

(7) PKA 経路が AM の Akt リン酸化抑制作用に与える影響: 最後に AM が活性化する PKA 経路が AM の Akt リン酸化抑制作用に与える影響について検討した。その結果、H89 (PKA inhibitor) は AM が抑制した TNF- 刺激 HGFs の Akt リン酸化を元のレベルに回復した。

【まとめ】

歯周炎病変局所において AM は HGFs の CXCL10 産生を抑制することにより Th1 細胞浸潤を減少させている可能性が考えられた。また、この抑制作用に AM が活性化する cAMP-PKA 経路が関与し、PKA 経路は Akt リン酸化を抑制することにより TNF- 刺激 HGFs の CXCL10 産生を減少させている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3件)

Yoshitaka Hosokawa, Satoru Shindo, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, IL-6 trans-signaling enhances CCL20 production from IL-18-stimulated human periodontal ligament cells. *Inflammation*, 37 巻、381-386 頁 (2014 年) 査読有、DOI: 10.1007/s10753-013-9750-8.

Satoru Shindo, Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Genipin inhibits IL-18-induced CCL20 and IL-6 production from human periodontal ligament cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33 巻、357-364 頁 (2014 年) 査読有、DOI: 10.1159/000356675.

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, IL-22 enhances CCL20 production in IL-18-stimulated human gingival fibroblasts. *Inflammation*, 37 巻、2062-2066 頁 (2014 年) 査読有、DOI: 10.1007/s10753-014-9939-5.

[学会発表](計9件)

Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo: Melatonin inhibits inflammatory mediators productions in human periodontal ligament cells. 93rd General Session & Exhibition of the IADR (2015.3.12, Hynes Convention Center, Boston, USA)

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo: IL-4 modulates chemokine productions from IL-1 -stimulated human periodontal ligament cells. 93rd General Session & Exhibition of the IADR (2015.3.12, Hynes Convention Center, Boston, USA)

Satoru Shindo, Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo: The effect of genipin on dendritic cells activation. 93rd General Session & Exhibition of the IADR (2015.3.12, Hynes Convention Center, Boston, USA)

進藤智、細川義隆、細川育子、尾崎和美、

松尾敬志、shikonin がヒト歯根膜由来細胞の IL-6 および IL-8 産生に与える影響、第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2014.10.30, 山形テルサ、山形県山形市)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、松尾敬志、活性型ビタミン D は IL-1 刺激ヒト歯根膜細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制する、第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会(2014.6.20, 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール、滋賀県大津市)

進藤智、細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志、genipin は E.coli LPS が誘導するヒト歯根膜細胞の IL-6 および IL-8 産生を抑制する、第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会(2014.6.20, 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール、滋賀県大津市)

北中祐太郎、細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、松尾敬志、genipin は TNF- α が誘導するヒト歯根膜細胞の IL-6 産生を抑制する、第 57 回春季日本歯周病学会学術大会(2014.5.23, 岐阜県長良川国際会議場、岐阜県岐阜市)

Satoru Shindo, Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Takashi Matsyo: The effect of genipin on MMP-1 and MMP-3 expression in IL-1 α -stimulated human periodontal ligament cells, 13th Joint scientific meeting of JSCD-KACD(2013.11.23, The K Hotel & Resort, 慶州市、韓国)

進藤智、細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志: Genipin は IL-1 β が誘導するヒト歯根膜細胞の CCL20 および IL-6 産生を抑制する、第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2013.10.17, 秋田県総合生活文化会館、秋田県秋田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 育子 (HOSOKAWA, Ikuko)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号: 50707908