

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11424

研究課題名(和文) 歯肉上皮中の前駆蛋白分解酵素ADAMsを標的とした歯周病予防薬の開発

研究課題名(英文) Study of drug development targeting ADAMs in gingival epithelium for prevention of periodontal diseases

研究代表者

栗野 秀慈 (Awano, Shuji)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20301442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ADAM17は、TNF- α 転換酵素で炎症性サイトカインのTNF- α の産生に関わっている。本研究では歯肉上皮中で発現しているADAM17をターゲットとした歯周病予防薬の開発の可能性について検証を行った。本研究結果、ADAM17 が歯肉上皮ならびに口腔のケラチノサイト(HOKs)に強く発現しており、またHOKsからLPSによって産生されるTNF- α のレベルが、ADAM17の阻害剤やADAM17のmRNAの発現を抑制するsiRNA処理によって、減少することを明らかとし、歯肉上皮中に発現しているADAM17が口腔ケラチノサイトで産生されるTNF- α を制御する一つの重要な酵素であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17), one of proteases belonging ADAMs family, is a tumor necrosis factor (TNF)-converting enzyme that cleaves the prodomain of TNF- α , a proinflammatory cytokine that plays a central role in immune regulation and a variety of inflammatory responses in destructive periodontal disease. This study verified the possibility of ADAM17 in the gingival epithelium as a target for drug development to prevent periodontal diseases. Strong immunoreactivity for ADAM17 was observed in the epithelium of the inflamed gingival tissues and in human oral keratinocytes (HOKs). Furthermore, treatment with either ADAM17 inhibitor or ADAM17 siRNA inhibited the generation of TNF- α induced by lipopolysaccharide (LPS) in HOKs. The present study demonstrates that ADAM17 is strongly expressed in the epithelium of gingival tissues and suggests that ADAM17 may be a key enzyme that regulates the generation of TNF- α in oral keratinocytes.

研究分野：予防歯科

キーワード：歯周病予防 メタロプロテアーゼ TNF- α ADAM17

1. 研究開始当初の背景

メタロプロテアーゼである ADAMs は、結合組織の主要構成成分である細胞外マトリックス (ECM) 蛋白質及び細胞表面における重要な蛋白分解反応 (shedding: シェディング) を触媒している他、サイトカイン、成長因子、細胞接着分子、及び受容体の放出、シグナル伝達、細胞成長、細胞-細胞及び細胞-マトリックスの相互作用に関連するプロセスを触媒する。現在まで ADAMs はヒトゲノムにおいて 23 種類が同定されている。最近になり、その中のいくつか特定の ADAMs 活性の増進は、癌、関節リウマチ、変形性関節症、炎症性腸疾患、及び心臓疾患を含む多くの重大な疾患の病態の発生に関連していることが明らかになってきている。その一方、ADAMs の生体内における役割については、その多くは未だ不明のまま、口腔内における ADAMs についても同様である。歯周病と ADAMs との関係では、歯周炎を有する歯の歯肉溝液中や歯周組織中の ADAM17 のレベルが増加し、骨破壊に関連する RANKL と関連していたとの報告 (J Dent Res. 87: 273-77, 2008 and BMB reports 44:473-7, 2011) や、薬剤性歯肉増殖症の歯周組織内において ADAM17 の発現が増加しているという報告 (Arch Oral Biol 58: 1013-20, 2013)、また ADAM28 は歯根膜幹細胞の細胞増殖、アポトーシスや異形性を操作できることを実証した報告があるが (J Periodontol. 81:934-44, 2010.)、その数は多くはない。一方、申請者は歯周病原性細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* が前駆蛋白分解酵素の 1 つである endthelin-converting enzyme (ECE)-1 様の性質を有するエンドペプチダーゼ PgPepO を有することを明らかにして以来 (Awano S, et al., FEBS Lett. 460: 139-44, 1999)、口腔内におけるエンドペプチダーゼに関連する研究を現在まで行ってきている。その中で、申請者らの研究チームは歯周組織における ECE-1 のジェディングにより産生されるエンドセリン (ET-1) の発現の局在性ならびに *P. gingivalis* 感染の影響について (Yamamoto E, Awano S, et al., J Periodont Res. 38: 417-21, 2003)、また口腔扁平上皮細胞における 4 種類の ECE-1 isoform (a,b,c,d) の細胞内における局在性を明らかにし、口腔癌細胞と正常細胞との発現の違いについて検証を行いエンドセリンシステムの口腔癌との関連について報告した (Awano S, et al., Int. J. Cancer 118: 1645-52, 2006)。一方、歯肉上皮細胞を用いて歯周炎における前駆蛋白分解酵素の 1 つの Neutral endopeptidase (NEP) の抗炎症作用について検証し、細菌由来の LPS などの刺激により細胞から産生される炎症性

ペプチドの substance P と IL18 が NEP によって制御されていることを (Nakata M, Awano S, et al., Eur J Oral Sci 121: 434-442, 2013)、別の研究では口腔粘膜における ADAMs の ADAM-17 mRNA 発現レベルと歯周健康状態との関連性があることを報告した (Kinoshita N, Awano S, et al., J Periodontal Res 48: 606-614, 2013)。また最近、ADAM17 が歯周組織中の歯肉上皮細胞に強く発現し、歯周疾患ならびに口腔癌などの口腔疾患と関連する可能性を学会で報告している (口腔衛生学会雑誌 64: 198, 2014)。このように、口腔における様々な前駆蛋白分解酵素は、口腔癌や歯周疾患の病態に関連している可能性があり、口腔疾患の新たな治療における標的になる可能性を有している特に ADAM17 のように ADAMs の中には、炎症性ネットワークで重要な役割を担う TNF- α などの様々な炎症メディエーターの産生に関わっているものがあり、口腔炎症性疾患の代表である歯周病における ADAMs について探求していくことは、新たな歯周病予防・治療の戦略を構築する上でも重要であると考えられる。また現在までの申請者らの研究の成果で、ADAM17 が歯肉上皮細胞においても強く発現していることが明らかとなり、歯垢中の歯周病原性細菌の影響を最初に直接受ける歯肉上皮細胞において ADAMs を標的とした TNF- α などの炎症性ネットワークの制御を考えることは、歯周病の初期段階における発症を防ぐことにつながり結果的に歯周病予防薬の新たな開発に結びつくものと期待される。

2. 研究の目的

歯周炎の発症に関連する病原性細菌の影響を最初に直接受ける歯肉上皮組織中の TNF- α (腫瘍壊死因子) などの産生に関与している前駆蛋白分解酵素である ADAMs の動態を明らかにし、歯周炎の初期段階における TNF- α などから起因する炎症性ネットワークの阻害をターゲットにした歯周病予防のための創薬の可能性を検討する。

3. 研究の方法

歯周組織、歯肉上皮細胞や口腔扁平上皮癌細胞上の ADAM17 の発現状況を蛍光免疫染色のあと共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。
歯肉上皮細胞を *P. gingivalis* と *E. coli* 由来の LPS にて刺激した前後の、ADAM17 の局在や発現の動態を、蛍光免疫細胞染色法にて観察した。
LPS 刺激前後のそれぞれの細胞における ADAM17 と TNF- α の前駆体である pro-TNF- α の mRNA レベルと蛋白質レベルの発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法とウェスタンブロッティング

法にて測定した。また、細胞外に分泌された TNF- α の培養上清中の濃度を ELISA 法にて測定した。

ADAM17 活性阻害剤ならびに ADAM17siRNA を用いて、LPS 刺激下における歯肉上皮細胞中の pro-TNF- α の蛋白質レベルの発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法とウェスタンブロッティング法にて測定する。また、細胞外に分泌された TNF- α の培養上清の濃度を ELISA 法にて測定した。

九州歯科大学倫理委員会に申請・許可を得た後、同大学附属病院に来院中の患者から、同意の上、歯肉縁下プラークと相当部位の歯肉溝浸出液の採取を行った。またサンプリングを行った患者の歯周健康状態ならびに全身健康状態について併せて記録した。採取されたプラークを適時処理し、Porphyromonas gingivalis、Tannerella forsythia、Treponema denticola などの歯周病原性細菌レベルを DNA チップ法に定量分析を行った。同時に採取された歯肉溝液中の ADAM17 と TNF- α の蛋白質レベルを ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

本研究の結果、ADAM17 が歯肉上皮ならびに口腔のケラチノサイト(HOKs)に強く発現しており、また HOKs から LPS によって産生される TNF- α のレベルが、ADAM17 の阻害剤や ADAM17 の mRNA の発現を抑制する siRNA 処理によって、減少することを明らかとし、歯肉上皮中に発現している ADAM17 が口腔ケラチノサイトで産生される TNF- α を制御する一つの重要な酵素であることが示唆された。

歯周病患者の歯肉溝液中の ADAM17 と TNF- α レベルと歯肉溝液を採取した同一部位の歯肉縁下プラーク中の口腔内細菌叢の違い、また臨床的な病態との関係を検証したが、明確な関係性を示すためのデータが取得できず、継続的に現在においても検証中である。

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)

Hirayama A, Awano S, Seta Y, Ansai T. ADAM17 regulates TNF- α expression upon lipopolysaccharide stimulation in oral keratinocytes. Biomed Res. 38(3):157-165. 2017. doi: 10.2220/biomedres.38.157.

〔学会発表〕(計1件)

村野綾、粟野秀慈、岩崎正則、邵仁浩、

安細敏弘:歯肉上皮細胞における ADAM17 と TNF- α の関係について.第 64 回 日本口腔衛生学会・総会(2015年5月27-29日、つくば市).

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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

粟野秀慈 (Shuji Awano)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20301442

(2)研究分担者

邵仁浩 (Inho Soh)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 10285463

安細敏弘 (Toshihiro Ansai)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80244789

岩崎正則 (Masanori Iwasaki)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 80584614

角田聡子 (Satoko Kakuta)
九州歯科大学: 歯学部・助教
研究者番号: 70364156

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者 ()