

平成 21年 5月 7日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号：19791621
 研究課題名(和文) プロスタグランジン E 受容体作用薬を用いた歯周炎進行抑制のための薬物応用
 研究課題名(英文) A study of pharmacotherapy using prostaglandin agents for suppress of periodontal progression
 研究代表者
 滝口 尚 (TAKIGUCHI TAKASHI)
 昭和大学・歯学部・助教
 研究者番号：60317576

研究成果の概要：ヒト抹消血単球細胞 THP-1 細胞由来マクロファージにおいて、IL-1 依存性のケモカイン産生に対して PGE₂ の作用を検討した結果、IL-8, RANTES, MIP-1 ,MCP-3 の産生が、PGE₂ 添加により有意に抑制することが確認された。また、THP-1 細胞における E P 受容体の発現を確認した結果、EP1, 2, 3, 4 は恒常的に発現していることが確認された。さらに、EP2 および EP4 アンタゴニストを用いて IL-1 依存性 IL-8 産生における PGE₂ の作用を検討した結果、EP4 アンタゴニストは PGE₂ により抑制された IL-8 産生を有意に増加させたが、EP2 アンタゴニストは影響を及ぼさなかった。

今回の研究よりPGE₂の抗炎症作用にはEP4受容体が関係していることが確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：

PGE₂ ケモカイン 重度歯周炎

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周疾患におけるプロスタグランジンE₂ (PGE₂)の役割

炎症歯肉組織中には健康な歯肉組織中と比べてPGE₂レベルが約20倍増加しているおり、歯肉溝滲出液中(GCF)にもPGE₂が検出され、そのレベルは歯肉組織中のPGE₂レベルと相関している。(Goodson JM *et.al.* Prostaglandins 6, 81-85, 1971) また、GCF中の

PGE₂レベルと付着歯肉のアタッチメントロスの関係や、近年ではGCF中のPGE₂量と妊婦羊水中のPGE₂には正の相関関係が報告され、(Offenbacher S *et.al.* J Periodontol. 67 1103-1113, 1996) 歯周病と低体重児出産が社会的に認知されてきた。

(2) PGE₂の炎症反応と抗炎症反応

PGE₂はアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)を律速酵素として産生される

代表的な生理活性脂質で、古くから炎症性メディエーターとして認識されてきた。事実、炎症時に惹起される中枢性の発熱や局所での血管透過性の亢進には、PGE₂が必須なことがよく知られている。しかしながら好中球やマクロファージは細菌感染時に大量のPGE₂を放出するが、PGE₂はこれら炎症性細胞でのサイトカイン産生を抑制することが報告されている。

(3) PGE受容体の骨形成、抗炎症性作用

PGE₂受容体には4種類のサブタイプが存在し、骨形成に関しては各EP受容体欠損マウス、受容体アゴニストの研究からPGE₂の骨形成はEP₄受容体を介すことが明らかとなった (Yoshida K et.al. Proc Natl Acad Sci. 99, 4580-4585. 2002) さらに、EP₄受容体がマクロファージにおいて抗炎症活性を担うことが受容体アゴニスト、アンタゴニストを用いることで明らかとなった。(Takayama K et.al. J. Biol. Chem. 277, 44147-44154, 2002) 各EP受容体の特異的に刺激または阻害する医薬品を開発し、臨床応用することができれば、関節リウマチ、動脈硬化症などの炎症性疾患の治療薬として期待される。一方、申請者は歯周組織構成細胞の歯根膜細胞と骨芽細胞においてEP₂, EP₄受容体が存在し、PGE₂依存的に各受容体が増加することとEP₂, EP₄受容体がPGE₂依存的な骨形成能(Smad1のリン酸化)に重要であることを報告した。そこで申請者は、歯周炎進行抑制のための薬物療法の確立のために、EP受容体作用薬を用いて以下の目標に取り組むことにした。

2. 研究の目的

(1) PGE₂によるケモカイン産生の抑制効果：ヒト末梢血由来のモノサイト・マクロファージ(THP-1)細胞を用いてIL-1が誘導する各種ケモカインに対するPGE₂の抑制作用を明らかにする。

(2) THP-1細胞におけるPGEレセプターの確認：

THP-1細胞表面に存在するEP_{1,2,3,4}レセプターの存在をRT-PCR法にて確認する。

(3) 抗炎症EPレセプターの検討：

IL-1が誘導するIL-8産生に対するPGE₂の抑制作用をEP_{2,4}レセプターantagonistを用いて検討する。

3. 研究の方法

細胞培養：ヒト末梢血由来細胞 THP-1 を 5% 牛胎児血清を含む RPMI1640(Gibco)で 5% CO₂、95%air37 条件下で培養し、10ng/ml の phorbol myristate acetate(PMA)(Wako) を 24 時間添加し、マクロファージに分化させた。

RT-PCR法：THP-1細胞は6穴プレートに1×10⁶個/穴の割合で10ng/mlのPMA添加し播種した。培養24時間後、IL-1(5ng/ml)あるいはPGE₂(10nM)を添加しさらに6時間、12時間培養した。その後細胞を回収し全RNAを抽出した。cDNAは全RNA(2.0mg)から逆転写酵素(SuperScript™II)とオリゴ(dT)プライマー(Invitrogen)を用いて合成したのち、遺伝子増幅を行った。

使用したPCRプライマー配列は以下に示す通りである。

EP1:5'-ATCTGCTGGAGGCCAATGCTGGTGT-3'(forward),5'-AGTCGTTGGGCCTCTGTTGTGCTT-3'(reverse)

EP2:5'-CCTGGCCGTGCTGCCTGTCATCTAT-3'(forward),5'-CCATGGAVACCCTTTCCCTCTCCT-3'(reverse)

EP3:5'-TTCGGGCTGACCATGACTGTTTTCG-3'(forward),5'-GAGGCGAAGAAAAGTTGCCCCAGT-3'(reverse)

EP4:5'-TTTGCAGGCCATCCGAATTGCTTCT-3'(forward),5'-CCTGCCTCCAAGGCCATTTTCACTGG-3'(reverse)

IL-8:5'-CGATGTCAAGTGCATAAAGACA-3'(forward),5'-TGAATTCTCAGCCCTTCAAAA-3'(reverse)

RANTES:5'-GAAGGTCTCCGCGGCAGCC-3'(forward),5'-CTGGGCCCTTCAAGGAGCGG-3'(reverse)

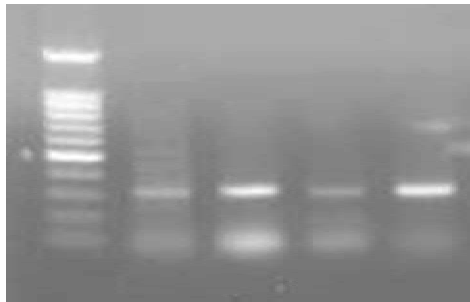
MCP-3:5'-AAAACAAGCCATGACTTGAGAA-3'(forward),5'-ATTTGGGAGTCATACATATGCA-3(reverse)

ELISA法：PGE₂(10mM - 1nM)あるいはIL-1(5ng/ml)およびEP₄antagonist(H161982,10nM),EP₂antagonist(AH6809,10nM)で72時間培養後、培養上清中に分泌されたIL-8, MCP-3産生量をhumanIL-8, human MCP-3 ELISA kit(R&D Systems)を用い、吸光度を450nmにて測定した。

4. 研究成果

THP-1由来マクロファージにおけるEPレセプター遺伝子発現の確認：THP-1細胞に発現しているEPレセプター1,2,3,4を確認するためにRT-PCR法にて確認した結果、EP_{1,2,3,4}は恒常的に発現していることが確認された。(Fig1)

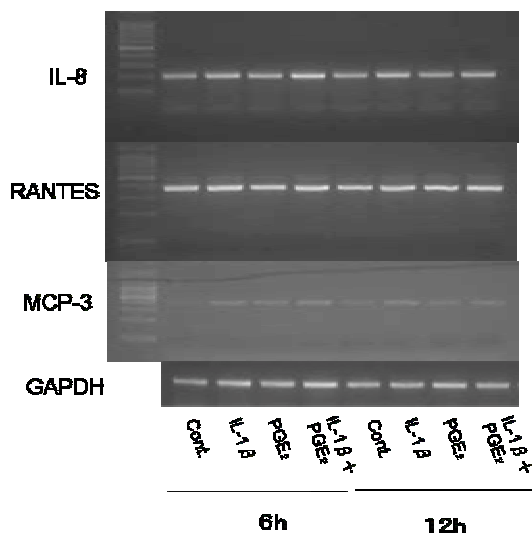
Fig1



THP-1 細胞における EP レセプター mRNA 発現

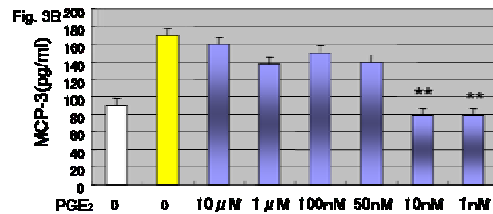
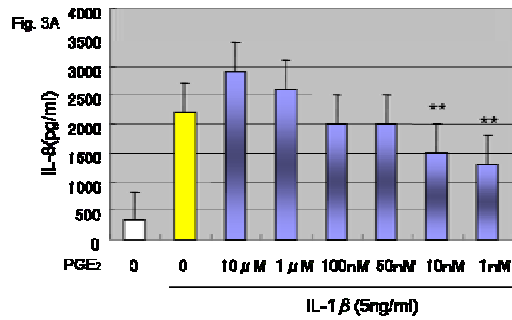
THP-1 由来マクロファージにおける IL-8, RANTES, MCP3 mRNA 発現に及ぼす IL-1 および PGE₂ の影響 : IL-8 および MCP-3 mRNA 発現は IL-1 刺激により 6, 12 時間ともにコントロールと比較して増加していることが確認された。またこの発現は、IL-1 と PGE₂ を同時添加することで、12 時間後に抑制されることが確認された。一方で RANTES の mRNA 発現の変化は認められなかった。(Fig2)

Fig2



THP-1 細胞における IL-8, RANTES, MCP-3 mRNA 発現

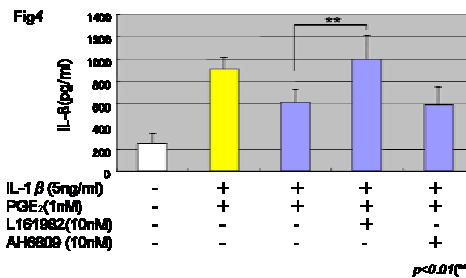
THP-1 由来マクロファージにおける IL-8, MCP-3 タンパクに及ぼす PGE₂ の影響 : IL-8, MCP-3 のタンパク質発現を確認するため ELISA 法を行った。IL-1 刺激した THP1 培養上清中の IL-8, MCP-3 を確認したところ IL-8, MCP-3 はコントロールと比較して有意に増加していることが確認された。また増加した IL-8, MCP-3 は PGE₂ (10nM, 1nM) を同時添加することで有意に抑制された。(Fig3A, 3B)



The difference from the values in the cells treated with rIL-1β alone was significant at $p < 0.01$ (**)

PGE₂ 各濃度における培養上清中の IL-8, MCP-3 産生

PGE₂ 依存的 IL-8 産生抑制に対する EP₄, EP₂ の作用 : PGE₂ (1nM) により抑制された IL-1 依存的 IL-8 産生は EP₄ antagonist (10nM) により回復した。しかし EP₂ antagonist は影響を及ぼさなかった。(Fig4)



IL-8 産生における EP₂, EP₄ antagonist の影響
統計処理 : 実験結果は全て平均 ± S.D. で表示し、統計解析は Student-Newman-Keuls 法を用いた。

考察

PGE₂ は 4 種類の PGE レセプター EP₁, EP₂, EP₃, EP₄ と結合することが報告されている。EP₁ は細胞内 Ca 濃度上昇系に作用し、EP₂, EP₄ はアデニル酸シクラーゼ促進系に作用する。本研究において THP-1 細胞由来マクロファージにおける EP レセプターを確認したところ、EP₁, EP₂, EP₃, EP₄ は恒常的に発現していることが確認された。特に EP₂, EP₄ の発現は他の EP 発現より強いことが確認された。一方で、健常者の抹消血由来マクロファージにおいては EP₄ のみが発現しているとの報告もある。

IL-1 は THP-1 細胞において IL-8 産生を増加することが報告されている。本研究においても同様の結果が得られた。さらにヒト単

球、T細胞、好中球の走化性を示す MCP-3 について検討した結果、IL-1 依存的に増加することが確認された。この作用は遺伝子レベルでも同様に観察された。また、IL-1 で誘導された IL-8, MCP-3 産生に対する PGE₂ の影響を検討した結果、PGE₂ の濃度が 10nM 以下において有意に抑制することが確認された。一方で、近年自己免疫性炎症で重要なケモカインである RANTES について検討してみたが、遺伝子レベル、タンパク質レベルで影響は認められなかった。

PGE₂ による IL-1 依存的 IL-8 産生抑制作用を EP₂, EP₄ antagonist を用いて検討した結果、EP₄ antagonist において PGE₂ 依存的抗炎症性活性が抑制されることが確認された。興味深いことに、EP₂ も発現が確認されているが、EP₂ の抗炎症性作用は弱いと考えられる。以上の結果から、PGE₂ の代わりに EP₄ 特異的 agonist を用いれば、PGE₂ の抗炎症作用のみを利用できると考えられる。

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0件)

[学会発表](計0件)

[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:

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

滝口 尚 (TAKIGUCHI TAKASHI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号: 60317576