

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 24 年 4 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592622

研究課題名（和文）薬剤性歯肉線維化局所におけるコラゲナーゼインヒビターの役割

研究課題名（英文）Pathological roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in the tissues of drug-induced fibrous gingival over growth.

研究代表者

久保田 健彦（KUBOTA TAKEHIKO）

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：50303136

研究成果の概要（和文）：第 1 報「TIMP-3, TIMP-4 の歯肉増殖症、歯周炎罹患歯肉組織中における遺伝子発現レベルおよび免疫組織化学的局在」を当該分野で初めて *Archs Oral Biology* (2009) に報告した。本研究シリーズの成果について 2009 年度日本歯科保存学会学会学術賞を授与された (*Review* 2010)。第 2 報「薬剤性歯肉増殖症に特異的な遺伝子発現」をマイクロアレイとデータマイニング遺伝子発現解析及び第 3 報：「歯肉増殖症と歯周炎の特異的遺伝子発現パターン」に関しそれぞれ *Archs Oral Biology* (2011), *J Periodont Res* (2011) に報告した。

研究成果の概要（英文）：We have reported the 1st report “Gene expression and immunohistochemical protein localization of TIMP-3 and TIMP-4 in gingival overgrowth and periodontitis-affected gingival tissues” *Archs Oral Biology* (2009) . Then I have received the Academic Senior Investigator’s Award for this series of studies in 2009 from Japanese Society of Conservative Dentistry (*Review* 2010). The 2nd and 3rd reports:” Microarray and data-mining analyses for specific gene expression in drug-induced gingival overgrowth tissues. *Archs Oral Biology* (2011)” , and “Altered gene expression pattern and specific biological pathways in periodontitis-affected gingival tissues.” *J Periodont Res* (2011) have published in international scientific peer review journals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯周病学

キーワード：歯周免疫機能学

1. 研究開始当初の背景

歯肉増殖症はカルシウム拮抗薬、免疫抑制剤、抗てんかん薬といった薬剤の副作用で生じる歯肉の線維性増殖と炎症を伴う疾

患であり、カルシウム拮抗薬は高血圧の治療に用いられ、歯周病を有する高齢者が服用する割合が多い。したがって、カルシウム拮抗薬剤性の歯肉増殖症の有病者が多く、

歯周病分野において研究の必要がある。一方、これまでカルシウム拮抗薬剤性の歯肉増殖症領域においては、*in vitro*において歯肉線維芽細胞への影響やラットへのカルシウム拮抗薬投与実験が行われてきた。歯肉増殖症の主要な病態である結合組織形成は、結合組織を分解するタンパク質である Matrix metalloproteinases (MMPs) とコラゲナーゼインヒビターである Tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) のバランスが破綻することによって発症すると考えられているが、その病因については不明な点が多い。我々はこれまで歯周炎罹患歯肉における MMPs と TIMPs 遺伝子発現を報告してきたことから、歯肉増殖症の歯肉における MMPs と TIMPs 発現に着目した。歯肉の線維症である歯肉増殖症でも MMPs と TIMPs のバランスが破綻している可能性が大きい。TIMP-3 は、マトリックス分解抑制機能に加え、血管新生・アポトーシス・細胞移動抑制など炎症をコントロールする機能を持つが、TIMP-3 の病的歯肉線維化に及ぼす役割を突き止めるためには、より多くの臨床検体の中で遺伝子およびタンパク質発現、両面から研究する必要がある。

2. 研究の目的

カルシウム拮抗薬による重度薬剤性歯肉増殖症線維化組織中において、Collagen 代謝に重要な遺伝子発現およびタンパク質局在を調査することにより、歯肉線維化病変部における強調された肉芽組織反応の分子機構を解明する。

(1) ヒト歯肉増殖症歯肉と健常者歯肉でのコラゲナーゼインヒビターTIMP-3, -4 の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法にて解析し、発現量を比較検討すると共にタンパク質発現を免疫組織学的手法を用いて解析し、発現組織局在・発現細胞を同定、健常者と比較する。

(2) 発展として線維化歯肉及び歯周炎歯肉における遺伝子発現の特徴をマイクロアレイとデータマイニングの手法を用いて解析する。

3. 研究の方法

(1) TIMP-3, -4 遺伝子発現レベルのバランス解析

①対象：新潟大学医歯学総合病院 歯周病診療室を受診し、重度カルシウム拮抗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より、歯周外科時に歯周ポケット底相当部上皮および結合組織を採取する。直ちにPCR用試料はRNA安定化溶液浸漬後Deepfreezer (-80℃)にて保存する。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PBSに保存する。

② RT-PCR解析：歯肉検体はホモジェナイズ後、全RNAを抽出し逆転写酵素反応によりcDNAを合成する。cDNAをテンプレートに quantitative Real time PCR (qRT-PCR) を行いTIMP-3および各MMPs, TIMPs遺伝子の発現量を comparative threshold cycles (Ct) 法により定量する。

③ 統計解析：群間比較については Kruskal-Wallis test の後に多重比較を行う。各検定の有意水準は5%に設定する。

(2) TIMPsの組織学的、免疫組織学的解析

① パラフィン切片作製：組織解析用試料も歯周外科時に採取し、通法に従ってパラフィンに包埋する。その後、マイクロトームにて5μmに薄切しパラフィン切片を作製する。

②組織学的および免疫組織学的検索：通法どおり脱パラフィン、脱水後にヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行う。免疫染色にはH-E染色した切片の連続切片を用いる。1次抗体に抗MMP-1, -3, TIMP-1, -2, -3, -4 ポリクローナル抗体を用いる。H-E所見および免疫組織所見は同一部位を写真撮影し、TIMP-1, -2, -3, -4の歯肉組織中での局在を解析する。

(3) 歯肉線維化組織のマイクロアレイ・データマイニング解析

継続研究として、歯肉線維化局所での遺伝子発現を網羅的に解析する。

① 歯肉線維化局所に特異的に発現している遺伝子を突き止めるべく、患者cDNAをテンプレートにヒトDNAチップを用いたマイクロアレイ解析を行う。対照は、同一患者の歯周炎罹患歯肉組織とする。同様に、歯周炎特異的な遺伝子発現を同一患者の非歯周炎部位を対照に検索する。

②得られた、データを解析ソフトウェアにてマイニングし、特異的な遺伝子発現パターンを抽出すると共に、パスウェイ解析により特徴のある生物学的経路についてター

ゲットを絞り込む。確認には、ストックされた患者 cDNA にて各遺伝子の発現量を qRT-PCR 定量解析する。

4. 研究成果

本研究は、新潟大学歯学部倫理委員会において承認された計画に基づき行われた。インフォームドコンセントの得られた歯周炎併発歯肉増殖症患者 10 人とコントロールとして歯周炎患者及び非歯周炎患者各 10 名の歯肉組織を対象として、定量 RT-PCR 及び免疫組織学的解析を行った。成果は第 1 報として「TIMP-3, TIMP-4 の歯肉増殖症、歯周炎罹患歯肉組織中における遺伝子発現レベル (図 1) および免疫組織化学的局在 (図 2)」を当該分野で初めて、歯科基礎分野の国際誌である *Archs Oral Biology* (2009) に報告した。

図 1 : TIMP-3, -4 の遺伝子発現レベルの比較

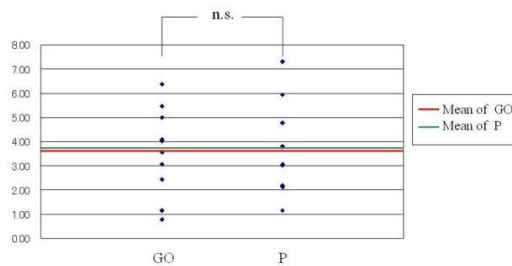


図 2 : TIMP-3 の免疫組織染色 (上皮下の内



皮細胞、線維芽細胞に陽性所見を認める)。

本研究を含む一連の研究成果について 2009 年度日本歯科保存学会学会学術賞を授与された (日本歯科保存学会雑誌 2010)。

第 1 報から得られた結果から「真に薬剤性歯肉増殖症に特異的な遺伝子発現」を突き止めるべく、継続・発展させたマイクロアレイとデータマイニング遺伝子発現解析を行い、歯肉増殖症と歯周炎の特異的遺伝子発現パ

ターンについて第 2 報を *Archs Oral Biology* (2011)、第 3 報を *J Periodont Res* (2011) にそれぞれ報告した。

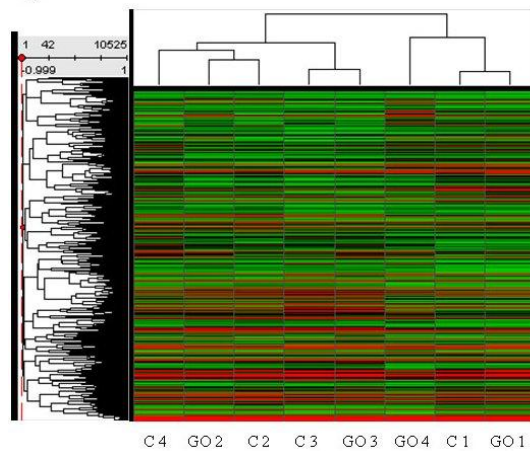


図 3 : 線維性増殖症歯肉組織の遺伝子発現パターン (個人差が見られる)

Figure 3

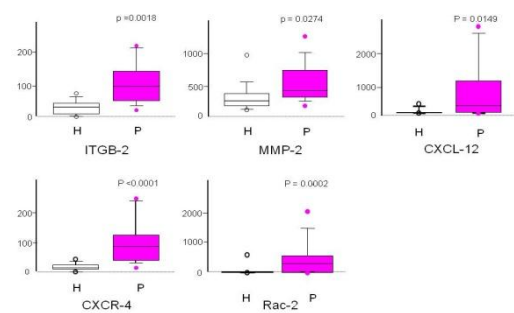


図 4 : 歯周炎歯肉組織で発現上昇が見られた遺伝子群

Figure 4

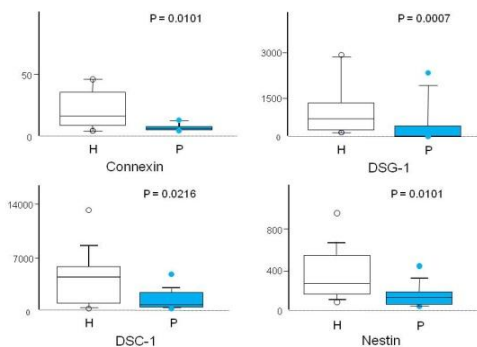


図 5 : 歯周炎歯肉組織で発現低下が見られた遺伝子群

その結果、歯肉増殖症線維化には個人レベルで特徴が異なること (図 3) が解明され、バックグラウンドにある歯周炎には特徴的

生物学的 pathways が関与していることを明らかにした (図 4、図 5)。現在、新規発病関連遺伝子グループに着目し本研究課題を進展させるべくさらなる成果を目指している。

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 4 件)

- ① Abe D, Kubota T, Morozumi T, Shimizu T, Nakasone N, Itagaki M, Yoshie H. Altered gene expression in leukocyte transendothelial migration and cell communication pathways in periodontitis-affected gingival tissues. *J Periodont Res*. 査読有り 46, 2011, pp345-353.
- ② Shimizu T, Kubota T, Nakasone N, Abe D, Morozumi T, Yoshie H. Microarray and quantitative RT-PCR analyses in calcium-channel blockers induced gingival overgrowth tissues of periodontitis patients. *Arch Oral Biol*. 査読有り 56, 2011, pp277-284.
- ③ 久保田健彦、ミニレビュー：歯周炎組織破壊における生体酵素動態と歯周炎感受性診断、日本歯科保存学会雑誌、査読有り、53 巻、2010, pp6-8
- ④ Nakasone N, Kubota T, Hoshino C, Nohno K, Itagaki M, Shimizu T, Yoshie H. Differential gene and protein expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-3 and TIMP-4 in gingival tissues from drug induced gingival overgrowth. *Arch Oral Biol*. 査読有り 54, 2009, pp634-641.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 富田尊志、久保田健彦、中曽根直弘、飯山真奈美、両角俊哉、永田昌毅、堀水慎、濃野要、吉江弘正、ACE 及び TIMP-3 の薬物性歯肉増殖症と歯周炎の歯肉組織における遺伝子発現とタンパク質局在、第 54 回秋季日本歯周病学会学術大会、2010 年 9 月 24 日、下関市
- ② 久保田健彦、阿部大輔、清水太郎、中曽根直弘、両角俊哉、吉江弘正、アルツハイマー病関連遺伝子は歯周炎罹患歯肉において転写発現亢進している、第 53 回秋

季日本歯周病学会学術大会、2010 年 9 月 19 日、高松市

- ③ Kubota T, Abe D, Shimizu T, Nakasone N, Morozumi T, Yoshie H. Alzheimer's disease pathway was accelerated in periodontitis-affected gingival tissues. IADR 88th General Session 2010, July 14-17, 2010, Barcelona, Spain.
- ④ Shimizu T, Kubota T, Abe D, Morozumi T, Nakasone N, Yoshie H. Transcriptomes in sites with drug-induced gingival-overgrowth Microarray and qRT-PCR analyses. EUROPERIO6, June 4-6, 2009, Stockholm, Sweden
- ⑤ 清水太郎、久保田健彦、阿部大輔、両角俊哉、中曽根直弘、吉江弘正、薬剤性歯肉増殖症の感受性と特異的遺伝子発現の網羅的解析、第 52 回春季日本歯周病学会学術大会、2009 年 5 月 15-16 日、岡山市

[図書] (計 1 件)

- ① 久保田 健彦、吉江弘正、医歯薬出版、歯周組織再生と歯根膜、歯界展望別冊「歯と歯列を守るための歯根膜活用術」2011 年 pp58-61 /pp146 共著

[その他]

ホームページ等

- ① 日本歯科保存学会学術賞受賞論文の URL: http://wwwsoc.nii.ac.jp/jscd/member/pdf/vol153_no1/6.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 健彦 (KUBOTA TAKEHIKO)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：50303136

(2) 研究分担者

中曽根 直弘 (NAKASONE NAOHIRO)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：20447634

(3) 連携研究者

丸山 智 (MARIYAMA SATOSHI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：30397161
濃野 要 (NOUNO KANAME)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：80422608