

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12027

研究課題名(和文)慢性歯周炎抑制機序におけるp38 MAPK family新規機能の解明

研究課題名(英文)Effect of p38 MAPK family new function in periodontitis suppression mechanism

研究代表者

合田 征司 (Goda, Seiji)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70351476

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)：抗炎症作用として注目されている内因性の細胞外マトリックス分解酵素阻酵素であるTissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)の歯肉線維芽細胞における産生について研究を行った。結果は創傷治癒や歯周組織再生に関わっているサイトカインであるbFGF刺激により歯肉線維芽細胞のTIMP-1産生が増強された。bFGF刺激による歯肉線維芽細胞のTIMP-1産生は阻害剤や遺伝子ノックダウンを用いた実験により細胞内酵素であるp38 MAP kinaseがTIMP-1産生を制御していることが明らかとなり、今後薬剤の開発に有益な結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究の意義は細胞シグナル伝達機構の検討によりp38MAP kinaseが内因性の細胞外マトリックス分解酵素阻酵素であるTIMP-1の制御機構としての役割を解明出来れば、TIMP-1の産生を選択的に増強させ、MMP-1の機能を抑制する事が可能となり、内因性の抗慢性歯周炎抑制作用が明らかとなる。波及効果はさらに研究が進めば、慢性歯周炎の画期的な薬剤の開発となり、安全で局所に効率よく作用する慢性歯周炎治療薬の開発につながり慢性歯周炎だけでなく関連している心筋梗塞や糖尿病などの生活習慣病の治療に役立つと考えられる。そうすれば国民の健康増進に向けて大きく前進することが出来る。

研究成果の概要(英文)：We studied the production of Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP) in gingival fibroblasts, which is an endogenous extracellular matrix degrading enzyme inhibitor that has been attracting attention as an anti-inflammatory effect. As a result, TIMP-1 production in gingival fibroblasts was enhanced by stimulation with bFGF, which is a cytokine involved in wound healing and periodontal tissue regeneration. As for the TIMP-1 production of gingival fibroblasts stimulated with bFGF, it was revealed by an experiment using an inhibitor and siRAN knockdown that the p38 MAP kinase regulates TIMP-1 production.

研究分野：生理学

キーワード：慢性歯周炎 TIMP bFGF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在、歯科保健の分野では、高齢者においても歯の喪失が10歯以下であれば食生活に大きな支障を生じないとの研究に基づき、生涯にわたり自分の歯を20歯以上保つことにより健全な咀嚼能力を維持し、健やかで楽しい生活を送るという8020運動が提唱・推進されている。現実には55～64歳で歯周炎の有病率が82.5%となるなど、歯周疾患の有病状況は他の疾患に類を見ないほど高率を示している。また、咀嚼能力に直接的な影響を与える歯の喪失状況についても、60歳代で半分(14歯)の歯を失い、80歳代では約半数の人がすべての歯を喪失している。歯周炎は歯牙喪失を引き起こし、それに伴い味覚異常や唾液分泌異常を生じるだけでなく、中枢ならびに自律神経系の異常を招くことが明らかとなってきた。口腔領域の生活習慣病と位置づけられる歯周炎は、長く局所感染症として認識されてきたが、近年高感度CRP陽性、高フィブリノーゲン血症、IL-2、IL-6やTNF-などの炎症性サイトカインが局所だけにとどまらず全身的にも上昇すること、さらに生活習慣病である糖尿病、骨粗鬆症や動脈硬化に伴う虚血性心疾患、糖尿病、老人性肺炎、早産・低体重児出産などの様々な全身性疾患のリスクファクターになっていることが報告されていることから、歯周疾患は国民の保健上大きな課題となり、ペリオドンタルメディシンが重要である。

慢性歯周炎の歯周組織破壊は、組織コラゲナーゼを中心とするMMPsが主役を演じていることは良く知られている。免疫細胞や線維芽細胞などから産生されるMMPsは結合組織の主成分であるコラーゲン、プロテオグリカン、接着性糖たんぱく質を分解し、歯周組織を破壊して細菌の侵入や増殖を容易にするだけでなく、接着分子、受容体やサイトカインといった免疫に重要な因子を分解、不活性化させるため、慢性歯周炎の継続・増悪が生じると考えられている。活性化されたMMPsの働きを抑制的に制御する因子として内因性TIMPが存在し、TIMPは歯肉線維芽細胞より産生される。また、慢性歯周炎患者のTIMP-1は、健常者と比較して低値を示すことも知られている。以上より、歯周組織におけるTIMPの産生機序を解明することは慢性歯周炎の治療に繋がると考えられる。我々は、これまでに慢性歯周炎組織に発現している炎症性サイトカインCX3CLと細胞外マトリックスとの接着機構を報告した(Goda S, Domae N, et al. J Immunol 2000;164: 4313-4320, Goda S, et al. J Immunol 2004; 172:5379-5387)。さらに、慢性歯周炎組織に見られる炎症性サイトカインCXCL12とMMPsを産生との関係を報告した(Goda S, Domae N, et al. Am J Pathol 2006; 169:445-458)。MMPsが骨リモデリング促進に関与する事も明らかにした(Goda S, Kaneshita Y, Domae N, et al. J Dent Res 2008;87:782-787, Goda S, Kaneshita Y, Domae E, Ikeo T, Domae N, et al. J Periodontol 2009;80:1631-1637)。

## 2. 研究の目的

慢性歯周炎症組織における歯肉線維芽細胞のTIMP産生機序は明らかになっていない。内因性の酵素の産生機序を明らかにし慢性歯周炎における歯周組織破壊の抑制、歯周組織再生の機序を明らかにし、国民が求めている慢性歯周炎の治療に役立てることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、bFGF刺激による歯肉線維芽細胞のTIMP-1の産生機序についての解明を進め、特に細胞シグナル伝達機構におけるp38MAP kinase  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ との関係についての解明をするために以下の実験を行った。

歯肉線維芽細胞におけるbFGF刺激によるp38MAP kinase  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ の活性化およびTIMP-1産生へのp38阻害剤の影響を検討

siRNA 法を用いて p38 ノックダウン細胞の作製

p38  $\alpha$  ノックダウン歯肉線維芽細胞における bFGF 刺激による TIMP-1 産生の影響を検討

p38  $\alpha$  ノックダウン歯肉線維芽細胞と親細胞とのシグナル伝達経路相違の検討

p38  $\alpha$  ノックダウン歯肉線維芽細胞における bFGF 刺激による MMP-1 産生およびコラーゲン分解能の影響を検討

#### 4. 研究成果

抗炎症作用として注目されている内因性の細胞外マトリックス分解酵素阻酵素である Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) の歯肉線維芽細胞における産生について研究を行った。結果は創傷治癒や歯周組織再生に関わっているサイトカインである bFGF (20ng/mL から 100 ng/mL) 刺激により歯肉線維芽細胞の TIMP-1 産生が濃度依存性増強された (図 1)。bFGF 刺激による歯肉線維芽細胞の TIMP-1 産生は p38 阻害剤である SB203580 で検討した結果、SB203580 低濃度 (44 $\mu$ M) では TIMP-1 産生には影響が認められなかったが、高濃度 (100 $\mu$ M) では TIMP-1 産生の増強が認められた (図 2)。P38 阻害剤低濃度では p38 kinase ファミリーのなかで、サブユニットが抑制され、高濃度では、 $\beta$  が抑制されることが知られている。そこで我々は、さらにターゲット分子を明確にするために siRNA を用いて p38MAP kinase  $\alpha$  を特異的にノックダウンさせた歯肉線維芽細胞を作成し、bFGF 存在下での TIMP-1 産生能を検討した。その結果 bFGF 刺激存在下で siRNA p38MAP kinase 歯肉線維芽細胞による TIMP-1 産生能は control siRNA と比較して増強された (図 3)。さらに IKKB の活性化も増強された。以上の結果から今後 p38MAP kinase  $\alpha$  は歯肉線維芽細胞において bFGF 刺激存在下では TIMP-1 産生におけるネガティブレギュレーターとしての機能を持つことが示唆された。さらに p38MAP kinase  $\alpha$  をターゲットにした慢性歯周炎治療薬の開発に有益な示唆を得たと考えている。

図 1

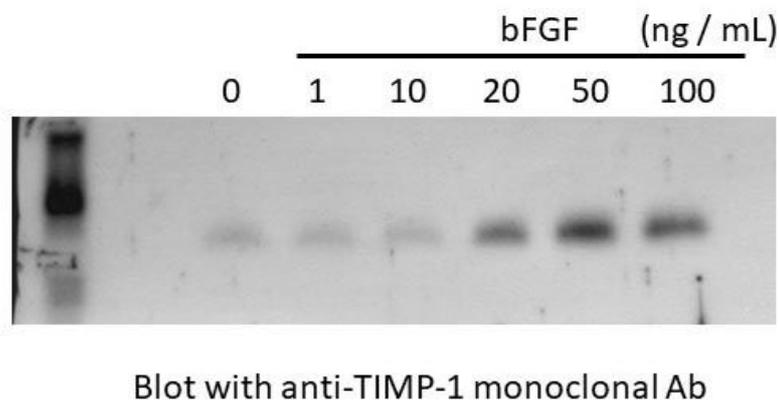


図 1 歯肉線維芽細胞の TIMP-1 産生における bFGF の影響

図2

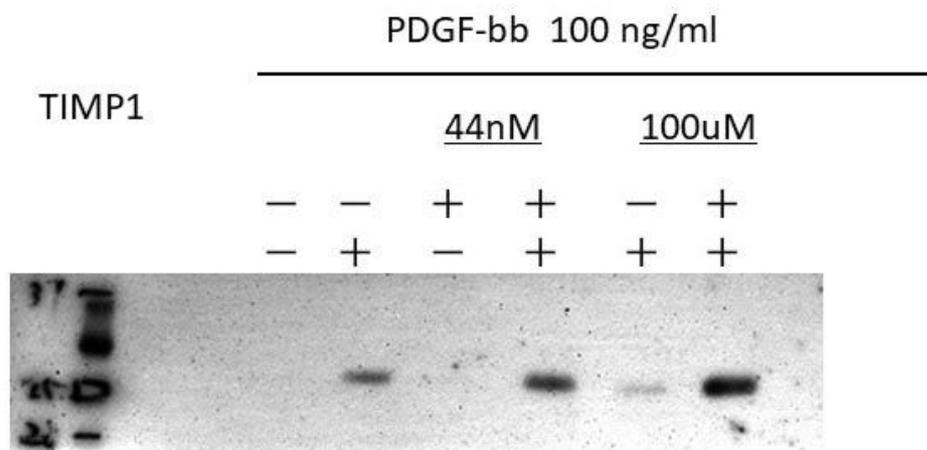
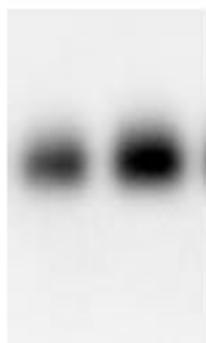


図2 p38 阻害剤における TIMP-1 産生の影響

図3

bFGF (50ng/ml)

Cont. p38 $\beta$  p38 $\alpha$



Blot with anti-TIMP-1

図3 siRNA p38 における TIMP-1 産生の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Domae E, Tuji K, Hirai Y, Yoshikawa Y, Kamada A, Morita S, Goda S, Ikeo	4. 巻 15(3)
2. 論文標題 IL-15, but Not IL-2, induces proliferative activity of human ex vivo expanded V <sub>9V</sub> 2 T cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oral Tissue Engin.	6. 最初と最後の頁 143-148.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto T, Inoue H, Hirano S, Goda S.	4. 巻 53(2)
2. 論文標題 Effect of bisphenol A exposure on spontaneous behavior using the elevated plus maze test.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 187-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Keitaro Inaba, Haruka Sasaki, Takenori Sato, Kiyoko Watanabe, Seiji Goda and Nobushiro Hamada,
2. 発表標題 The Role of Porphyromonas salivosa Fimbriae in Alveolar Bone Resorption
3. 学会等名 ASM microbe
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲葉啓太郎, 佐々木悠, 佐藤武則, 渡辺清子, 合田征司, 浜田信城
2. 発表標題 Porphyromonas salivosa ATCC 49407 株線毛の歯周組織破壊への影響について
3. 学会等名 第156回神奈川歯科大学学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keitaro Inaba, Haruka Sasaki, Toshizo Toyama, Takenori Sato, Kiyoko Watanabe, Seiji Goda and Nobushiro Hamada
2. 発表標題 Biological Activity of <i>Porphyromonas salivosa</i> ATCC 49407 fimbriae
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲葉啓太郎, 佐々木悠, 佐藤武則, 渡辺清子, 合田征司, 浜田信城
2. 発表標題 <i>Porphyromonas salivosa</i> 線毛は破骨細胞分化とサイトカイン産生を誘導する
3. 学会等名 第157回神奈川歯科大学学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue H, Goda S, Nishikawa.
2. 発表標題 Effect of S-PRG filler eluate on MAP kinase-family phosphorylation of human gingival fibroblasts.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲葉啓太郎, 佐々木悠, 佐藤武則, 渡辺清子, 合田征司, 浜田信城.
2. 発表標題 <i>Porphyromonas salivosa</i> ATCC 49407株線毛の精製と生物活性の検討.
3. 学会等名 平成29年度日本歯周病学会60周年記念京都大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤武則, 渡辺清子, 合田征司, 浜田信城.
2. 発表標題 太陽電池付与酸化チタン内蔵電動歯ブラシの口腔バイオフィルム除去効果.
3. 学会等名 平成29年度日本歯周病学会60周年記念京都大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 細山有規子, 堂前英資, 合田征司, 松本尚之.
2. 発表標題 破骨細胞分化におけるp38 MAP kinase 経路に対するGallotanninの影響.
3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上 博, 合田征司, 西川泰央.
2. 発表標題 S-PRGフィラー溶出液がヒト歯肉線維芽細胞のMatrix metalloproteinase産生に及ぼす影響.
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩佐一弘, 小正玲子, 吉川一志, 合田征司, 山本一世.
2. 発表標題 ヒト歯髓由来線維芽細胞におけるNOD1の影響.
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小正玲子, 保尾謙三, 三浦 樹, 岩崎和恵, 小正紀子, 合田征司, 山本一世.
2. 発表標題 ヒト歯髓由来線維芽細胞に対する iE-DAP刺激の影響.
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 博  (Inoue Hiroshi)  (10330143)	大阪歯科大学・歯学部・講師    (34408)	
研究分担者	佐藤 武則  (Sato Takenori)  (40638904)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師    (32703)	