

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592210

研究課題名（和文）抗炎症薬開発に向けた唾液蛋白質ヒスタチンの機能解明

研究課題名（英文）The functional elucidation of salivary protein histatin toward the development of anti-inflammatory agent

研究代表者

今村 泰弘（IMAMURA YASUHIRO）

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00339136

研究成果の概要（和文）：唾液蛋白質ヒスタチンは歯周病原菌に対する抗菌作用を有する。一方、ヒスタチンの生体（宿主）に及ぼす影響は殆ど明らかにされていない。本研究では、ヒスタチンがヒト歯肉線維芽細胞（主な歯周組織構成細胞）の増殖を促進することが示された。また、ヒスタチンは抗炎症作用を有する因子であることが明らかとなった。これらは、炎症などによって生ずる口腔内の損傷治癒が他の組織・臓器と比べ早いことを示唆する。また、唾液蛋白質による抗炎症薬開発に結び付く結果である。

研究成果の概要（英文）：Salivary protein histatin has antimicrobial activity toward pathogenic bacteria of periodontitis. However, the effect of histatin on living body (host) is scarcely clarified. In this study, histatin showed the enhancement of human gingival fibroblast (which constitute the major cellular population of gingival tissue) proliferation. It became apparent that histatin is an anti-inflammatory factor. These observations suggest that wound healing induced by inflammatory, etc., in the oral cavity is earlier than that in the other tissues and organs. Moreover, it seems more likely that the salivary protein is developed as an anti-inflammatory agent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：唾液蛋白質、ヒスタチン、炎症、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患発症原因の1つとして環境要因が挙げられ、歯周病原菌の刺激は歯と軟組織間の付着破壊、結合組織や硬組織の破壊を誘

導する。これらは歯周支持組織に存在する宿主細胞間の複雑な相互作用によって惹起され、慢性炎症性疾患となる。歯周病の罹患率は30歳代で80%に達することから、social

disease である。また、近年、歯周病が心臓血管疾患、糖尿病、高血圧やリュウマチなどといった全身疾患と密接に関係することが示唆され始めた。これは歯周病が全身疾患のリスクファクターとなることを意味する。これまでに我々は、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*)由来リポポリサッカライド (LPS) を歯周組織の主な構成細胞であるヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) に処理すると、IL-1、TNF- α などといった炎症性サイトカインの産生が亢進されることを明らかにした。また、歯周病原菌由来プロテアーゼによる結合組織の破壊機序を解明した。

唾液は一日当たり 0.5~1.5 l 分泌され、口腔内の恒常維持や嚥下、咀嚼、会話などの機能に影響を及ぼしている。唾液は、様々な口腔疾患 (口腔乾燥症、歯周病やカンジタ症、う蝕、ウイルス感染や癌、HIV による日和見感染症など) と強い相関性がある。特に、唾液蛋白質ヒスタチンは、*P. g.*、カンジダ菌などに対する抗菌作用や齶蝕原因菌の増殖抑制、歯周病原菌由来コラゲナーゼやその他のプロテアーゼを阻害する。また、HIV 感染者のヒスタチン発現量は顕著に減少し、カンジタ症などの感染症を発症することが示唆されている。

ヒスタチンの発現は顎下腺、耳下腺、舌下腺で認められ、組織特異的である。しかし、その詳細なメカニズムは明らかになっていなかった。これまでに、ヒスタチン遺伝子プロモーターを用いた転写制御解析から、ヒスタチンの発現は唾液腺由来細胞で特異的であることを明らかにした。また、ヒスタチンは歯肉上皮細胞や HGFs の増殖促進効果を有することが判明した。

以上のように、唾液蛋白質の未知なる機能解明は、漸く精力的に行われ始めたのが現状である。

2. 研究の目的

唾液蛋白質ヒスタチンは、歯周病原菌・齶蝕原因菌に対する抗菌作用や、これらの菌が産生する各種プロテアーゼなどを阻害する。この様に、ヒスタチンは自然免疫関連因子であり、口腔内で非常に重要な機能を果たしている。一方、宿主、特に口腔内細胞に及ぼすヒスタチンの影響や生理的意義は詳細に分かっていない。

そこで本研究では、以下の項目について解明することを目的とした。

(1) ヒスタチンによる HGFs の細胞増殖・生存促進効果の作用機序解明。

(2) ヒスタチンによる熱ショック蛋白質誘導

性炎症の抑制。

3. 研究の方法

(1) ヒスタチンによる HGFs の細胞増殖・生存促進効果の作用機序解明

①15-デオキシスピガリン (15-DSG) 存在下におけるヒスタチンの HGFs 増殖・生存への影響

0.1%牛胎児血清 (FBS) 存在下で 24 時間以上培養した HGFs にヒスタチンを添加し、BrdU 取込みによる DNA 合成法及び MTT アッセイによって細胞増殖・生存をそれぞれ解析した。

②ヒスタチンによる HGFs の細胞周期関連因子サイクリン D1、CDK2、サイクリン E の発現

0.1% FBS 存在下で 24 時間以上培養した HGFs にヒスタチンを添加し、細胞抽出液を調製した。これを用いて抗サイクリン D1、CDK2、サイクリン E 抗体により、それぞれウェスタンブロッティングを行った。

③熱ショック蛋白質 HSC70 に依存したヒスタチンの HGFs 増殖促進

HSC70 の siRNA を HGFs に導入してノックダウン (KO) させ、この細胞にヒスタチンを添加後、DNA 合成解析及び MTT アッセイを行った。

④ヒスタチン/HSC70/p27 複合体形成に対する ATP の影響

0.1% FBS 存在下で 24 時間以上培養した HGFs の細胞抽出液を抗 p27 抗体で免疫沈降した。この沈殿物にヒスタチン、ATP を混合後、抗 HSC70 抗体により、ウェスタンブロッティングを行った。また、HEK293 細胞に HSC70 発現ベクターを導入し、細胞抽出液を調製した。これと GST 融合ヒスタチン (GST-ヒスタチン) を用いた GST プルダウン法を行った。この沈殿物に ATP を混合後、HSC70、p27 をウェスタンブロッティングにより、それぞれ検出した。

(2) ヒスタチンによる熱ショック蛋白質誘導性炎症の抑制

①ヒスタチンによる熱ショック蛋白質の Toll 様受容体 (TLR) シグナルの抑制と 15-DSG の影響

HEK293 細胞で TLR4、MD2、CD14 が構成的に発現している細胞 (293-TLR4/MD2-CD14) に、NF- κ B 結合配列を連結したルシフェラ

一ゼ遺伝子 (NF- κ B-Luc) を導入した。24 時間後、15-DSG 有無のヒスタチン/HSC70 混合物を細胞に添加した。6 時間後、細胞抽出液を調製し、Luc アッセイを行った。

②熱ショック蛋白質による HGFs の MAP キナーゼ活性化

0.1% FBS 存在下で 24 時間以上培養した HGFs を HSC70 で刺激した。細胞抽出液を調製後、抗リン酸化 ERK、JNK、p38、I κ B- α 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

③熱ショック蛋白質刺激による HGFs のインターロイキン (IL) -6 及び IL-8 産生に及ぼすヒスタチンの影響

ヒスタチン有無の HSC70 は、0.1% FBS 存在下で 24 時間以上培養した HGFs に加えられた。培養上清を回収後、ELISA により IL-6、IL-8 をそれぞれ測定した。

4. 研究成果

(1) ヒスタチンによる HGFs の細胞増殖・生存促進効果の作用機序解明

①15-DSG 存在下におけるヒスタチンの HGFs 増殖・生存への影響

15-DSG は HSC70 に特異的に結合する免疫抑制剤である。15-DSG 存在下でのヒスタチンによる DNA 合成及び生存は、HGFs を用いて解析された。その結果、ヒスタチンによって誘導される DNA 合成促進は有意に抑制された。また、細胞の生存も抑制傾向となった。これらから、ヒスタチンと HSC70 の相互作用は、HGFs の細胞増殖に重要であることが示唆された。

②ヒスタチンによる HGFs の細胞周期関連因子サイクリン D1、CDK2、サイクリン E の発現

G0/G1 に同調した HGFs にヒスタチンを加え、サイクリン D1、CDK2、サイクリン E の発現をウェスタンブロッティングにて解析した。その結果、ヒスタチン量に依存して、サイクリン D1、CDK2 の発現量は増加した (図 1)。これは 10% FBS を添加した場合と同じ結果となった。一方、BSA、コントロールペプチドを添加した場合は、サイクリン D1、CDK2 の発現量増加が認められなかった。以上から、ヒスタチンはサイクリン D1、CDK2 の発現を誘導し、細胞周期 G1/S 期移行に関与することが明らかとなった。

③熱ショック蛋白質 HSC70 に依存したヒスタチンの HGFs 増殖促進

HSC70 の siRNA を発現するレトロウイルス

を HGFs に感染させ、HSC70 を KO させた。この細胞にヒスタチンを添加し、DNA 合成解析及び MTT アッセイを行った (図 2)。その結果、HSC70 は HGFs 内で KO され、ヒスタチン添加時の DNA 合成率は、HSC70 を KO していない HGFs (none) の場合と比べ、40% になった。一方、HGFs に HSC70 のコントロール siRNA を発現させ、ヒスタチン添加時の DNA 合成率は、HSC70 を KO していない HGFs (none) の場合と比べ、ほぼ同じであった。以上から、ヒスタチンによる HGFs の DNA 合成促進は、HSC70 に依存していることが判明した。

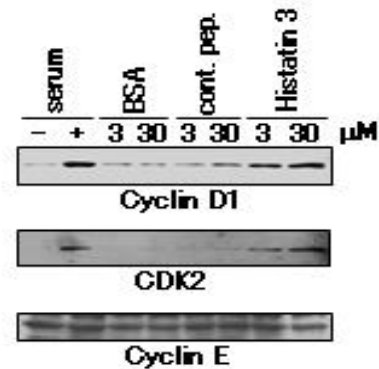


図 1 ヒスタチンの刺激によって誘導される HGFs の細胞周期制御因子

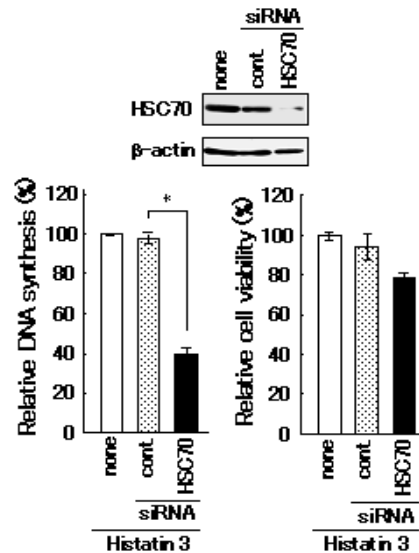


図 2 熱ショック蛋白質を KO させた HGFs におけるヒスタチンの DNA 合成への影響

④ヒスタチン/HSC70/p27 複合体形成に対する ATP の影響

HSC70 は p27 と直接結合するが、この複合体は ATP によって解離することが明らかとさ

れている。そこで、この現象に及ぼすヒスタチンの影響について調べた。G0/G1 に同調した HGFs の細胞抽出液を抗 p27 抗体で免疫沈降し、ヒスタチン、ATP を加えてインキュベートした。p27 と結合した HSC70 をウェスタンブロッティングにより検出した。その結果、ヒスタチンは ATP が存在するにもかかわらず、HSC70/p27 複合体を形成した (図 3)。一方、コントロールペプチドでは ATP 存在下でこの複合体を解離させた。従って、ヒスタチンは HSC70/p27 複合体形成に重要な働きを持つことが示唆された。

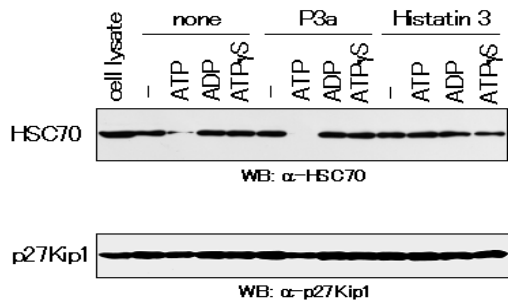


図 3 ヒスタチン、ヌクレオチド存在下による熱ショック蛋白質/p27 複合体形成への影響

HEK293 細胞に HSC70 とその変異体 HSC70 (D10N) (10 番目の Asp が Asn に変換) 発現ベクターをそれぞれ導入後、細胞抽出液を調製し、GST-ヒスタチンと混合して GST プルダウンした。これにヌクレオチド (ATP、ADP、ATP γ S) を混合後、熱ショック蛋白質、p27 をウェスタンブロッティングによりそれぞれ検出した。その結果、ATP、ADP、ATP γ S 存在下ではヒスタチン/HSC70/p27 複合体形成が認められた (図 4)。一方、ATP はヒスタチン/HSC70 (D10N) / p27 複合体を解離させた。ADP、ATP γ S 存在下ではヒスタチン/HSC70 (D10N) 複合体は維持されたが、p27 は HSC70 (D10N) から解離した。以上から、ヒスタチンは ATP 存在下でも HSC70 と結合し、HSC70 を介して p27 と複合体を安定に形成することが判明した。

(2) ヒスタチンによる熱ショック蛋白質誘導性炎症の抑制

①ヒスタチンによる熱ショック蛋白質の TLR シグナルの抑制と 15-DSG の影響

293-TLR4/MD2-CD14 細胞に、NF- κ B-Luc を導入した。24 時間後、15-DSG 有無のヒスタチン/HSC70 混合物を細胞に添加し、6 時間刺激した。その後、Luc アッセイを行った。

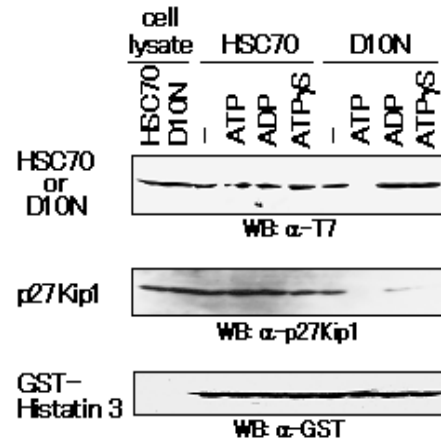


図 4 ヒスタチン/熱ショック蛋白質/p27 複合体形成に対するヌクレオチドの影響

その結果、15-DSG 非存在下における NF- κ B の転写活性は HSC70 のみの刺激時の約 40% となり、15-DSG 存在下では約 80% となった。以上から、ヒスタチンは HSC70 と結合することにより、HSC70 の TLR4 に対するリガンド機能を抑制することが明らかとなった。また、15-DSG はヒスタチン/HSC70 複合体のヒスタチンと入れ換わることで、HSC70 のリガンド機能を回復させたことが判明した。

②HGFs の MAP キナーゼ活性化

G0/G1 に同調した HGFs を HSC70 で 0、10、30、60 分間刺激し、細胞抽出液を調製後、抗リン酸化 ERK、JNK、p38、I κ B- α 抗体でウェスタンブロッティングを行った。その結果、HSC70 は時間経過と共に、ERK、JNK、p38、I κ B- α のリン酸化 (活性化) を促進した。これらは、HGFs を大腸菌及び *P. g.* 菌由来 LPS で刺激した場合と同様の結果となった。従って、HSC70 は HGFs の MAP キナーゼカスケードの活性化を誘導することが判明した。

③HSC70 による HGFs のインターロイキン (IL) -6 及び IL-8 産生に及ぼすヒスタチンの影響

ヒスタチンと HSC70 の混合物は、G0/G1 に同調した HGFs に加えられた。培養上清を回収後、ELISA により IL-6 及び IL-8 の産生量をそれぞれ測定した。その結果、ヒスタチン量に依存して、これらサイトカインの産生量は減少した。以上から、ヒスタチンは HSC70 刺激による HGFs の炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。

本研究によって明らかになったことをまとめると、ヒスタチンはエンドサイトーシスによりヒト歯肉線維芽細胞に取込まれ、細胞

内で恒常的に発現している熱ショック蛋白質 HSC70 と結合する。ヒスタチン/HSC70 複合体は、細胞周期を促進する CDK/サイクリンの阻害因子 p27 と結合する。この3者複合体は、ATP 存在下でも複合体形成を維持する。細胞周期 G1/S 期への移行において、ATP/ADP の濃度比変化が認められるが、3者複合体は細胞内のヌクレオチド濃度変化を伴っても安定に維持され、核と細胞質間を行き来し、細胞増殖に関わる。これらの結果は、口腔内組織（細胞）の損傷治癒が他の組織や臓器と比べ、早いと認識されていることを示唆する知見である。

炎症性サイトカイン IL-6、IL-8 は、HSC70 刺激によってヒト歯肉線維芽細胞から産生される。ヒスタチンは HSC70 と結合することで、HSC70 の TLR を介したシグナル伝達を減弱させ、NF- κ B を介した IL-6 及び IL-8 産生を抑制する。このことは、口腔内（歯肉）損傷によって放出された HSC70 による炎症誘発をヒスタチンが抑制することを意味する。

これまで、ヒスタチンの機能解明は、歯周病原菌等に対する抗菌作用といった自然免疫学的観点から行われてきた。一方、ヒスタチンの宿主に与える生理的意義解明は殆ど行われていなかった。従って、本研究の知見は、これまで明らかにされていない唾液蛋白質の新たな機能を世界に先駆けて解明した内容である。

宿主に及ぼすヒスタチンの機能解明は、前述疾病（歯周病やカンジダ症など）による歯肉の炎症やこれに伴う歯槽骨吸収の軽減、歯肉の主構成細胞の再生・治療に繋がる。また、ヒスタチンの薬剤としての開発に期待される。

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2件）

① Imamura, Y., Fujigaki, Y., Oomori, Y., Ouryouji, K., Yanagisawa, S., Miyazawa, H., and Wang, P.-L. Transcriptional regulation of the salivary histatin gene: Finding of a strong positive regulatory element and its binding protein. *J. Biochem.*, 査読有, 2009, Vol. 145, 279-288

② Imamura, Y., Fujigaki, Y., Oomori, Y., Usui, S., and Wang P.-L. Cooperation of salivary protein histatin 3 with heat shock cognate protein 70 relative to the G1/S transition in human gingival

fibroblasts. J. Biol. Chem., 査読有, 2009, Vol. 284, 14316-14325

〔学会発表〕（計3件）

① 今村泰弘, ヒト歯肉線維芽細胞の細胞周期に関与する唾液ヒスタチンの機能. 第50回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2008年9月25日, 東京都 TOC有明

② 今村泰弘, 唾液ヒスタチンによるヒト歯肉線維芽細胞の細胞周期制御. 第51回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2009年9月11日, 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

③ 今村泰弘, 熱ショック蛋白質を介したTLR4シグナルにおける唾液ヒスタチンの抑制効果. 第52回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2010年9月22日, 東京都 タワーホール船堀

〔その他〕

① 読売新聞 長野版, 2009年6月27日, 朝刊, 口腔内の傷 回復の仕組み解明 たんぱく質結合 歯肉細胞が増殖, 松本歯科大

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 泰弘 (IMAMURA YASUHIRO)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 00339136

(2) 研究分担者

藤垣 佳久 (FUJIGAKI YOSHIHISA)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 80367523

荒 敏昭 (ARA TOSHIAKI)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 90387423

藤波 義明 (FUJINAMI YOSHIAKI)
松本歯科大学・歯学部付属病院・助手
研究者番号: 80392801

王 宝禮 (WANG PAO-LI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20213613