

平成22年 5月10日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791613

研究課題名（和文）歯周組織におけるマレイン酸イルソグラジンの抗炎症作用の解析

研究課題名（英文）The anti-inflammatory effect of irsogladine maleate in human gingival tissue.

研究代表者

藤田 剛 (FUJITA TSUYOSHI)

広島大学・病院・助教

研究者番号：80379883

研究成果の概要（和文）：

マレイン酸イルソグラジン（IM）は歯周病に対する予防効果があると考え、本研究では、歯周病原細菌刺激下の歯肉上皮における IM の影響について、*in vivo* および *in vitro* の面から検討した。その結果 *A. actinomycetemcomitans* 刺激によって惹起された炎症に対し、IM が歯肉上皮への炎症細胞浸潤を抑制するとともに、細胞間バリアーを強化し、炎症を制御することが示唆された。以上から IM の抗炎症効果が証明され、歯周病予防に有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

By regulating the intercellular junctional complex and chemokine secretion in human gingival epithelial cells (HGEC), irsogladine maleate (IM) may be useful to prevent periodontal disease. To clarify the effects and regulatory mechanism of IM *in vivo* and *in vitro*, we examined the expression of E-cadherin and neutrophil chemotaxis induced by *A. actinomycetemcomitans* under IM pretreatment. In the present study, we demonstrated that IM inhibited the *A. actinomycetemcomitans*-induced inflammatory response in gingival epithelium by suppressing neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. In addition, IM recovered the *A. actinomycetemcomitans*-induced reduction in E-cadherin, suggesting enhancement of the barrier function of gingival epithelium. In conclusion, IM may control *A. actinomycetemcomitans*-induced gingival inflammation by regulating neutrophil migration and E-cadherin expression in gingival epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病予防、歯肉上皮細胞、マレイン酸イルソグラジン、ケモカイン、細胞接着因子

## 1. 研究開始当初の背景

報告者はこれまでにマレイン酸イルソグラジンが細胞間結合に及ぼす効果について研究してきた。マレイン酸イルソグラジンは、歯周病原性細菌 *A.actinomycetemcomitans* によって誘導される歯肉上皮細胞の細胞間連絡ギャップジャンクションの低下を回復することを明らかにした。さらにマレイン酸イルソグラジンによる細胞間連絡の回復には、IL-8 が関与していること、またマレイン酸イルソグラジンは歯周病原性細菌 *A.actinomycetemcomitans* 刺激によるタイトジャンクション構成タンパクの発現低下を抑制することを解明した。さらに炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ 刺激に対する歯肉上皮細胞の細胞間連絡の低下をマレイン酸イルソグラジンが回復することを明らかにした。このようにマレイン酸イルソグラジンは歯周病原性細菌によって引き起こされる細胞間接着の破壊を回復することが明らかにされた。

## 2. 研究の目的

これまでに細胞接着装置に対するマレイン酸イルソグラジンの影響に関する研究を行ってきたが、歯周病原性細菌に感染した上皮細胞が産生する炎症起因子に関する研究はほとんど行っていない。これらの炎症起因子が細胞間結合に及ぼす影響も含めて、マレイン酸イルソグラジンの上皮細胞への抗炎症作用をさらに検討していく予定である。In vitro では、すでに DNA マイクロアレイを用いた予備研究を行っており、細菌刺激によって増加する IL-6, MIP-3, C-X-C ケモカインなどの炎症性サイトカインの mRNA 発現をマレイン酸イルソグラジンが制御することを明らかにしている。これらのサイトカインの発現及び細胞接着装置への相

互作用についても調べていく予定である。また in vivo では、ラットを用いて上記のサイトカイン、細胞接着装置の発現を確認する。

## 3. 研究の方法

(1)マレイン酸イルソグラジンが歯周病原性細菌刺激下においてヒト歯肉上皮細胞 (HGEC)の宿主防御機能に与える効果

①培養ヒト歯肉上皮細胞に IM 存在下または非存在下で、*A.actinomycetemcomitans* を作用させ、産生する炎症性サイトカイン、ケモカインの発現をタンパク質レベル(ELISA キット)および遺伝子レベル (リアルタイム PCR 法) で解析する。

②マレイン酸イルソグラジンが歯周病原性細菌存在下の上皮細胞における細胞内シグナル伝達系(MAP キナーゼ)に及ぼす影響について分析を行う。また各種インヒビター存在下で、マレイン酸イルソグラジンが細胞間結合および炎症性サイトカインに及ぼす影響について調べる。

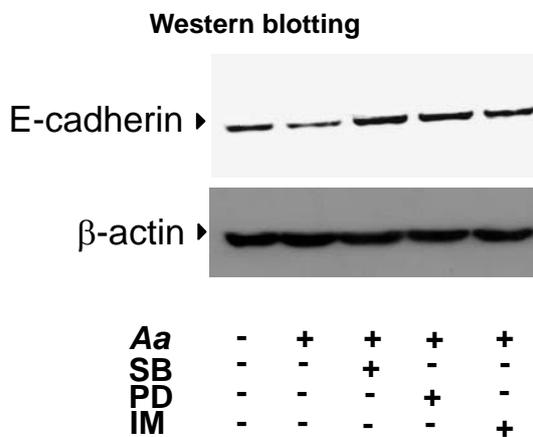
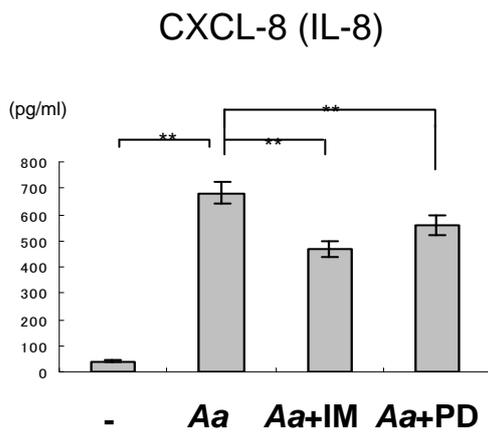
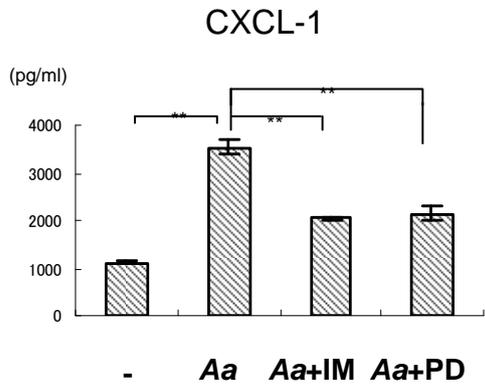
(2)実験的歯周炎における歯肉上皮の応答

マレイン酸イルソグラジン前投与及び非投与ラットの歯肉に歯周病原性細菌を感染させる。3 時間後の歯肉の発赤と腫脹の状態を調べる。また好中球の浸潤についても観察する。また、歯肉上皮細胞が産生する炎症性ケモカイン (CINC-2 $\alpha$ ) 及び細胞間接着因子 E-cadherin の発現を免疫染色によって調べる。

## 4. 研究成果

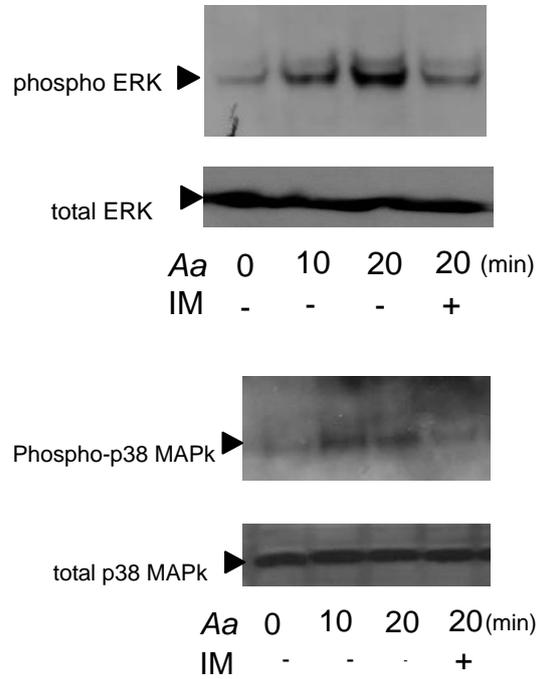
(1)HGEC 培養系においては *A.actinomycetemcomitans* によって誘導される CXCL-1, IL-8 の発現増加を IM, ERK のインヒビターが抑制した(ELISA)。さらに HGEC における E-cadherin の発現は

*A.actinomycetemcomitans* によって減少するが、IM、ERK 及び p38MAPK のインヒビターはこの発現低下を回復した (Western blotting)。

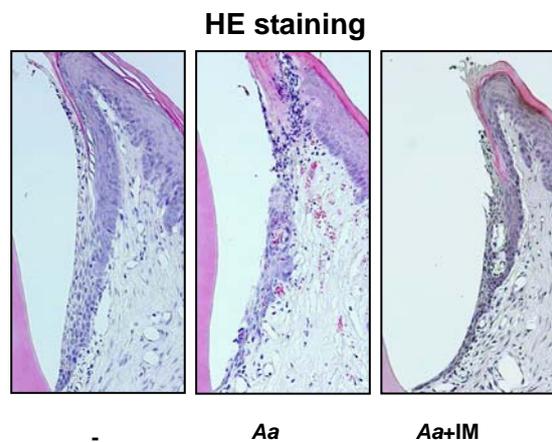


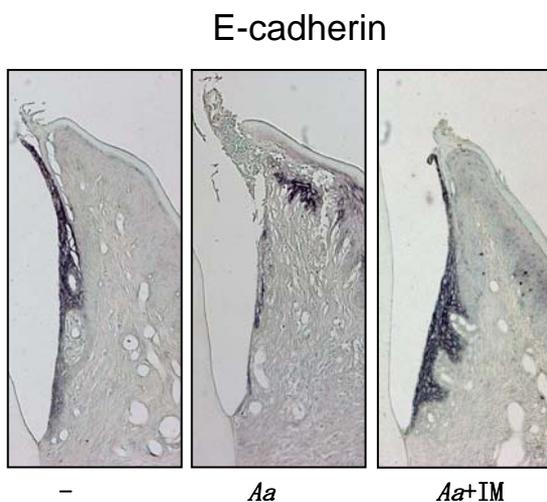
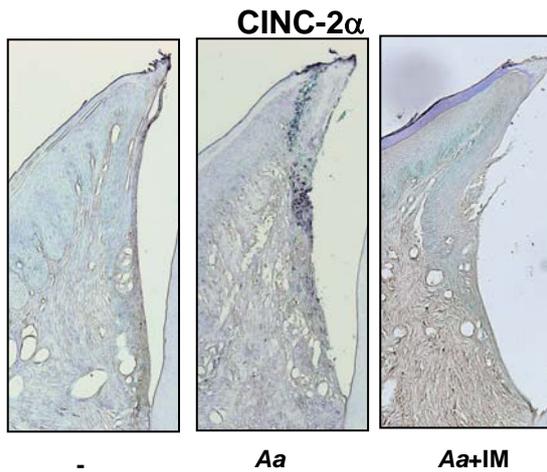
|           |   |   |   |   |   |
|-----------|---|---|---|---|---|
| <b>Aa</b> | - | + | + | + | + |
| <b>SB</b> | - | - | + | - | - |
| <b>PD</b> | - | - | - | + | - |
| <b>IM</b> | - | - | - | - | + |

(2)HGEC 培養系において、IM は *A.actinomycetemcomitans* によって誘導される ERK, p38 MAPK のリン酸化を抑制した。



(3)IM 投与群は、非投与群と比較して *A.actinomycetemcomitans* によって歯肉内縁上皮へ誘導される炎症性細胞の数が少なく、CINC-2αの発現が低かった。一方、IM 投与群は非投与群よりも E-cadherin の発現は高かった。





E-cadherin発低下を制御する 日本歯周病学会秋季学術大会 平成 21 年 10 月 10 日 宮崎観光ホテル(宮崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 剛 (FUJITA TSUYOSHI)

広島大学・病院・助教

研究者番号：80379883

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

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)

① Fujita T., Kishimoto A., Shiba H., 他 9 名中 1 番目

Irsogladine maleate regulates neutrophil migration and E-cadherin expression in gingival epithelium stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Biochemical Pharmacology*. 79:1496-1505, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

① 藤田 剛, マレイン酸イルソグラジンは *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* による歯肉上皮のケモカイン産生及び