

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18768

研究課題名(和文) ダウン症候群における歯周病の病態予測にユビキチンリガーゼPDLIM2は有効か？

研究課題名(英文) Low level expression of PDZ and LIM domain protein 2 (PDLIM2) human gingival fibroblasts is indicative of severe periodontal inflammation in Down syndrome

研究代表者

矢口 学 (YAGUCHI, Manabu)

日本大学・松戸歯学部・専修医

研究者番号：90732181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Down症候群(DS)はその特徴的な遺伝的背景により免疫応答の異常が認められ、重篤な歯周病を発症しやすいが、その機序は未だ不明な点が多い。本研究では歯肉線維芽細胞(GF)を用いた実験系により、転写因子NF- κ Bをユビキチン化・分解することで炎症反応を負に制御するユビキチンリガーゼE3であるPDZ and LIM domain protein-2(PDLIM2)の遺伝子発現ならびにタンパク質発現が、健常者由来GFに比べDS由来GFでは恒常的に低い傾向にあることが示された。従って、DSの重篤な歯周病病態にPDLIM2が深く関与している可能性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患の病態解明のために、その疾患特有の遺伝子に欠損もしくは変異が生じている遺伝性疾患を利用する手法が用いられており、近年、Down症候群(DS)由来細胞を用いたAlzheimer病の病態解明が大きな成果をあげている。本研究では、健常者と比べDS由来歯肉線維芽細胞で炎症を負に制御するPDLIM2の発現が恒常的に低かった。つまり、DSは炎症抑制遺伝子の欠損ないし変異が生じていると言える。本研究に使用した臨床サンプルは小児DS由来のため、経過を追うことで将来的な歯周病発症の有無を確認し、DSにおける免疫応答性の個体差を明らかにできれば、健常者における歯周病の病態解明にも応用できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Individuals with Down syndrome (DS) have a high prevalence of severe periodontitis, which develops early and proceeds rapidly, in comparison with healthy controls (non DS). The abnormal host responses have been considered to result in severe periodontal disease in individuals with DS. However, the mechanisms of development and procedure of periodontal inflammation in DS are not fully understood. The nuclear PDZ and LIM domain protein 2 (PDLIM2) acts an ubiquitin E3 ligase that targets the p65 subunit of nuclear factor-kappa B (NF- κ B), thus terminating NF- κ B-mediated inflammation. In this study, we compared the gene and protein expression levels of PDLIM2 in the gingival fibroblasts from individuals with DS (DGF) and non DS (NGF). The gene and protein expression levels of PDLIM2 in DGF were constitutively lower than those in NGF. These data indicate that low level expression of PDLIM2 in DGF may be associated with the severe periodontal disease in DS patients.

研究分野：歯学

キーワード：Down症候群 歯周病 NF- κ B ユビキチンリガーゼ PDLIM2

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Down 症候群 (DS) は、染色体異常の中でも最も頻度が高く、歯科領域における最重要課題は、早期に発症し急速に進行する重篤な歯周病である。現在までに DS の歯周病の発症と進行のメカニズムに関する基礎研究は、国内で数施設、国外ではほとんど認められない状態であり、未だ病態解明には至っていない。申請者らは、DS 由来歯肉線維芽細胞 (DGF) における歯周病原細菌由来 LPS に対する宿主反応に着目し、健常者由来歯肉線維芽細胞 (NGF) と比較して、様々な炎症関連物質の発現亢進を明らかにするなど多くの研究成果を得ている。しかしながら DS の臨床症状は個人差が大きく、重篤な歯周病の発症と進行のメカニズムは未だ不明な点が多い。これまでの研究成果から、DS の宿主反応が健常者と異なることは明らかであり、なかでも DGF において炎症反応に必須の転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の異常活性化が示唆されたことは興味深い、その機序は明らかにできていない。

一方、これまでの DS における歯周病の基礎研究は炎症を促進する因子ばかりが注目されてきた。しかしながら、DS における重篤な歯周病には、炎症反応に対して抑制的に働く因子に何らかの異常があり、炎症期が終息できないために慢性炎症の遷延化が引き起こされているのではないかと考えた。最近、核内ユビキチンリガーゼである PDZ and LIM domain protein-2 (PDLIM2) が樹状細胞において NF- κ B をユビキチン化・分解することで炎症反応を抑制していることが明らかにされた。そこで、炎症抑制系に働く PDLIM2 が DS における重篤な歯周病の病態形成に関与しているのではないかと考えに至った。さらに、これまで行ってきた基礎研究において DS の宿主反応の個人差が大きいことを経験してきた。臨床経験からも DS 患者における歯周病の病態に個人差があることを強く認識している。これらのことから、DS 個体間における免疫機能の差が歯周病の病態形成に大きく影響しているものと予想された。

2. 研究の目的

DS はその特徴的な遺伝的背景により免疫応答の異常が認められ、重篤な歯周病が持続しやすいが、その機序は未だわかっていない。申請者らは、歯周病原細菌に対する DS 由来歯肉線維芽細胞の宿主反応が健常者と異なることを明らかにしてきた。一方で、興味深いことに臨床経験から DS であっても歯周病を発症しない者も多く見受けられる。炎症反応に必須な転写因子 NF- κ B の過剰かつ無制限な活性化が慢性炎症性疾患を発症させるが、この NF- κ B の活性化の ON/OFF がうまく制御できていないことが DS における歯周病の病態の違いの要因ではないかと考えられる。そこで、本研究では NF- κ B をユビキチン化・分解することにより炎症反応を負に制御する PDLIM2 に着目することで、DS における歯周病の発症と進行のメカニズムの解明を目指す。さらに、これらの結果より得られた知見は健常者における歯周病の病態解明にも応用できるものと考えられる。

3. 研究の方法

これまでにヒト歯肉線維芽細胞において PDLIM2 に関連した報告はない。従って、ヒト歯肉線維芽細胞株 HGF-1 (ATCC[®] CRL-2014[™]) を用いて歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 由来 LPS (P-LPS) に対する PDLIM2 遺伝子およびタンパク質発現の変動をリアルタイム PCR 法ならびにウェスタンブロット法で検討することで本研究を遂行するための足がかりとした。加えて、PDLIM2 が歯周病の病態形成にどのような影響を与えているかは不明であることから、ヒト歯肉線維芽細胞においても PDLIM2 は歯周病原細菌に起因する炎症反応を抑制し得るかを確認した。すなわち、siRNA を用いて PDLIM2 をノックダウンさせた HGF-1 における P-LPS に対する NF- κ B の標的遺伝子の発現、NF- κ B p65 の核移行を指標に検証した。さらに、DS と健常者より分離培養した歯肉線維芽細胞を用いて PDLIM2 の発現の違いや、P-LPS 刺激に対する炎症関連物質の発現への影響を比較検討した。

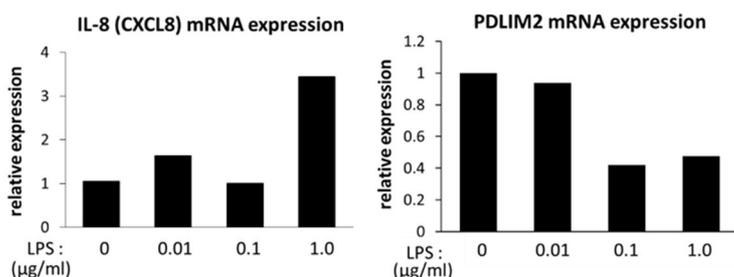
4. 研究成果

本研究の結果、ヒト歯肉線維芽細胞 HGF-1 において恒常的に PDLIM2 が発現していることが確認された。一方、P-LPS 刺激によって IL-8 遺伝子発現は有意に上昇したのに対し、PDLIM2 遺伝子発現およびタンパク質発現は濃度依存的に有意に減少した (図 1, 2)。また、転写因子 NF- κ B p65 の核移行は濃度依存的に P-LPS 刺激によって誘導された (図 2)。さらに、siRNA を用いて PDLIM2 をノックダウンさせた HGF-1 において P-LPS 刺激で IL-8 遺伝子発現が対照と比較して有意に上昇した (図 3)。以上より、ヒト歯肉線維芽細胞において PDLIM2 が P-LPS によって誘導される炎症応答を抑制的に制御している可能性が高いと考えられた。

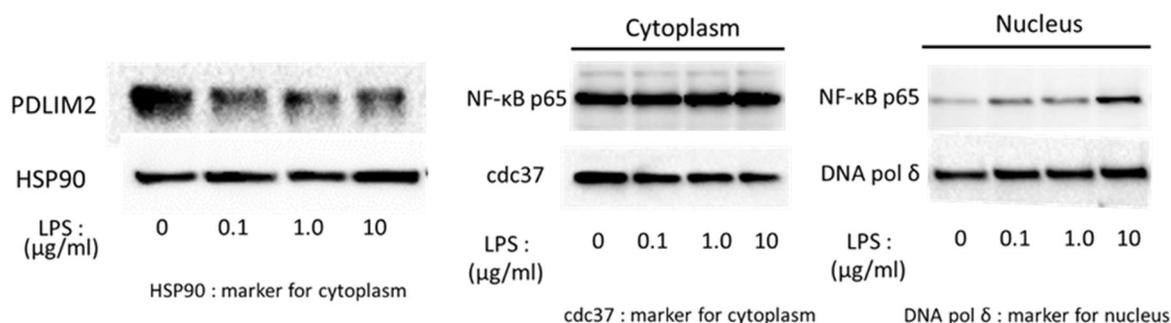
次に、健常者由来歯肉線維芽細胞 (NGF) と DS 由来歯肉線維芽細胞 (DGF) との比較では、P-LPS 刺激による IL-8 遺伝子発現が DGF で有意に上昇した (図 4)。さらに興味深いことに、NGF と比較して DGF では無刺激時に PDLIM2 発現が有意に低いことが示された (図 5)。従って、DS における重篤な歯周病の病態形成には、炎症反応に対して抑制的に働く PDLIM2 の低発現が深く関与している可能性が高く、そのことが慢性炎症の遷延化を引き起こしているのではないかと考えら

れた。また、本研究で用いた臨床サンプルは小児 DS 由来であるため、経過を追うことで将来的な歯周病発症の有無を検証し、DS における免疫応答性の個体差を明らかにすることができれば、健常者における歯周病の病態解明にも応用できるものと考えられる。

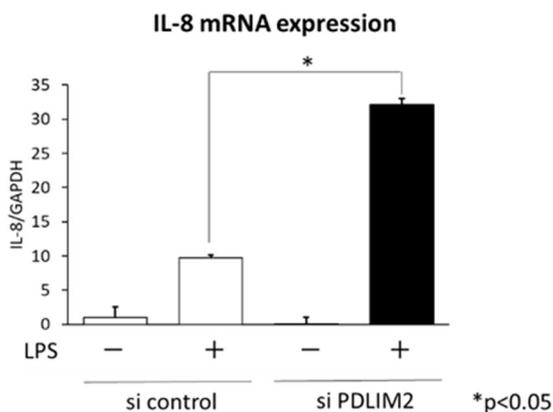
(図 1) HGF-1 における P-LPS 刺激による IL-8 ならびに PDLIM2 遺伝子発現



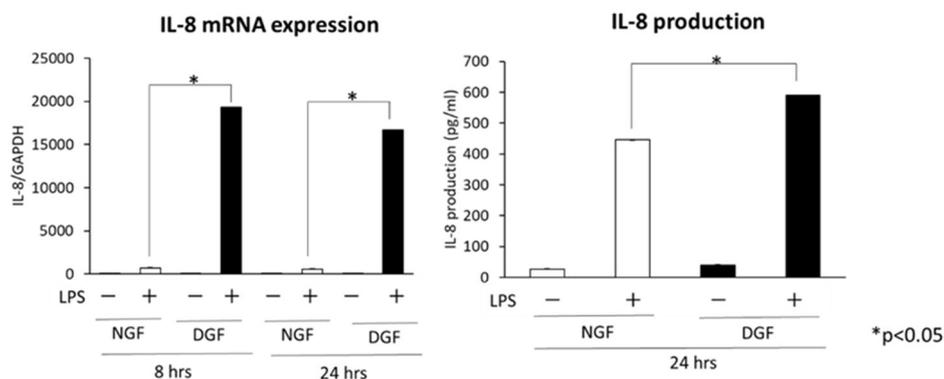
(図 2) HGF-1 における LPS 刺激による PDLIM2 および NF- B p65 タンパク質発現



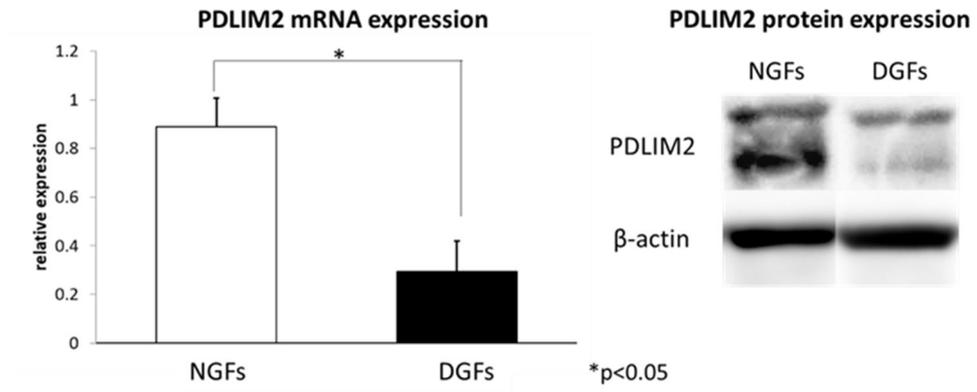
(図 3) HGF-1 における PDLIM2 ノックダウンによる影響



(図 4) DGF における P-LPS 刺激による IL-8 遺伝子発現ならびにタンパク質産生量



(図 5) DGF における PDLIM2 遺伝子発現およびタンパク質発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takatoshi Nomura, Yoko Tanaka, Manabu Yaguchi, Noriko Shinozaki-Kuwahara, Takato Nomoto	4. 巻 22
2. 論文標題 High glucose promotes invasion of <i>Fusobacterium nucleatum</i> and inflammatory responses in human bronchial fibroblasts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 165-177
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 野村宇稔, 田中陽子, 矢口学, 栗原紀子, 野本たかと	4. 巻 50
2. 論文標題 高濃度グルコース条件下において <i>Fusobacterium nucleatum</i> 接種により血管内皮細胞のIL-1 およびMMP-9 発現に与える影響	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日大口腔科学	6. 最初と最後の頁 1-12
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keiko Higa, Yoko Tanaka, Manabu Yaguchi, Takatoshi Nomura, Noriko Kuwahara, Takato Nomoto	4. 巻 21
2. 論文標題 Imbalance of IL-1 Family mRNA Expression and IL-37 as a Potential Therapeutic Target for Periodontal Inflammation in Down Syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 147-155
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 比嘉桂子, 田中陽子, 矢口学, 野村宇稔, 栗原紀子, 野本たかと	4. 巻 49
2. 論文標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞への <i>Fusobacterium nucleatum</i> 接種の影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日大口腔科学	6. 最初と最後の頁 1-11
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazukuni Ichikawa, Manabu Yaguchi, Yoko Tanaka	4. 巻 20
2. 論文標題 The Effect of Porphyromonas gingivalis Augmented Invasion by TNF- on Gingival Fibroblasts Derived from Down Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 87-97
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小野晃弘, 矢口学, 田中陽子	4. 巻 47
2. 論文標題 Down 症候群由来歯肉線維芽細胞にみられる Porphyromonas gingivalis 生菌体に対する応答性の異常	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日大口腔科学	6. 最初と最後の頁 239-251
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田中陽子, 矢口学, 野村宇稔, 市川一國, 根岸浩二, 小野晃弘, 栗原紀子, 野本たかと	4. 巻 42
2. 論文標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞に対するPorphyromonas gingivalis 産生酵素PepDの影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本障害者歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 43-52
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 矢口学, 田中陽子, 栗原紀子, 野村宇稔, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるFusobacterium nucleatumの活性酸素ストレスへの影響
3. 学会等名 第40回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中陽子, 竹内麗理, 矢口学, 野村宇稔, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞における細胞増殖能
3. 学会等名 第40回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村宇稔, 田中陽子, 矢口学, 栗原紀子, 野本たかと
2. 発表標題 高血糖状態における血管内皮細胞へのFusobacterium nucleatumの影響
3. 学会等名 第40回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢口学, 田中陽子, 野村宇稔, 栗原紀子, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるPorphyromonas gingivalis 外膜小胞による影響
3. 学会等名 第39回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中陽子, 矢口学, 野村宇稔, 栗原紀子, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるIL-1ファミリー遺伝子発現のアンバランスさ
3. 学会等名 第39回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野村宇稔, 田中陽子, 矢口学, 栗原紀子, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるプロテアーゼ活性化受容体の過剰発現
3. 学会等名 第39回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takatoshi Nomura, Yoko Tanaka, Manbu Yaguchi, Takato Nomoto
2. 発表標題 The importance of face-to-face relationship for mutual understanding in regional medical corporation
3. 学会等名 第2回アジア障害者歯科学会 (AADOH) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢口学, 田中陽子, 野村宇稔, 市川一國, 野本たかと
2. 発表標題 Down 症候群由来歯肉線維芽細胞にみられる Porphyromonas gingivalis に対する異常な細胞応答性
3. 学会等名 第38回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中陽子, 矢口学, 野村宇稔, 市川一國, 野本たかと
2. 発表標題 Down 症候群由来歯肉線維芽細胞にみられる環境変化感知センサーTRPの低発現
3. 学会等名 第38回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村宇稔, 田中陽子, 矢口学, 市川一國, 野本たかと, 桑原紀子
2. 発表標題 TNF- 刺激ヒト気管上皮細胞における P. gingivalis による炎症応答の増大
3. 学会等名 第38回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村宇稔, 田中陽子, 矢口学, 市川一國, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞に対するPorphyromonas gingivalisの生菌および死菌の影響
3. 学会等名 第20回日本大学口腔科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢口学, 田中陽子, 佐久間 圭, 野村宇稔, 市川一國, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるPDLIM2発現の低下
3. 学会等名 第37回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間圭, 田中陽子, 矢口学, 野村宇稔, 市川一國, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるIL-4に対する炎症メディエーターの細胞内シグナル伝達異常
3. 学会等名 第37回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根岸浩二, 田中陽子, 矢口学, 佐久間圭, 野村宇稔, 市川一國, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるMMP発現へのIL-4の影響
3. 学会等名 第37回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村宇稔, 田中陽子, 矢口学, 佐久間圭, 市川一國, 桑原紀子, 野本たかと
2. 発表標題 型P.g由来タンパク分解酵素によるDown症候群由来歯肉線維芽細胞への影響
3. 学会等名 第37回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根岸浩二, 田中陽子, 矢口学, 佐久間圭, 市川一國, 野村宇稔, 野本たかと
2. 発表標題 Down症候群由来歯肉線維芽細胞におけるIL-4の影響
3. 学会等名 第20回日本大学口腔科学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------