

## 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 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592657

研究課題名（和文） 抗炎症作用を有するエンドペプチダーゼを用いた歯周病予防・治療薬の開発

研究課題名（英文） Study on anti-inflammatory action of endopeptidases for prevention and treatment of periodontal diseases

研究代表者

粟野 秀慈（Awano Shuji）

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20301442

研究成果の概要（和文）：口腔上皮におけるneutral endopeptidase（NEP）ならびに endothelin-converting enzyme-1（ECE-1）の抗炎症反応の役割を解明するため、ヒト培養口腔ケラチノサイト（hOMK）におけるNEPと神経ペプチドで炎症関連因子の一つであるsubstance P（SP）、同じく炎症関連因子の一つであるinterleukin-1 $\beta$ （IL-1 $\beta$ ）との関連について検証を行い、NEPは口腔ケラチノサイトにおいて、細胞から産生されるSP及びIL-1 $\beta$ の産生量を制御することが示された。また、ECE-1はhOMKにおいて、NEPと協働で炎症因子を制御し、抗炎症作用を有している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This project verified the role of neutral (NEP) and endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) in oral epithelial keratinocyte (hOMK). As a result, NEP has been found to regulate the levels of inflammatory mediators such substance P and interleukin-1 $\beta$  generated from hOMK with ECE-1, and it is suggested that NEP and ECE-1 on hOMK have anti-inflammatory action during the inflammatory process of periodontal diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	900,000	270,000	1,170,000
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：社会系歯学

キーワード：エンドペプチダーゼ、NEP、サブスタンス P、インターロイキン-1、歯周疾患、ケラチノサイト

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚は生体を防御するための重要な免疫システムの役割を担っており、皮膚を司る細胞ケラチノサイトは、紫外線、抗原、アレルゲンといった有害な物質に対する反応で様々なサイトカインやケモカインなどを分泌することにより皮膚上で起きる免疫・炎症反応

に関与している。一方、ケラチノサイト上には、ケモカインやサイトカインのようなペプチドを分解して、免疫・炎症反応を制御するエンドペプチダーゼが存在している。これらのエンドペプチダーゼはケラチノサイトだけでなく様々な細胞で発現しており、免疫・炎症ネットワークを阻害することにより、抗

炎症、抗腫瘍作用などの重要な役割を担っていると考えられている。口腔上皮においても様々なエンドペプチダーゼが発現し、歯周病や口腔癌といった口腔疾患の病態の制御に関わっていると考えられる。したがって口腔ケラチノサイトにおけるエンドペプチダーゼの免疫・炎症ネットワークに対する作用を明らかにすることは、歯周炎の発生や進行を制御する方法を考える上で重要である。

## 2. 研究の目的

抗炎症作用を有するエンドペプチダーゼを用いた歯周病予防・治療薬の可能性を検証するため、口腔ケラチノサイトにおける NEP や ECE-1 の免疫・炎症ネットワークに対する作用について基礎的データを収集することを目的としている。

## 3. 研究の方法

培養ケラチノサイト上の NEP や ECE-1 のエンドペプチダーゼ活性を制御した場合、培養ケラチノサイトに対する炎症誘発因子により誘導される Substance P といった神経ペプチドまたは interleukin-1 などのサイトカインによる炎症ネットワークの変化を検証し、各種エンドペプチダーゼの抗炎症作用を検証する。

## 4. 研究成果

NEP 酵素活性は、NEP・ECE-1 活性阻害剤 (Phosphoramidon) 及び NEP 特異的阻害剤 (Thiorphan) 添加時に NEP 酵素活性の減少が認められた。一方、ECE-1 活性に影響される ET-1 濃度は Thiorphan を添加した場合には減少は認められず、Phosphoramidon を添加した場合に有意に減少した。また、培養上清中の SP 濃度は、Phosphoramidon と Thiorphan の添加時においては、それぞれが単独で添加された場合に比べて増加する傾向にあり、同様に IL-1 $\beta$  濃度も、Phosphoramidon と Thiorphan の添加時においては、それぞれ単独で添加した場合に比べてより増大する傾向にあった。

本研究の結果より、NEP は口腔ケラチノサイトにおいて、細胞から産生される SP 及び IL-1 $\beta$  の産生量を制御することが示された。また、ECE-1 は hOMK において、NEP と協働で炎症因子を制御し、抗炎症作用を有している可能性が示唆された。

## 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 10 件)

- ① Rikimaru, T., Awano, S., Mineoka, T., Yoshida, A., Ansai, T. and Takehara, T.: Relationship between endothelin-1 and interleukin-1 beta in inflamed periodontal tissues. Biomed Res. 30: 349-355, 2009.
- ② Ansai, T., Soh, I., Ishisaka, A., Yoshida, A., Awano, S., Hamasaki, T., Sonoki, K., Takata, Y. and Takehara, T.: Determination of cortisol and dehydroepiandrosterone levels in saliva for screening of periodontitis in older Japanese adults. Int J Dent. vol. 2009, Article ID 280737, 8 pages.
- ③ Masakiyo, Y., Yoshida, A., Takahashi, Y., Shintani, Y., Awano, S., Ansai, T., Sawayama, S., Shimakita, T. and Takehara, T.: Rapid LED-based fluorescence microscopy distinguishes between live and dead bacteria in oral clinical samples. Biomed Res. 31: 21-26, 2010.
- ④ Takahashi, Y., Yoshida, A., Nagata, E., Hoshino, T., Oho, T., Awano, S., Takehara, T. and Ansai, T.: Streptococcus anginosus L-cysteine desulphhydrase gene expression is associated with abscess formation in BALB/c mice. Molecular Oral Microbiol. 26: 221-227, 2011.
- ⑤ Takata, Y., Ansai, T., Soh, I., Awano, S., Yoshitake, Y., Kimura, Y., Nakamichi, I., Goto, K., Fujisawa, R., Sonoki, K., Yoshida, A., Toyoshima, K. and Nishihara, T.: Physical fitness and 6.5-year mortality in an 85-year old community-dwelling population. Arch Gerontol Geriatr. 2012 Jan;54(1):28-33.
- ⑥ Awano S., Takata Y, Soh I., Yoshida A., Hamasaki T, Sonoki K, Ohsumi T, Nishihara T, Ansai T.: Correlations between health status and OralChroma™-determined volatile sulfide levels in mouth air of the elderly. J Breath Res. 2011 Sep 22;5(4):046007.
- ⑦ Takahashi Y, Yoshida A., Nagayoshi M, Kitamura C, Nishihara T, Awano S., Ansai T. Enumeration of viable Enterococcus faecalis, a predominant apical periodontitis pathogen, using propidium monoazide and quantitative real-time polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 2011 Oct 17. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00390.x.
- ⑧ Takata Y, Ansai T., Soh I., Awano S., Yoshitake Y, Kimura Y, Nakamichi I, Akifusa S, Goto K, Yoshida A., Fujisawa R, Sonoki K, Nishihara T: Association of disease-specific mortality with physical fitness measurements and nonparticipation in an 80-year-old

population. Geriatrics, In: Geriatrics, ed. by Craig S. Atwood; InTech (Open Access Publisher), ISBN 978-953-51-0080-5, 2012.

- ⑨ Iizuka N, Awano S, Ansai T: Salivary  $\alpha$ -amylase activity and stress in Japan Air Self-Defence Force cargo pilots involved in Iraq reconstruction. American Journal of Human Biology, 2012 Feb 18. doi: 10.1002/ajhb.22247.
- ⑩ Teratani G, Awano S, Soh I, Yoshida A, Kinoshita N, Hamasaki T, Takata Y, Sonoki K, Nakamura H, Ansai T: Oral health in patients on haemodialysis for diabetic nephropathy and chronic glomerulonephritis. Clin Oral Investig. 2012 May 3.

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① Kinoshita, N., Awano, S., Yoshida, A., Soh, I., Mineoka, T., and Ansai, T.: Neutral Endopeptidase and Endothelin-converting Enzyme in Human Buccal Mucosal Epithelium. 58th Japanese Association for Dental Research, Kitakyushu, Nov 20-21, 2010.
- ② 中田元希, 粟野秀慈, 木下直昌, 峰岡哲郎, 吉田明弘, 邵 仁浩, 安細敏弘: 培養口腔ケラチノサイトにおける neutral endopeptidase と substance P との関係について. 第 71 回九州歯科学会総会, 北九州, 2011 年 5 月 28, 29 日, 九州歯科学会雑誌 65: 33, 2011.
- ③ 木下直昌, 粟野秀慈, 中田元希, 吉田明弘, 邵 仁浩, 峰岡哲郎, 安細敏弘: 頬粘膜上皮で発現するメタロプロテアーゼ遺伝子に関するパイロット研究. 第 71 回九州歯科学会総会, 北九州, 2011 年 5 月 28, 29 日, 九州歯科学会雑誌 65: 34, 2011.
- ④ 木下直昌, 粟野秀慈, 中田元希, 吉田明弘, 邵 仁浩, 峰岡哲郎, 安細敏弘: 粘膜上皮におけるメタロプロテアーゼの遺伝子発現レベルと歯周健康状態との関係. 第 60 回日本口腔衛生学会総会, 松戸, 2011 年 10 月 8-10 日, 口腔衛生会誌 61: 472, 2011.
- ⑤ 中田元希, 粟野秀慈, 木下直昌, 峰岡哲郎, 吉田明弘, 邵 仁浩, 安細敏弘: 培養口腔ケラチノサイトにおける neutral endopeptidase の作用について. 第 60 回日本口腔衛生学会総会, 松戸, 2011 年 10 月 8-10 日, 口腔衛生会誌 61: 479, 2011.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kyu-dent.ac.jp/dept/oral-health/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粟野秀慈 (Awano Shuji)  
九州歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 20301442

(2) 研究分担者

安細敏弘 (Ansai Toshihiro)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 80244789

邵 仁浩 (Sou Inho)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 10285463

竹原直道 (Takehara tadamichi)  
九州歯科大学・歯学部・名誉教授  
研究者番号: 00038879

吉田明弘 (Yoshida Akihiro)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 20364151

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: