

## 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 4 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792087

研究課題名（和文）歯肉上皮細胞の防御機能制御による新規歯周病予防法の開発

研究課題名（英文）Investigation of preventive method for periodontal disease by regulating gingival epithelial cell's function

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）：これまでにイルソグラジンマレイン酸が *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* によって誘導されるヒト歯肉上皮細胞の IL-8 産生を抑制すること、及び細胞間結合能の低下を回復することを明らかにした。このことから、イルソグラジンマレイン酸は歯周病に対する予防効果があると考えられる。歯肉上皮細胞間バリアーは歯周病原性細菌侵入に対して物理的バリアーとして機能する。本研究では、TNF- $\alpha$ 作用下の歯肉上皮においてイルソグラジンマレイン酸が歯肉上皮細胞間バリアーに及ぼす影響について検討した。ヒト歯肉上皮細胞培養系では、TNF- $\alpha$ で刺激したヒト歯肉上皮細胞において細胞間の透過性亢進が認められたが、イルソグラジンマレイン酸はその透過性亢進を抑制した。また、蛍光免疫染色において、イルソグラジンマレイン酸は TNF- $\alpha$ によって誘導される claudin-1 の不均一な局在を抑制した。さらに TNF- $\alpha$ は E-cadherin を mRNA, タンパクレベルで発現を低下させたが、イルソグラジンマレイン酸は発現低下を抑制した。以上から、イルソグラジンマレイン酸は歯肉上皮細胞の細胞間バリアーを強化することで、炎症を制御すること可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Since gingival epithelial cell layer functions as a mechanical barrier, the permeability of epithelial cell layer indicates the defensive ability against invasion of periodontal pathogens. E-cadherin and claudin-1 are key molecules to regulate permeability of epithelium. Irsogladine maleate (IM) is a medication for gastric ulcer and also regulates chemokine secretion and E-cadherin expression in gingival epithelium stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* *in vivo* and *in vitro* studies. In this study, we have further investigated the effects of IM on barrier functions of gingival epithelial cells in inflammatory condition. TNF- $\alpha$  induced the disruption of claudin-1 and E-cadherin and IM recovered the disruption in human gingival epithelial cell. These results suggest that IM recovers the TNF- $\alpha$ -induced disruption of gingival epithelial barrier by regulating E-cadherin and claudin-1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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, イルソグラジンマレイン酸, 細胞間バリアー, 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主にイルソグラジンマレイン酸の抗炎症効果について研究してきた。イルソグラジンマレイン酸は、歯周病原性細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* によって誘導される歯肉上皮細胞のIL-8の産生を抑制すること、および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、さらにイルソグラジンマレイン酸による細胞間連絡の回復にはIL-8が関与していることを報告した。またイルソグラジンマレイン酸は歯周病原細菌が引き起こす歯周組織への炎症細胞の遊走を抑制することを *in vitro*, *in vivo* において明らかにした。また一方で、歯周炎の発症に深く関与している接合上皮において、細胞間バリアーに関与する接着タンパク claudin-1が存在していることを初めて報告した。

## 2. 研究の目的

上述のように報告者は、歯周病原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を報告してきた。しかしながら、歯肉上皮細胞は細菌に対して最前線に位置しているため、上皮細胞の防御機能に関する解析がさらに必要である。本研究においては、イルソグラジンマレイン酸が *A. actinomycetemcomitans* に感染した歯肉上皮細胞の物理的バリアー機能に及ぼす影響について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) claudin-1の発現について

LPS刺激下のラット歯肉から接合上皮をレーザーマイクロダイセクションで切り出し、DNA マイクロアレイで分析した結果、接着因子である claudin-1 mRNA が有意に LPS によって抑制されることが明らかとなった。ラットの歯肉接合上皮を用いて、claudin-1の免疫染色を行い、コントロール群と比較する。

### (2) イルソグラジンマレイン酸の上皮細胞間バリアーに対する影響について

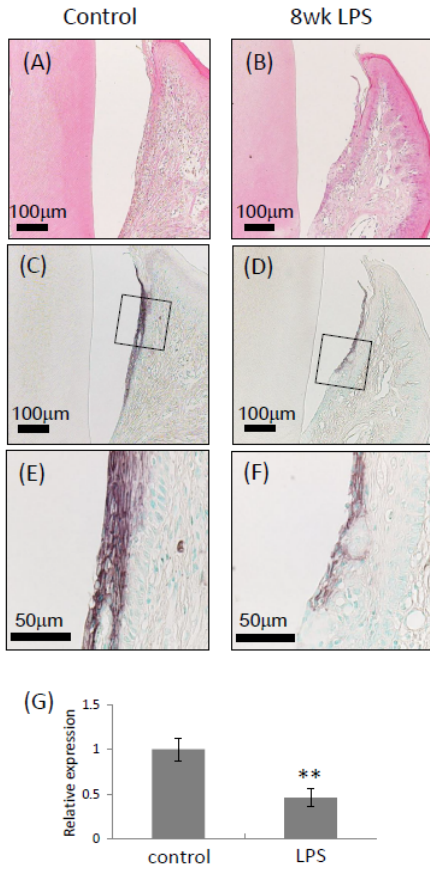
培養歯肉上皮細胞がコンフルエントになった時点で、イルソグラジンマレイン酸を TNF- $\alpha$  存在下で上皮細胞に作用させる。細胞応答の解析は歯肉上皮細胞の細胞間透過性については transepithelial electric resistance (TER) 法で解析した。細胞接着タンパクの発現 claudin-1, E-cadherin の発現をタンパクレベルで解析した。

## 4. 研究成果

### (1) claudin-1の発現について

遺伝子レベルと同様に、claudin-1が有意にLPSによって抑制されることが明らかとなった。

claudin-1 (免疫染色)



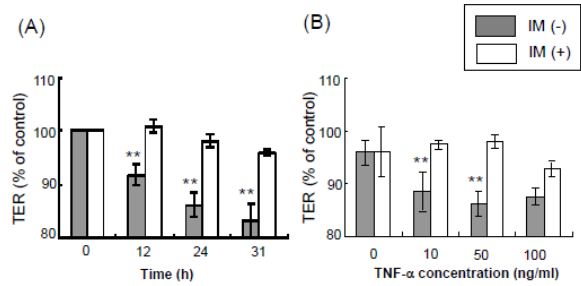
以上から、歯周病の発症において claudin-1が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(2) イルソグラジンマレイン酸の効果について

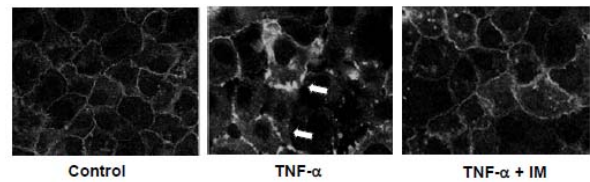
イルソグラジンマレイン酸を作用させた歯肉上皮培養細胞は炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ によって低下する上皮細胞間バリアーを回復することが解明された。さらに、細胞接着装置である E-cadherin, claudin-1の構造がTNF- $\alpha$ によって破壊されるが、イルソグラジンマレイン酸の投与によってその破壊は抑制されることが明

らかとなった。

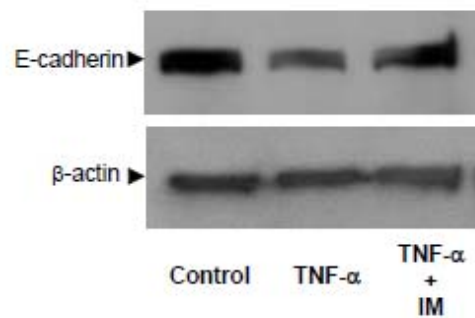
上皮細胞間透過性



claudin-1(免疫染色)



E-cadherin (Western blotting)



これらのことから、炎症性サイトカインによって誘導された歯肉上皮細胞の細胞間バリアーの破壊が、イルソグラジンマレイン酸の投与によって予防できることが示唆された。

## 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2件)

1. Loss of claudin-1 in lipopolysaccharide-treated periodontal epithelium. Fujita T., Firth JD., Kittaka M., 以下3名  
*J. Periodontal Res.* 2012, 47:222-227.  
査読有

2. Irsogladine maleate regulates epithelial barrier function in tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated human gingival epithelial cells. Fujita T., Yumoto H., Shiba H., 以下8名  
*J. Periodontal Res.* 2012, 47:55-61.  
査読有

[学会発表] (計1件)

1. 藤田剛、イルソグラジンマレイン酸を用いた歯肉上皮細胞の機能制御による歯周病予防法開発に関する研究 第53回歯科基礎医学会, 歯科基礎医学会学会賞受賞講演(招待講演) 平成23年10月2日 長良川国際会議場(岐阜)

[その他]

ホームページ等

## 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：