

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593119

研究課題名(和文) 歯周炎罹患歯肉局所におけるアルツハイマー病関連遺伝子の発現亢進を探る

研究課題名(英文) Elevated expression of Alzheimer disease related genes in periodontitis-affected gingival tissues

研究代表者

久保田 健彦 (Kubota, Takehiko)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：50303136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：(第1報) Amyloid beta (A4) precursor protein, interleukin (IL)-1 beta, C1QAが歯周炎罹患歯肉局所で有意に発現上昇していること、発現細胞がMacrophagesであることを報告(Archs Oral Biol 2014)。(第2報) 歯周炎罹患歯肉組織において、炎症関連経路:Toll-like receptor signaling pathway のMD-2, CD14, IL-1beta, IL-8 及びCXCL-9 mRNA が有意に上昇していることを突き止めた (Opn J Stomatol 2014)。

研究成果の概要(英文)：We have first reported that the significantly elevated expression of Amyloid beta (A4) precursor protein (APP) transcript levels in human periodontitis-affected gingival tissues. It was also identified that the APP-expressing cells in inflamed gingival tissues were mainly macrophages (Archs Oral Biol 2014). Secondary, significantly upregulated genes including MD-2, CD14, IL-1beta, IL-8 and CXCL-9, which belongs to toll-like receptor (TLR) signaling pathway were also found in periodontitis-affected gingival tissues. It was reported and published in Opn J Stomatol 2014.

研究分野：歯周病学

キーワード：医療・福祉 歯学 免疫学 病理学 遺伝子発現 タンパク質局在 歯周病 アルツハイマー病

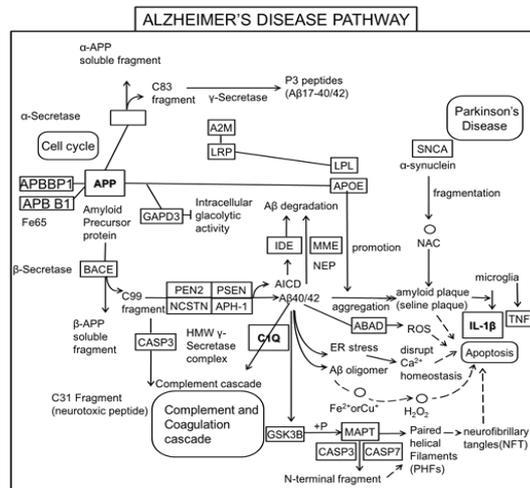
1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) はアミロイドタンパクの沈着、タウ蛋白から成る神経原線維の変性を伴う原因不明の脳炎症性疾患である。一方、近年の超高齢化社会に伴い歯周炎有病者が増加するとともに全身疾患を併発する患者が増えている。中でも認知症の原因の大部分を占める AD は本人の QOL を損ねるだけでなく、患者家族や親族にも影響を及ぼし大きな社会問題となっている。アメリカ歯周病学会は、脳・心臓血管障害・糖尿病・リウマチ・悪性腫瘍と同列に加齢・炎症に伴う歯周病関連全身疾患として AD を挙げている (*J Periodontol*, 2010)。しかしながら本疾患と歯周炎との相互関係はレビュー (*Dementia* 2008) を含めいくつかの疫学研究があるものの生物学的関連メカニズムに関しては不明な点が多い。

一方、AD は Amiloid beta (A4) precursor protein (AAP)タンパクが遺伝・加齢・炎症に伴い蓄積することが一因となることが解っており、その合成と分解のバランスと最終的な組織破壊には、Matrix metalloproteinases (MMPs) が重要な役割を果たす (*Nature*, 2009) ことから、その病態形成に歯周炎との共通項が多い。

我々はこれまで歯周組織破壊必須酵素である MMPs とそのインヒビターである TIMPs について 15 年以上にわたり一連の分子生物学的及び免疫組織化学的研究を行ってきた (*Arch Oral Biol*, 1996, 2008, 2010; *J Periodontal Res*, 1997, 2001, 2011; *J Clin Periodontol*, 2004a, 2004b, *J Periodontol*, 2008, 2011, *Med Oral Pahol* 2008)。更に、歯周炎罹患歯肉局所で、特異的に転写増強される遺伝子群及び抑制される遺伝子群を画期的な DNA Microarray (GeneChip®, Human genome array U133) system を用いて、5 万余の遺伝子の中から網羅的検索を行った。その結果、歯周炎罹患歯肉組織中において、白血球血管内移動経路と同時にアルツハイマー病関連遺伝子群の発現上昇を歯周組織で発見し報告した (*J Periodontal Res* 2011)。中でも、APP, 炎症性サイトカイン interleukin (IL)-1 β, 補体成分 complement component 1 (q subcomponent, A chain) (C1QA) など歯周炎と AD に共通する炎症関連遺伝子群・生物学的経路の亢進も突き止めた (Kubota *et al*, *J Dent Res*, Sppl.3404, 2010)。

これまで、APP は AD 組織以外での報告は少なく、創傷の治癒や腫瘍組織での報告があるのみであり (*In J Cancer* 2004, *J Neurochem* 2003, *Exp Cell Res* 2002, *Endocrine-Related Cancer* 2008)、歯周炎罹患歯肉局所での発現と更にはその発現量が上昇しているのは何を意味するのか? APP が AD と歯周炎の関連を橋渡しするのか? きわめて興味深い。APP,



IL-1β, C1QA は、相互に協調して機能しておりこれら遺伝子の発現量及び歯肉組織内での局在、発現細胞を同定することは、慢性炎症による歯周炎組織破壊と原因不明な加齢関連炎症性疾患である AD とのつながりを考える上できわめて貴重な結果をもたらすことが期待され、研究を行う意義がある。

2. 研究の目的

慢性歯周炎により歯肉組織破壊をきたした病変部における、APP 遺伝子発現量を定量し、そのタンパク組織局在と比較することにより機能を明らかにする。

(1) ヒト重度慢性歯周炎患者歯肉における APP, C1QA, IL-1β の遺伝子発現レベルを、臨床的健常部位歯肉における遺伝子発現レベルと quantitative reverse-transcription real-time polymerase-chain reactions (qRT-PCR)法を用いて比較検討する。

(2) ヒト重度慢性歯周炎歯肉中の APP, C1QA, IL-1β のタンパク質の局在について特異抗体を用いた免疫組織科学的手法を用いて解析する。

3. 研究の方法

(1) APP, IL-1β, C1QA 遺伝子発現レベルの解析

対象:新潟大学医歯学総合病院 歯周病診療室を受診し、重度慢性歯周炎と診断され、インフォームドコンセントの得られた患者より、歯周外科時に歯周ポケット底相当部上皮および結合組織を採取する。直ちにPCR用試料はRNA安定化溶液浸漬後Deep freezer (-80 )にて保存する。組織解析用試料は4%パラホルムアルデヒドに24時間浸漬固定後PBSに保存する。

qRT-PCR解析: 歯肉検体はホモジェナイズ後、全RNAを抽出し逆転写酵素反応により

cDNAを合成する。cDNAをテンプレートに quantitative Real time PCR を行い各遺伝子の発現量を comparative threshold cycles (Ct) 法により定量する。

統計解析：APP, IL-1 $\beta$ , C1QA の Ct 値を  $\beta$ -actin 補正し、各々の相対定量値を算出する。それらについて、慢性歯周炎群と歯肉増殖症群との群間比較を行う。群間比較については Mann-Whitney U test の後に多重比較を行う。統計解析は SPSS 16.0 を用いて行う。また、各検定の有意水準は 5% に設定する。

## (2) 免疫組織学的解析

パラフィン切片作製：組織解析用試料も歯周外科時に採取し、通法に従ってパラフィンに包埋する。その後、マイクロトームにて 5 $\mu$ m に薄切しパラフィン切片を作製する。

組織学的および免疫組織学的検索：通法どおり脱パラフィン、脱水後にヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行う。免疫染色には H-E 染色した切片の連続切片を用いる。1次抗体に抗 APP ポリクローナル抗体を用いる。H-E 所見および免疫組織所見は同一部位を写真撮影し、APP の歯肉組織中での局在を解析する。

## 4. 研究成果

本研究は、新潟大学歯学部倫理委員会において承認された計画に基づき行われた。インフォームドコンセントの得られた重度歯周炎患者 14 人とコントロールとして非歯周炎患者各 14 名の歯肉組織を対象として、定量 RT-PCR 及び免疫組織学的解析を行った。成果は第 1 報として「APP, IL-1 $\beta$ , C1QA の歯周炎罹患歯肉組織中における遺伝子発現レベル(図 1)および免疫組織化学的局在(図 2)」を当該分野で初めて、歯科基礎分野の国際誌である *Archs Oral Biology* (2014) に報告した。

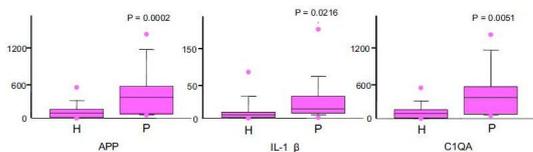


図 1：APP, IL-1 $\beta$ , C1QA の遺伝子発現レベルの比較

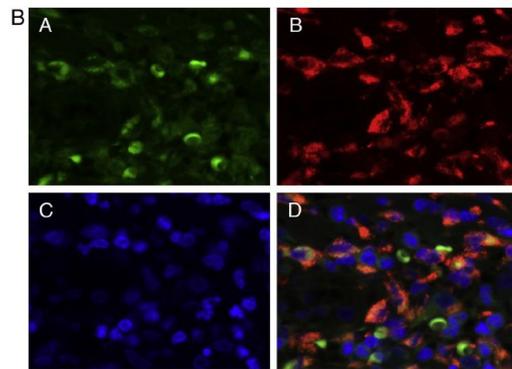
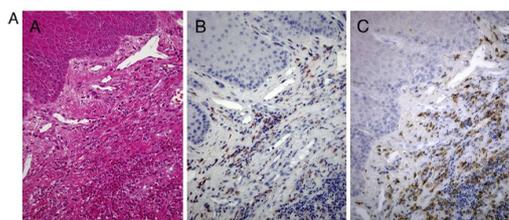


図 2A, B：APP の免疫組織染色 (CD68+ Macrophages に陽性所見を認める)

本研究の一連の研究成果は、「Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Diseases」(PLOS ONE 2016) をはじめ当該分野の論文に引用され AD と歯周炎を関連づける研究に多大な影響を与えている。

第 1 報から得られた結果から継続して **重度歯周炎特異的な遺伝子発現を突き止めるべく、歯周炎発症のイニシエーターとなる Toll-like receptors に着目し発展させた研究**を第 2 報として *Opn J Stomatol* (2014) (図 3)に、更に歯周炎罹患歯肉組織中の TACE 発現、歯肉増殖症特異的バイオマーカー検索を、それぞれ第 3 報、4 報として *Archs Oral Biol* (2013), *Opn J Stomatol* (2016) にそれぞれ報告した。

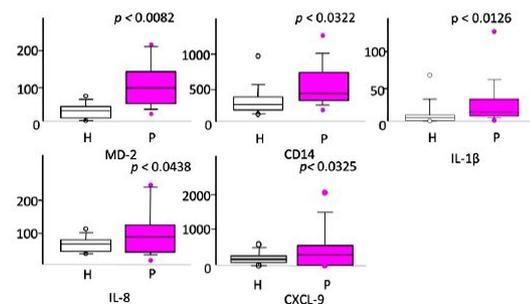


図 3：歯周炎歯肉組織で発現上昇が見られた TLR パスウェイ遺伝子群

歯周炎には AD pathway, TLR pathway, Leukocyte Migration pathway に代表される特徴的生物学的 pathways が関与していることが明らかになった。現在、AD 共通の加齢関連慢性炎症惹起遺伝子に着目し本研究課題を発展させるべくさらなる成果を目指している。

## 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 4 件)

1. Shimizu T, Kubota T, Iwasaki M, Morozumi T, Yoshie H: Changes in biomarkers after initial periodontal treatment in gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontitis presenting with drug-induced gingival over growth. *Opn J Stmatol* (査読有り) .6: 64-72, 2016
2. Kubota T, Maruyama S, Abe D, Tomita T, Morozumi T, Nakasone N, Saku T, Yoshie H ; Amyloid beta (A4) precursor protein expression in human periodontitis-affected gingival tissues. *Archs of Oral Biol* (査読有り) , 59 : 586-594, 2014
3. Abe D, Kubota T, Morozumi T, Yoshie H: Upregulated genes in toll-like receptor (TLR) signaling pathway in periodontitis-affected gingival tissues. *Opn J Stmatol* (査読有り) .4: 22-28, 2014
4. Tomita T, Kubota T, Nakasone N, Morozumi T, Abe D, Maruyama S, Shimizu T, Saku T, Yoshie H; Gene and protein localisation of Tumor Necrosis Factor (TNF) - $\alpha$  converting enzyme in gingival tissues from periodontitis patients with drug-induced gingival overgrowth. *Arch Oral Biol* (査読有り) 58: 1014-1020, 2013

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 根津新、久保田健彦、丸山智、永田昌毅、堀水慎、濃野要、保苅崇大、両角俊哉、朔敬、吉江 弘正 : 歯周炎罹患歯肉組織における Neprilysin ( Alzheimer 病関連遺伝子 ) の発現 . 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会、アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)、2015.9.12-13.
2. Kubota T, Nezu A, Maruyama S, Horimizu M, Nohno K, Hokari T, Morozumi T, Saku T, Yoshie H: Alzheimer's diseases-related gene and protein expressions in periodontitis-affected gingival tissues. *Europerio* 8, London (U.K.), June 3-6, 2015.
3. Kubota T: Basic and Clinic of Drug-induced Gingival Overgrowth. 2014 Research meeting of new development for periodontology and periodontics. [Invited Lecture], Harbin medical University, Harbin (China), January 10, 2014.
4. 清水太郎、久保田 健彦、両角俊哉、吉江 弘正 : 歯肉増殖症における分子生物学的関連因子ネットワーク解析 . 第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会、前橋テルサ (群馬県前橋市)、2013.9.22.
5. 富田尊志、久保田健彦、中曽根直弘、両角俊哉、堀水慎、吉江弘正 : TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE, ADAM-17), TIMP-3 の歯周組織発現解析および歯肉増殖症への関与 . 平成 24 年度新潟歯学会第 2 回例会、新潟大学歯学部 (新潟県新潟市)、2012.11.10.
6. 阿部大輔、久保田健彦、両角俊哉、中曽根直弘、清水太郎、吉江弘正 : 歯周炎罹患部位歯肉組織における Toll-like receptor signaling pathway 関連遺伝子の上昇 . 日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会(第 136 回)、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)、2012.6.29.
7. Kubota T, Mauiyama S, Abe D, Shimizu T, Nakasone N, Morozumi T, Saku T, Yoshie H: Amyloid beta (A4) precursor protein expression in periodontitis-affected gingival tissues. The 98<sup>th</sup> Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, Los Angeles (U.S.A.), September 29 - October 2, 2012.
8. Shimizu T, Kubota T, Iwasaki M, Morozumi T, Nakasone N, Yoshie H: Molecular biological factors in drug-induced gingival overgrowth. The 98<sup>th</sup> Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, Los Angeles (U.S.A.), September 29 - October 2, 2012.
9. Kubota T, Maruyama S, Abe D, Shimizu T, Nakasone N, Morozumi T, Saku T, Yoshie H: Amyloid beta (A4) precursor protein expression in periodontitis-affected gingival tissues. EUROPERIO7, Vienna (Austria), June 6-9, 2012.
10. Abe D, Kubota T, Morozumi T, Nakasone N, Shimizu T, Yoshie H: Toll-like receptor (TLR) signaling pathway is upregulated in periodontitis-affected gingival tissues. EUROPERIO7, Vienna (Austria), June 6-9, 2012.
11. Tomita T, Kubota T, Nakasone N, Iiyama M, Morozumi T, Horimizu M, Abe D, Nagata K, Nohno H, Yoshie H: Gene and protein expression of TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE/ADAM17) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 in gingival tissues from periodontitis patients with drug-induced gingival overgrowth. EUROPERIO7, Vienna (Austria), June 6-9, 2012

〔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

## 1. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保田 健彦 (KUBOTA TAKEHIKO)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：50303136

### (2) 研究分担者

丸山 智 (MARIYAMA SATOSHI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30397161

### (3) 連携研究者

濃野 要 (NOUNO KANAME)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80422608