

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593123

研究課題名(和文) イルソグラジンマレイン酸による歯肉上皮細胞機能の分子制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) The regulatory mechanism of function on gingival epithelium by irsogladine maleate

研究代表者

藤田 剛 (FUJITA, TSUYOSHI)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：80379883

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)：Aggregatibacter actinomycetemcomitansはTGF-betaレセプターのリン酸化，さらにsmad2のリン酸化を介して歯肉上皮細胞のアポトーシスを誘導した。また歯肉上皮細胞において，イルソグラジンマレイン酸，アンホテリシンB，アジスロマイシン，ドクダミがA. actinomycetemcomitans刺激下で上昇するIL-8の産生を抑制することを報告してきた。この歯肉上皮細胞におけるIL-8産生制御のメカニズムの一つとしてERKシグナルの関与を解明した。以上から，上記シグナルの制御によって歯肉上皮細胞の機能制御を行い，歯周病予防が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Smad2 was involved in Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced apoptosis in human gingival epithelial cells. In addition, irsogladine maleate, amphotericin B, azithromycin, and Houttuynia cordata down-regulated A. actinomycetemcomitans-induced increase of IL-8 through ERK signaling in human gingival epithelial cells. These findings suggested that the regulation of these cascades may lead the prevention of periodontal disease by regulating the function of gingival epithelium.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病予防 歯肉上皮 アポトーシス イルソグラジンマレイン酸 IL-8 smad2 ERK

## 1. 研究開始当初の背景

国民の健康意識の高まりとともに高齢者の残存歯数は年々増加している。多数の歯が残存するという事は、高齢者の齲蝕や歯周病の罹患歯が増加することにも繋がり、治療予防の新たな戦略が求められている。特に歯周病は糖尿病などの全身疾患への影響が解明され、高齢者の健康を守るには歯周病の予防は不可欠である。ブラッシングによる細菌バイオフィーム(プラーク)の除去は歯周病予防に有効であるが、身体的・精神的理由から高齢者には困難になることも多い。したがって効果的で安全性の高い歯周病の予防法の開発は急務である。

歯周病の予防法としては、寄生体である歯周病原細菌をターゲットとする方法と宿主機能を制御する方法の2つが考えられる。歯周病原細菌をコントロールすることは極めて重要であるが、多種多様な細菌から構成される口腔内細菌叢の中で歯周病原細菌だけをターゲットとする予防法の確立は困難である。一方、宿主機能を制御する予防法はより安全性が高いと考えられるが、諸外国や本国内において申請者らの研究を除いてほとんど研究されていない。歯周病の成立には上皮細胞が重要な役割を果たしていることから、本研究では歯肉上皮細胞の機能を制御する新しい概念の歯周病予防法を確立するための基礎的研究を行う。

## 2. 研究の目的

これまでに、防護系胃潰瘍治療薬として実際に臨床応用されているイルソグラジンマレイン酸が歯肉上皮細胞においても、バリアー機能の低下を回復することを報告した。歯周病の発症・進行に歯肉接合上皮の細胞間バリアー機能は深く関与する。バリアー機能の低下は、細菌の直接の作用以外に、炎症性サイトカインやアポトーシスによって誘導さ

れ、細胞間接着装置が関与すると考えられているが、未だ不明な点が多い。特にアポトーシスは自己を守るための生物応答でもあるが、アポトーシスシグナルによって上皮細胞のバリアーの破壊が起こり、その結果として炎症が波及することが報告されている。本研究では、特にアポトーシス関連遺伝子と細胞間接着装置との関連に着目して、上皮バリアー機能低下のメカニズムを解明し、さらにイルソグラジンマレイン酸を用いた制御メカニズムについて検討する。

また、イルソグラジンマレイン酸の他にも漢方薬などの natural product を始め、歯周病予防に応用できる可能性のある薬剤についても検討を行い、イルソグラジンマレイン酸の作用機序との検討を行う。

## 3. 研究の方法

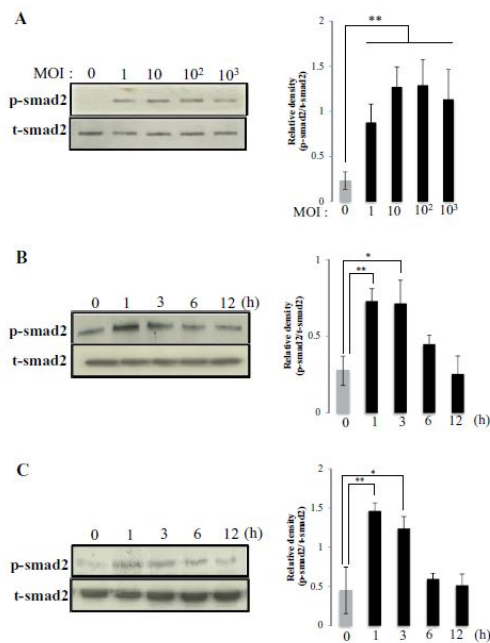
ヒト歯肉上皮から遊離させたヒト歯肉上皮細胞(HGEC)または、不死化したヒト歯肉上皮細胞株(OBA9)を培養し死菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* を作用させた後、タンパクを抽出し、リン酸化 smad2, cleaved caspase-3 をウェスタンブロット法によって評価した。また、TGF-beta レセプターインヒビターや TGF-beta レセプター-siRNA 導入によって、TGF-βレセプターの関与を調べた。歯肉上皮細胞のアポトーシスは TUNEL 法にて分析した。

また、培養歯肉上皮細胞(HGEC)にイルソグラジンマレイン酸、抗真菌薬アンホテリシン B, 抗菌薬アジスロマイシン、漢方薬ドクダミでの前処理を行い、*A. actinomycetemcomitans* で刺激後、炎症関連タンパク発現、ERK のリン酸化を検討した。

## 4. 研究成果

歯肉上皮細胞において細菌刺激が誘導す

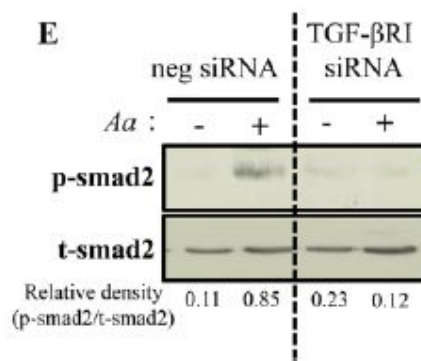
るアポトーシスシグナルを検討するために、smad2 シグナルに注目した。まず、caspase-3 発現と TUNEL assay から、A. actinomycetemcomitans 刺激は歯肉上皮細胞のアポトーシスを誘導することが確認された。さらに、SMAD2 リン酸化、アポトーシス関連遺伝子について解析を行ったところ、A. actinomycetemcomitans 刺激は SMAD2 リン酸化を促進、抗アポトーシス遺伝子は減少、アポトーシス促進遺伝子は増加することが確認された(図1)。これまでに細菌と smad2 リン酸化の関わりに関する報告はなく、smad2 の制御による歯周組織の炎症の制御が可能となることが示唆される。



(図1) A. actinomycetemcomitans 刺激下の HGEC 及び OBA9 における smad2 のリン酸化 (A) HGEC, 作用濃度に対する影響, 1 時間刺激 (B) HGEC, 作用時間に対する影響 A. actinomycetemcomitans 10<sup>7</sup> cell/well (C) OBA9, 作用時間に対する影響 A. actinomycetemcomitans 刺激は smad2 のリン酸化を促進した。

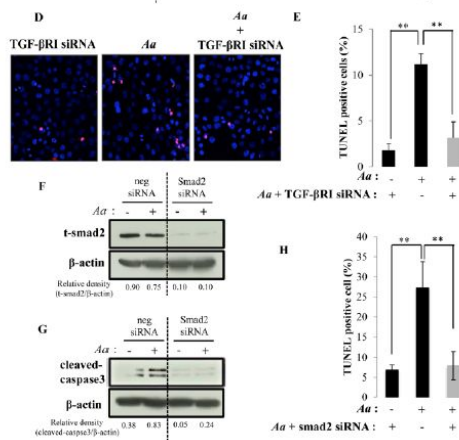
この細菌刺激に対する smad2 のリン酸化メカニズムを解明するために、smad2 リン酸化経

路としてよく知られている TGF-beta レセプターリン酸化を検討した。実際に、A. actinomycetemcomitans 刺激によって TGF-beta レセプターのリン酸化が免疫沈降によって確認された。さらに siRNA 導入、TGF-beta レセプター I インヒビター (SB431542) を用いた抑制実験によって A. actinomycetemcomitans 刺激による smad2 リン酸化は TGF-beta レセプターリン酸化を介していることが示唆された(図2)。



(図2) A. actinomycetemcomitans 刺激で誘導された OBA9 の smad2 のリン酸化促進は、TGF-beta レセプター I siRNA 導入によって抑制された。

次に、このカスケードが歯肉上皮細胞のアポトーシスに関与するかどうかを検討した。TGF-beta レセプター I siRNA 導入、SB431542 は A. actinomycetemcomitans 刺激下の歯肉上皮細胞の発現する cleaved caspase-3 の上昇、TUNEL 陽性細胞を抑制した。その結果、TGF-beta レセプターの抑制またはノックダウンは歯肉上皮細胞のアポトーシスを抑制した。以上から、A. actinomycetemcomitans は TGF-beta レセプター/smad2 シグナリングを介して、アポトーシスを誘導する可能性が示唆された。



(図3) TGF-beta レセプターノックダウンは、歯肉上皮細胞において、A. actinomycetemcomitans が誘導した cleaved caspase-3 の発現増加、TUNEL 陽性細胞の増加を抑制した。

このメカニズムについては、細菌が直接レセプターに結合しリン酸化を活性化させる系と間接的にレセプターをリン酸化する系が考えられる。アポトーシスによって歯肉上皮のバリアー機能が低下することが報告されている。したがって、本研究から smad2 の発現制御により、歯肉上皮細胞のバリアー機能を制御できる可能性が示唆された。

一方で、歯肉上皮細胞のバリアー機能をイルソグラジンマレイン酸が制御することをすでに報告してきた。今回は、バリアー機能に加えて、A. actinomycetemcomitans 存在下の歯肉上皮細胞が産生する ICAM-1, MMP-3, IL-6 などの炎症関連因子の発現誘導を抑制することを in vitro, あるいは in vivo で示した。さらに、イルソグラジンマレイン酸が、A. actinomycetemcomitans と同様に Porphyromonas gingivalis によって増加する IL-8 を抑制することを報告した。また、アンホテリシン B, アジスロマイシン, ドクダミなどが A. actinomycetemcomitans 刺激下で上昇する IL-8 の産生を抑制することを報告してきた。この歯肉上皮細胞における IL-8 産生制御のメカニズムの一つとして ERK シグナルの関与を解明した。

これらの一連の報告から、本研究課題であるイルソグラジンマレイン酸による歯肉上皮細胞機能の制御メカニズムが明らかになったとともに他の薬剤の作用部位と比較検討することによってより詳細なメカニズムが解明され、歯周病予防薬の開発において必須のデータとなると思われる。

## 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6件)

1. Savitri IJ., Ouhara K., Fujita T., Kajiya M., Miyagawa T., Kittaka M., Yamakawa M., Shiba H., Kurihara H. Irsogladine maleate inhibits *Porphyromonas gingivalis*-mediated expression of toll-like receptor 2 and interleukin-8 in human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res.* (査読有) in press.
2. Kabir MA., Fujita T., Ouhara K., Kajiya M., Matsuda S., Shiba H., Kurihara H. *Houttunia Cordata* suppressed the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced increase of inflammatory-related genes in cultured human gingival epithelial cells. *J Dent Sci.* (査読有) 10:88-94, 2015.
3. Yoshimoto T., Fujita T., Ouhara K., Kajiya M., Imai H., Shiba H., Kurihara H. Smad2 is involved in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced apoptosis. *J Dent Res.* (査読有) 93(11): 1148-1154, 2014.
4. Imai H., Fujita T., Kajiya M., Ouhara K., Miyagawa T., Matsuda S., Shiba H., Kurihara H. Amphotericin B down-regulates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced production of IL-8 and IL-6 in human gingival epithelial cells. *Cell Immunol.* (査読有) 290(2): 201-208, 2014.
5. Miyagawa T., Fujita T., Ouhara K., Matsuda S., Kajiya M., Hayashida K., Imai H., Yoshimoto T., Iwata T., Shiba

H., Abiko Y., Kurihara H. Irsogladine maleate regulates the inflammatory related genes in human gingival epithelial cells stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Int Immunopharmacol.* (査読有) 15(2):340-347, 2013.

6. Fujita T., Alotaibi M., Kitase Y., Kota Y., Ouhara K., Kurihara H., Shuler CF. Smad2 is involved in the apoptosis of murine gingival junctional epithelium associated with inhibition of Bcl-2. *Arch Oral Biol.* (査読有) 57(11):1567-1573, 2012.

〔学会発表〕(計3件)

1. 吉本哲也, 他3名, ヒト歯肉上皮細胞におけるバクテリアによるアポトーシスと smad2 の関与, 第56回歯科基礎医学会学術大会, 2014年9月26日, 福岡国際会議場
2. 藤田 剛, 歯肉上皮細胞に着目した歯周炎発症のメカニズムの解明とその制御, 第56回春季日本歯周病学会学術大会, 2013年5月31日, タワーホール船堀
3. 吉本哲也 他9名, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の outer membrane protein-29 はヒト歯肉上皮細胞において smad2 を介してアポトーシスシグナルを誘導し, E-cadherin の発現を減少させる, 日本歯科保存学会第136回春季学術大会, 2012年6月28日, 沖縄コンベンションセンター

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔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・講師  
研究者番号: 80379883

(2) 研究分担者

松田 真司 (MATSUDA SHINJI)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号: 30611321

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号: