

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593163

研究課題名(和文) 前駆蛋白質転換酵素ADAMsを標的とした歯周病予防・治療戦略の検討

研究課題名(英文) Study of a disintegrin and metalloproteases for prevention and treatment of periodontal diseases

研究代表者

栗野 秀慈 (Awano, Shuji)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20301442

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)：本研究課題では、前駆蛋白分解酵素ADAMsを標的とした歯周病予防ならびに治療に関する新たな戦略の検討を行った。本研究では、ADAMsの一つの重要な酵素であるADAM17に焦点を当て、ADAM17が歯周組織において歯肉上皮細胞中に多く発現していることを明らかとした。また培養歯肉上皮細胞と扁平上皮癌細胞の両者において、歯周病原性細菌である*P.gingivalis*ならびに*E.coli*由来のLPSの刺激により、ADAM17と炎症性サイトカインの一つであるTNF $\alpha$ の発現レベルが増加し、有意な相関関係があることが示され、ADAM17は歯肉上皮細胞においてTNF $\alpha$ の産生に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to verify the possibility of a disintegrin and metalloproteinases (ADAMs), which was a family of peptidase proteins, as a target for treatment and prevention of periodontal diseases. In this study, ADAM17, which was an important enzyme of ADAMs, was focused, and it was evident that ADAM17 was prevalent in the epithelial cells of periodontal tissue. Additionally, this study showed that the levels of expression of ADAM17 and TNF $\alpha$ , which was a inflammatory cytokine, from the cultured oral epithelial cells and squamous cell carcinoma were enhanced by the stimulation of bacterial LPS originated from *P. gingivalis*, which was a pathogenic bacteria of periodontitis, and *E.coli*, and that there was a significant correlation between the expression of the ADAM17 and the TNF $\alpha$ . Thus, this study suggested that ADAM17 might be associated with the production of TNF $\alpha$  in gingival epithelial cells,

研究分野：予防歯科

キーワード：ADAM17 歯周病 歯周組織 口腔ケラチノサイト TNF

## 1. 研究開始当初の背景

メタロプロテアーゼである ADAMs は、ECM 及び細胞表面における重要な蛋白分解反応 (shedding: シェディング) を触媒している他、サイトカイン、成長因子、細胞接着分子、及び受容体の放出、シグナル伝達、細胞成長、細胞-細胞及び細胞-マトリックスの相互作用に関連するプロセスを触媒する。研究開始当時 ADAMs はヒトゲノムにおいて 23 種類が同定されていた。その中のいくつか特定の ADAMs 活性の増進は、癌、関節リウマチ、変形性関節症、及び心臓疾患を含む多くの重大な疾患の病態の発生に関連していることが明らかになっていった。その一方、ADAMs の生体内における役割については、その多くは未だ不明のまま、口腔内における ADAMs についても同様であった。口腔疾患と ADAMs との関係については、口腔扁平上皮癌の発癌に ADAMs ファミリーに属する ADAM-10 の発現が (**Cancer let. 245: 33-43, 2007**)、また転移に Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) 転換酵素である ADAM-17 が関連している可能性を示唆する報告 (**Biochem Biophys Res Commun. 365:393-98,2008**) や、歯周炎を有する歯の歯肉溝液中の ADAM17 のレベルは増加し、骨破壊に関連する RANKL と関連していたとの報告 (**J Dent Res. 87: 273-77, 2008**)、また ADAM28 は歯根膜幹細胞の細胞増殖、アポトーシスや異形性を操作できることを実証した報告があったが (**J Periodontol. 81:934-44,2010.**)、その数は多くはなかった。

一方、申請者らは歯周病原性細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* が前駆蛋白分解酵素の 1 つである endothelin-converting enzyme (ECE)-1 様の性質を有するエンドペプチダーゼ PgPepO を有することを明らかにして以来 (**Awano S, et al., FEBS Lett. 460: 139-44, 1999**)、口腔内におけるエンドペプチダーゼに関連する研究を現在まで行

ってきた。その中で、申請者らの研究チームは歯周組織における ECE-1 のジェディングにより産生されるエンドセリン (ET-1) の発現の局在性ならびに *P. gingivalis* 感染の影響について (**Yamamoto E, Awano S, et al., J Periodont Res. 38: 417-21, 2003**)、また口腔扁平上皮細胞における 4 種類の ECE-1 isoform (a,b,c,d) の細胞内における局在性を明らかにし、口腔癌細胞と正常細胞との発現の違いについて検証を行いエンドセリンシステムの口腔癌との関連について報告した (**Awano S, et al., Int. J. Cancer 118: 1645-52, 2006.**)。また当時、歯肉上皮細胞を用いて歯周炎における前駆蛋白分解酵素の 1 つの Neutral endopeptidase (NEP) の抗炎症作用について検証し、細菌由来の LPS などの刺激により細胞から産生される炎症性ペプチドの substance P が NEP によって制御されていることを (**口腔衛生学会雑誌 61: 479, 2011**)、別の研究では口腔粘膜における ADAMs の ADAM-17 mRNA 発現レベルと歯周健康状態また糖尿病との関連性があることを発見し学会にて報告していた (**九州歯科学会雑誌 65(suppl): 34, 2011**)。

このように、口腔における様々な前駆蛋白分解酵素は、口腔癌や歯周疾患の病態に関連している可能性があり、口腔疾患の新たな治療法における標的になる可能性を有していた。特に ADAMs の中には、炎症性ネットワークで重要な役割を担う TNF- $\alpha$  などの様々な炎症メディエーターの産生に関わっているものがあり、口腔炎症性疾患の代表である歯周疾患における ADAMs について探求していくことは、新たな歯周病予防・治療の戦略を構築する上でも重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

歯周炎の歯周組織破壊には、結合組織の主要構成成分である細胞外マトリックス (ECM) 蛋白質が関与しており、それら ECM 蛋白質

の分解調整には細胞内の様々なエンドプロテアーゼ群の前駆蛋白質分解酵素がその役割を担っていると考えられている。一方、その多くの前駆蛋白質分解酵素については、各々の役割を含め口腔内における状況が明らかになっていない。本申請研究では、炎症性疾患において重要な役割を担っている TNF- $\alpha$ (腫瘍壊死因子)などの産生に關与している前駆蛋白質分解酵素である ADAMs(a disintegrin and metalloproteinases)の口腔内における動態を明らかにし、それら酵素をターゲットにした歯周病予防・治療のための創薬の可能性を検討することを目的とした。

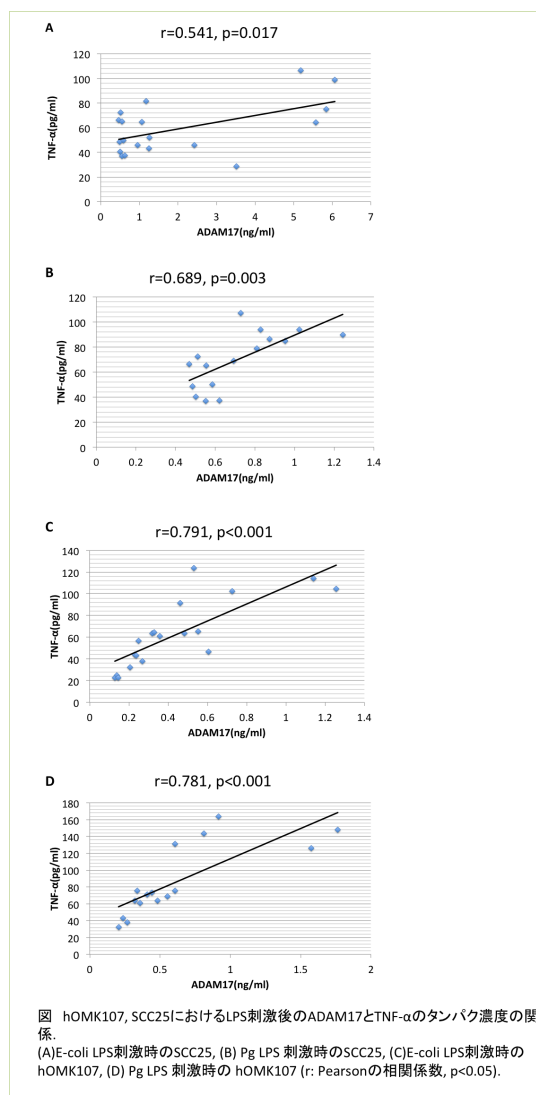
### 3. 研究の方法

- (1) 歯周組織における ADAMs ファミリーの局在性や発現レベルの違いを検証する。
- (2) 歯周組織における ADAMs と ADAMs によってシェディングされる TNF- $\alpha$ などの様々な炎症性シグナル物質の発現レベルを検証し、ADAMs が關連した炎症性ネットワークの仮説モデルを構築する。
- (3) 歯肉上皮細胞、繊維芽細胞、マクロファージを用いて ADAMs の炎症性ネットワークでの作用を検証し、ADAMs 活性化を特異的に阻害した場合の炎症性ネットワークの動態を検証し、ADAMs を標的とした歯周病予防・治療薬としての可能性を検討する。

### 4. 研究成果

本研究では、ADAMs の一つの重要な酵素である ADAM17 に焦点を当て、ADAM17 が歯周組織において歯肉上皮細胞中に多く発現していることを明らかとした。また培養歯肉上皮細胞と扁平上皮癌細胞の両者において、歯周病原性細菌である *P.gingivalis* ならびに *E.coli* 由来の LPS の刺激により、ADAM17 と炎症性サイトカイン一つである TNF の発現

レベルが増加し、有意な相関関係があることが示され、ADAM17 は歯肉上皮細胞において TNF の産生に關連している可能性が示唆された(図)。



現在までのところ、口腔内における ADAM17 に関する報告はほとんどなく、本研究成果は、ADAM17 が歯周疾患の発症のメカニズムに何らかの役割を担っている可能性を示す貴重な知見であると捉えている。しかしながら本研究では ADAMs(a disintegrin and metalloproteinases)の口腔内における動態を明らかにし、それら酵素をターゲットにした歯周病予防・治療のための創薬の可能性を検討するに本研究所の目的の達成までは至っておらず、今後、ADAM17 の作用を阻害した場合にどのような変化が起きるか明らかにし、ADAM17 をターゲットにした創薬の可能

性を詳細に検証していく予定である。

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2件)

Kinoshita N, Awano S, Yoshida A, Soh I, Ansai T: Periodontal disease and gene expression of metalloendopeptidases in human buccal mucosal epithelium. J Periodont Res., in press, 2013. doi: 10.1111/jre.12045.

Nakata, M., Awano, S., Kinoshita, N., Yoshida, A. and Ansai, T.: Neutral endopeptidase regulates neurogenic inflammatory responses induced by stimulation of human oral keratinocytes with bacterial lipopolysaccharide and nicotine. Eur J Oral Sci. 121: 434-442, 2013. doi: 10.1111/eos.12072.

[学会発表](計3件)

Kinoshita, N., Awano, S., Yoshida, A., Soh, I., Mineoka, T., and Ansai, T.: Neutral Endopeptidase and Endothelin-converting Enzyme in Human Buccal Mucosal Epithelium. 58<sup>th</sup> Japanese Association for Dental Research, Kitakyushu, Nov 20-21, 2010.

村野 綾、栗野秀慈、瀬田裕司、吉田明弘、邵 仁浩、豊島邦昭、安細敏弘: 歯周組織における a disintegrin and metalloproteinase 17 の局在性について 第 73 回九州歯科学会総会 北九州, 2013 年 5 月 18, 19 日, 九州歯科学会雑誌 67: 30, 2013.

村野 綾、栗野秀慈、吉田明弘、邵 仁浩、安細敏弘: 歯周組織における a

disintegrin and metalloproteinase 17 について. 第63回日本口腔衛生学会・総会 (5.29~5.31、熊本市).

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

(2)研究分担者  
邵 仁浩 (Inho Soh)  
九州歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 10285463

吉田明弘 (Akihiro Yoshida)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 20364151

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

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: