

## 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 5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592628

研究課題名（和文）：TNFファミリーの制御を基盤とした新規歯周病治療薬の開発とメカニズムの解明

研究課題名（英文）：The development of a new therapy for periodontitis by regulation of TNF family members.

研究代表者：町頭 三保（MACHIGASHIRA MIHO）

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：80253897

研究成果の概要（和文）：

TNF- $\alpha$ はプロサイトカインの一つで、炎症反応で重要な役割を担っており、その前駆体はTACEとよばれるメタロプロテアーゼにより活性化される。TNF- $\alpha$ は歯周病の発症と進行にも深く関与している。今回、TNF- $\alpha$ の産生抑制による歯周病治療薬を開発する目的で、TACE阻害剤とエピガロカテキンガレート(EGCG)の有効性を評価した。TACEはヒト歯肉炎症組織のマクロファージと歯肉線維芽細胞に存在した。ACE阻害剤とEGCGは、THP-1細胞におけるTNF $\alpha$ の産生を用量依存的に抑制し、特にEGCGは高濃度のグルコース存在下でTNF- $\alpha$ の産生抑制効果が高かった。さらにラット歯周病モデルにおいて、TACE阻害剤は歯槽骨吸収抑制効果を示した。TACE inhibitorとEGCGは、ヒト歯周炎治療の魅力的なターゲットである。

研究成果の概要（英文）：

TNF- $\alpha$  is a proinflammatory cytokine, plays a pivotal role in the inflammatory reaction. Its precursor is cleaved by a metalloprotease named TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) to generate the mature TNF- $\alpha$ . The aim of this study is to generate a potent anti-inflammatory drug, TACE inhibitor and epigallocatechin 3 gallate(EGCG) to periodontitis where TNF- $\alpha$  is thought to be pathologically indicated. TACE immunopositively localized mainly in macrophages and gingival fibroblast in inflamed human gingival tissues. The TACE inhibitor and EGCG eliminated kinetics of LPS-induced TNF- $\alpha$  secretion in a dose-dependent manner by ELISA. Furthermore, EGCG showed more strong inhibitory effect under high glucose conditions. TACE reduced alveolar bone loss in a rat model of *P. gingivalis*-induced periodontitis. TACE inhibitor and EGCG appear to be an attractive target for treating human periodontitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科：歯学

細目：歯周治療系歯学

キーワード：TNFファミリー、歯周病、治療薬、TACE阻害剤、エピガロカテキンガレート

### 1. 研究開始当初の背景

TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor: 腫瘍壊死因子) は、歯周病を含め様々な炎症の初期において重要な役割を有することが知られている。さらにTNF- $\alpha$ は、破骨細胞の誘導による骨吸収作用や、脂肪細胞のGLUT4の発現抑制によるインスリン抵抗性を示すことが明らかにされている。TNF- $\alpha$ はリポ多糖 (LPS) により主に単球やマクロファージにおいて膜貫通型蛋白として産生され、膜結合型メタロプロテアーゼであるTNF- $\alpha$ 変換酵素 (TNF- $\alpha$  converting enzyme: TACE)により切断されて可溶性TNF- $\alpha$ となる。近年、抗TNF- $\alpha$ 療法はリウマチなどの治療に応用され、劇的な効果を上げており、TNF- $\alpha$ の制御は歯周病の治療においても有効であると考えられる。そこで今回、TACE阻害剤の歯周病抑制効果を検討し、さらにカテキンの1つで、マトリックスメタロプロテアーゼやヒアルロニダーゼなどへの酵素阻害作用を有するエピガロカテキンガレート (EGCG) についても検討した。

### 2. 研究の目的

本研究では、TNF- $\alpha$ の産生抑制物質を検索し、歯周病治療薬としての応用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TACEの局在の確認

ヒト歯周組織におけるTACEの存在を免疫染色にて確認し、歯周病部位と健常部位を比較する。

(2) THP-1細胞におけるLPS誘導のTNF- $\alpha$ 産生に対するTACE阻害剤とEGCGの効果をELISAにて検討する。

(3) THP-1細胞におけるTNF- $\alpha$ 産生に対するEGCGの影響を高濃度(15mM)のグルコース存在下で検討する。

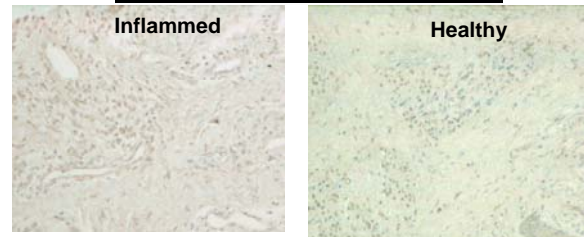
(4) ラット歯周病モデルにおけるTACE阻害剤の有効性の評価

### 4. 研究成果

#### (1) 歯周組織におけるTACEの局在の確認

TACEの免疫染色により、ヒト歯周組織にお

#### Immunolocalization of TACE



けるTACEの存在が確認された。TACEは健常部位に比べて炎症部位で強く発現し、マクロファージと歯肉線維芽細胞に存在した。

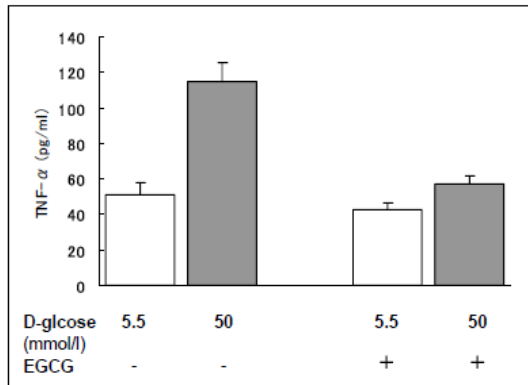
#### (2) TNF- $\alpha$ 産生に対するTACE阻害剤とEGCGの効果

THP-1細胞におけるTNF- $\alpha$ 産生に対して、TACE阻害剤は100nMから用量依存的に抑制した。EGCGにおいても同様のTNF- $\alpha$ 産生抑制効果が、25 $\mu$ Mから用量依存的にみられた。

#### (3) 高濃度のグルコース存在下におけるTNF- $\alpha$ 産生に対するEGCGの影響

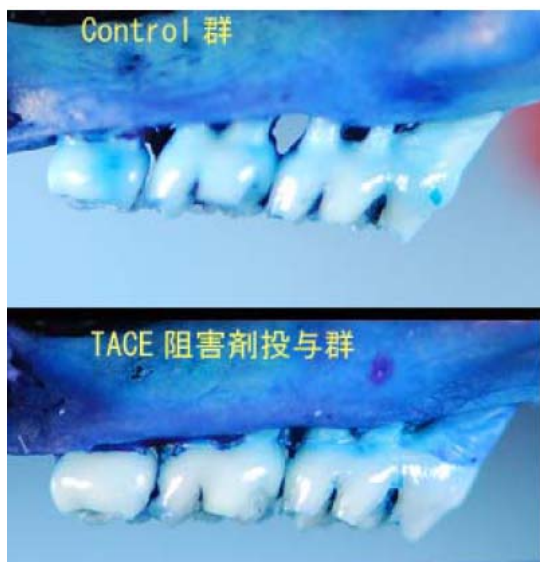
EGCGは肝細胞でのグルコース産生を抑制し、かつインスリンレセプターとIRS-1のチロシンリン酸化を促進することで抗糖尿病的作用も示すことが報告されている。そこで今回は、高濃度(50mM)のD-グルコース存在下における

TNF- $\alpha$  産生に対するEGCGの影響を検討した。その結果、TNF- $\alpha$  の産生量は約2倍に上昇したが、EGCGにより抑制され、抑制率は49.7%と高値を示した。



(4) ラット歯周病モデルにおけるTACE 阻害剤の評価

歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis*) をラットの口腔内に投与して歯周炎を惹起し、TACE阻害剤投与群の骨吸収量を評価したところ、TACE 阻害剤により歯槽骨吸収が抑制されることが明らかとなり、TACE 阻害剤の臨床的有効性が示唆された。



(6) さらに歯周疾患の成立に関与するといわ

れる単球特異的走化性因子 (Monocyte Chemotactic Protein-1 : MCP-1) に関してもELISAにより評価したところ、*P. gingivalis* のLPSにより誘導されるMCP-1の産生は、TACE阻害剤により抑制される傾向がみられた。

以上より、今回検討したTACE阻害剤は歯周病における抑制効果が期待でき、またEGCGは糖尿病を有する歯周病患者への有効な治療薬としての可能性が示唆された。

今後、破骨細胞分化因子RANKLの発現を含め、破骨細胞分化へ及ぼす影響などについてさらなる検証が必要である。

#### 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7件)

① Yamashita D, Noda M, Machigashira M, Miyamoto M, Takeuchi H, Takeuchi N, Kono H, Noguchi K, Ban S. In Vitro Evaluation of Hydroxyapatite-Containing Glass Coating on Zirconia. *Key Engineering Materials.*, 査読有, 2011, 493-494. 7-10  
doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.7

② Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, 他 35 名. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial., *J Dent Res*, 査読有, 2011; 90: 35-40  
doi: 10.1177/0022034510384616

③ Takeuchi N, Machigashira M, Yamashita D, Shirakata Y, Kasuga T, Noguchi K, Ban S. Cellular compatibility of a gamma-irradiated modified siloxane-poly (lactic acid)-calcium carbonate hybrid membrane for guided bone regeneration., *Dent Mater J*. 査読有, 2011, 8, 730-738  
doi: 10.4012/dmj.2011-075

④ Takeuchi H, Machigashira M, Yamashita D, Kozono S, Nakajima Y,

Miyamoto M, Takeuchi N, Setoguchi T, Noguchi K. The association of periodontal disease with oral malodour in a Japanese population., *Oral Dis*, 査読有, 2010, 16, 702-706  
doi:

10.1111/j.1601-0825.2010.01685.x.

⑤ Shirakata Y, Taniyama K, Yoshimoto T, Miyamoto M, Takeuchi N, Matsuyama T, Noguchi K. Regenerative effect of basic fibroblast growth factor on periodontal healing in 2-wall intrabony defects in dogs., *J Clin Periodontol*, 査読有, 2010, 37, 374-381

doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01539.x

⑥ Yamashita D, M, Machigashira M, Miyamoto M, Takeuchi H, Noguchi K, Ban S Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast like cells on two types of zirconia. *Dent Mater J*. 査読有, 2009, 28(4): 461-470  
doi: 10.4012/dmj.28.461

⑦ Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, Komaki M, Machigashira M, Ishikawa I, Izumi Y. Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways. *Oral Microbiol Immunol*. 査読有, 2009, 24(4), 292-298

doi: 10.1111/j.1399-302X.2009.00508.x

[学会発表] (計8件) (うち招待講演計2件)

① Yamashita D, Noda M, Machigashira M, Miyamoto M, Takeuchi H, Takeuchi N, Kono H, Noguchi K, Ban S, In Vitro Evaluation of Hydroxyapatite-Containing Glass Coating on Zirconia., *Bioceramics* 23, November 8, 2011, Istanbul

② 大西智和, 町頭三保, 坂東健二郎, 楠山譲二, 柿元協子, 松口徹也, 結紮誘導歯周炎モデルにおける *P. gingivalis* 感染が糖尿病マウスに及ぼす影響、第53回歯科基礎医学会学術大会、2011年10月1日、岐阜

③ Yamashita D, Machigashira M, Miyamoto M, Takeuchi H, Kono H,

Takeuchi N, Noguchi K, Ban S, Biocompatibility of Osteoblast-Like Cells to Zirconia/Alumina Nanocomposite., IADR General Session, July 15, 2010, Barcelona

④ 町頭三保、エムドゲインゲルを用いた再生療法の可能性を探る 再生療法の現状と未来、第28回日本顎咬合学会学術大会、2010年6月13日、東京

⑤ 武内博信, 町頭三保, 宮本元治, 中島結実子, 山下大輔, 竹内尚士, 野口和行、歯周病患者における舌苔および唾液中の歯周病原細菌と口臭の関連、第53回春季日本歯周病学会学術大会、2010年5月14日、盛岡

⑥ 町頭三保、炎症反応の視点に立って歯周病細菌を再考する 歯周病原細菌の新規測定試薬の開発、第52回日本歯周病学会秋季学術大会、2009年10月15日、宮崎

⑦ 白方良典, 吉元剛彦, 谷山勝義, 宮本元治, 竹内尚士, 松山孝司, 野口和行 EMD、bFGF、PDGF/ $\beta$ -TCP を用いた歯周組織再生 イヌ2壁性骨欠損モデルにおける比較検討、第130回日本歯科保存学会学術大会、2009年6月11日、札幌

⑧ 中島結実子、町頭三保、中村利明、吉元剛彦、小菌清香、竹内尚士、谷山勝義、南睦美、松山孝司、野口和行、カンナビノイドレセプターアンタゴニストは *P. gingivalis* 菌感染による歯槽骨吸収を抑制する、第52回日本歯周病学会春季学術大会

2009年5月15日、岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

町頭 三保 (MACHIGASHIRA MIHO)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：80253897

### (2) 研究分担者

宮本 元治 (MIYAMOTO MOTOHARU)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：50452941