

指導教授氏名	指導役割
印	研究の総括的指導
印	
印	

学位論文要旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	歯周病態学分野	身分	大学院生	氏名	中村 亜里紗
論文題名 真菌二次代謝産物(+)-terreinが <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> 刺激時にヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響の解明					

【緒言】

歯周病は、歯周病原細菌の感染によって発症する慢性感染症であり、細菌感染に伴う免疫応答によって歯周組織に炎症が惹起され、歯槽骨破壊を生じる炎症性疾患でもある。現行では、感染源除去を主体とした歯周治療が展開されているが、治癒過程は宿主に依存している。炎症の制御が可能となれば、感染の拡大を改善するだけでなく、組織の治癒を促進し恒常性を保つことにも繋がる。そのため、宿主の炎症反応を制御することにより歯周組織治癒や恒常性維持を良好に保つ治療法の開発に注目が集まっている。

歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) が、歯肉組織の物理的バリアである歯肉上皮細胞 (human gingival epithelial cells : HGEs) に感染すると、歯周炎症が惹起される。侵襲を受けたHGEsは、抗菌ペプチド産生による殺菌に加え、細胞遊走因子インターロイキン8 (interleukin-8 : IL-8) などのケモカインを産生し、食細胞を引き寄せ、免疫を活性化させる。また、HGEsは、細胞間で生理活性物質を輸送させる細胞接着機構を有しており、細胞間接着因子として存在する zonula occludin-1 protein (ZO-1) とコネキシン (connexin : CX) は、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たす。一方、Aaが細胞に付着・細胞内に侵入すると、細胞間接着因子が破壊・解離することによって炎症を惹起するという報告がある。そのため、Aaの感染を制御しうる薬剤等の研究が必要である。

今回申請者は、真菌 *Aspergillus terreus* から二次代謝産物として分離された低分子化合物(+)-terreinの効果に着眼した。これまでの先行知見から、有機化学的に合成された(+)-terreinは抗炎症作用を有することから、HGEsの機能に影響を及ぼす可能性が示唆されているが、未だ詳細は不明である。

本研究では、HGEsを用いて、(+)-terreinがAa刺激時に生じる炎症反応と細胞間接着機構に及ぼす影響の解明を図った。

【材料と方法】

1. 試薬 : (+)-terrein は L-酒石酸から合成したものを用いた (岡山大学大学院自然科学研究科 萬代大樹博士提供)。
2. 細菌の調製 : 細菌は、Aa Y4 株を使用し、37 °C、5 %炭酸ガス存在下で培養した後、波長 660 nm (A₆₆₀) の吸光度を測定し、1,710 × g で 4 °C、20 分間の遠心と洗浄後、100 °C、20 分の加熱処理を行い失活させた。細胞添加時には、菌濃度を multiplicity of infection (MOI) = 1-100 相当に調製して刺激した。
3. 細胞の培養と細胞傷害性の検討 : HGEs は primary human gingival epithelial cells, pooled を用い、100 units/mL ペニシリンと 100 μg/mL ストレプトマイシンを含むメディウム (CnT-PR) を用いて、37 °C、5 %炭酸ガス存在下、95 %湿潤下で培養した。(+)-terrein が HGEs の細胞傷害性に及ぼす影響は、1 × 10⁴ cell/cm² の密度で播種し、(+)-terrein を 0-1,000 μM で添加し 24 時間培養後、MTS 法を利用し検討した。
4. 遺伝子発現の検出 : 12-well plate に 2.0 × 10⁵ cells/cm² (IL-8)、4.0 × 10⁵ cells/cm² (ZO-1, CX43) の細胞密度で播種し、(+)-terrein (10 μM) で 30 分間前処理後、加熱処理した Aa を MOI = 1-100

相当の濃度で刺激した。刺激 6 時間後に全 RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR 法で IL-8, ZO-1, CX43 の遺伝子発現量を評価した。

5. **タンパクの検出**：【Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA】HGEs を 2×10^5 cells/cm² で播種し培養後、(+)-terrein (10 μ M) で 30 分間前処理し、加熱処理した Aa を MOI = 1-10 相当の濃度で刺激した。刺激 12 時間後の培養上清を回収し、IL-8 タンパク産生量を ELISA 法で検討した。【Western blotting : WB】12-well plate に 2.0×10^5 cells/cm² (リン酸化 ERK1/2, p38MAPK), 4.0×10^5 cells/cm² (ZO-1, CX43) の細胞密度で播種し、(+)-terrein (10 μ M) で 30 分間前処理し、加熱処理した Aa を MOI = 10 相当の濃度で刺激した。刺激から 5 分後 (リン酸化 ERK1/2, p38MAPK), 12 時間後 (ZO-1, CX43) に全細胞を回収し、細胞内シグナル伝達因子と細胞間接着因子のタンパク産生量を WB 法で評価した。
6. **統計解析**：3 群間以上の差の検定には one-way analysis of variance (one-way ANOVA)、多重比較検定には Tukey/Kramer test を用いた。2 群間の検定には Student's *t*-test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. HGEs における(+)-terrein の細胞傷害性：(+)-terrein は 10 μ M 以下では細胞傷害性がなかった。
2. Aa が誘導する IL-8 発現と(+)-terrein の及ぼす影響：MOI = 1-100 相当の Aa 刺激により、HGEs は刺激 6 時間後の IL-8 の mRNA 発現量を増加させ (p<0.05)、刺激 12 時間後の上清中 IL-8 タンパクの量を増加させた (p<0.05)。一方、(+)-terrein (10 μ M) を添加すると、Aa 刺激により亢進された IL-8mRNA 発現とタンパク産生は有意に抑制された (p<0.05)。
3. Aa が接着装置関連タンパク発現に与える影響と (+)-terrein の及ぼす影響：HGEs を Aa (MOI=10 相当) で刺激すると、刺激 6 時間後の ZO-1 および CX43 の mRNA 発現は抑制され、刺激 12 時間後のタンパク発現は低下した (p<0.05)。一方、(+)-terrein を添加すると、Aa 刺激時に誘導される ZO-1 および CX43 の mRNA およびタンパク発現低下は抑制された (p<0.05)。
4. HGEs における Aa が活性化する MAP Kinase と(+)-terrein の及ぼす影響：HGEs を Aa (MOI = 10 相当) で刺激すると、刺激 5 分後の ERK1/2 および p38MAPK のリン酸化が亢進した (p<0.05)。一方、(+)-terrein を添加すると、ERK1/2 および p38MAPK のリン酸化は抑制された (p<0.05)。

【考察】

本研究において、(+)-terreinは、HGEsのAa刺激によって誘導されるIL-8の産生を抑制した。また、細胞間接着因子のZO-1とCX43のAa刺激に伴う発現低下を抑制した。さらに、細胞内シグナル伝達因子であるERK1/2とp38MAPKのリン酸化を抑制した。本結果から、(+)-terreinには、HGEsのバリア機能を強化することによって、感染制御および炎症の波及を抑制する効果を有する可能性が示唆された。

(+)-terreinは、歯周病発症初期に関与するとされるAa感染に対し、歯周組織の物理的バリアとして機能するHGEsの機能を制御して抗炎症効果を発揮する可能性がある。近年、歯周病は感染性疾患としての側面よりも、炎症性疾患としての側面に注目が集まっている。すなわち、歯周病原細菌が感染することによって惹起される宿主の炎症反応をいかに効率的に制御できるかが重要である。本研究において、(+)-terreinは、免疫担当細胞を炎症局所に誘導するIL-8の産生を抑制するだけでなく、TJやGJといった細胞間接着に関与するZO-1およびCX43の発現を制御し、細菌の組織内侵入を防げる可能性が示唆される。以上のように歯周病原細菌と初期に対峙するHGEsに対して(+)-terreinが及ぼす効果は高く、新たな歯周病治療薬として応用できる可能性が示唆される。

(+)-terreinは低分子化合物であり、受容体を介さずに細胞膜を通過して細胞内に作用する可能性が高い。そのため、(+)-terreinの標的分子はシグナル伝達分子 (ERK1/2およびp38MAPK) に作用できる分子と推察されるが未だ不明である。そのため、今後分子レベルでのさらなる作用機序の検証が必要である。一方、(+)-terreinは有機化学的に合成可能であり、より副作用の少ない新規誘導体を合成することが可能である。そして、安価で簡便に内服可能な新規抗炎症薬への応用が可能と考える。

【結論】

(+)-terreinはHGEsにおいて、Aa誘導性IL-8の産生を抑制し、さらに細胞間接着因子のZO-1, CX43のAa誘導性発現低下を抑制することで、抗炎症効果を発揮する可能性が示唆された。