

真菌二次代謝産物(+)-terrein が

Aggregatibacter actinomycetemcomitans 刺激時に

ヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響の解明

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

中村 亜里紗

**Elucidation of the influence of synthetic (+) - terrein
on human gingival epithelial cells upon stimulation
with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science

Arisa NAKAMURA

(平成 29 年 12 月 15 日受付)

緒言

歯周病は、口腔内の歯周病原細菌の感染によって発症する慢性感染症である。また、歯周病は、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、結合組織深部の歯槽骨破壊を生じる炎症性疾患である^{1,2)}。この炎症の進行を絶つことが歯周治療の原則であることから、感染源の除去を始めとする感染の制御が歯周治療を行う上で重要視されている³⁾。また、歯周治療で行う炎症の制御は、感染の波及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、近年、歯周病における感染の制御に加え、歯周組織の治癒や恒常性の維持を良好に保つ新しい治療法が開発されつつある⁴⁾。

一方、歯周病は現在、国民病とも呼ばれ、厚生労働省が3年毎に実施している患者調査の平成26年の結果によると、歯肉炎および歯周疾患の総患者数（継続的な治療を受けていると推測される患者数）は、約350万人にものぼり、前回の調査より約85万人以上増加している⁵⁾。また、平成28年の国民調査・栄養調査の結果から、過去1年間に歯科検診を受けた者の割合は全国民のうち52.9%であり、平成21年以降有意に増加している⁶⁾。その背景には、近年の8020運動を代表とする口腔衛生に対する意識向上に伴い、80歳で20本以上の自分の歯を

有する高齢者の割合が急増（約 50 %）していることも関与している⁷⁾。一方で、現在歯数の増加に伴い、歯周炎に罹患する高齢者数の増加も報告⁸⁾されており、今後我が国における歯周炎患者数はさらに増え続ける可能性が高い。そのため、これからの歯科医療には、高齢者に対する治療を意識した安全で効率の高い治療法の開発が求められる。

歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（*A. actinomycetemcomitans*）等が、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）に付着・侵入する⁹⁾ことによって歯周炎症が惹起される。これに対して HGEs は、抗菌ペプチド産生による殺菌¹⁰⁾や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て¹¹⁾食細胞を引き寄せ¹²⁾、免疫を活性化する¹³⁾。一方で、HGEs は、細胞間で生理活性物質等を輸送するために、接着装置で細胞同士を接着¹⁴⁾させ上皮組織を形成する。これらのうち歯肉上皮細胞間には、タイトジャンクション（tight junction : TJ）とギャップジャンクション（gap junction : GJ）が接着装置として存在している¹⁴⁾。TJ は、病原微生物に対して最前線に位置し、zonula occludin-1 protein (ZO-1) , occludin, そして claudin-1 を中心とする分子で構成される^{15,16)}。

また、GJは6量体のコネクシン（connexin：CX）として存在し、隣接する二つの細胞同士を互いに結合させて細胞間の物質輸送を司る^{17, 18)}。これまでの報告では、*A. actinomycetemcomitans* の菌体成分が接着因子を破壊・解離させ、*A. actinomycetemcomitans* が細胞内に侵入する^{19, 20)}ことによって炎症を惹起させることが示唆されている。したがって、現在、HGEsにおける*A. actinomycetemcomitans* の感染や侵入を制御²¹⁾する殺菌・抗炎症²²⁾効果をもった薬剤等の研究がされている。

真菌の一種の *Aspergillus terreus* から二次代謝産物として分離された化合物である(+)-terrein²³⁾は、その効果の一つとして抗炎症効果が報告されている²⁴⁾。また、有機化学的な合成経路が確立されており^{25, 26)}、IL-6/可溶性IL-6受容体誘導性の signal transducers and activator of transcription 3 (STAT3) と細胞外シグナル調節キナーゼ 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2 : ERK1/2) のリン酸化を抑制し、天然物と同等の抗炎症効果を発揮することが知られている²⁶⁾。また、(+)-terrein は分子量 154.2 の低分子化合物であることから組織浸透性も期待できるが、今現在 HGEs における研究報告はない。

本研究では、有機化学的に合成した(+)-terrein が、HGEs において *A. actinomycetemcomitans* 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, Mandai らの方法²⁶⁾に従って L-酒石酸から合成したものを, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.2 : Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で希釈し, 100 mM の濃度に調製して-80 °C 下で保存した。使用の際には, CnT-Prime, Epithelial Culture Medium (CnT-PR, CELLnTEC, Bern, Switzerland) で調製した。

Western blot (WB) 法の一次抗体は, ラビット由来抗リン酸化 ERK1/2 モノクローナル IgG 抗体 (No. 4370, 1 : 1,000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), ラビット由来抗リン酸化 p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) モノクローナル IgG 抗体 (No. 4511, 1 : 1,000, Cell Signaling Technology), マウス由来抗 ZO-1 モノクローナル IgG 抗体 (No.71-0700, 1 : 1,000, Thermo Fisher Scientific), ラビット由来抗 CX43 ポリクローナル IgG 抗体 (No.33-9100, 1 : 1,000, Thermo Fisher Scientific), およびマウス由来抗 β -actin モノクローナル IgG 抗体 (No.A5441, 1 : 10,000, Sigma-Aldrich) を用い, 二次抗体として, horseradish

peroxidase (HRP) 標識ラビット IgG 抗体と HRP 標識マウス IgG 抗体 (共に 1 : 2,500, GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) を用いた。

2. 細胞の培養と細胞傷害性の検討

HGEs は primary human gingival epithelial cells, pooled (CELLnTEC) を用い, 100 Units/mL ペニシリンと 100 µg/mL ストレプトマイシン (共に Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を含む 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。細胞が 80 %コンフルエントの細胞密度で継代し, 4~10 継代した細胞を実験に供した。細胞数の計測には, 血球計算板 (NanoEntec, Seoul, Korea) を用いた。

(+)-terrein が HGEs の細胞傷害性に及ぼす影響の検討には, 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム (MTS) 法を利用し, CellTiter 96[®] Aqueous Assay (Promega, Madison, WI, USA) を使用した。HGEs を 96-well plate (#3596, Corning, Corning, NY, USA) に 1×10^4 cell/cm² の細胞密度で播種し, (+)-terrein を 0-1,000 µM の濃度で添加した。刺激 24 時間後に MTS 試薬を最終濃度 0.5 mg/mL で添加し, 2

時間後に生成されたホルマザン色素の吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 680 : Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて 490nm の波長で測定した。

3. 細菌の調製

細菌は, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) Y4 株を使用し, Tryptic Soy Broth 1L 当たりに yeast extract (共に Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を 5 g 添加した培地で 37 °C, 5 %炭酸ガス存在下で培養した。また, 嫌氣的条件にするために, アネロパック・ケンキ (三菱ガス科学, 東京) を使用した。細菌の増殖度は, 吸光度計 (miniphoto518 R : タイテック, 埼玉) を用いて波長 660 nm (A_{660}) における吸光度を測定することで判定した。 A_{660} が 0.5 になるように培養した細菌は, 1,710 × g で 4 °C, 20 分間の遠心と PBS への懸濁を 2 度繰り返して洗浄した後, 100 °C, 20 分の熱処理を行い, 失活させた。その後, 寒天培地に播種し, 失活させた細菌が増殖しないことを確認した。なお, 細胞添加時には, 細菌の菌濃度を調製して実験に用いた。

4. 遺伝子発現の検出

HGEs において(+)-terrein が *A. actinomycetemcomitans* 誘導性 IL-8, ZO-1, および CX43 の各遺伝子の発現に与える影響は,リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。12-well plate (#3513, Corning) に 2.0×10^5 cells/cm² (IL-8) , 4.0×10^5 cells/cm² (ZO-1, CX43) の細胞密度で播種し, 前述の記載 (材料と方法 2 項) と同様に培養後, (+)-terrein (10 μ M) で 30 分間前処理し, 失活処理した *A. actinomycetemcomitans* を細胞数と細菌数の比率から multiplicity of infection (MOI) = 1-100 相当の濃度で刺激した。そして, 添加 6 時間後に全 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した。RNA の濃度と純度は, Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて 260 nm と 280 nm での吸光度とその比を用いて測定した。全ての RNA の純度は A260/A280 値が 1.8~2.2 の間である事を確認した。また, RNA 抽出過程で RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて混入した DNA を除去した。抽出した RNA 1 μ g をテンプレートとして, 50 μ M oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer と 10 mM dNTP Mix (ともに Life Technologies) を 1 μ L ずつ混合し, RNase-free Water (Qiagen) を追加することで

13 μL とした溶液を 65 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間熱処理をして RNA のステム・ループ構造を破壊した後、氷上で 1 分間急冷反応させ、プライマーを 60 $^{\circ}\text{C}$ でアニールした。

さらに、4 μL の 5 \times First Strand Buffer, 各 1 μL の 0.1 M ジチオトレイトール, SuperScript III Reverse Transcriptase (全て Life Technologies) , および RNase-free Water を追加することで最終量を 20 μL の溶液とし、50 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間の逆転写反応を行って cDNA を合成した。その後、70 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間の熱処理を加え、逆転写酵素の不活化を行った。合成した cDNA について、リアルタイム RT-PCR 法を用いて *IL-8*, *ZO-1*, そして *CX43* の発現に関する解析を行った。リアルタイム RT-PCR 法は、上記の cDNA 合成後の反応液を、forward ならびに reverse PCR プライマー (10 μM) , 2 \times power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) , そして RNase-free Water と混合し、95 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒間変性し、60 $^{\circ}\text{C}$ で 60 秒のアニーリングと伸長反応を同時に行うステップを含む 2 段階ステップを 40 サイクル行った。この反応は 7300 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて行い、その際に PCR 産物が発する蛍光量を SDS v1.X with RQ Software (Life Technologies) にて測定した。なお、各遺伝子の mRNA 量は *GAPDH* の mRNA 量を内部対照として比較 C_t 法 ($\Delta\Delta C_t$ 法) にて定量し、相対発現量として示した。

使用した PCR プライマーは表 1 にまとめて記す。各 PCR プライマーは NCBI primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて目的遺伝子に理論上特異的であることを確認した。

5. タンパク質の検出

【固相酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)】

A. actinomycetemcomitans 刺激時の IL-8 タンパク質産生量に(+)-terrein が与える影響は、ELISA 法により検討した。HGEs を 12-well plate (#3513, Corning) に 2×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種し、培養後、(+)-terrein (10 μM) で 30 分間前処理し、MOI = 1-10 相当の失活処理させた *A. actinomycetemcomitans* で刺激した。刺激 12 時間後の培養上清を回収し、1,710 ×g で 4 °C, 20 分間の遠心分離を行い、得られた上清を -80 °C 下で保管した。IL-8 タンパク質量の測定には Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, San Diego, CA, USA) を用い、添付文書に記載の方法に従って行った。

【Western blot : WB】

A. actinomycetemcomitans 刺激時の細胞内シグナル伝達分子, ZO-1, および CX43 のタンパク質発現に(+)-terrein が与える影響は, WB 法で検討した²⁷⁾。

12-well plate(#3513, Corning)に 2.0×10^5 cells/cm²(リン酸化 ERK1/2, p38 MAPK), 4.0×10^5 cells/cm² (ZO-1, CX43) の細胞密度で播種し, 前述の記載(材料と方法 2 項)と同様に培養後, (+)-terrein (10 μ M) で 30 分間前処理し, 失活処理した *A. actinomycetemcomitans* を MOI = 10 相当の濃度で刺激した。刺激 5 分後(リン酸化 ERK1/2, p38 MAPK), 12 時間後(ZO-1, CX43)に, 氷冷した cell lysis buffer {50 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 10 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸バッファー (Tris-HCl, pH7.2), 1% ノニデット p-40, 5 mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), プロテアーゼインヒビターカクテル (Complete) } にて細胞を 10 分間溶解し, 4 °C で 10 分間, 12,000 \times g にて遠心分離を行い, その上清をタンパク質として回収した。タンパク質の定量は, ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を対照に, Bradford の方法に基づいて行った²⁷⁾。回収したタンパク質 (10 μ g) は, SDS サンプルバッファー {1% (w/v) SDS, 45 mM Tris-HCl (pH6.8), 15% (v/v)

グリセリン, 144 mM 2-メルカプトエタノール, 0.002 %ブロモフェノールブルー} を加え, 95 °C で 5 分間煮沸し, 還元状態にした。なお, 還元状態にするまでの過程は, 全て氷上で行った。還元状態にしたタンパク質を, 泳動用緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 200 mM グリシン, 35 mM SDS) を用いたポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド濃度 : ERK1/2, p38 MAPK, および CX43 : 12 % (w/v) , ZO-1 : 7.5 % (w/v)) 電気泳動にて分離した (室温, 150 V 定電圧条件)。その後, 分離したタンパク質を, 湿式転写装置 (MINI PROTEAN® II : Bio-Rad laboratories) を用いて転写用バッファー (1.8 mM Tris-HCl, 190 mM グリシン, 20 % メタノール) 中で 60 分間 polyvinylidene difluoride (PDVF) 膜 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) へ転写した (4 °C, 100 V 定電圧条件)。転写後の PDVF 膜は, 5 %スキムミルク (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を含有するトリス緩衝食塩水 (T-TBS : 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20, pH7.4) に浸漬し, 室温下で 1 時間のブロッキング操作を行った。その後, 一次抗体を 5 %スキムミルク含有 TBS で希釈した液体中に PVDF 膜を浸漬し, 12 時間振とうした。反応後, PVDF 膜は T-TBS で洗浄し, 二次抗体を 5 %スキムミルク含有 TBS で希釈した液体に浸漬し, 室温下で 1 時間振とうした。反応タン

パク質の検出は、高感度ケミルミネッセンス法 (enhanced chemiluminescence : ECL 法, SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate : Thermo Fisher Scientific) を用いた。使用した PVDF 膜は、抗体除去バッファー (Restore[™] Western Blot Stripping Buffer : Thermo Fisher Scientific) に浸漬し、室温下にて 30 分間振とうさせ抗体を除去した後、上記に記載したブロッキング操作と同様の操作を行った上で、 β -actin 抗体を用いて検出することで標準化に供した。標的タンパク質に相対するバンドの強度は画像解析ソフト Image J (version 1.46r, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて黒化度を数値化し、(+)-terrein 未処理かつ *A. actinomycetemcomitans* 無刺激の 0 分時の黒化度を基準とした相対黒化度とした。

6. 統計解析

各実験系における統計解析は、3 群間以上の差の検定に one-way analysis of variance (one-way ANOVA) を用い、多重比較検定には Tukey-Kramer test を使用した。2 群間の差の検定には、Student's *t*-test を用いた。各々の統計処理には、JMP (Ver. 9.0.2 : SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて検定を行い、*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、0.01-100 μM の濃度で HGEs の細胞傷害性に影響を与えなかった。しかし、1,000 μM の濃度で作用させると細胞増殖活性を半減させた (図 1 : $p < 0.05$) 。

以上の結果から、以降の実験では、(+)-terrein は 10 μM の濃度で使用した。

2. HGEs における *A. actinomycetemcomitans* が誘導する IL-8 発現と (+)-terrein の影響

HGEs を *A. actinomycetemcomitans* (MOI = 1-100 相当) で刺激すると、IL-8 の mRNA 発現量は増加した (図 2 : $p < 0.05$) 。そのピークは MOI = 10 相当のときであった。そして、刺激 12 時間後には培養上清中への IL-8 のタンパク質産生量も増加した (図 3 : $p < 0.05$) 。しかし、(+)-terrein (10 μM) で事前に処理すると、IL-8 の mRNA 発現量とタンパク質産生は抑制された (図 2 と図 3 : $p < 0.05$) 。なお、MOI = 100 相当の場合の IL-8 の mRNA 量は、MOI = 10 相当で刺激した場合

と比べて 1/3 程度に留まり MOI = 1 相当と同等であったが, (+)-terrein を添加しても MOI = 1 相当の場合のように抑制されなかった (図 2)。

3. HGEs における *A. actinomycetemcomitans* が接着装置関連タンパク質発現に与える影響と(+)-terrein の影響

A. actinomycetemcomitans が HGEs の接着装置関連タンパク質のうち, TJ の細胞接着因子である ZO-1, および GJ の細胞接着因子であるコネクシンのうち CX43 の発現に及ぼす影響を調べた。HGEs を *A. actinomycetemcomitans* (MOI = 10 相当) で刺激すると, 刺激 6 時間後には両因子の mRNA 発現は抑制され (図 4 : $p < 0.05$), 刺激 12 時間後には両因子のタンパク質発現も抑制された (図 5 : $p < 0.05$)。しかし, (+)-terrein (10 μ M) で事前に処理すると, *A. actinomycetemcomitans* 刺激時に誘導される ZO-1 および CX43 の mRNA およびタンパク質発現の低下は抑制され, 両因子の mRNA 発現量とタンパク質発現量は, 未添加時のレベルに回復した (図 4 と 5 : $p < 0.05$)。

4. HGEs における *A. actinomycetemcomitans* 刺激による MAP Kinase のリ

リン酸化と(+)-terrein の影響

HGEs を *A. actinomycetemcomitans* (MOI = 10 相当) で刺激すると MAP Kinase である ERK1/2 および p38 MAPK のリン酸化が刺激 5 分後にピークとなった (図 6A と B : $p < 0.05$)。しかし, (+)-terrein (10 μM) で事前に処理すると, *A. actinomycetemcomitans* 刺激による ERK1/2 および p38 MAPK のリン酸化は約 70 ~80%に抑制された (図 6A と B : $p < 0.05$)。

考察

HGEs は、歯周病原細菌の感染に対して、TJ や GJ に代表される細胞間接着装置を介した物理的バリアとして機能する¹⁴⁾とともに、ケモカインである IL-8 等を産生し¹¹⁾、免疫担当細胞を感染巣局所に遊走させて炎症を惹起する¹²⁾。そのため、HGEs は歯周炎症初期に重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、真菌由来代謝産物である(+)-terrein が HGEs のケモカイン産生性および細胞接着因子の発現に及ぼす作用効果と作用機序の解明を試みた。具体的には(+)-terrein が、HGEs における *A. actinomycetemcomitans* 刺激時に誘導される IL-8 の産生ならびに細胞間接着因子である ZO-1 と CX43 の発現に及ぼす影響を検討し、さらに、(+)-terrein が、IL-8 および細胞接着因子の発現に関与するシグナル伝達分子 (ERK1/2 および p38 MAPK) のリン酸化に及ぼす影響を検討した。本研究で得られた結果は次の 3 点である。*A. actinomycetemcomitans* 刺激時の HGEs において、1) (+)-terrein は IL-8 の産生を抑制した。また、2) (+)-terrein は細胞間接着因子の ZO-1 と CX43 の発現低下を抑制した。さらに、3) (+)-terrein は ERK1/2 と p38 MAPK のリン酸化を抑制した。

本研究において、(+)-terrein の効果の検証に先立ち、HGEs における(+)-terrein の細胞傷害性を MTS 法にて検討したところ、100 μM 以下の濃度では細胞傷害性を示さなかった (図 1)。これまでの知見で、(+)-terrein は HGFs や歯髓細胞においても同様の濃度依存的な細胞傷害性を示しており、10 μM 以下の濃度では細胞傷害性を示さなかった²⁶⁾。以上の結果と知見をふまえ、以後の実験系に用いる(+)-terrein の濃度を 10 μM に設定した。

まず、(+)-terrein が HGEs において、*A. actinomycetemcomitans* で刺激させた時の IL-8 の産生性に及ぼす影響を検討した。10 μM の(+)-terrein は *A. actinomycetemcomitans* (MOI = 1-10 相当) で誘導した HGEs において、IL-8 の遺伝子発現とタンパク質産生を有意に抑制した (図 2, 3)。IL-8 は、病原微生物の感染や自己免疫応答によって産生されるケモカイン^{28, 29)}であり、歯周炎の発症にも深く関連している³⁰⁾。そのため、HGEs から産生される IL-8 の産生を制御することが可能になれば、局所における歯周炎症の制御へとつながる。すなわち、*A. actinomycetemcomitans* 感染に伴う病的歯周ポケットの形成抑制等を目的に(+)-terrein を応用できる可能性が示唆される。

次に、(+)-terrein の細胞間接着因子へ及ぼす影響を検討した。HGEs に歯周病原細菌が感染すると、細胞接着機構に異常を生じる^{31, 32)}。これまでに *A. actinomycetemcomitans* 感染によって TJ の構成分子である claudin-1 やアドヘレンスジャンクションの構成分子 E-cadherin の発現が抑制されることが知られている³³⁾。また、*A. actinomycetemcomitans* の感染によって ZO-1 および CX43 の遺伝子およびタンパク質発現が抑制されるという報告もあり^{34, 35)}、これら細胞接着機構が *A. actinomycetemcomitans* 感染によって機能低下することで炎症がさらに波及し、その後の深部組織の破壊に繋がると考えられている³⁶⁾。本研究においても、HGEs に *A. actinomycetemcomitans* で刺激すると、ZO-1 および CX43 の mRNA 発現が低下し、タンパク質発現も抑制されることを確認している (図 4, 5)。しかし、(+)-terrein を作用させると、その発現低下が抑制され、未添加時のタンパク質発現レベルにまで回復できることを確認している (図 4, 5)。すなわち、(+)-terrein を作用させることによって、*A. actinomycetemcomitans* により生じる炎症作用を抑制し、TJ および GJ の機能を維持することで組織内への病原微生物の侵入を防ぐことが可能になると考える。

そして、(+)-terrein が *A. actinomycetemcomitans* 刺激時の細胞内シグナル伝達系へ及ぼす影響を検討した。歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* や *A. actinomycetemcomitans* が HGEs に感染すると、細胞内刺激伝達因子である ERK1/2 および p38 MAPK が活性化され、IL-8 の産生を亢進することが知られている^{28, 37, 38}。また、細胞接着因子の発現に ERK1/2 と p38 MAPK が関与しているという報告もある^{39, 40}。MAPK 経路に属する ERK1/2 および p38 MAPK は、細胞増殖、分化、細胞死、ストレス応答など多くの細胞機能の制御に関わる刺激伝達因子であり、重要なターゲット因子でもある^{41, 42}。本研究において、(+)-terrein は HGEs における *A. actinomycetemcomitans* 誘導性の ERK1/2 および p38 MAPK の活性を抑制する効果を示した (図 6)。以上の結果より、HGEs において、(+)-terrein は、*A. actinomycetemcomitans* 刺激時に ERK1/2 と p38 MAPK のシグナル伝達経路を抑制することによって、IL-8 の産生を抑制したことが示唆される。また、ZO-1 と CX43 の発現制御による物理的バリア機能の維持によって抗炎症効果を示す可能性が示唆されるも、今後さらなる分子生物学的な検討が必要である。

今回着目した(+)-terrein は、経口投与が可能な低分子化合物であり、高齢者への応用を考慮すると非常に有用な候補化合物である。また、有機化学的に合成

することが可能なため、より効果が高く、副作用の少ない新規類縁体の開発へとつなげられる。今後、*in vivo* での効果並びに副作用の有無の研究を重ねることによって、(+)-terrein が HGEs の機能制御による歯周病治療、または予防の一助を担う候補化合物としての可能性を検討していくことが望まれる。

結論

有機化学的に合成された(+)-terrein は HGEs において, *A. actinomycetemcomitans* 刺激時の IL-8 の産生を抑制し, さらに細胞間接着因子 ZO-1 および CX43 の *A. actinomycetemcomitans* 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。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また、様々な面にわたり終始御指導賜り、貴重な御助言と御協力を下さいました岡山大学病院歯周科の大森一弘講師、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の富川知子助教、小林寛也助教、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻国際環境科学講座口腔微生物学分野の中山真彰助教、ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯

周病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- 第37回岡山歯学会学術大会（2016年10月，岡山）
- 第60回日本歯周病学会春季学術大会（2017年5月，福岡）

参考文献

- 1) Williams, R.C.: Periodontal Disease. *N. Eng. J. Med.*, **322**, 373-382, 1990.
- 2) Bosshardt, D.D.: The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol. 2000*, **30**, 2017.
- 3) Van der Weijden, G.A., and Timmerman, M.F.: A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, **29**, 55-71, 2002.
- 4) Bartold, P.M., and Van Dyke, T.E.: Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol. 2000*, **75**, 317-329, 2017.
- 5) 厚生労働省：平成26年患者調査「患者調査の概要」，
（「<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/dl/gaiyou.pdf>」2014年10月現在）
- 6) 厚生労働省：平成28年国民健康・栄養調査「結果の概要」
（「http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-KenkoukyokuGanta-isakukenkouzoushinka/kekkagaiyou_7.pdf」2017年9月現在）

- 7) 厚生労働省：平成28年歯科疾患実態調査「20本以上の歯を有する者の割合の年次推移」（「<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-28.html>」2018年2月現在）
- 8) 厚生労働省：平成28年歯科疾患実態調査「歯周病罹患率（4 mm以上の歯周ポケットを有する者）の経年比較」（「<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-28-02.pdf>」2018年2月現在）
- 9) Kochi, S., Yamashiro, K., Hongo, S., Yamamoto, T., Ugawa, Y., Shimoe, M., Kawamura, M., Hirata-Yoshihara, C., Ideguchi, H., Maeda, H., and Takashiba, S.: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* regulates the expression of integrins and reduces cell adhesion via integrin $\alpha 5$ in human gingival epithelial cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **436**, 39-48, 2017.
- 10) Hans, M., and Hans, V.M.: Epithelial antimicrobial peptides: guardian of the oral cavity. *Int. J. Pept.*, **2014**, 1-13, 2014.
- 11) Uchida, Y., Shiba, H., Komatsuzawa, H., Takemoto, T., Sakata, M., Fujita, T., Kawaguchi, H., Sugai, M., and Kurihara, H.: Expression of IL-1 β and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus*

- actinomycetemcomitans*. *Cytokine*, **14**, 152-161, 2001.
- 12) Agace, W., Hedges, S., Andersson, U., Andersson, J., Ceska, M., and Svanborg, C.: Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **14**, 602-609, 1993.
- 13) Mathews, M., Jia, H.P., Guthmiller, J.M., Losh, G., Graham, S., Johnson, G.K., Tack, B.F., and McCray, P.B.Jr.: Production of β -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect. Immun.*, **67**, 2740-2745, 1999.
- 14) 柴秀樹, 藤田剛, 内田雄士, 栗原英見: 歯肉上皮細胞の機能制御による歯周炎予防治法開発の基礎研究. 日本歯周病学会会誌, **54**, 315-322, 2012.
- 15) Schneeberger, E.E., and Lynch, R.D.: The tight junction: a multifunctional complex. *Am. Physiol. Cell Physiol.*, **286**, 1213-1228, 2004.
- 16) Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M.: Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **36**, 157-165, 2014.
- 17) Hatakeyama, S., Mikami, T., Habano, W., and Takeda, Y.: Expression of connexins and the effect of retinoic acid in oral keratinocytes. *J. Oral Sci.*, **53**, 327-332, 2011.

- 18) Xiao, F., Weng, J., Fan, K., and Wang, W.: Detailed regulatory mechanism of the interaction between ZO-1 PDZ2 and connexin43 revealed by MD simulations. *PLoS One*, **6**,1-9, 2011.
- 19) Kiley, P., and Holt, S.C.: Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infect. Immun.*, **30**, 862-873, 1980.
- 20) Schenkein, H.A., Barbour, S.E., Berry, C.R., Kipps, B., and Tew, J.G.: Invasion of human vascular endothelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via thereceptor for platelet-activating factor. *Infect. Immun.*, **68**, 5416-5424, 2000.
- 21) Sfakianakis, A., Barr, C.E., and Kreutzer, D.L.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced expression of IL-1 α and IL-1 β in human gingival epithelial cells: role in IL-8 expression. *Eur. J. Oral Sci.*, **109**, 393-401, 2001.
- 22) Imai, H., Fujita, T., Kajiya, M., Ouhara, K., Miyagawa, T., Matsuda, S., Shiba, H., and Kurihara, H.: Amphotericin B down-regulates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced production of IL-8 and IL-6 in human gingival epithelial cells. *Cell. Immunol.*, **290**, 201-208, 2014.

- 23) Raistrick, H., and Smtih, G.: Studies in the biochemistry of micro-organisms. *Biochem. J.*, **29**, 606-611, 1935.
- 24) Lee, J.C., Yu, M.K., Lee, R., Lee, Y.H., Jeon, J.G., Lee, M.H., Jhee, E.C., Yoo, I.D., and Yi, H.K.: Terrein reduces pulpal inflammation in human dental pulp cells. *J. Endod.*, **34**, 433-437, 2008.
- 25) Altenbach, H.J., and Holzapfel, W.: Synthesis of (+)-terrein from L-tartaric acid. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **29**, 67-68, 1990.
- 26) Mandai, H., Omori, K., Yamamoto, D., Tsumura, T., Murota, K., Yamamoto, S., Mitsudo, K., Ibaragi, S., Sasaki, A., Maeda, H., Takashiba, S., and Suga, S.: Synthetic (+)-terrein suppresses interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor induced-secretion of vascular endothelial growth factor in human gingival fibroblasts. *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 5338-5344, 2014.
- 27) Omori, K., Naruishi, K., Nishimura, F., Yamada-Naruishi, H., and Takashiba, S.: High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6643-6649,

2004.

- 28) Groeger, S., Jarzina, F., Domann, E., and Meyle, J.: *Porphyromonas gingivalis* activates NF κ B and MAPK pathways in human oral epithelial cells. *BMC Immunol.*, **18**, 1-11, 2017.
- 29) Yoshimura, T., Mathushima, K., Oppenheim, J.J., and Leonard, E.J.: Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS) stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J. Immunol.*, **139**, 788-793, 1987.
- 30) Groeger, S.E., and Meyle, J.: Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol. 2000*, **69**, 46-67. 2015.
- 31) Choi, Y.S., Kim, Y.C., Ji, S., and Choi, Y.: Increased bacterial invasion and differential expression of tight-junction proteins, growth factors, and growth factor receptors in periodontal lesions. *J. Periodontol.*, **85**, 313-322, 2014.
- 32) Yeh, T.H., Hsu, W.C., Chen, Y.S., Hsu, C.J., and Lee, S.Y.: Lipopolysaccharide decreases connexin 43 expression on nasal epithelial cells in vitro. *Acta.*

Otolaryngol., **125**, 1091-1096, 2005.

- 33) Fujita, T., Yumoto, H., Shiba, H., Ouhara, K., Miyagawa, T., Nagahara, T., Matsuda, S., Kawaguchi, H., Matsuo, T., Murakami, S., and Kurihara, H.: Irsogladine maleate regulates epithelial barrier function in tumor necrosis factor- α -stimulated human gingival epithelial cells. *J. Periodontal Res.*, **47**, 55-61, 2012.
- 34) Fujita, T., Ashikaga, A., Shiba, H., Uchida, Y., Hirono, C., Iwata, T., Takeda, K., Kishimoto, A., Hirata, R., Kawaguchi, H., Shiba, Y., and Kurihara, H.: Regulation of IL-8 by Irsogladine maleate is involved in abolishment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induced reduction of gap-junctional intercellular communication. *Cytokine*, **34**, 271-278, 2006.
- 35) Uchida, Y., Shiba, H., Komatsuzawa, H., Hirono, C., Ashikaga, A., Fujita, T., Kawaguchi, H., Sugai, M., Shiba, Y., and Kurihara, H.: Irsogladine maleate influences the response of gap junctional intercellular communication and IL-8 of human gingival epithelial cells following periodontopathogenic bacterial challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 502-507, 2005.

- 36) Belibasakis, G.N., Kast, J.I., Thurnheer, T., Akdis, C.A., and Bostanci, N.: The expression of gingival epithelial junctions in response to subgingival biofilms. *Virulence*, **6**, 704-709, 2015.
- 37) Kishimoto, A., Fujita, T., Shiba, H., Komatsuzawa, H., Takeda, K., Kajiya, M., Kawaguchi, H., and Kurihara, H.: Irsogladine maleate abolishes the increase in interleukin-8 levels caused by outer membrane protein 29 from *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* through the ERK pathway in human gingival epithelial cells. *J. Periodontal Res.*, **43**, 503-513, 2008.
- 38) Fujita, Y., Nakayama, M., Naito, M., Yamachika, E., Inoue, T., Nakayama, K., Iida, S., and Ohara, N.: Hemoglobin receptor protein from *Porphyromonas gingivalis* induces interleukin-8 production in human gingival epithelial cells through stimulation of the mitogen-activated protein kinase and NF- κ B signal transduction pathways. *Infect. Immun.*, **82**, 202-211, 2014.
- 39) Wang, K., Jin, X., Chen, Y., Song, Z., Jiang, X., Hu, F., Conlon, MA., and Topping, D.L.: Polyphenol-rich propolis extracts strengthen intestinal barrier function by

activating AMPK and ERK Signaling. *Nutrients*, **8**, 272-284, 2016.

- 40) Xia, Z., Han, Y., Wang, K., Guo, S., Wu, D., Huang, X., Li, Z., and Zhu, L.: Oral administration of propionic acid during lactation enhances the colonic barrier function. *Lipids Health Dis.*, **16**, 62-70, 2017.
- 41) Obata, T., Brown, G.E., and Yaffe, M.B.: MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit. Care. Med.*, **4**, 67-77, 2000.
- 42) McCubrey, J.A., Lahair, M.M., and Franklin, R.A.: Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1775-1789, 2006.

図の説明

図1. HGEsにおける(+)-terreinの細胞傷害性

HGEs (1.0×10^4 cells/cm²) を培養後, (+)-terreinを0-1,000 μ Mの濃度で24時間処理した後, 細胞傷害性をMTS法で調べた。

グラフは独立した3回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。各濃度における細胞傷害性 (吸光度) は, Student's *t*-testを用いて検定した (* : $p < 0.05$) 。

図2. *A. actinomycetemcomitans*刺激時のIL-8遺伝子発現に(+)-terreinが及ぼす影響

HGEs (2.0×10^5 cells/cm²) を(+)-terrein (10 μ M) で30分前処理した後に, *A. actinomycetemcomitans* (Aa, MOI=1-100 相当) で刺激し, 6時間培養した。全RNAを回収し, IL-8 mRNA量をリアルタイム RT-PCR法で検討した。GAPDHのmRNA量を内部対照として比較C_t法 ($\Delta\Delta C_t$ 法) にて定量し, 相対発現量として示した。

グラフは独立した3回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。
それぞれの相対発現量の違いは、ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した
(* : p<0.05)。

**図3. *A. actinomycetemcomitans*刺激時のIL-8タンパク質産生に(+)-terreinが
及ぼす影響**

HGEs (2.0×10^5 cells/cm²) を(+)-terrein (10 μ M) で30分前処理した後に、*A. actinomycetemcomitans* (Aa, MOI=1-10相当) で刺激し、12時間培養後に回収した培養上清中のIL-8タンパク質量をELISA法で定量した。

グラフは独立した3回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。
それぞれの産生量の違いは、ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した (* :
p<0.05)。

**図4. *A. actinomycetemcomitans*刺激時のZO-1とCX43遺伝子発現に
(+)-terreinが及ぼす影響**

HGEs (4.0×10^5 cells/cm²) を(+)-terrein (10 μ M) で 30 分前処理した後に, *A. actinomycetemcomitans* (Aa, MOI=10 相当) で刺激し, 6 時間培養した。全 RNA を回収し, *ZO-1* と *CX43* の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。*GAPDH* の mRNA 量を内部対照として比較 C_t法 ($\Delta\Delta C_t$ 法) にて定量し, 相対発現量として示した。

グラフは独立した 3 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの相対発現量の違いは, ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した (* : p<0.05) 。

図5. *A. actinomycetemcomitans*刺激時のZO-1とCX43のタンパク質産生に

(+)-terreinが及ぼす影響

HGEs (4.0×10^5 cells/cm²) を(+)-terrein (10 μ M) で 30 分前処理した後に, *A. actinomycetemcomitans* (Aa, MOI=10 相当) で刺激し, 12 時間培養後に回収した。タンパク質中の *ZO-1* と *CX43* の産生量を WB 法にて調べた。

A : *ZO-1*のWB像と相対黒化度で示した*ZO-1*産生量

B : *CX43*のWB像と相対黒化度で示した*CX43*産生量

検出されたバンドの強度は、Image Jを用いて黒化度を数値化し、*A. actinomycetemcomitans*無刺激且つ(+)-terrein未処理0分を基準とした比率で相対黒化度を算出した。

グラフは独立した3回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの産生量の違いは、ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した（* : p<0.05）。

図6. *A. actinomycetemcomitans*刺激時のERK1/2とp38 MAPKのリン酸化に(+)-terreinが及ぼす影響

HGEs (2.0×10^5 cells/cm²) を(+)-terrein (10 μ M) で30分前処理した後に、*A. actinomycetemcomitans* (Aa, MOI=10相当) で刺激し、5分培養後に回収したタンパク質中のリン酸化ERK1/2とリン酸化p38 MAPKの量をWB法にて調べた。

A : リン酸化ERK1/2のWB像と相対黒化度で示したリン酸化ERK1/2産生量

B : リン酸化p38 MAPKのWB像と相対黒化度で示したリン酸化p38 MAPK産生量

検出されたバンドの強度は、解析ソフトImage Jを用いて黒化度を数値化し、*A. actinomycetemcomitans*無刺激且つ(+)-terrein未処理0分を基準とした比率で相対黒化度を算出した。

グラフは独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

それぞれのリン酸化タンパク質量の違いは、ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した (* : $p < 0.05$) 。