

# gingipain-R阻害剤による歯周炎治療薬の開発に関する研究

森 真理 [北海道医療大学歯学部／講師]

## 背景・目的

歯周病は現代人の70%～80%が冒されている罹患率の高い感染症の1つである。本疾患は歯周組織の炎症や破壊を引き起こし、もし治療しなければ歯牙喪失の最大の原因であることが知られている。本研究の目的は歯周炎の発症における歯周炎の進展に重要な役割を果たすと考えられる歯周病原性菌*Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*)由来酵素であるgingipain-Rの病原性と歯周炎の発症のメカニズムを明らかにすることにより、gingipain-Rをターゲットにした新たな歯周炎予防法や治療法を確立することであった。

## 内容・方法

*P. gingivalis* 381株から、分子量47kDaのアルジニン特異的なシステインプロテアーゼgingipain-Rを精製した。健康なヒト歯肉からアウトグロース法で得た歯肉線維芽細胞(HGF)を10%FCS含有DMEM培地にて継代培養し実験に用いた。IL-8量の測定は、CLB社製IL-8 ELISAキットを用いた。mRNAの発現は、Gibco社製TRIZOLを用いtotal RNAを線維芽細胞より得た後、MBI社製Multiplex PCR Kits For Human Chemokines Set-1を用いReverse transcription(RT)-PCR法を行い、1% Ethidium bromide含有2% Agarose gelにて電気泳動して検索した。HGFを $1 \times 10^5$  cells/mlに調整し、100 mm 培養用ディッシュまたは96穴培養用プレートに播種し、10%FCSを含むDMEM培地で48時間培養した。コンフルエントに達した後、無血清のDMEMに1.0 U/mlの濃度のgingipain-Rを添加し12時間培養した。さらに1%FCSを含むDMEMに培地を交換し、12時間培養した後にサンプルを回収し測定に用いた。

## 結果・成果

gingipain-Rで12時間刺激されたHGFは無刺激のHGFの培養上清と比較して、培養上清中のIL-8量は減少した。しかしHGFのIL-8mRNAはgingipain-Rで12時間刺激したHGFでは無刺激のHGFと比較して強い発現が認められた。gingipain-Rを含まない1%FCS含有DMEMでさらに12時間培養すると、gingipain-Rであらかじめ刺激したHGFでは培養上清中のIL-8量が増加した。gingipain-R刺激するHGFにgingipain-Rの酵素活性阻害剤である0.1mM TLCKまたは0.1mM leupeptinを同時に添加しFCSを含まないDMEM培地で12時間培養後、さらに1%FCS含有DMEM培地にて12時間培養すると培養上清中のIL-8量の増加は

認められなかった。また、60°Cで30分加熱し不活性化させたgingipain-Rをgingipain-Rのかわりに添加しFCSを含まないDMEM培地で12時間培養後1%FCS含有DMEM培地にてさらに12時間培養すると培養上清中のIL-8量の増加は起こらなかった。このことからgingipain-RによるHGFのIL-8産生の増加にはgingipain-Rの酵素活性が関与していることが考えられた。さらにヒト唾液由来ヒスタチン5を酵素活性阻害剤の代わりに培地に添加し培養すると、酵素活性阻害剤の1/3程度ではあるがIL-8産生増加が抑制された。

さらにプロテアーゼの細胞作用を媒介する受容体であるProtease activated receptor (PAR)-1、PAR-2、PAR-3、PAR-4がHGFで発現するかどうかについて、PARsのmRNAの発現について検討した。その結果、PAR-1とPAR-4のmRNAは強く発現していることが確認された。PAR-3のmRNAはわずかな発現であった。PAR-2のmRNAの発現は認められなかった。このことから、gingipain-RによるHGFのIL-8産生にPAR-1とPAR-4が関係していると考えられた。そのため、PAR-1とPAR-4の合成activating peptideをそれぞれ実験系に添加し、PAR-1と-4の関与についてさらに検討した。その結果、PAR-1合成activating peptideの濃度依存的にコントロールと比較して培養上清中のIL-8量は増加した。PAR-4合成activating peptideではIL-8産生の増加は認められなかった。

これらの結果からgingipain-RはHGFのIL-8産生を誘導している事が明らかになった。gingipain-Rはこれまでタンパク分解酵素として直接的に歯周組織を破壊することが注目されてきたが、免疫応答に影響を及ぼすことにより間接的歯周炎の進展に深くかかわっていることが示唆された。さらに、PAR-1の合成activating peptideによりIL-8産生が誘導されたことからHGFのIL-8産生の増加には、PAR-1が関与している可能性が示唆された。さらに、ヒト唾液由来タンパクであるヒスタチン5によりgingipain-Rの酵素活性が抑制され、HGFのIL-8産生が抑制された。

これらの結果から、PARのアンタゴニストやヒスタチン5を用いた歯周炎治療薬開発の可能性があることが示唆された。

## 今後の展望

gingipain-RによるHGFのIL-8産生増加により、歯周炎局所において、病態形成にgingipain-Rが重要な役割を果たしていることが明らかになった。gingipain-RによるHGFのIL-8産生増加において、gingipain-Rの酵素活性が重要な役割を果たしていることから、酵素活性阻害剤や唾液由来タンパクであるヒスタチン5を用いた歯周炎予防薬あるいは治療薬の開発の可能性が示された。また、gingipain-Rの細胞受容体はPAR-1が関与している可能性が示されたことから、PARのアンタゴニストによる治療薬開発の可能性も考えられた。今後は、これらの2点について、治療薬開発についてさらに検討していく予定である。