

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 1×10^5 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℃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。