

研究者：村野 綾（所属：九州歯科大学地域健康開発歯学分野）

研究題目：ADAMs を標的とした歯周病予防・治療戦略の検討

目的：

歯周炎の歯周組織破壊には、結合組織の主要構成成分である細胞外マトリックス（ECM）蛋白質が関与しており、それら ECM 蛋白質の分解調整には細胞内のエンドプロテアーゼ群の前駆蛋白質分解酵素がその役割を担っていると考えられている。一方、その多くの前駆蛋白質分解酵素については、各々の役割を含め口腔内における状況が明らかになっていない。本研究では、炎症性疾患において重要な役割を担っている TNF- α などの産生に関与している前駆蛋白質分解酵素である ADAM17（a disintegrin and metalloproteinase 17）の口腔内における動態を歯周組織由来の培養細胞を用いて検証した。

対象および方法：

材料：培養細胞は、ヒト培養口腔ケラチノサイト（hOMK107）と、扁平上皮癌細胞（SCC25）を用いた。

方法：カルチャースライドにて培養したヒト培養口腔ケラチノサイト（hOMK107）と、扁平上皮癌細胞（SCC25）を固定後、切片を作成し、細胞内における ADAM17 の局在性ならびに発現レベルを免疫細胞染色にて観察した。hOMK107, SCC25 を *P. gingivalis*（Pg）ならびに *E. coli*（E-coli）の LPS で刺激し細胞中の ADAM17, 細胞上清中の TNF- α のタンパク濃度変化を ELISA 法にて観察した。統計解析は SPSS 11.0 を用いて行った。

結果および考察：

免疫細胞染色において hOMK107 ならびに SCC25 の細胞膜上での ADAM17 の発現が認められた。SCC25 において 10 μ g/ml Pg LPS と E-coli LPS, 1 μ g/ml Pg LPS で刺激後、ADAM17 と TNF- α のタンパク濃度が、また hOMK107 において 10 μ g/ml Pg LPS と E-coli LPS, 1 μ g/ml Pg LPS で TNF- α のタンパク濃度が有意に上昇した。また統計的な有意差は認められなかったが、10 μ g/ml LPS の刺激により、細胞中の ADAM17 のタンパク濃度が高くなる傾向が認められ、加えて ADAM17 と TNF- α 間のタンパク濃度間では有意な正の相関関係が認められた。以上の結果から ADAM17 は歯肉上皮細胞中に発現し、歯肉上皮細胞における炎症性サイトカインである TNF- α の産生に関連する可能性が示唆された。

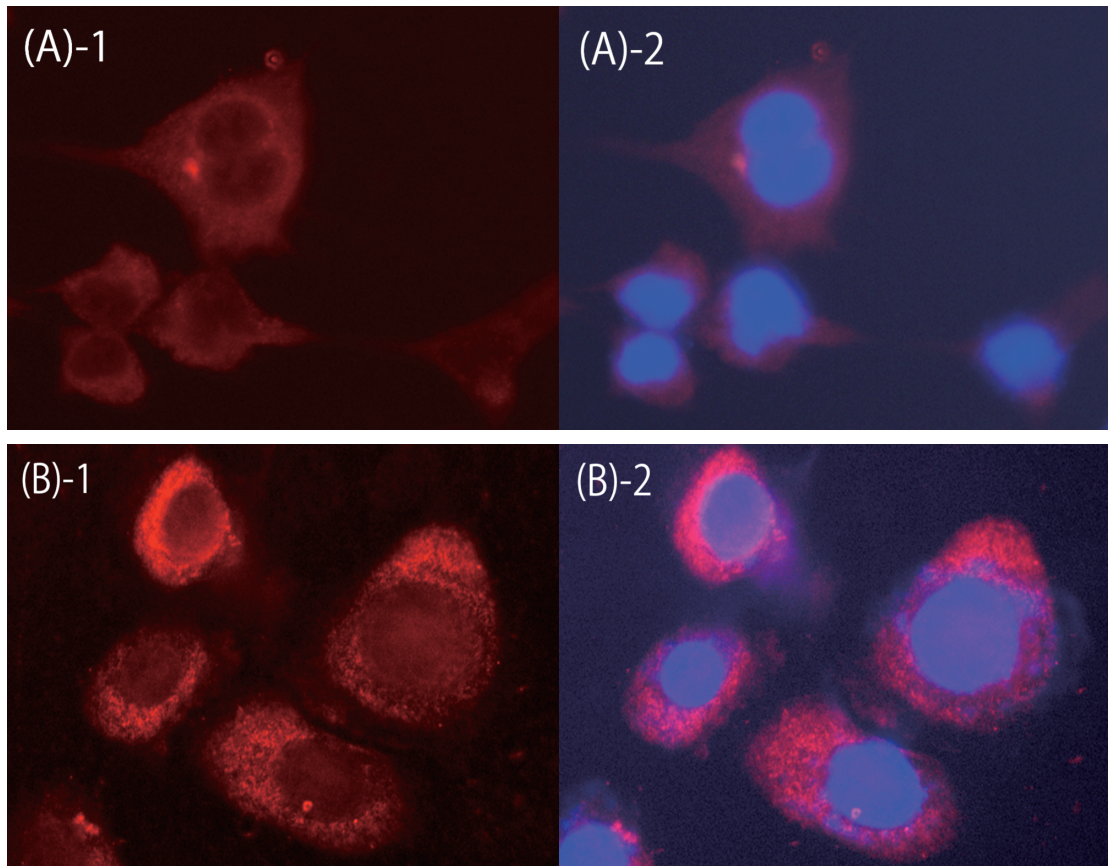


図1 培養細胞における ADAM17 の発現と分布.

ADAM17 は一次抗体に ADAM17 抗体 (1 : 200) と二次抗体に CFTM 555 標識 Donkey Anti-Rabbit IgG (1 : 1000) を用いて染色した。青色が DAPI 染色した細胞核。核は DAPI を用いて染色した。赤 : ADAM17, 青 : 細胞核。(A)-1, (A)-2-SCC25 の免疫組織染色画像, (B)-1, (B)-2-hOMK107 の免疫組織画像。

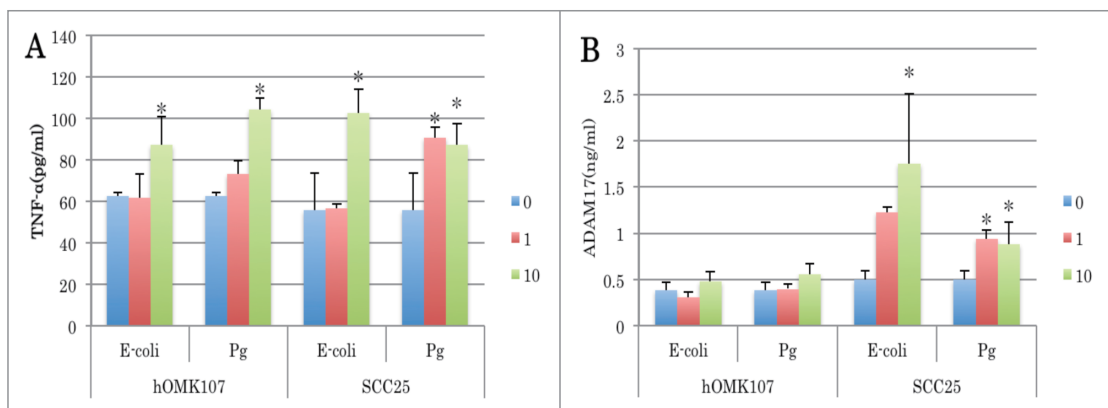


図2 hOMK107, SCC25 における LPS 刺激時の ADAM17, TNF- α の ELISA の結果。

(A) LPS 刺激による TNF- α の濃度変化。(B) LPS 刺激による ADAM17 の濃度変化。24well プレートを用いて, LPS 添加後細胞中の ADAM17, 細胞上清中の TNF- α タンパク濃度を EIA kit にて測定した。LPS は E-coli と Pg の 2 種類を用いて刺激した。青 : LPS 0 μ g/ml, 赤 : LPS 1 μ g/ml, 黄 : LPS 10 μ g/ml. 1 バーは標準偏差を示す。* p <0.05 [ANOVA (Dunnnett) vs. コントロール]。

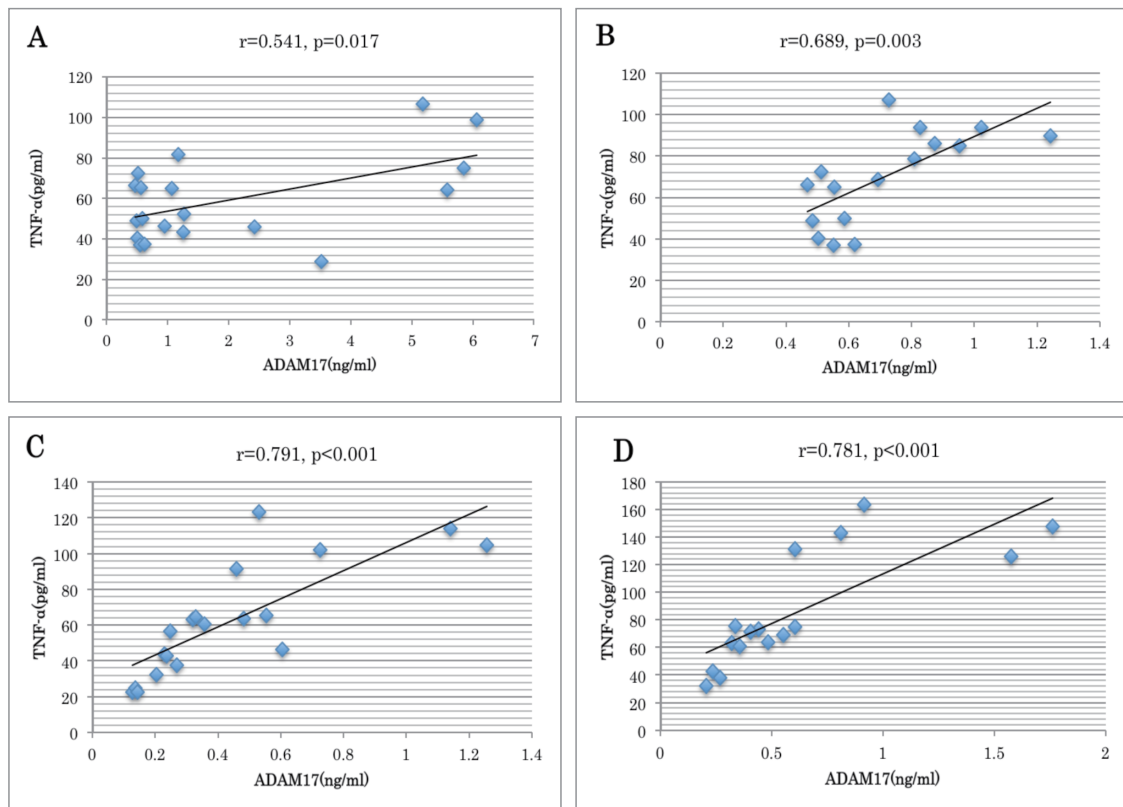


図3 hOMK107, SCC25におけるLPS刺激後のADAM17とTNF- α のタンパク濃度の関係。
 (A)E-coli LPS刺激時のSCC25, (B)Pg LPS刺激時のSCC25, (C)E-coli LPS刺激時のhOMK107,
 (D)Pg LPS刺激時のhOMK107 (r: Pearsonの相関係数, $p < 0.05$)。

成果発表: (予定を含めて口頭発表, 学術雑誌など)

1. 村野 綾, 栗野秀慈, 岩崎正則, 邵 仁浩, 安細敏弘: 歯肉上皮細胞におけるADAM17とTNF- α の関係について。
 第64回 日本口腔衛生学会・総会 (2015. 5. 27~29, つくば市) (予定)
2. 村野 綾, 栗野秀慈, 吉田明弘, 邵 仁浩, 安細敏弘: 歯周組織におけるa disintegrin and metalloproteinase17について。
 第63回日本口腔衛生学会・総会 (2014. 5. 29~31, 熊本市)。
3. 村野 綾, 栗野秀慈, 瀬田裕司, 吉田明弘, 邵 仁浩, 豊島邦昭, 安細敏弘: 歯周組織におけるa disintegrin and metalloproteinase17の局在性について。
 第73回九州歯科学会総会 (2013. 5. 18~19, 北九州市)。