

抗肝細胞増殖因子（抗 HGF）中和抗体を用いた新たな歯周治療の開発

日本大学歯学部生化学講座

専任講師 山 口 洋 子

（指導：鈴 木 直 人 教授）

目次

概要	．．．．． 2
第 1 章	．．．．． 5
抗肝細胞増殖因子（抗 HGF）中和抗体 of 歯肉局所投与によるサル歯周炎の改善	
緒言	．．．．． 6
材料および方法	．．．．． 8
結果	．．．．． 11
考察	．．．．． 13
表および図	．．．．． 15
第 2 章	．．．．． 20
ヒト歯周炎生体外モデルに対する抗 HGF 中和抗体の効果	
緒言	．．．．． 21
材料および方法	．．．．． 23
結果	．．．．． 26
考察	．．．．． 28
表および図	．．．．． 31
総括	．．．．． 36
引用文献	．．．．． 37
謝辞	．．．．． 43
参考論文	．．．．． 44

概要

歯周病は国民病と言われるほど罹患率が高く、2016年の歯科疾患実態調査では、40歳以上の約7割が歯周病であると報告されている。とくに、歯周炎はプラークコントロールを行っても、歯と歯肉との付着の喪失、すなわちアタッチメント・ロスが生じるため、最終的に歯が脱落するリスクがある。また、近年においても歯周炎の有病状況は改善しておらず、有効な治療法が確立されているとはいえない。さらに、適切な実験動物モデルも存在しないため、歯周炎の病態については不明な点が多く残されている。

著者は歯周炎の病態を解明するために、歯周炎患者の歯肉組織由来の歯肉線維芽細胞を外生させて凍結保存し、これらの初代培養細胞を用いて研究を進めてきた。一般的に、細胞は二次元で培養・継代されるが、二次元培養は生体環境と大きく異なるという問題がある。そこで、コラーゲンゾルの中に歯肉線維芽細胞を包埋してゲル化させ、その上に歯肉上皮細胞を播種する細胞包埋法による三次元共培養を行った。

歯周炎患者の歯肉線維芽細胞と歯肉上皮細胞を用いて三次元共培養を行ったところ、コラーゲンを高度に分解する細胞群が存在することがわかった。ほとんどの歯周炎患者の歯肉線維芽細胞から、このような形質を示す細胞群を分離することができたため、これらを歯周炎関連線維芽細胞群（Periodontitis-associated fibroblasts：PAFs）とした。健常者の歯肉組織からは、PAFsのようにコラーゲンを高度に分解する細胞群はこれまで分離されていないことから、PAFsは歯周炎の歯肉組織に特異的な病的変化を起こす細胞群であると考えられた。また、コラーゲンが高度に分解される現象は、歯肉上皮細胞と歯周炎患者の歯肉線維芽細胞の三次元共培養を行ったときにしか認められなかった。したがって、歯肉上皮細胞と歯周炎患者に由来する歯肉線維芽細胞を三次元共培養すると顕著なコラーゲン分解が生じる現象は、歯周炎由来の歯肉線維芽細胞に特異的であることから、歯周炎の分子病態の一部を再現する「生体外歯周炎モデル」として応用可能であると考えられた。

さらに、三次元共培養に用いたコラーゲングル中の細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、PAFs を含むゲルにおいて肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor : HGF) mRNA の発現が上昇することがわかった。したがって、HGF が歯周炎の病態形成に関与している可能性があるが、詳細は不明である。

そこで、本研究では HGF が歯周炎の病態形成に関与し、歯周炎の治療標的となりうるかを検証するため、抗ヒト HGF ポリクローナル中和抗体 (抗 HGF 中和抗体) をサルの歯周炎組織に投与し、その治療効果を検証した。また、ヒト生体外歯周炎モデルにおいても抗 HGF 中和抗体を作用させ、コラーゲン分解能や遺伝子発現への影響を検討した。

第 1 章では、歯周炎を自然発症したサルの歯肉組織に抗 HGF 中和抗体を投与し、その効果を検討し、さらに、サル生体外歯周炎モデルを用いて抗 HGF 中和抗体歯肉組織投与の影響を検証した。まず、歯周炎を自然発症したサルの歯肉にコラーゲンを顕著に分解する細胞群、PAFs が存在することを確認した。また、サルの歯肉線維芽細胞で構築した生体外歯周炎モデルへ抗 HGF 中和抗体を作用させたところコラーゲン分解を阻害した。そして、サルの歯周炎組織での抗体による HGF の中和は歯周炎を改善するのか検討した。サルの歯肉組織に抗 HGF 中和抗体を局所投与し、3 か月間経過観察したところ臨床的に歯周炎の改善がみられた。肉眼的観察終了後、歯肉組織を病理組織学的に解析した。その結果、抗 HGF 中和抗体を局所投与された歯肉では炎症性細胞浸潤の減弱がみられた。さらに、その歯肉組織から外生させた歯肉線維芽細胞を用いて三次元培養を行ったところ、抗 HGF 中和抗体を投与された歯肉線維芽細胞を包埋したコラーゲングルでは、コラーゲン分解が抑制されていた。以上のことから、抗 HGF 中和抗体は歯周治療薬として有効である可能性が示唆された。

第 2 章では、歯周炎患者由来の歯肉線維芽細胞を用いた三次元共培養、すなわちヒト生体外歯周炎モデルを用いて、コラーゲングル分解に対する抗 HGF 中和抗体の影響を解析した。さらにそのコラーゲングル中の細胞から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行

い、HGF を介した作用を阻害することを示す遺伝子発現プロファイルの変化を調べた。その結果、抗 HGF 中和抗体は、コラーゲン分解を抑制するとともに、細胞外マトリックス (Extracellular matrix : ECM) や細胞接着に関連する遺伝子群の発現変化を誘導した。このことから、歯周炎組織における HGF を介した作用の阻害は、コラーゲン分解の抑制だけでなく ECM 合成や細胞接着になんらかの影響を及ぼすことが明らかになった。

以上のことから、HGF は歯周炎の病態形成に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、抗 HGF 中和抗体を用いて HGF を介した作用を阻害することは、歯周治療の新たなアプローチとなる可能性が考えられた。

第 1 章

抗肝細胞増殖因子（抗 HGF）中和抗体の歯肉局所投与による

サル歯周炎の改善

緒言

歯周炎は世界人口の 50%が罹患していると推定されており、世界的な健康上の課題となっている [Kassebaum NJ et al., 2014; Petersen PE et al., 2012]。歯周炎はこれまで、単純な感染症と考えられてきたが、近年における広範な研究により、この認識は大きく変わってきている [Eke PI et al., 2012; Hajishengallis G et al., 2017; Loe H, 1993; Loe H et al., 1986; Williams RC, 2008; Hajishengallis G, 2014]。歯周炎の病態には、細菌感染が関与するだけでなく、宿主の病的な反応によって段階的に進行することが示唆されている [Williams RC, 2008]。歯周炎は組織レベルで異なる段階に分類され、進行期においては、慢性炎症が歯肉組織の破壊を引き起こしている [Hajishengallis G et al., 2014; Kornman KS et al., 1997]。進行期では、上皮細胞と線維芽細胞の相互作用のバランスが崩れ、正常な創傷治癒過程が損なわれた状態で歯肉組織のリモデリングが進み、歯肉溝に沿って上皮細胞の遊走が生じる。病的に活性化した線維芽細胞は、癌や線維性疾患における病態と同様に、歯周炎の病態においても重要な役割を担うと考えられている [Micke P et al., 2004]。このような線維芽細胞は、正常な線維芽細胞と比較して、細胞外マトリックス成分やタンパク質分解酵素の産生、成長因子やサイトカインの分泌を介して、歯周炎の病態に積極的に関与していると考えられる [Franco C et al., 2017; Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016]。

著者はこれまで、歯周炎の *in vitro* 実験モデルとして、歯肉線維芽細胞と歯肉上皮細胞をコラーゲンゲルで培養する三次元共培養システムを構築した [Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016; Horie M et al., 2016]。この実験モデルを用いて、歯周炎患者由来の歯肉線維芽細胞を分析したところ、コラーゲンゲルの分解を強く誘導する細胞集団があることを発見し、これを歯周炎関連線維芽細胞群 (Periodontitis-associated fibroblasts : PAFs) と定義した [Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016; Horie M et al., 2016]。PAFs は正常な歯肉線維芽細胞と比較して、コラーゲンの分解能力が著しく高いことがわ

かった [Ohshima M et al., 2016; Horie M et al., 2016]。さらにこの培養システムにおいてトランスクリプトーム解析を行ったところ、歯周炎患者由来の歯肉線維芽細胞を含むコラーゲンゲルでは、独特な遺伝子発現プロファイルが認められ、成長因子などのリガンドや受容体の発現上昇などの特徴が認められた。その中でも、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor : HGF) の発現量は多かった [Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016]。

HGF は細胞の増殖・運動・形態変化に関与する多機能性の成長因子 [Fajardo-Puerta AB et al., 2016] であり、創傷治癒や組織の再生において重要な役割を果たしていることが知られている [Chmielowiec J et al., 2007; Fukushima T et al., 2018]。HGF の受容体である c-MET は、上皮細胞に発現しているが、線維芽細胞を含む間葉系細胞にはほとんど発現していない。歯周炎患者の歯肉溝滲出液 (Gingival crevicular fluid : GCF) や唾液中の HGF は、健常者と比較して有意に高く [Anil S et al., 2014; Kakimoto K et al., 2002; Ohnishi T et al., 2003; Ohshima M et al., 2002]、歯周治療により GCF 中の HGF 濃度が低下することも報告されている [Nagaraja C et al., 2007]。さらに GCF 中の HGF レベルは、プロービング深さ (Probing depth : PD)、歯肉炎指数 (Gingival index : GI)、プロービング時出血 (Bleeding on probing : BOP)、骨吸収など、歯周炎の重症度を示す確立されたマーカーと相関する [Ohnishi T et al., 2003; Ohshima M et al., 2002; Suzuki S et al., 2020]。このように、HGF は歯周炎の進行に重要な役割を果たしていることが、実験的にも臨床的にも示唆されている。

そこで、本研究では歯周炎を自然発症したカニクイザルの歯肉に抗 HGF 中和抗体を投与し、その効果を検討した。さらに、サル生体外歯周炎モデルを用いて抗 HGF 中和抗体の影響を検討した。

材料および方法

1. 歯周炎サル歯肉からの PAFs の分離

サルの歯肉組織は、筑波霊長類医科学研究センターで飼育されていた、歯周炎に罹患したサル 4 頭（16 歳，22 歳，27 歳，37 歳）と歯周炎に罹患していないサル 2 頭（1 歳，2 歳）を用いた（表 1）。

サルの歯肉を摘出し、歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞を分離・培養した [Ohshima M et al., 1994; Ohshima M et al., 2008]。この細胞を用いて、既報のプロトコールにしたがい三次元共培養を行った [Ikebe D et al., 2007; Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016]（図 1）。ウシ胎仔血清（FBS; Hyclone, Logan, USA）0.5 mL に歯肉線維芽細胞を懸濁し（ 2.5×10^5 個），2.3 mL の I 型コラーゲンゾル Cellmatrix type I-A; Nitta Gelatin, Osaka, Japan），670 μ L の 5 \times Dulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM; Nitta Gelatin），330 μ L の再構成試薬（Nitta Gelatin）の混合溶液（3 mL）を 6 ウェルプレートの各ウェルに入れ、37°C のインキュベーター内でゲル化させた（図 1A）。さらにサプリメント S7 添加 EpiLife[®]（Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA）培地 2 mL に懸濁した 2.5×10^5 個の歯肉上皮細胞を各ゲルの表面に播種した（図 1B）。翌日、各ウェルからゲルを剥がして培地中に浮遊させて 5 日間培養した（図 1C）。細胞群はコラーゲンゲルサイズの縮小程度によって PAFs, non-PAFs, 中間の intermediate とした（図 1D）。さらに、上皮細胞を重層化させるためにゲルの上面を空気に曝露させ、さらに 5 日間培養したのち（図 1E）、中性緩衝ホルマリン液で固定し（図 1F）、パラフィンに包埋した。ゲルの縦断面をヘマトキシリン・エオジン（HE）で染色し組織学的に観察した。

2. サル生体外歯周炎モデルに対する HGF リコンビナント蛋白および抗 HGF 中和抗体の効果

PAFs の同定で得られた細胞を用いてサル生体外歯周炎モデルを構築した。このモデル

に正常ヤギコントロール IgG (20 µg/mL, AB-108-C, R&D Systems, Waltham, USA), ヒト HGF リコンビナント蛋白 (50 ng/mL, Peprotech, Cranbury, USA), または抗 HGF 中和抗体 (20 µg/mL, AF-294NA, R&D Systems) で処理した。培養したコラーゲンゲルの最終的なサイズによってコラーゲン分解の度合いを評価した。

3. サル歯周炎に対する抗 HGF 中和抗体の局所投与

歯周炎を自然発症したサル 4 頭を筑波霊長類医科学研究センターの繁殖コロニーから選択した。2 頭のサルをパイロット試験の対象とし、抗体の投与量と観察期間を決定した。さらに、2 頭は治療効果の評価試験に用いた (表 2)。飼育室は、1 日 12 時間点灯し、温度は約 25±2°C、湿度は約 60 % に設定されている。また、食餌は果物 (200 g) と CMK-2 モンキー・チョー (70 g, CLEA Japan, Tokyo, Japan) が与えられ、水は自由摂取とした。

サルに 5-10 mg/kg の ketamine (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan), 0.1 mg/kg の xylazine (Rompun, Bayer Japan, Osaka, Japan), 0.01 mg/kg の atropine (Mitsubishi Tanabe Pharma, Osaka, Japan) を筋肉注射し麻酔した。そして、PD (頬側部 3 点) と BOP を記録した。PD 4 mm 以上の部位が少なくとも 1 か所存在する歯肉にリン酸緩衝液で希釈した 100 µL (200 µg/mL) の抗 HGF 中和抗体を、選択歯の歯間部の歯肉頰移行部に注射した。抗体の投与は上下顎 1 か所のみに行い、反対側は未処置とした。抗体投与は 1 回のみ、抗体投与後、同一検査者による歯周検査を行い、1, 2, 4, 8 および 13 週目に投与部位の写真撮影をした。実験期間中、口腔衛生状態の変化による治療効果への影響を避けるため、歯垢や歯石除去は行わなかった。観察期間終了後、抗体投与部位と未投与部位の歯肉を切除し、HE 染色を行い組織学的に観察した。さらに、2. と同様の方法を用いて、生体外歯周炎モデルを作製し、抗体処理した歯肉と未処理の歯肉の線維芽細胞を含むゲルを HE 染色して観察した。

4. 倫理承認

本研究は筑波霊長類医科学研究センターの動物管理ガイドライン、日本霊長類学会が策

定した「ヒト以外の霊長類を用いた動物実験に関する指針」[Honjo S, 1985], および「実験動物の飼育と使用の手引き」[Ilar C, 2011] に従って実施した。また, 本研究は独立行政法人医薬基盤研究所の動物福祉・動物飼育委員会の承認も得ている (承認番号 DS30-1)。

結果

1. 歯周炎サル歯肉組織からの PAFs の同定

サル歯周炎組織からコラーゲン分解能が高い歯肉線維芽細胞集団 PAFs が分離できた (図 2A, 左)。また, コラーゲン分解能が健常由来の歯肉線維芽細胞と同程度の細胞集団 non-PAFs も分離された (図 2A, 右)。PAFs を含むコラーゲングルでは, 歯肉線維芽細胞周囲に空胞が多数観察された (図 2B)。一方, non-PAFs を含むコラーゲングルでは空胞の形成はみられなかった (図 2C)。PAFs は歯周炎が発症した歯肉組織からは分離・培養できたが, 歯周炎が発症していない歯肉組織からは確認できなかった。PAFs を含む三次元培養法をサル生体外歯周炎モデルとした。

2. サル生体外歯周炎モデルに対するヒト HGF リコンビナント蛋白と抗 HGF 中和抗体の影響

サル生体外歯周炎モデルにヒト HGF リコンビナント蛋白を添加すると, コントロール IgG を添加したコラーゲングル (図 2D, 左) と同程度のコラーゲン分解がみられた (図 2D, 中)。さらに, 抗 HGF 中和抗体を添加すると, PAFs によるコラーゲン分解が明らかに抑制された (図 3D, 右)。また, コントロール IgG や HGF で処理したゲル (図 2E, 左および中) では空胞の形成がみられたが, 抗 HGF 中和抗体で処理したゲルでは空胞がみられなかった (図 2E, 右)。

3. サル歯周炎への抗 HGF 中和抗体の局所投与による効果

はじめにサル 2 頭を用い, 抗 HGF 中和抗体投与部位, 投与量などを検討した。その結果, 投与 1 週間後の診査では, 潰瘍・腫脹その他の局所反応は観察されなかった。また, 全身への副作用も認められなかった。そこで, さらにサル 2 頭を追加して抗 HGF 中和抗体の歯周組織投与を実施した。実験期間中 4 頭のサルの体重・食欲に変化はみられなかった。抗体投与後 13 週の投与側では, 抗体投与時点で BOP が陽性であった 9 か所のうち 8 か所で陰性となったのに対し, 未投与部位では BOP に変化がみられなかった。PD は投与

側では 12 か所中 5 か所で減少したが，未投与側では，ほとんど減少しなかった（図 3）。

4. 組織学的観察および三次元培養による観察

抗体投与部位と未投与部位の歯肉組織像を図 4A に示す。未投与部位ではリンパ球浸潤が顕著であった。対照的に，炎症細胞浸潤は抗体投与部では減弱し，歯肉上皮下領域に局所的に存在するのみであった。さらに，*ex vivo*での機能解析として，初代培養の歯肉線維芽細胞を用いた三次元共培養実験を行った。抗体投与部位由来の歯肉線維芽細胞を用いた場合には，未投与部位由来の歯肉線維芽細胞と比較して，ゲルのサイズが大きく，コラーゲン分解能が低下していた。一方，未投与部位由来の歯肉線維芽細胞を用いたコラーゲンゲルでは空胞形成がみられたことから，コラーゲン分解能は変化していないことが確認された（図 4B）。

考察

本研究は、歯周炎に対する抗体治療の効果を検討した初めての前臨床研究である。著者は *in vitro* での歯周炎の実験モデルを用いて、HGF を介した作用が治療標的となることを示し、さらに中和抗体によって HGF を介した作用を阻害する治療法が歯周炎を自然発症したサルの歯周炎の改善につながる可能性を示した。サルの口腔内や歯の構造はヒトに類似している。ヒトと同様にプラークを形成し、口腔内細菌叢も類似し、歯周炎を自然発症することから、ヒトの歯周治療の研究において、有用な動物モデルと考えられる [Schou S et al., 1993]。したがって本研究で得られた知見は、臨床的に意義が高いと思われる。

本研究で用いた、歯周炎患者由来の歯肉線維芽細胞と歯肉上皮細胞をコラーゲンゲルで三次元共培養する *in vitro* の歯周炎モデルでは、HGF mRNA レベルの上昇が、コラーゲンゲルの分解と関連していた [Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016]。血清中の HGF 濃度と歯周炎の関連性を示す報告 [Lonn J et al., 2011] や HGF が破骨細胞の分化と活性化を刺激するとの報告もある [Knowles HJ et al., 2009]。つまり、HGF は歯周炎の病態を反映する疾患マーカーとしてだけでなく、歯周炎の病態形成に関与する可能性が示されている。本研究の結果は、これらの報告を支持すると考えられる。

HGF を標的とする治療戦略は、Golub らによって確立された「ホストモデュレーション療法」の概念に合致する [Golub LM et al., 1994; Golub LM et al., 1998; Golub LM et al., 2020]。すなわち、細菌感染の除去などの外来物質を標的とするのではなく、宿主反応に介入することによって治療効果を得るという考え方である。このような治療法には、非ステロイド性炎症薬、低用量テトラサイクリンによるコラーゲン分解の調節、緑茶やビタミン剤の補充などがある [Williams RC, 2008; Kaboosaya B et al., 2020; Shadisvaaran S et al., 2021; Kwon T et al., 2021]。本研究で用いた抗 HGF 中和抗体による治療は、病的変化を起こした歯周炎組織の微小環境を改善することから、ホストモデュレーション療法に基づく治療手段の候補となるのではないかと考えられる。

HGF の受容体である c-MET は上皮細胞に発現するが歯肉線維芽細胞ではほとんど発現していない。したがって、歯周炎組織における HGF 作用の阻害は、上皮細胞を介して歯肉線維芽細胞のコラーゲン分解を抑制している可能性がある。

抗 HGF 中和抗体投与によりサル歯周炎の改善がみられたことは今後の歯周治療法の開発に有益であると思われる。すでにさまざまな癌種に対して、ヒト HGF に対する完全ヒト型 IgG 2 モノクローナル抗体の Rilotumumab を用いた第 II 相臨床試験が行われている [Catenacci DVT et al., 2017; Glisson B et al., 2017]。したがって、抗 HGF 中和抗体を用いた歯周治療が臨床応用できる可能性があり、さらなる研究の蓄積が望ましいと思われる。

表 1：歯周炎サル歯肉からの PAFs 同定に用いたサル群

ID	性別	年齢	歯肉組織から分離した細胞集団のうち PAFs とされた割合
1421607074	雄	1	0 of 1
1521510025	雄	2	0 of 4
1310006043	雌	16	1 of 10
1219502018	雌	22	2 of 4
1228905051	雄	27	2 of 3
1117912152	雌	37	1 of 3

表 2：抗 HGF 中和抗体の局所投与のパイロット試験および評価試験に用いたサル群

	ID	性別	年齢	体重 (kg)		歯周炎の重症度
				投与日 (日付)	投与後 (日付)	
パイロット試験	1219002026	雌	28	2.99 (2018.05.29)	3.43 (2019.08.23)	Moderate
	1228907071	雄	27	5.60 (2018.05.29)	5.99 (2018.09.03)	Moderate
評価試験	1118803018	雌	30	3.12 (2018.10.25)	3.00 (2019.02.04)	Severe
	1219110208	雌	26	4.60 (2018.10.25)	4.40 (2019.02.04)	Severe

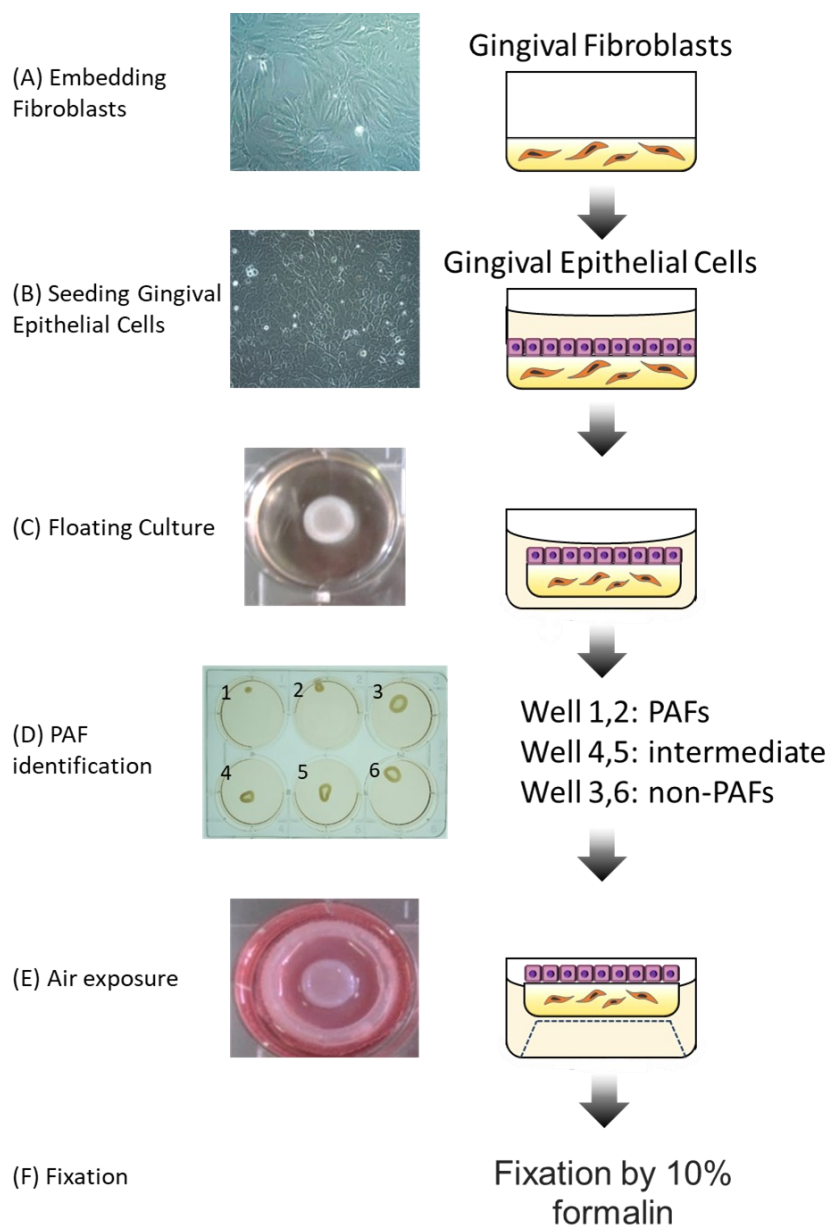


図1：三次元培養および PAFs の分離法

(A) 歯肉線維芽細胞と I 型コラーゲンゲルの混合 (B) 歯肉上皮細胞の播種 (C) 浮遊培養 (D) PAFs の分離 (E) ゲル上面の空気曝露 (F) 中性緩衝ホルマリン固定

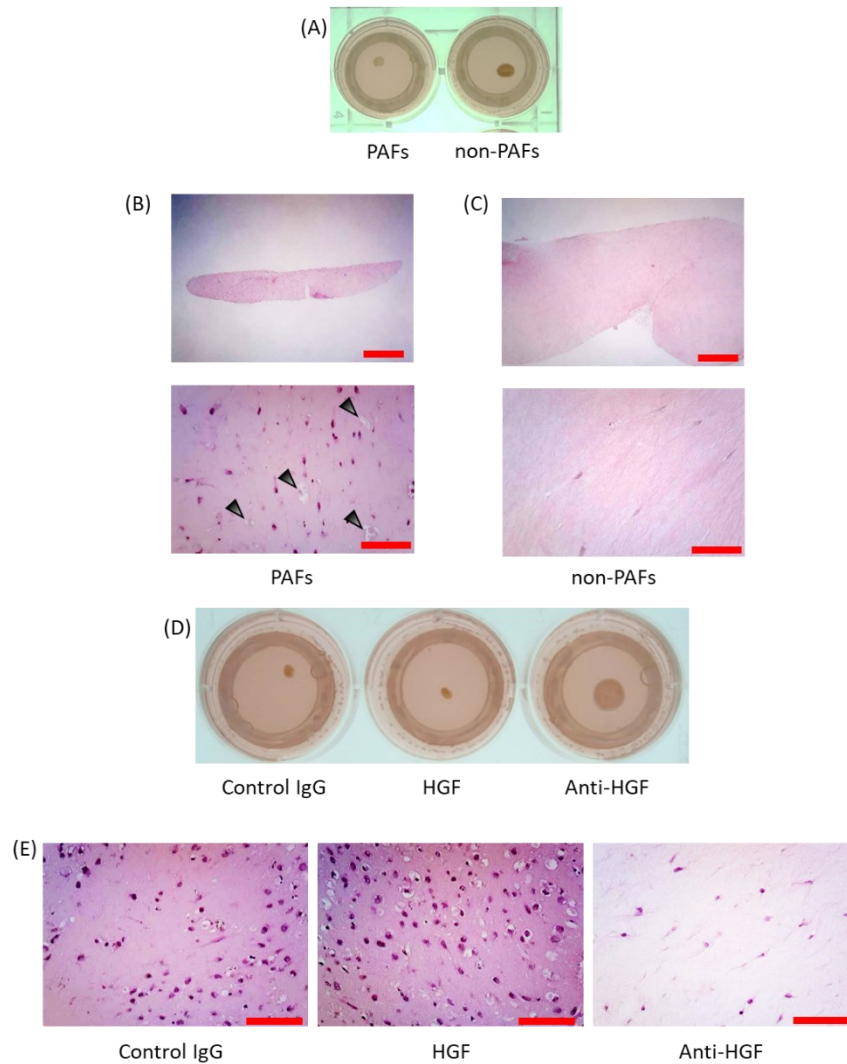


図 2：サル歯肉組織から得られた初代培養細胞を用いた三次元培養法

(A) PAFs 同定，コラーゲン分解能が高い歯肉線維芽細胞 PAFs (左)；コラーゲン分解が正常細胞と同程度の線維芽細胞 non-PAFs (右)

(B) PAFs の HE 染色標本，矢頭：コラーゲン分解による空胞

(C) non-PAFs の HE 染色標本

(D) コントロール IgG，ヒト HGF リコンビナント蛋白，抗ヒト HGF 中和抗体添加ゲル

(E) コントロール IgG，ヒト HGF リコンビナント蛋白，抗 HGF 中和抗体添加ゲルの HE 標本。

B,C 上段のスケールバー：200 μm ，B,C 下段および E のスケールバー：25 μm 。

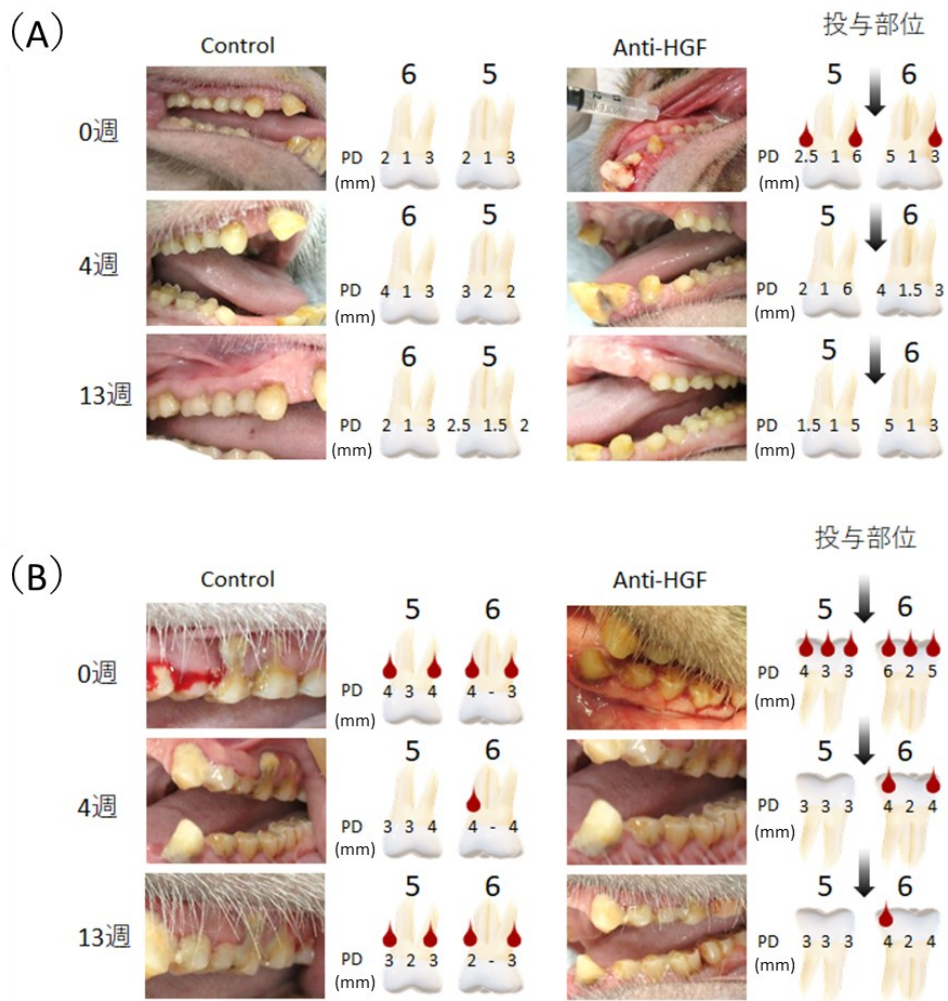


図 3：サル歯周炎に対する抗 HGF 中和抗体の投与
 歯周炎を自然発症した雌サル (A) と雌サル (B) の抗 HGF 中和抗体投与後 0, 4, 13 週目の投与側および未投与側の口腔内写真。矢印：注入部位，水滴マーク：BOP 陽性部位。

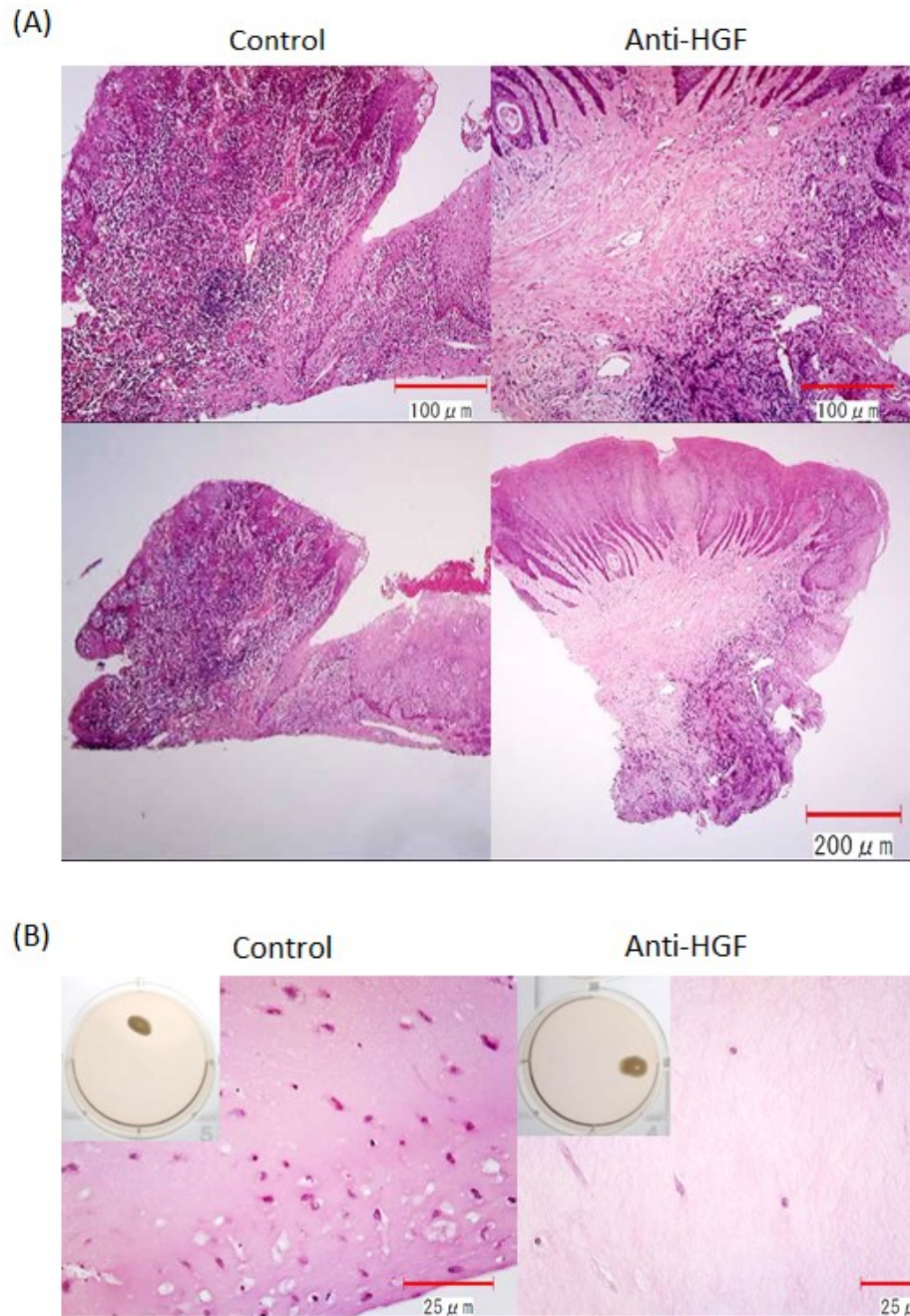


図 4：抗 HGF 中和抗体投与後の歯肉組織

(A) 歯肉組織の H E 染色像。未投与側 (左), 抗体投与側 (右)

(B) 三次元培養ゲルの H E 染色像。未投与側 (左), 抗体投与側 (右)

第 2 章

ヒト歯周炎生体外モデルへの抗 HGF 中和抗体の効果

緒言

歯周炎は、歯を支える組織の喪失を伴う慢性炎症である [Holtfreter B et al., 2015; Nascimento GG et al., 2020]。歯周炎は、口腔内細菌叢の変化 [Deng ZL et al., 2017; Ikeda E et al., 2020; Buonavoglia A et al., 2013; Rams TE et al., 2015] や、様々な要因の影響を受ける宿主反応が関与している [Song IS et al., 2016; Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016; Hajishengallis G et al., 2017; Shi T et al., 2020]。さらに、全身疾患 [Smirani R et al., 2018; Kim J Amar S, 2006] や遺伝子多型 [Slebioda Z et al., 2021; Suzuki A et al., 2004; Ikuta T et al., 2015] は、歯周炎のリスクと相関していることが報告されている。歯と歯肉の間に位置する歯肉結合組織の ECM の分解は、歯周炎の病理学的プロセスを進行させる要因となる [Ohshima M et al., 2016; Franco C et al., 2017; Horie M et al., 2016; Li W et al., 2016; Romero-Castro NS et al., 2020]。

著者は歯周炎の生体外歯周炎モデルを作製するために、歯肉線維芽細胞をコラーゲンゲル中に包埋し、その上面に歯肉上皮細胞を播種し、三次元共培養系を構築した。この培養システムでは、歯肉結合組織における歯肉線維芽細胞と歯肉上皮細胞の相互作用を再現することができる。さらに、培養の過程でみられるコラーゲンゲルの分解は、歯周炎患者における歯と歯肉との付着喪失、すなわちアタッチメント・ロスを模倣する実験モデルになると考えた。

HGF は歯周炎患者の唾液や GCF 中に豊富に含まれており、歯周炎の病態形成への関与が示唆されている [Anil S et al., 2014; Nagaraja C et al., 2007]。GCF 中の HGF 濃度は、歯周炎の指標となる PD, GI, BOP, 骨吸収など、歯周炎の重症度を示す確立されたマーカーと相関している [Nagaraja C et al., 2007; Ohnishi T et al., 2003; Ohshima M et al., 2001; Ohshima M et al., 2002]。さらに、歯周治療後に、GCF 中の HGF 濃度が低下する報告もある [Nagaraja C et al, 2007]。つまり、HGF は診断マーカーとしてだけでなく、疾患の進行や治療効果を示すサロゲートマーカーとしても有用である可能性もある。

これまで PAFs は正常な歯肉線維芽細胞と比較して、コラーゲンの分解能力が著しく高いことが明らかにされている [Ohshima M et al., 2016; Horie M et al., 2016]。さらに、網羅的な遺伝子発現プロファイリングにより、PAFs を含むコラーゲンゲルで発現上昇を示す 22 個の遺伝子を同定した先行研究において、HGF は明らかに高い発現を示しており、歯周炎の実験モデルにおいても HGF が結合組織のコラーゲン分解を促進する役割を有している可能性が示唆される [Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016; Horie M et al., 2016]。

そこで、本研究では、歯周炎患者由来の歯肉線維芽細胞を用いた三次元共培養、すなわちヒト生体外歯周炎モデルを用いた抗 HGF 中和抗体がコラーゲン分解に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

歯周炎患者の歯肉組織から、歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞を分離した [Ohshima M et al., 2010]。摘出した歯肉組織を小片に切り、6 ウェルプレートに入れ、組織片から外生してくる細胞を、歯肉線維芽細胞として回収した。各ウェルから得られた歯肉線維芽細胞は、各々1つの細胞集団として保存した。細胞は10% FBSと1% ペニシリン/ストレプトマイシン/ネオマイシン (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を添加した α -Minimum Essential Medium 培地 (Wako, Osaka, Japan) で培養した。歯肉上皮細胞は、増殖添加剤 S7 を添加したカルシウム入り EpiLife® 培地を用い、I型コラーゲンをコートしたフラスコ (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) で培養した。7~15回、継代をくり返した細胞を実験に使用した。

ドナーである歯周炎患者の情報は表3に示した。初代培養細胞に用いた歯肉組織は、日本大学歯学部附属歯科病院および東京医科歯科大学病院歯科 (歯系診療部門) 歯周病科において、歯周外科手術時に採取したものである。歯周病患者からのサンプル採取のプロトコールは、奥羽大学 (第59号)、日本大学歯学部 (倫許2013-1, EP18D018)、東京医科歯科大学歯学部 (D2013-057-01) の倫理委員会で承認されており、全てのドナーから、書面によるインフォームド・コンセントを得た。本研究は、世界医師会の倫理規定 (ヘルシンキ宣言) に基づいて実施された。

2. コラーゲンゲル共培養アッセイ

生体外歯周炎モデルとして、既報のプロトコールにしたがって、歯肉上皮細胞と PAFs の三次元共培養を行った [Ikebe D et al., 2007; Ohshima M et al., 2010; Ohshima M., 2016]。0.5 mL の FBS に歯肉線維芽細胞を懸濁し (2.5×10^5 個)、2.3 mL の I 型コラーゲンゾル (Cellmatrix type I-A; Nitta Gelatin, Osaka, Japan)、670 μ L の 5 \times DMEM、330 μ L の再構成試薬 (Nitta Gelatin) の混合溶液 (3 mL) を 6 ウェルプレートの各ウェルに入れ、

37°Cのインキュベーター内でゲル化させた。さらに S7 添加 EpiLife®培地 2 mL に懸濁した 2.5×10^5 個の歯肉上皮細胞を各ゲルの表面に播種した。翌日、各ウェルからゲルを剥がして浮遊培養とし、ゲルを培地中に 5 日間おいた。さらに 5 日間、ゲルの表面を空気に曝露させた状態で培養した。培養終了後、ゲルを中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィンに包埋した。縦断面を HE で染色した。

HGF の効果を検討するため、コラーゲンゲルに 0, 25, 50 ng/mL のヒト HGF リコンビナント蛋白 (#100-39, Peprotech, Crnbury, USA) または 0, 2, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヤギポリクローナル抗ヒト HGF 中和抗体 (AB-294-NA, R&D Systems, Minneapolis, USA) を添加した。抗 HGF 中和抗体のコントロールとしては、同じ濃度の正常ヤギポリクローナル IgG (AB-108-C, R&D Systems) を用いた。

3. コラーゲンアッセイ

ゲルを秤量してマイクロチューブに入れ、蒸留水を加えて総重量 1.0 g とした。その後、チューブを 80 °C で 1 時間加熱してコラーゲンを溶解した。この溶液を用いて Sircol™ Soluble Collagen Assay (Biocolor, Carrickfergus, UK) により、ゲル中に残存するコラーゲンの総量を算出した [Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016]。

4. マイクロアレイ解析

抗 HGF 中和抗体またはコントロール IgG で処理したのち、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、コラーゲンゲルからトータル RNA を抽出した。RNA サンプルは Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Wilmington, USA) で RNA の品質 (A260/A280 比: 1.8~2.1, RNA Integrity Number: 7.0 以上) を確認した。遺伝子発現プロファイルは、マイクロアレイ (Affymetrix GeneChip™, Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, USA) を用いて解析した。独立した 3 つの細胞培養実験において、正規化した値の倍数変化が 0.67 以下または 1.5 以上を示した遺伝子を比較解析に用いた。

5. 定量的 PCR

マイクロアレイ解析で得られた遺伝子発現変化を解析するため、定量的 PCR を実施した。トータル RNA は、Trizol 試薬 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いて抽出した。cDNA は、PrimerScript RT reagent kit (Takara, Kusatsu, Japan) を用いて抽出した。SYBR Green (SYBR Premix Ex Taq II, Takara) と PCR サーマルサイクラー (TP900, Takara) を用いて PCR を行い、mRNA レベルでの遺伝子発現を定量した。mRNA の相対的な発現量は、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて算出した。さらにグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : GAPDH) の発現レベルで正規化した。使用したプライマー配列を表 4 に示す。

6. 統計解析

データは平均値 + 標準偏差で表す。Kolmogorov-Smirnoff Test を行い正規性が確認できたことから、Welch's t-test を行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

結果

1. リコンビナント HGF 蛋白または抗 HGF 中和抗体のコラーゲン分解に対する影響

リコンビナント HGF 蛋白を異なる濃度 (0, 25, 50 ng/ml) で作用させ、コラーゲン分解への影響を検討した。50 ng/ml の HGF を作用させたゲルの大きさはこれを作用させないゲルよりも小さく、コラーゲン分解能が高くなっている可能性が考えられた (図 5A)。次に抗 HGF 中和抗体を異なる濃度 (2, 10, 20 µg/ml) で作用させた。抗 HGF 中和抗体は濃度依存的にコラーゲン分解を減弱させ (図 5B)、異なる 6 名の歯周炎患者に由来する PAFs において、コントロールに比較して、抗 HGF 中和抗体の処理によって残存するコラーゲン量が有意に多かった (図 5C)。

2. コラーゲングル内の空胞化に対する抗 HGF 中和抗体の影響

コントロール IgG および抗 HGF 中和抗体作用においてもゲル内の細胞周囲に空胞 (図 6) はみられた。しかし、3次元培養ではゲル内の細胞は増殖しないことから、細胞周囲に空胞を有する細胞数を計測した結果、その細胞の割合は、コントロールと比べて、抗 HGF 中和抗体で処理したゲルで約 1/3 に減少した。

3. 抗 HGF 中和抗体で処理したコラーゲングルにおける遺伝子発現プロファイリング

コントロール IgG または抗 HGF 中和抗体 (10 µg/mL) 処理による遺伝子発現の変化を解析した。異なる 3 名の歯周病患者に由来する PAFs を含むコラーゲングルから RNA を抽出し、さらにマイクロアレイ解析を行い、抗 HGF 中和抗体の処理によって共通して発現上昇あるいは発現低下を示す転写産物を同定した。その結果、抗 HGF 中和抗体の処理に伴い発現量が減少した転写産物は 11 個、発現量が増加した転写産物は 23 個であった (図 7)。これらの転写産物からは、それぞれ 10 個と 21 個の遺伝子に対応させることができた。

4. 抗 HGF 中和抗体による遺伝子発現変化 (定量的リアルタイム PCR)

発現上昇を示す遺伝子として BOC cell adhesion associated, oncogene regulated (BOC), 発現低下を示す遺伝子として laminin subunit alpha (LAMA3), WAP four-disulfide core domain 5 (WFDC5) の発現変化を, 4 つの異なるサンプルを用いた定量的 PCR 法で検討したところ, マイクロアレイ解析で確認された発現変化と同じ傾向が確認できた (図 8)。これらの結果から, HGF を介した作用の阻害により, コラーゲン分解が抑制されるだけでなく, 複数の遺伝子群の発現変化が誘導されることがわかった。

考察

歯周炎の分子病態の解明、および効果的な治療の開発は、臨床上の大きな課題である。著者はこれまでの研究で、PAFs が歯周炎の病態に重要な役割を果たしていることを示唆する実験結果を得てきた。すなわち、*in vitro* での歯周炎実験モデルにおいて、PAFs がコラーゲンを分解する能力が高く、正常な歯肉線維芽細胞を用いた場合にはそのような効果がみられないという現象である [Ohshima M et al., 2010; Ohshima M et al., 2016; Horie M et al., 2016]。コラーゲン分解は歯肉組織の破壊に関連する現象であると考えられ、この現象に関与している分子シグナルを標的とすることは、歯周炎に対する新たな治療戦略となる。

HGF とその受容体である c-MET を介したシグナルが、臓器の線維化や腫瘍の進行など、様々な疾患において重要な役割を担うことは、これまでの研究により明らかになっている [Blumenschein GR et al., 2012]。歯周炎患者では、唾液中の HGF 濃度と歯槽骨の減少との間に有意な関連性があることが報告されている [Scannapieco FA et al., 2007]。著者や他の研究グループは、歯周炎患者の GCF においても HGF 濃度が上昇していることを報告している [Ohshima M et al., 2001; Ohshima M et al., 2002; Kakimoto K et al., 2002; Nagaraja C et al., 2007]。さらに、PAFs を用いた生体外歯周炎モデルでも HGF 遺伝子の発現上昇が明らかになっており [Ohshima M et al. 2010; Ohshima M et al., 2016]、PAFs における HGF の発現上昇が、歯周炎患者の唾液や GCF 中の HGF 濃度の上昇に寄与していることが示唆されている。

本研究では、中和抗体を用いて HGF を介した作用を阻害することで、三次元共培養におけるコラーゲン分解が抑制されることが明らかになり、HGF を介した作用阻害が歯周炎の治療に有効である可能性が示唆された。すなわち、歯肉上皮細胞と PAFs を用いた生体外歯周炎モデルにおいて、HGF を分子標的とする歯周炎の治療戦略の可能性が示された。

これまでの報告における歯周炎の *in vitro* 実験モデル [Liu X et al., 2018; Issarangun B et

al., 2017]とは異なり、本研究では歯周炎患者に由来する歯肉線維芽細胞を用いており、コラーゲン分解を歯周炎の程度の指標とした。この三次元共培養システムは、歯肉組織における上皮細胞と線維芽細胞の細胞間相互作用を、より生体に近い状態で再現していると考えられる。

中和抗体を用いた HGF の作用阻害によりコラーゲン分解が抑制されたことから、HGF が ECM のターンオーバーに関与していることが示唆された。抗 HGF 中和抗体を投与するとコラーゲンゲル中の歯肉線維芽細胞の周囲にみられる空胞が減少しており、この現象はコラーゲン分解の抑制と関連していると推測された。歯肉線維芽細胞には c-MET の発現が乏しいことから、抗 HGF 中和抗体の投与により、まず歯肉上皮細胞において HGF を介した作用が阻害され、さらに歯肉上皮細胞を介した歯肉線維芽細胞の活性化に影響がおよぶものと考えられる。著者は過去の報告において、Transforming Growth Factor- β (TGF- β)の I 型受容体キナーゼ阻害剤が、生体外歯周炎モデルにおいてコラーゲン分解を効果的に阻害することを明らかにしている [Ohshima M et al., 2010]。したがって TGF- β シグナルが歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞の相互作用に関与している可能性がある。

本研究では、抗 HGF 中和抗体処理後の三次元共培養コラーゲンゲルの遺伝子発現変化を調べた。その結果、様々な遺伝子が抗 HGF 中和抗体処理によって上昇または低下した。3 つの比較群に共通して発現が変化する遺伝子群のうち、いくつかの遺伝子は、抗 HGF 治療の重要な効果に介在している可能性が考えられた。発現上昇した遺伝子群からは、インテグリンと結合し、細胞と ECM の相互作用に影響を与える Cysteine-rich angiogenic inducer 61 / CCN family member 1 (CYR61/CCN1) [Kim KH et al., 2018], アポトーシスの制御に関与する Bcl-2-associated X protein (BAX) [Fletcher JI and Huang DC, 2008], 免疫グロブリン/フィブロネクチン III 型リピートファミリーのメンバーであり細胞間相互作用に影響を与える BOC [Sanchez-Arrones L et al., 2012] が同定された。発現低下した遺伝子では、ECM の相互作用に関与する ANTXR2 と LAMA3 が同定された [Sergeeva

OA and van der Goot FG, 2019; Li Y et al., 2020]。さらにロイコトリエン B4 受容体数も減少しており，HGF が炎症応答に影響を及ぼしている可能性が示唆された [Saeki K and Yokomizo T, 2017; Paula-Silva FWG et al., 2020]。

本研究で同定された遺伝子の明確な役割や，歯周炎における組織リモデリングへの影響については，さらなる検討が必要である。歯肉上皮細胞と線維芽細胞の相互作用には，いくつかのシグナル経路が関与していると考えられるが，HGF の具体的役割や他のシグナル経路との関連性については詳細を明らかにできなかった。本研究で活用した生体外歯周炎モデルで検討できるのは歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞の相互作用のみで，炎症細胞による影響は検討できていない。すなわち，生体内における複雑な細胞間相互作用の一部分しか確認できていないことは注意すべきである。さらに，歯周炎には多くの臨床的表現型があり，著者のモデルでは歯周炎の重症度に応じた表現型の相違までは検討できていない。このように，歯周炎の重症度や炎症応答に関連した表現型の違いは，今後の研究において重要な課題となるだろう。さらに，HGF の作用を阻害した後の，遺伝子発現の時系列的な変化を分析することで，HGF シグナルに関連した歯肉線維芽細胞の表現型の変化を，より詳細に明らかにできる可能性がある。

本研究から，歯周炎に伴う組織リモデリングには HGF が関与していることが考えられ，将来的に抗 HGF 中和抗体などの HGF を標的とするアプローチが，新たな歯周治療薬の開発につながる可能性が示唆された。

表 3 : 実験に使用した初代培養細胞

PAFs	重症度	性別	年齢	図 1 A	図 1B	図 1C	図 2	図 3	図 4
#1	重症	女性	27			使用			使用
#2	重症	女性	65	使用		使用			
#3	重症	男性	49			使用			
#4	重症	男性	58		使用	使用			
#5	重症	男性	38			使用	使用		使用
#6	重症	女性	59			使用		使用	
#7	重症	男性	50				使用		
#8	重症	男性	58					使用	使用
#9	重症	男性	59					使用	使用

表 4 : 実験に使用したプライマー

	Primer sequence	
BOC	Forward	TGACATCACGAGTTCACGATACC
	Reverse	GTGGCTGACATGCTTGAATCC
GAPDH	Forward	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG
	Reverse	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
LAMA3	Forward	CACCGGGATATTTTCGGGAATC
	Reverse	AGCTGTCGCAATCATCACATT
WFDC5	Forward	GACAGCCAGTGTCCCTTGAC
	Reverse	GCATCGCTTTTTGCCCGAG

BOC : BOC cell adhesion associated, oncogene regulated

LAMA3 : laminin subunit alpha3

WFDC5 : WAP four-disulfide core domain 5

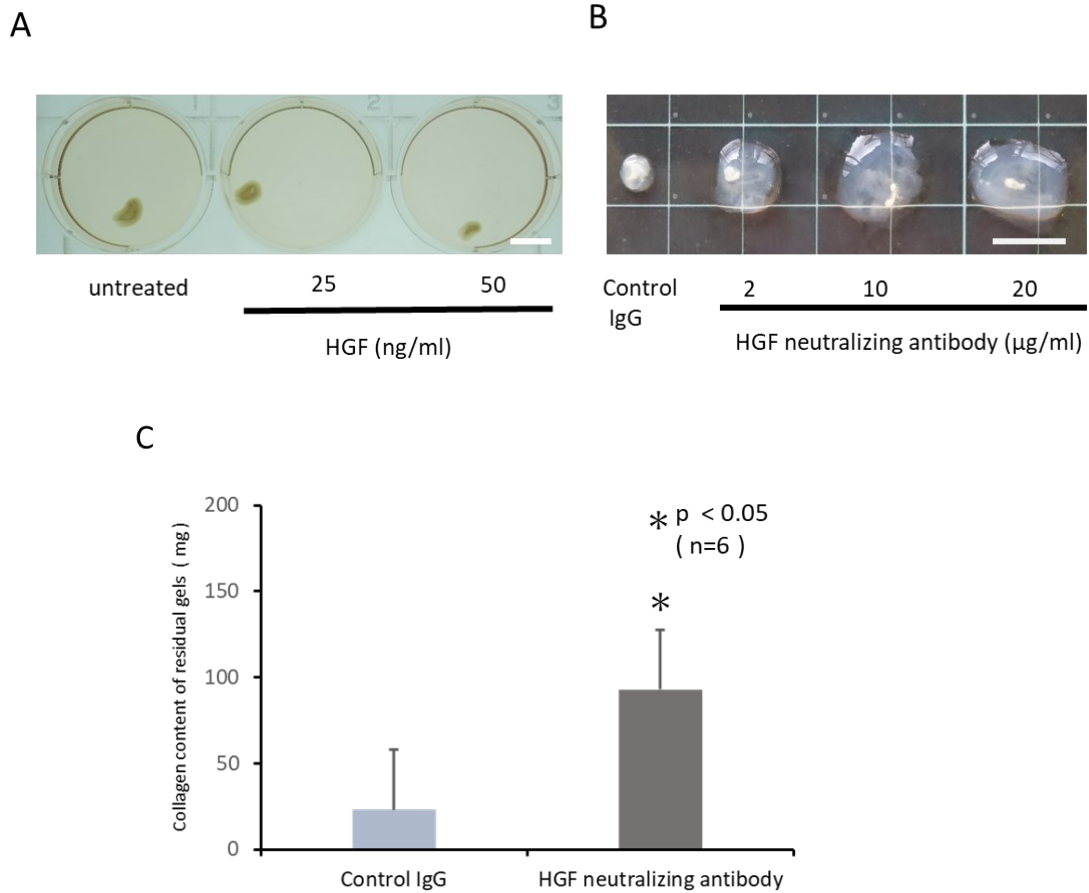


図5：リコンビナント HGF 蛋白または抗 HGF 中和抗体のコラーゲン分解に対する影響

(A) コラーゲンゲル分解に対する HGF リコンビナント蛋白 (25, 50 ng/mL) の効果

(B) コラーゲン分解に対するコントロール IgG (20 µg/mL) または抗 HGF 中和抗体 (2, 10, 20 µg/mL) の効果 スケールバー：1cm。

(C) 6 人の異なる歯周炎患者由来の PAFs を含む三次元共培養コラーゲンゲルの残存コラーゲン量。10 µg/mL の抗 HGF 中和抗体を使用した。p=0.011, Welch's t-test。

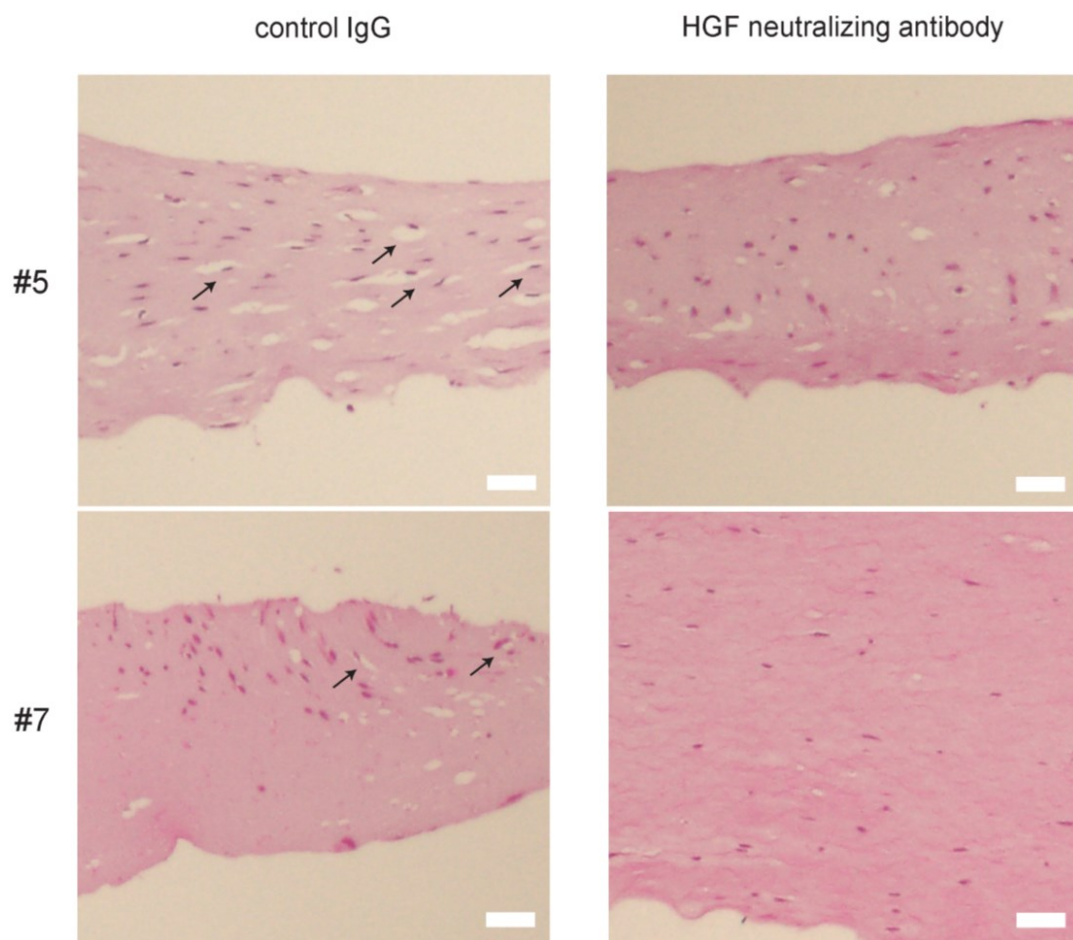
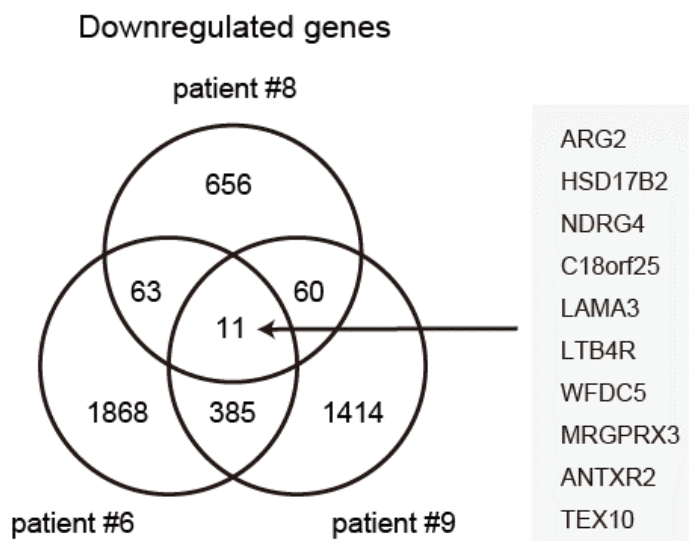


図6：コラーゲンゲル内の空胞化に対する抗 HGF 中和抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の影響
矢印：空胞, スケールバー：50 μm 。

A



B

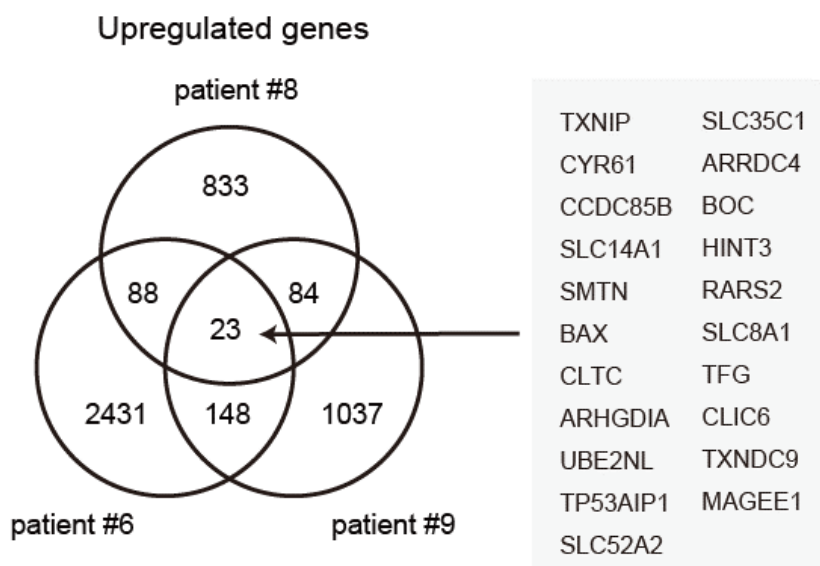


図7：抗 HGF 中和抗体で処理したコラーゲンゲルにおける遺伝子発現プロファイリング

- (A) 抗 HGF 中和抗体によって発現低下した遺伝子
- (B) 抗 HGF 中和抗体によって発現上昇した遺伝子

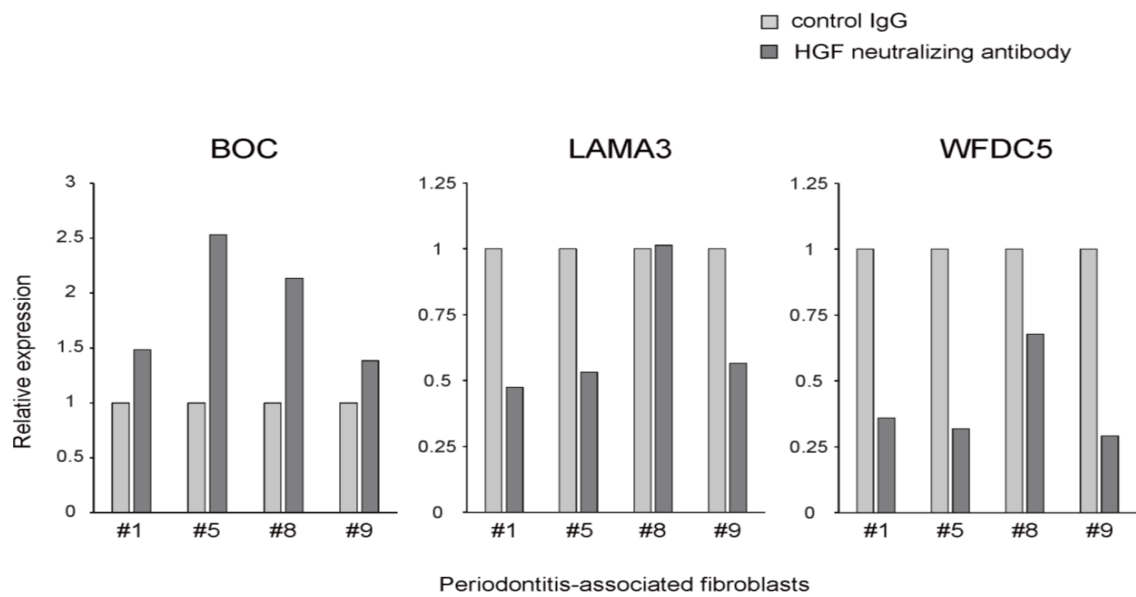


図8：抗 HGF 中和抗体による遺伝子発現変化（定量的リアルタイム PCR）

総括

本研究では、歯周炎の病態における HGF の機能的意義や、HGF をターゲットとした歯周治療薬の可能性について検討した。

第 1 章では、歯周炎を自然発症したサルを用いて、抗 HGF 中和抗体の影響を検討した。歯周炎を自然発症したサルにおいて、抗ヒト HGF 中和抗体を歯肉頬移行部に局所投与し、3 か月間経過観察を行ったところ、歯周炎の改善がみられた。さらに観察終了後に歯肉組織片を切除し、病理学的な変化を検討した。歯肉組織の HE 染色では、抗体投与側において炎症細胞浸潤の減少がみられた。さらに歯肉組織片から外生させた初代培養細胞を用い、生体外での三次元共培養により、再構成的に歯周炎モデルを作製した。抗体投与側から得られた歯肉線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルでは、コントロール側の歯肉線維芽細胞と比べ、コラーゲン分解が抑制された。以上のことより、抗 HGF 中和抗体は歯周治療薬として有効である可能性が示唆された。

第 2 章では、ヒト生体外歯周炎モデルを用いて、抗 HGF 中和抗体のコラーゲンゲル分解への影響を検討した。PAFs を含むコラーゲンゲルのサンプルを対象としマイクロアレイ解析を行い、HGF を介した作用を阻害することによる遺伝子発現変化を調べた。抗 HGF 中和抗体は、コラーゲン分解を抑制するとともに、ECM や細胞接着に関連する遺伝子群の発現変化を誘導した。このことから、HGF の作用阻害によって、細胞と細胞、細胞と ECM の相互作用に広範な影響を及ぼすことが明らかになった。したがって、HGF は歯周炎の疾患マーカーとなるだけでなく、病態形成において機能的な役割を担っていることが示唆された。

以上のことから、抗 HGF 中和抗体を用いた HGF を介した歯周病に対する宿主作用の阻害は、歯周治療薬の開発の新たなアプローチになると考えられた。

引用文献

- Anil S, Vellappally S, Preethanath RS, Mokeem SA, AlMoharib HS, Patil S et al. Hepatocyte growth factor levels in the saliva and gingival crevicular fluid in smokers with periodontitis. *Dis Markers*. 2014; 2014:146974. doi:10.1155/2014/146974.
- Blumenschein GR, Jr., Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 3287-96. doi:10.1200/JCO.2011.40.3774.
- Buonavoglia A, Latronico F, Pirani C, Greco MF, Corrente M, Prati C. Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation. *Odontology*. 2013; 101: 84-8. doi: 10.1007/s10266-011-0053-y.
- Catenacci DVT, Tebbutt NC, Davidenko I, Murad AM, Al-Batran SE, Ilson DH et al. Rilotumumab plus epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line therapy in advanced MET-positive gastric or gastro-oesophageal junction cancer (RILOMET-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017; 18: 1467-82.
- Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol*. 2007; 177:151-62.
- Deng ZL, Szafranski SP, Jarek M, Bhujju S, Wagner-Dobler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep*. 2017; 7: 3703. doi:10.1038/s41598-017-03804-8.
- Eke PI, Thornton-Evans G, Dye B, Genco R. Advances in surveillance of periodontitis: the Centers for Disease Control and Prevention periodontal disease surveillance project. *J Periodontol*. 2012; 83: 1337-42. doi: 10.1902/jop.2012.110676.
- Fajardo-Puerta AB, Mato Prado M, Frampton AE, Jiao LR. Gene of the month: HGF. *J Clin Pathol*. 2016; 69: 575-9. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203575.
- Fletcher JI, Huang DC. Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums. *Cell Cycle*. 2008; 7: 39-44. doi:10.4161/cc.7.1.5178.
- Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. *Int J Mol Sci*. 2017; 18. doi:10.3390/ijms18020440.
- Fukushima T, Uchiyama S, Tanaka H, Kataoka H. Hepatocyte growth factor activator: A proteinase linking tissue injury with repair. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 3435. doi: 10.3390/ijms19113435.

- Glisson B, Besse B, Dols MC, Dubey S, Schupp M, Jain R et al. A randomized, placebo-controlled, phase 1b/2 study of rilotumumab or ganitumab in combination with platinum-based chemotherapy as first-line treatment for extensive-stage small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2017; 18: 615-625.e8. doi: 10.1016/j.clcc. 2017.05.007.
- Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res*. 1998; 12: 12-26. doi: 10.1177/08959374980120010501.
- Golub LM, Wolff M, Roberts S, Lee HM, Leung M, Payonk GS. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. *J Am Dent Assoc*. 1994; 125: 163-9; discussion 169-71. doi: 10.14219/jada.archive.1994.0261.
- Golub LM, Lee HM. Periodontal therapeutics: Current host-modulation agents and future directions. *Periodontol 2000* . 2020; 82: 186-204. doi: 10.1111/prd.12315.
- Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. 2017; 75: 116-51. doi:10.1111/prd.12181.
- Hajishengallis G. Aging and its impact on innate immunity and inflammation: Implications for periodontitis. *J Oral Biosci*. 2014; 56: 30-37. doi: 10.1016/j.job.2013.09.001.
- Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, Dye BA, Eaton KA, Eke PI et al. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA periodontal epidemiology working group. *J Clin Periodontol*. 2015; 42: 407-12. doi:10.1111/jcpe.12392.
- Honjo S. The Japanese Tsukuba Primate Center for Medical Science (TPC): an outline. *J Med Primatol*. 1985; 14: 75-89.
- Horie M, Yamaguchi Y, Saito A, Nagase T, Lizio M, Itoh M et al. Transcriptome analysis of periodontitis-associated fibroblasts by CAGE sequencing identified DLX5 and RUNX2 long variant as novel regulators involved in periodontitis. *Sci Rep*. 2016; 6:33666. doi:10.1038/srep33666.
- Ikebe D, Wang B, Suzuki H, Kato M. Suppression of keratinocyte stratification by a dominant negative JunB mutant without blocking cell proliferation. *Genes Cells*. 2007; 12: 197-207. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01043.x.
- Ikeda E, Shiba T, Ikeda Y, Suda W, Nakasato A, Takeuchi Y et al. Japanese subgingival microbiota in health vs disease and their roles in predicted functions associated with periodontitis. *Odontology*. 2020; 108: 280-91. doi:10.1007/s10266-019-00452-4.
- Ikuta T, Inagaki Y, Tanaka K, Saito T, Nakajima Y, Bando M et al. Gene polymorphism of beta-defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. *Odontology*. 2015; 103: 66-74. doi:10.1007/s10266-013-0139-9.

- Illar C. Guide for the care and use of laboratory animals 8th ed. Washington (D.C.)2011.
- Issaranggun Na Ayuthaya B, Satravaha P, Pavasant P. Interleukin-12 modulates the immunomodulatory properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2017; 52: 546-55. doi:10.1111/jre.12421.
- Kaboosaya B, Wulansari LK, Trang Nguyen VN, Kasugai S. Drinking green tea alleviates alveolar bone resorption in ligature-induced periodontitis in mice. *J Oral Biosci.* 2020; 62: 162-168. doi: 10.1016/j.job.2020.04.002.
- Kakimoto K, Machigashira M, Ohnishi T, Kajihara T, Semba I, Setoguchi T et al. Hepatocyte growth factor in gingival crevicular fluid and the distribution of hepatocyte growth factor-activator in gingival tissue from adult periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2002; 47: 655-63. doi:10.1016/s0003-9969(02)00050-x.
- Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res.* 2014; 93: 1045-53. doi: 10.1177/0022034514552491.
- Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology.* 2006; 94: 10-21. doi:10.1007/s10266-006-0060-6.
- Kim KH, Won JH, Cheng N, Lau LF. The matricellular protein CCN1 in tissue injury repair. *J Cell Commun Signal.* 2018; 12: 273-9. doi:10.1007/s12079-018-0450-x.
- Knowles HJ, Athanasou NA. Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation. *Histol Histopathol.* 2009; 24: 337-46. doi: 10.14670/HH-24.337.
- Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 33-53. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00191.x.
- Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current concepts in the management of periodontitis. *Int Dent J.* 2021; 71: 462-476. doi: 10.1111/idj.12630.
- Li W, Zhu Y, Singh P, Ajmera DH, Song J, Ji P. Association of common variants in MMPs with periodontitis risk. *Dis Markers.* 2016; 2016:1545974. doi:10.1155/2016/1545974.
- Li Y, Zhang J, Cheng Z, Wang Y, Huang T, Lai K et al. Adenovirus-mediated LAMA3 transduction enhances hemidesmosome formation and periodontal reattachment during wound healing. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020; 18: 291-303. doi: 10.1016/j.omtm.2020.06.001.
- Liu X, Zhang Z, Pan S, Shang S, Li C. Interaction between the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the EMMPRIN/MMP-2, 9 route in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2018; 53: 842-52. doi:10.1111/jre.12574.
- Loe H. Periodontal diseases: a brief historical perspective. *Periodontol 2000.* 1993; 2:7-12. doi: 10.1111/j.1600-0757.1993.tb00215.x.

- Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986; 13: 431-45. doi: 10.1111/j.1600-051x.1986.tb01487.x.
- Lonn J, Starkhammar Johansson C, Kalvegren H, Brudin L, Skoglund C et al. Hepatocyte growth factor in patients with coronary artery disease and its relation to periodontal condition. *Results Immunol.* 2011; 2:7-12. doi: 10.1016/j.rinim.2011.12.002. eCollection 2011.
- Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy ?. *Lung Cancer.* 2004; 45 Suppl 2: S163-75. doi: 10.1016/j.lungcan.2004.07.977.
- Nagaraja C, Pradeep AR. Hepatocyte growth factor levels in gingival crevicular fluid in health, disease, and after treatment. *J Periodontol.* 2007; 78: 742-7. doi:10.1902/jop.2007.060249.
- Nascimento GG, Dahlen G, Lopez R, Baelum V. Periodontitis phenotypes and clinical response patterns to non-surgical periodontal therapy: reflections on the new periodontitis classification. *Eur J Oral Sci.* 2020; 128: 55-65. doi:10.1111/eos.12670.
- Ohnishi T, Daikuhara Y. Hepatocyte growth factor/scatter factor in development, inflammation and carcinogenesis: its expression and role in oral tissues. *Arch Oral Biol.* 2003; 48: 797-804. doi:10.1016/s0003-9969(03)00180-8.
- Ohshima M, Yamaguchi Y, Matsumoto N, Micke P, Takenouchi Y, Nishida T et al. TGF- β signaling in gingival fibroblast-epithelial interaction. *J Dent Res.* 2010; 89: 1315-21. doi:10.1177/0022034510378423.
- Ohshima M, Yamaguchi Y, Ambe K, Horie M, Saito A, Nagase T et al. Fibroblast VEGF-receptor 1 expression as molecular target in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2016; 43: 128-37. doi:10.1111/jcpe.12495.
- Ohshima M, Noguchi Y, Ito M, Maeno M, Otsuka K. Hepatocyte growth factor secreted by periodontal ligament and gingival fibroblasts is a major chemoattractant for gingival epithelial cells. *J Periodontal Res.* 2001; 36: 377-83. doi:10.1034/j.1600-0765.2001.360605.x.
- Ohshima M, Sakai A, Ito K, Otsuka K. Hepatocyte growth factor (HGF) in periodontal disease: detection of HGF in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res.* 2002; 37: 8-14. doi:10.1034/j.1600-0765.2002.00660.x.
- Ohshima M, Fujikawa K, Akutagawa H, Kato T, Ito K, Otsuka K. Hepatocyte growth factor in saliva: a possible marker for periodontal disease status. *J Oral Sci.* 2002; 44: 35-9. doi: 10.2334/josnurd.44.35.

- Ohshima M, Otsuka K, Suzuki K. Interleukin-1 β stimulates collagenase production by cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1994; 29: 421-9. doi: 10.1111/j.1600-0765.1994.tb01244.x.
- Ohshima M, Yamaguchi Y, Micke P, Abiko Y, Otsuka K. In vitro characterization of the cytokine profile of the epithelial cell rests of Malassez. *J Periodontol.* 2008; 79: 912-9. doi: 10.1902/jop.2008.070553.
- Paula-Silva FWG, Ribeiro-Santos FR, Petean IBF, Manfrin Arnez MF, Almeida-Junior LA, Carvalho FK, et al. Root canal contamination or exposure to lipopolysaccharide differentially modulate prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ signaling in apical periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2020; 28: e20190699. [https://doi.org/ 10.1590/1678-7757-2019-0699](https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0699).
- Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000.* 2012; 60: 15-39. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x.
- Rams TE, Hawley CE, Whitaker EJ, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Centipeda periodontii in human periodontitis. *Odontology.* 2015; 103: 286-91. doi:10.1007/s10266-014-0166-1.
- Romero-Castro NS, Vazquez-Villamar M, Munoz-Valle JF, Reyes-Fernandez S, Serna-Radilla VO, Garcia-Arellano S et al. Relationship between TNF-alpha, MMP-8, and MMP-9 levels in gingival crevicular fluid and the subgingival microbiota in periodontal disease. *Odontology.* 2020; 108: 25-33. doi:10.1007/s10266-019-00435-5.
- Saeki K, Yokomizo T. Identification, signaling, and functions of LTB₄ receptors. *Semin Immunol.* 2017; 33:30-6. doi:10.1016/j.smim.2017.07.010.
- Sanchez-Arrones L, Cardozo M, Nieto-Lopez F, Bovolenta P. Cdon and Boc: Two transmembrane proteins implicated in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44: 698-702. doi:10.1016/j.biocel.2012.01.019.
- Scannapieco FA, Ng P, Hovey K, Hausmann E, Hutson A, Wactawski-Wende J. Salivary biomarkers associated with alveolar bone loss. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098: 496-7. doi:10.1196/annals.1384.034.
- Schou S, Holmstrup P, Kornman KS. Non-human primates used in studies of periodontal disease pathogenesis: a review of the literature. *J Periodontol.* 1993; 64: 497-508. doi: 10.1902/jop.1993.64.6.497.
- Sergeeva OA, van der Goot FG. Converging physiological roles of the anthrax toxin receptors. *F1000Res.* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-1415. doi: 10.12688/f1000research.19423.1. eCollection 2019.

- Shadisvaaran S, Chin KY, Shahida MS, Ima-Nirwana S, Leong XF. Effect of vitamin E on periodontitis: Evidence and proposed mechanisms of action. *J Oral Biosci.* 2021; 63: 97-103. doi: 10.1016/j.job.2021.04.001.
- Shi T, Jin Y, Miao Y, Wang Y, Zhou Y, Lin X. IL-10 secreting B cells regulate periodontal immune response during periodontitis. *Odontology.* 2020; 108: 350-7. doi:10.1007/s10266-019-00470-2.
- Slebioda Z, Wozniak T, Dorocka-Bobkowska B, Wozniewicz M, Kowalska A. Beta-defensin 1 gene polymorphisms in the pathologies of the oral cavity- data from meta-analysis: association only with rs1047031 not with rs1800972, rs1799946 and rs11362. *J Oral Pathol Med.* 2021; 50: 22-31. doi: 10.1111/jop.13136.
- Smirani R, Truchetet ME, Poursac N, Naveau A, Schaefferbeke T, Devillard R. Impact of systemic sclerosis oral manifestations on patients' health-related quality of life: A systematic review. *J Oral Pathol Med.* 2018; 47: 808-15. doi:10.1111/jop.12739.
- Song IS, Han K, Park YM, Ji S, Jun SH, Ryu JJ et al. Severe periodontitis is associated with insulin resistance in non-abdominal obese Adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101: 4251-9. doi:10.1210/jc.2016-2061.
- Suzuki A, Ji G, Numabe Y, Ishii K, Muramatsu M, Kamoi K. Large-scale investigation of genomic markers for severe periodontitis. *Odontology.* 2004; 92: 43-7. doi:10.1007/s10266-004-0035-4.
- Suzuki S, Aoki A, Katagiri S, Maekawa S, Ejiri K, Kong S et al. Detection of hepatocyte growth factor in oral rinses using water for possible periodontal diagnosis. 2020; 62: 250-5. doi: 10.2334/josnusd.18-0226.
- Williams RC, Skelton AJ, Todryk SM, Rowan AD, Preshaw PM, Taylor JJ. Leptin and pro-inflammatory stimuli synergistically upregulate MMP-1 and MMP-3 secretion in human gingival fibroblasts. *PLoS One.* 2016; 11: e0148024. doi:10.1371/journal.pone.0148024.
- Williams RC. Understanding and managing periodontal diseases: a notable past, a promising future. *J Periodontol.* 2008; 79(8 Suppl):1552-9. doi: 10.1902/jop.2008.080182.

謝辞

本研究遂行にあたり格別たるご指導ご鞭撻を賜りました，奥羽大学薬学部 故大島光宏教授，および東京大学医学部 齋藤朗講師に謹んで心より感謝申し上げます。また本研究を通じ多大なるご協力ご助言を賜りました，本学部生化学講座 鈴木直人教授，ウプサラ大学医学部 Patrick Micke 教授，フンボルト大学医学部 Kai Kappert 教授，東京医科歯科大学歯学部 青木章教授，つくば霊長類医科学研究センター，生化学講座の皆様へ深く感謝いたします。

参考論文

1. Yoko Yamaguchi, Mitsuhiro Ohshima (2021) Local administration of anti-hepatocyte growth factor-neutralizing antibody reverts naturally occurring periodontitis. *J Oral Biosci.* 63, 245-252.
2. Yoko Yamaguchi, Akira Saito, Masafumi Horie, Akira Aoki, Patrick Micke, Mitsuhiro Ohshima, Kai Kappert (2021) Targeting hepatocyte growth factor in epithelial-stromal interactions in an *in vitro* experimental model of human periodontitis. *Odontology* 109, 912-920.