

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

鈴木祐希

論文題目

Porphyromonas gingivalis 線毛は RAW264 細胞において To11 様受容体を介して破骨細胞形成を誘導する

I. 緒言

歯周炎は Red complex と呼ばれる 3 種の細菌 (*Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*), *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) を主な原因とする慢性炎症性疾患である。*P. g.* はグラム陰性の偏性嫌気性桿菌で、歯周病の病因において重要な細菌と考えられている。*P. g.* の主要な病原因子には、線毛、リポ多糖 (LPS)、ジンジパインが挙げられる。*P. g.* は、長い FimA 線毛と短い Mfa1 線毛の 2 種類の線毛を保有し、これらは細菌表面から突出したタンパク質性の糸状付属物であり、宿主組織への付着、バイオフィーム形成、連鎖球菌や樹状細胞との共凝集に重要な役割を担うと考えられている。FimA 線毛は、マクロファージ、歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞を刺激して、IL-1、TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインを産生し、破骨細胞の分化や歯槽骨の吸収を促進する。*P. g.* ATCC 33277 (野生型) はラットの歯槽骨吸収を誘導するが、*Mfa1* 欠損株は *fimA* 欠損株よりも骨吸収量が少ない。このことから、*Mfa1* 線毛は FimA 線毛より歯槽骨吸収誘導能がより強力であることが示唆される。さらに、FimA 線毛と *Mfa1* 線毛の二重欠損株は、宿主細胞への接着能力を完全に失っている。これらの結果は、FimA 線毛と *Mfa1* 線毛の両方が *P. g.* の病原性に重要であることを示唆している。病原体に対する宿主の自然免疫応答は、主に Toll-Like Receptor (TLR) によって媒介され、TLR2 と TLR4 は、様々な PAMPs を認識する細胞外の自然免疫受容体として最も広く研究されており、歯周病の病因と密接に関連している。

そこで本研究では、*P. g.* Mfa1 線毛が破骨細胞の分化・活性化に及ぼす影響を検討し、TLR2 および TLR4 のノックダウンが線毛刺激後の破骨細胞分化に与える影響についても検討した。

II. 材料および方法

1. 細胞培養

RAW264 細胞は理研セルバンクから購入し、培養した。

2. *P. g.* 線毛精製

P. g. ATCC33277 変異株 SMF-1 (*mfa1* 欠損) 由来の FimA 線毛は Yoshimura らのプロトコールに従って、また同 JI-1 (*fimA* 欠損) 由来の Mfa1 線毛は Hasegawa らのプロトコールに従い精製した。

3. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色

RAW264 細胞を RANKL 前刺激し、1 μ g/mL Mfa1、FimA、または 50 ng/mL RANKL で刺激後、TRAP 染色を行った。

4. 骨吸収アッセイ

骨吸収活性評価プレート上に播種した細胞に RANKL 前刺激し、1 μ g/mL Mfa1、FimA、または 50 ng/mL RANKL で刺激後、吸収窩を計測した。

5. Real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

RANKL、線毛刺激し回収した細胞より total RNA を抽出し、18S rRNA、*Acp5*、*Mmp9*、*Ctsk*、*Nfatc1*、*Tlr2*、*Tlr4* のプライマーを用いた qPCR 分析による各種 mRNA 発現を検討した。

6. RNA 干渉 (siRNA)

Tlr2、*Tlr4* または control siRNA を細胞に形質導入後、方法 3 および 5 の解析を行った。

7. フローサイトメトリー

RNA 干渉によるノックダウンを確認するため、TLR2、TLR4 または control siRNA を作用させた細胞に対して抗 CD282 PE、抗 CD284 PE、および isotype control 抗体にて染色を施し、フローサイトメーターにてタンパク発現の解析を行った。

8. 統計学的解析

各群の有意差の検定には、one-way ANOVA と Tukey's multiple comparisons test を用い、独立した 2 群間の比較は、Student の t 検定を使用し、データは平均値±標準偏差(SD)で表した。危険率は $p < 0.05$ をもって有意とし表記した。

III. 結 果

1. Mfa1 線毛による RANKL 誘導性破骨細胞分化への影響

RANKL 前処理した RAW264 細胞を Mfa1 または FimA で刺激し、RANKL 誘導性破骨細胞形成に影響を与えるかを検討したところ、Mfa1 刺激はコントロールと比較して TRAP 陽性多核細胞分化を効果的に誘導した。また、Mfa1 は FimA と比較して、有意に高い破骨細胞分化誘導能を示した。

2. Mfa1 線毛による RANKL 誘導性破骨細胞活性化への影響

骨吸収活性評価プレートを使用して、RANKL 前処理した RAW264 細胞を Mfa1 または FimA で刺激し、RANKL 誘導性破骨細胞活性化に影響を与えるかどうかを検討したところ、プレート表面は、Mfa1 または FimA 刺激した RANKL 誘導性破骨細胞によって部分的に吸収した。Mfa1 はコントロールと比較して吸収窩形成を有意に促進した。しかし、FimA による吸収窩形成面積はコントロールと比較して有意な増大を認めなかった。

3. Mfa1 線毛による RANKL 誘導性破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現変動

RANKL 前処理した RAW264 細胞を Mfa1 または FimA で刺激し、48 時間後の *Acp5*、*Mmp9*、*Ctsk*、*Nfatc1* の mRNA 発現を qPCR により検討した。Mfa1 は、RANKL 誘導性破骨細胞分化において、*Acp5*、*Mmp9*、*Ctsk* の発現を有意に上昇させた。しかし、Mfa1 および FimA は破骨細胞分化のマスター遺伝子である *Nfatc1* の発現には影響を与えなかった。

4. Mfa1 線毛が *Tlr2*、*Tlr4* 遺伝子発現に与える影響

RANKL 前処理した RAW264 細胞を Mfa1 または FimA で刺激し RANKL 誘導性破骨細胞の *Tlr2*、*Tlr4* 遺伝子発現に影響を与えるか qPCR を用いて検討した。RANKL 誘導性破骨細胞において、Mfa1 と FimA 刺激は *Tlr2* と *Tlr4* の発現を有意に増加した。

5. *Tlr2*、*Tlr4* siRNA の RAW264 細胞への形質導入

Tlr2 および *Tlr4* siRNA を導入した RAW264 細胞は、コントロールの siRNA

を導入した RAW264 細胞と比較して、*Tlr2* および *Tlr4* mRNA の有意なノックダウンを示した。また、フローサイトメトリー解析により、siRNA 導入した RAW264 細胞における TLR2 及び TLR4 のタンパク発現が、コントロールの細胞と比較して抑制されていることを示した。

6. Mfa1 線毛による破骨細胞分化に対する *Tlr2*, *Tlr4* RNA 干渉の影響

TLR2 あるいは TLR4 の発現を抑制した RANKL 前処理 RAW264 細胞を Mfa1 または FimA で刺激し、破骨細胞分化を TRAP 染色により調べたところ、Mfa1 で刺激した *Tlr2* siRNA 導入細胞は、コントロールの siRNA 導入細胞と比較して、TRAP 陽性細胞の数が著しく減少した。また、*Tlr4* のノックダウンは、破骨細胞分化に対する Mfa1 の効果を部分的にであるが有意に減弱させた。FimA 刺激においても、*Tlr2* および *Tlr4* のノックダウンにより、破骨細胞分化誘導能は有意に減弱した。

次に TLR2 あるいは TLR4 の発現を抑制した RANKL 前処理 RAW264 細胞に Mfa1 または FimA で刺激し、破骨細胞分化マーカーの発現を qPCR にて検討した。Mfa1 刺激後の *Acp5*、*Mmp9*、*Ctsk* の発現は、*Tlr2* siRNA あるいは *Tlr4* siRNA を導入した細胞において、コントロール siRNA 導入細胞と比較して有意に減少した。

IV. 考 察

本研究では、*P. g.* Mfa1 および FimA が破骨細胞の分化と活性化を促進することを明らかにし、特に、Mfa1 の破骨細胞分化・活性化に対する作用は FimA

よりも強いようであった。Mfa1 は間質細胞と骨髄細胞の共培養下で破骨細胞の活性化を促進する報告がある。また、破骨細胞の分化・活性化に対する FimA の直接的な作用は、我々の知る限りでは報告されていない。したがって、Mfa1 および FimA の破骨細胞形成に対する直接的な作用に関する報告は、今回が初めてとなる。しかし、破骨細胞分化に対する *P. g.* の線毛の作用機序の詳細については、今後、解明していく必要がある。

筆者の研究室における先行研究では、マクロファージの状態にある RANKL で前刺激を行わない RAW264 細胞は、Mfa1 刺激により様々な炎症性サイトカインを産生するが、Mfa1 単独での刺激ではマクロファージは破骨細胞に分化しないことを明らかにした。本研究における破骨細胞の分化・活性化に対する Mfa1 の作用は、RANKL 誘導性破骨細胞前駆細胞において生じるものと考えられる。破骨細胞の分化・活性化に対する Mfa1 の作用については、今後、詳細な研究が必要である。

TLR2 と TLR4 は歯周病原性細菌に由来する多くの成分を認識することが知られており、歯周病の発症と密接に関係している。本研究では、破骨細胞前駆細胞における Mfa1 と FimA の認識に、TLR4 とともに TLR2 が重要である可能性を示唆している。

V. まとめ

Mfa1 線毛は破骨細胞の分化・活性化を促進することで、歯槽骨の吸収を促進する可能性があると考えられ、Mfa1 の作用に対する理解は、歯周病の進

(論文内容の要旨)

No. 7

愛知学院大学

行メカニズムの解明や新たな治療法の開発に貢献するものと考えられる。