

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 鈴木祐希
論文題目 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 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 種の歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) を主な原因とする慢性炎症性疾患である。*P. gingivalis* はグラム陰性の偏性嫌気性桿菌で、複数の細菌が引き起こす歯周病の病因において重要な細菌と考えられている。一般的に歯周病原細菌が歯周組織を破壊するためには、歯周組織への付着と侵入、宿主免疫の過剰反応誘導、組織構造の破壊、宿主免疫からの回避など、高い感染力が必要とされる。*P. gingivalis* 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. gingivalis* は、長い FimA 線毛と短い Mfa1 線毛という 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および連鎖球菌や樹状細胞との共凝集に重要な役割を果たすと考えられている。長線毛の *fimA* 遺伝子は、主要タンパク質 FimA をコードしており、*FimA* の遺伝子型には I-V と Ib がある。*FimA* 遺伝子 II 型は重度の歯周炎患者に多く検出されるが、*FimA* 遺伝子 I 型は軽度の歯周炎患者に検出されるという報告がある。

一方、Mfa1 線毛は 5 つのタンパク質 (Mfa1-5) からなり、主要成分 Mfa1 タンパク質が数珠状に重合した繊維構造をしている。Mfa2 は線毛の長さを調節し、線毛の基部に位置している。さらに、微量成分 Mfa3-5 は線毛先端で複合体を形成する。近年、Mfa1 線毛には 53 型、70A 型、70B 型の 3 種類の遺伝子型があることが発見された。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、インターロイキン (IL) -1、腫瘍壊死因子 (TNF) - α 、IL-6 などの炎症性サイトカイン産生を誘導し、その結果、破骨細胞の分化や歯槽骨の吸収を促進する。*P. gingivalis* 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小さい。このことから、Mfa1 線毛は FimA 線毛より歯槽骨吸収誘導能が強力であることが示唆された。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. gingivalis* の病原性にとって重要であることを示唆している。

細胞は、Toll-Like Receptor (TLR)s などのパターン認識受容体を用いて病原体関連分子パターン (PAMPs) を認識する。病原体に対する宿主の自然免疫応答は、主に TLR シグナルによって媒介される。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。特に、TLR2 は *P. gingivalis* による炎症性サイトカイン産生に重要であることが示されている。また、*P. gingivalis* の線毛の認識には、TLR2 と TLR4 が関与している可能性が示唆されているが、現在のところ、一定の見解は得られていない。

そこで本研究では、*P. gingivalis* の線毛、特に Mfa1 線毛が歯槽骨吸収を引き起こす破骨細胞の分化・活性化に及ぼす影響を FimA 線毛と比較し検討した。さらに、TLR2 および TLR4 のノックダウンが線毛刺激による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

マウスマクロファージ細胞株 RAW264 細胞は理研セルバンク (Ibaraki, Japan) から購入し、10% ウシ胎児血清 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む Minimum Essential Medium (MEM) α (Thermo Fisher Scientific,

Wilmington, DE, USA) で培養した。細胞は 5%CO₂ インキュベーターで 37°C にて培養した。セミコンフルエントになった時点で、細胞を 0.25% トリプシン-EDTA (Thermo Fisher Scientific) で処理し、遠心分離により回収した。

2. *P. gingivalis* の培養、線毛精製

ATCC33277 由来の *P. gingivalis* 変異株 JI-1 (*fimA* 欠損) および SMF-1 (*mfal* 欠損) を、ブルセラ HK 寒天培地 (KYOKUTO, Tokyo, Japan) に 5% [v/v] ウサギ血清、2.5 μg/mL ヘミン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、5 μg/mL メナジオン (Sigma-Aldrich) を添加、調整し、37°C、嫌気条件下で培養した。液体培地は、Trypticase soy broth (Thermo Fisher Scientific)、0.25% yeast extract (Thermo Fisher Scientific) および蒸留水を混合し、滅菌後 2.5 μg/mL ヘミン、5 μg/mL メナジオンを加えて調製した。

JI-1 からの *Mfal* 線毛の精製は、既存のプロトコルを用いて実施した。概説すると、フランス式圧力セル (OHTAKEWORKS, Osaka, Japan) で破碎した *P. gingivalis* を超遠心分離し、上清を硫酸アンモニウム (50%飽和) で沈殿させた。次に、*Mfal* 線毛の画分をイオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sepharose Fast Flow chromatography, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) で分離した。*Mfal* 線毛の純度とホモロジーは、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と透過型電子顕微鏡によって確認した。一方、SMF-1 の *FimA* 線毛は Yoshimura らのプロトコルに従って精製した。

3. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色

RAW264 細胞を 50 ng/mL receptor activator of nuclear factor κ β ligand (RANKL) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) で 24 時間前刺激し、その後 48 時間ごとに 1 μg/mL *Mfal* 線毛、*FimA* 線毛、または 50 ng/mL RANKL で刺激した。96 時間後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、3.3% ホルムアルデヒド、クエン酸溶液、アセトンで 5 分間固定し、蒸留水にて洗浄した。その後、Fastgarnet GBc BASE 溶液、亜硝酸ナトリウム溶液、Naphthol AS-BIPb、酢酸溶液、酒石酸溶液および蒸留水を混合して調製した染色液にて 30 分間染色した。蒸留水で洗浄後、乾燥し、3 個以上の核を含む TRAP 陽性の多核細胞の数を倒立顕微鏡 (CKX41, OLYMPUS, Tokyo, Japan) でカウントした。

4. 骨吸収アッセイ

骨吸収活性評価プレート (Corning Osteo Assay Surface bone resorption activity evaluation plate, Corning Lifesciences, Corning, NY, USA) を α -MEM で洗浄後、播種した RAW264 細胞を 50 ng/mL RANKL で 24 時間前刺激し、48 時間ごとに 1 μg/mL *Mfal* 線毛、*FimA* 線毛、または 50 ng/mL RANKL で刺激した。120 時間後、細胞を 5% 次亜塩素酸ナトリウムで 5 分間溶解した。蒸留水で洗浄後、乾燥させ、光学顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE, Osaka, Japan) で吸収窩を観察した。1 サンプルごとに吸収窩の総面積を Analyzer (BZ-X, KEYENCE) を用いて測定し、3 つのサンプルの平均を算出した。

5. Real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

RAW264 細胞を 50 ng/mL RANKL で 24 時間前刺激した後、1 μg/mL *Mfal* 線毛、*FimA* 線毛、または 50 ng/mL RANKL で 48 時間刺激し、細胞を回収した。回収したサンプルより NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel Inc, Bethlehem, PA, USA) を用いて total RNA をプロトコルに従って抽出した。RNA サンプルの濃度は超微量紫外可視分光光度計 Thermo NANO DROP LITE™ (Thermo Fisher

Scientific) で測定し、その後、通法に従って cDNA 合成を行った。逆転写反応は、37°C 15 分、50°C 5 分、98°C 5 分、4°C hold にて行った。mRNA の発現量を比較するために、*Acp5* (Trap) (Mm00437135-m1)、*Mmp9* (Mm00442991-m1)、*Ctsk* (Mm00484039-m1)、*Nfatc1* (Mm00479445-m1)、*Tlr2* (Mm00442346_m1)、*Tlr4* (Mm00445273_m1) のプライマー/プローブ (Taqman Gene Expression Assay, Thermo Fisher Scientific) と TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、Real-Time System (StepOnePlus™ Real-Time System, Thermo Fisher Scientific) にて qPCR を実施した。反応条件は、95°C で 10 分、その後 95°C 15 秒、60°C 1 分を 40 サイクル行った。遺伝子発現の相対的変化は $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で算出した。内部コントロールとして 18S rRNA (Hs9999901-s1) を使用した。

6. RNA 干渉 (siRNA)

60%-80%コンフルエントの RAW264 細胞に Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) を使用して *Tlr2*、*Tlr4*-targeting siRNA (Silencer Select Pre-designed siRNAs, Ambion, Austin, TX, USA) または non-targeting control siRNA を形質導入した。その後、mRNA の発現量低下を確認するために *Tlr2*、*Tlr4* のプライマー/プローブ (Taqman Gene Expression Assay, Thermo Fisher Scientific) および TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて qPCR を行った。

7. フローサイトメトリー

siRNA を導入した RAW264 細胞を anti-mouse CD282 (TLR2) phycoerythrin (PE) (BioLegend, San Diego, CA, USA, Cat:148604)、anti-mouse CD284 (TLR4) PE (BioLegend, Cat:117605)、または isotype control antibody (PE) (BioLegend, Cat:400508) で染色し、MACSQuant analyzer と MACSQuantify software version 2.5 (Miltenyi Biotec, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

8. 統計学的解析

統計解析は PASW Statistics (version 18.0; SPSS Japan, Tokyo, Japan) を使用した。結果は、分散分析 (ANOVA) および Tukey's multiple comparisons test により比較した。独立した 2 群間の比較は、Student の t 検定を使用した。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 線毛または FimA 線毛で刺激し、RANKL 誘導性破骨細胞形成に影響を与えるかどうかを検討した。Mfa1 刺激は、コントロールと比較して、TRAP 陽性多核細胞の分化を効果的に誘導した。Mfa1 線毛は、FimA 線毛と比較して、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 線毛または FimA 線毛で刺激し、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。オステオアッセイ表面は、Mfa1 線毛または FimA 線毛で刺激した RAW264 細胞由来の破骨細胞によって部分的に吸収された。また、Mfa1 群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 群において、吸収窩形成はコントロールと比較して有意な促進を認めなかった。

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 線毛または FimA 線毛で 48 時間刺激し、RANKL 誘導性破骨細胞分化マーカーである TRAP (*Acp5*)、matrix metalloproteinase 9 (*Mmp9*)、cathepsin K (*Ctsk*)、*Nfatc1* の遺伝子発現に影響を与えるかについて、qPCR にて検討した。Mfa1 線毛は、RANKL 誘導性破骨細胞分化において、*Acp5*、*Mmp9*、*Ctsk* の mRNA 発現を有意に上昇させた。しかし、Mfa1 線毛および FimA 線毛は破骨細胞分化のマスター遺伝子である *Nfatc1* の mRNA 発現に影響を与えなかった。そこで、刺激時間を短くしたところ、8 時間と 24 時間刺激において *Nfatc1* mRNA 発現が増加していることが確認された。

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 線毛または FimA 線毛で刺激した際に、RANKL 誘導性破骨細胞の *Tlr2*、*Tlr4* 遺伝子発現に影響を与えるかを qPCR にて検討した。RANKL 誘導性破骨細胞において、Mfa1 線毛と FimA 線毛刺激は *Tlr2* と *Tlr4* の mRNA 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 あるいは *Tlr4* siRNA を導入した RAW264 細胞において、*Tlr2*、*Tlr4* mRNA 発現を qPCR で、TLR2、TLR4 のタンパク発現をフローサイトメトリーで検討した。*Tlr2* あるいは *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、それぞれ *Tlr2*、*Tlr4* mRNA 発現が有意にノックダウンされていた。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 あるいは TLR4 のタンパク発現は、コントロールの siRNA を導入した RAW264 細胞と比較し抑制されていることを確認した。

6. Mfa1 線毛の破骨細胞分化に対する *Tlr2*、*Tlr4* RNA 干渉の影響

TLR2 あるいは TLR4 の発現が抑制された RANKL 前処理 RAW264 細胞を Mfa1 線毛または FimA 線毛で刺激し、RANKL 誘導性破骨細胞形成に影響を与えるかどうかを TRAP 染色にて検討した。*Tlr2* あるいは *Tlr4* がノックダウンされた RAW264 細胞では、Mfa1 線毛、FimA 線毛刺激による破骨細胞分化が抑制されていた。特に、Mfa1 線毛で刺激した *Tlr2* siRNA 導入細胞では、Mfa1 線毛刺激で刺激したコントロール siRNA 導入細胞と比較して、TRAP 陽性多核細胞の数が著しく減少した。さらに、*Tlr4* のノックダウンは、破骨細胞分化に対する Mfa1 線毛の効果をも部分的ではあるが有意に減弱させた。FimA 線毛刺激においても、*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 の発現が抑制された RANKL 前処理 RAW264 細胞を Mfa1 線毛または FimA 線毛で刺激し、RANKL 誘導性破骨細胞分化マーカー *Acp5*、*Mmp9*、*Ctsk* の発現に影響を与えるかどうかを qPCR にて検討した。*Tlr2* siRNA あるいは *Tlr4* siRNA を導入した細胞では、コントロール siRNA 導入細胞と比較して Mfa1 線毛、FimA 線毛刺激による *Acp5*、*Mmp9*、*Ctsk* の遺伝子発現誘導能が有意に減弱した。

IV. 考 察

本研究では、*P. gingivalis* Mfa1 線毛および FimA 線毛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た。特に、破骨細胞分化・活性化に対する作用は、FimA 線毛よりも Mfa1 線毛が強いということは興味深い新知見であった。Hiramane らは、*P. gingivalis* の 67kDa の線毛 (Mfa1 に相当) が破骨細胞の活性化を誘導することを報告している。彼らは、マウスの初代骨髄細胞および間質細胞株を用いて、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、RANKL、デキサメタゾンおよび $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で処理した象牙質の切片で吸収窩形成を確認する研究を行った。彼らの研

究では、骨髄細胞と間質細胞が共培養されており、多くの因子が関与していることが考えられる。その場合、Mfa1 線毛は間質細胞上の受容体を刺激し、RANKL 産生を増加させることにより破骨細胞形成を促進する可能性がある。本研究では、破骨細胞前駆細胞への直接的な影響を調べているため、この点が先行研究と大きく異なる。一方、FimA 線毛は、ウシ骨片上の頭蓋骨の細胞の骨吸収活性を誘導する。しかし、破骨細胞の分化・活性化に対する FimA 線毛の直接的な作用は、渉猟する限り報告されていない。したがって、Mfa1 線毛および FimA 線毛の破骨細胞形成に対する直接的な作用に関しては、今回が初めての報告となる。

本研究では FimA 線毛は破骨細胞の活性化を有意には誘導しなかった。このように、*P. gingivalis* 線毛による破骨細胞の分化・活性化の誘導能の違いについては、今後さらに検討する必要がある。近年、*P. gingivalis* の FimA 線毛および Mfa1 線毛が新規 V 型線毛として分類され、Mfa2-5 などの微量成分を含む詳細な線毛構造が明らかにされた。骨吸収と *P. gingivalis* 線毛の関係を調べた研究では、このような線毛構造は考慮されていない。今後、Mfa1 線毛にも着目し、破骨細胞形成の直接的なメカニズムをさらに解明していくことが必要である。

炎症性メディエーターである IL-1 は破骨細胞の活性化を直接的に促進することが報告されている。また、TNF- α は破骨細胞の分化を直接的に促進する。一方、LPS は RANKL、IL-1、TNF- α とは独立して破骨細胞の生存と分化を促進する。LPS は IL-1、TNF- α 、PGE2 などのサイトカインや炎症性メディエーターを誘導するが、これらは破骨細胞の分化や活性化に重要な役割を果たす。RANKL と LPS あるいはブドウ球菌リポタイコ酸による同時刺激は、RANKL によって誘導される破骨細胞分化を阻害する。また、LPS による破骨細胞前駆細胞の刺激は、破骨細胞分化と破骨細胞の生存・活性化を促す。筆者の研究室における先行研究において、RANKL で前刺激を行わない RAW264 細胞は、Mfa1 線毛刺激により様々な炎症性サイトカインを産生するが、Mfa1 線毛単独刺激で RAW264 細胞は破骨細胞に分化しなかった（データ未公開）。実際、Hamada らは、Mfa1 線毛がマウス腹腔マクロファージにおける IL-1、IL-6、TNF- α の発現を増加させることを報告している。したがって、本研究における破骨細胞の分化・活性化に対する Mfa1 線毛の作用は、RANKL 誘導性破骨細胞前駆細胞に対して生じるものと考えられる。RANKL で刺激されたマクロファージは、*P. gingivalis* によって TNF- α 非依存的に破骨細胞形成を促進する。また、犬の歯周病原細菌である *P. gulae* の 41-kDa 線毛が RANKL と $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による刺激で破骨細胞分化を促進することが報告されている。実際の歯槽骨吸収では、周囲に多くの骨吸収促進因子が誘導され、Mfa1 線毛の働きにより、さらに強化されると思われる。破骨細胞の分化・活性化に対する Mfa1 線毛の作用については、今後、詳細な研究が必要である。

TLR は多くの細菌成分を認識し、自然免疫において決定的な役割を担っている。大腸菌の LPS は TLR4 で認識されることが広く知られているが、*P. gingivalis* の LPS は TLR2 と TLR4 の両方で認識されることが報告されており、*P. gingivalis* の細菌成分に対する生体反応はより複雑と思われる。リコンビナント FimA は、TLR4 を介してヒト末梢血単球系細胞における炎症性メディエーター産生を増強する。さらに、FimA リポタンパク質または FimA に関連するリポペプチドは、マクロファージにおいて TLR2 を介したシグナル伝達とその後の TNF- α 産生を少なくとも部分的には誘導することが示唆されている。筆者の研究室において、歯肉線維芽細胞による Mfa1 線毛の認識に TLR4 の重要性を報告した。一方、Takahashi らは、気管支上皮細胞による Mfa1 線毛の認識に TLR2 が重要である可能性を示唆している。本研究結果においても、破骨細胞前駆細胞が

Mfa1 線毛と FimA 線毛を認識するために、TLR4 とともに TLR2 が重要である可能性を示唆するものであった。実際、*P. gingivalis* の 67-kDa 線毛は破骨細胞の活性化を誘導し、その効果は TLR2 中和抗体によって減弱する。今後、ノックアウトマウスや CRISPR-Cas9 システムを用いた解析によって、Mfa1 線毛と FimA 線毛の認識受容体が明らかになることが予測される。

一方で、本研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究は細胞を用いた *in vitro* 研究であるため、今後、感染モデル動物を用いた *in vivo* 研究、特に *P. gingivalis* の線毛変異株を用いた歯槽骨吸収の解析を行い、歯周炎における Mfa1 線毛の役割を明らかにすることが必要であると思われる。第二に、歯周組織において、破骨細胞は骨芽細胞、マクロファージ、歯肉線維芽細胞、上皮細胞由来の炎症性メディエーターにより分化・活性化が誘導される。したがって、Mfa1 線毛の細胞間ネットワークに及ぼす複数の細胞への影響について検討することが必要である。第三に、本研究では、Mfa1 線毛の推定受容体である TLR の下での細胞内シグナル伝達については調べていない。歯周炎の病態制御の観点からも、この点は今後の検討課題であると考えられる。

V. 結論

本研究において、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ことが明らかになった。本研究は、歯周病の進行メカニズムの解明の一助となることや新たな治療法の開発に貢献するものと考えられる。