

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

近藤 駿

論文題目

歯周炎において誘導される ANGPTL4 は MMP13 の発現を
増加させる

I. 緒言

歯周炎は、口腔内における主要な慢性炎症性疾患である。歯と歯肉の間に形成される歯周ポケットに歯周病原細菌が持続的に感染し、歯周組織が破壊され病態が進行する。歯周病原細菌として知られている、*P. gingivalis* は、慢性歯周炎の炎症部位から最も頻繁に分離される細菌であり、リポ多糖 (LPS) やフィンブリエなどの病原因子となる構造を持つ細菌である。アンジオポエチン様タンパク質 (ANGPTL) は、アンジオポエチン (ANG) と構造的に類似した分泌タンパク質であり、アンジオポエチン受容体である Tie1 や Tie2 には結合しないという特徴がある。ANGPTL4 は、慢性または急性の炎症で産生されることが分かっている一方で、歯周炎における ANGPTL4 の関わりは明らかではない。今回、歯周炎における ANGPTL4 の新規作用を明らかにするため、歯周炎による炎症が ANGPTL4 の発現を上昇させるかどうか、また ANGPTL4 が何らかの形で炎症反応を制御するかどうかを検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物

実験動物には5週齢雄性、Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。

2. 実験的歯周炎の誘導

上顎両側第二臼歯の歯頸部に縫合用ナイロン糸 (3-0 Surgilon) を結紮し、実験的歯周炎を惹起させ歯周炎群 (n=8) とした。また、無処置のラッ

トを対照群 (n=8) とした。

3. 組織採取

実験的歯周炎を惹起し 14 日後に対照群、歯周炎群ともに CO₂ により屠殺した。両側上顎を採取し、病理組織学的解析および Micro Computer Tomography (micro CT) を用いた歯槽骨の形態学的解析に供した。また遺伝子解析用に第二臼歯周囲の歯肉を採取し、液体窒素で急速凍結し -80°C にて保存した。

4. Micro CT による歯槽骨の撮像

左側上顎骨に対し micro CT を使用し、実験的歯周炎による歯槽骨の形態学的変化を確認した。画像解析ソフトを用い、第二臼歯の近心頬側部セメントエナメル境から歯槽骨頂部までの距離を測定し、歯槽骨吸収量とした。

5. 歯周組織の病理学的および免疫組織学的評価

右側上顎を採取しパラフィン包埋を行った。上顎第二臼歯を矢状断方向に厚さ 5 μm で連続組織切片を作成した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色および抗 ANGPTL4 抗体と抗 MMP13 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、炎症性細胞浸潤の確認、ANGPTL4、MMP13 発現の評価を行った。蛍光免疫染色像は、画像解析ソフトを用い、定量化を行った。

6. 細胞培養、刺激方法

ヒト歯肉線維芽細胞 (hGF) を用い、100 ng/ml の濃度の *P. gingivalis* LPS または 100、250、500 ng/ml 濃度のヒト組換えタンパク質 ANGPTL4 で 4 時

間 (遺伝子発現解析)あるいは14時間 (タンパク質発現解析)刺激を行い、細胞回収を行った。

7. Real-time quantitative PCR (qPCR)解析

RNeasy を用いて、ラット歯肉組織および hGF から、total RNA を抽出し、ReverTraAce を用いて cDNA を合成した後、Real-time PCR 法にて、ANGPTLs、ANGPTL4 と *P. gingivalis* LPS 認識に関与するレセプター、炎症性サイトカイン、MMPs の遺伝子発現を検討した。

8. Western blot 解析

溶解バッファで細胞を溶解後、SDS-PAGE を作成し電気泳動を行い、メンブレンに転写した。ウサギ抗ヒト ANGPTL4 抗体、ウサギ抗ヒト β -アクチン抗体で一晩インキュベートした。次に、ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G と Can Get Signal Solution を使用し、メンブレン上のバンドを画像解析ソフトにて定量化した。

9. RNA 干渉 (siRNA)

hGF に対し、ANGPTL4 siRNA の形質導入を行った。24時間の形質導入後に、*P. gingivalis* LPS を用いて4時間 (遺伝子発現解析)、14時間 (タンパク質発現解析)刺激後の、遺伝子発現変動を解析した。また抗 MMP13 抗体を用いて免疫組織染色を行い、タンパク質発現変化を検討した。

10. 統計解析

全ての値は平均値±標準誤差で表し、統計学的解析は、2群間比較の場合

は t-test、多重比較の場合は、one-way ANOVA と Bonferroni multiple comparison test を用いて行い、危険率は $p < 0.05$ をもって有意とし表記した。

III. 結果

1. 歯周組織における病理組織学的所見

歯周炎群では、対照群と比較して歯槽骨吸収が有意に増加し、対照群と比較し歯周炎群で歯肉組織への炎症性細胞の浸潤を認めた。

2. 実験的歯周炎による歯肉の ANGPTL4 発現解析

歯周組織における ANGPTL4 タンパク発現量は、歯周炎群において対照群と比較し有意な増加を認めた。また歯肉における ANGPTL4 の遺伝子発現に関しても、歯周炎群は対照群に比べて有意な増加を認めた。

3. *P. gingivalis* LPS 刺激 hGF における遺伝子発現、タンパク発現解析

P. gingivalis LPS で刺激した場合、刺激群は対照群と比較し、ANGPTL4 の遺伝子発現を有意に増加させたが、他の ANGPTL 遺伝子発現、ANGPTL4 の受容体とされる ITG1、ITG5 と LPS 認識に関与するレセプターである TLR2、TLR4 の遺伝子発現に対して影響を与えなかった。また、*P. gingivalis* LPS の刺激により、iNOS、TNF- α の有意な遺伝子発現増加を認めた。ANGPTL4 のタンパク発現は、*P. gingivalis* LPS 刺激により対照群と比較し、有意に増加していた。

4. ヒトリコンビナント ANGPTL4 刺激 hGF における MMPs の遺伝子発現解析

ANGPTL4 が hGF に与える影響を評価するため、hGF にヒトリコンビナント ANGPTL4 を添加し、MMPs の遺伝子発現変動を確認した。ANGPTL4 は、MMP13 の遺伝子発現を有意に増加させたが、MMP1、MMP8、MMP10 に関しては、変化を認めなかった。

5. 実験的歯周炎を惹起した歯肉における MMP13 の発現解析

実験的歯周炎を惹起させた歯肉における MMP13 の遺伝子発現、タンパク発現は、対照群と比較し、歯周炎群で有意に増加していた。

6. *P. gingivalis* LPS 刺激 hGF における ANGPTL4 を介した MMP13 発現解析

P. gingivalis LPS は hGF における MMP13 のタンパク発現を増加させるが、この増加は siRNA を用いた ANGPTL4 のノックダウンにより抑制されることが明らかとなった。さらに、ANGPTL4 をノックダウンすると、*P. gingivalis* LPS によって増強される MMP13 の遺伝子発現が抑制されることを確認した。

IV. 考察

本研究では歯周炎における ANGPTL4 の役割について検討した。ナイロン糸結紮実験的歯周炎惹起により、歯周炎時の歯周組織における ANGPTL4 発現が増加することが明らかとなった。hGF は歯周組織において歯肉上皮の直下に存在し、歯周炎により上皮のバリアが破壊された後に炎症性細胞の浸潤が生じる歯肉結合組織の重要な構成細胞である。今回 *P. gingivalis* LPS 刺激は hGF において ANGPTL4 の遺伝子およびタンパク発現を増加させたが、

その受容体発現は変動させないことが明らかになった。

MMP は、タンパク質の細胞外マトリックスを分解する酵素の総称であり、プラークによる炎症反応や免疫応答により歯周組織を構成する細胞、あるいは歯周組織に浸潤する炎症性細胞によって産生される。コラーゲンなどの線維成分やコラーゲン以外の細胞外マトリックスの分解は、MMP の代表的な酵素であるコラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメリシンによって行われている。これらタンパク質分解酵素の産生は、炎症反応によって促進され、歯周炎における組織破壊に関与している。本研究において、ヒトリコンビナント ANGPTL4 刺激は hGF における、MMP13 遺伝子発現レベルを有意に増加させた。さらに、siRNA を用い ANGPTL4 をノックダウンすることにより、*P. gingivalis* LPS 刺激による hGF での MMP13 遺伝子発現増加が抑制されたことから、*P. gingivalis* LPS の刺激により ANGPTL4 の発現が誘導され、その結果、MMP13 産生が増強されるという可能性が示された。最近の研究では、MMP13 をノックダウンすることで、LPS 誘発実験的歯周炎に伴う炎症性骨吸収が抑制されることが示唆されている。これらの結果は、歯周炎における ANGPTL4 を介した MMP13 発現増加による歯槽骨吸収のメカニズムを支持するものである。しかしより詳細な作用機序の解明には、今後さらなる研究が必要である。

V. まとめ

本研究において実験的歯周炎により歯周組織での ANGPTL4 発現が増加し

た。また、*P. gingivalis* LPS 刺激は hGF おける ANGPTL4 の発現を増加させ、ANGPTL4 を介して MMP13 の発現を亢進させた。この結果は歯周炎において ANGPTL4 が、組織破壊を促進する MMP13 の発現を亢進する極めて重要な役割を担っている可能性を示唆している。以上の結果から、ANGPTL4 は歯周炎を評価するマーカーとして、また歯周炎の新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。