

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 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、口腔内に発生す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ることで病態が進行する。グラム陰性嫌気性菌である *Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola* は、Red complex と呼ばれる代表的な歯周病原細菌として知られている。このうち *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ち、ジンジパインなどのトリプシン様酵素やコラゲナーゼを産生する細菌である。

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、これまでに 7 種類の ANGPTL が同定されている。ANGPTL は、ANG と同様にフィブリノーゲン様ドメインとコルチコイドドメインの 2 つの構造的特徴を有するが、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。ANGPTL1-4 は血管新生を制御し、ANGPTL3-7 は脂質代謝、グルコース、エネルギーのホメオスタシスなどのプロセスに関与していると考えられている。筆者の研究室における先行研究において、ANGPTL2 が歯周炎に関与している可能性を報告している。*P. gingivalis* 由来の LPS は、歯肉上皮細胞における ANGPTL2 の発現を増加させ、更に ANGPTL2 欠損マウスでは、結紮糸による実験的歯周炎において炎症反応と破骨細胞形成が亢進し、より顕著な歯槽骨吸収が確認されている。一方、ANGPTL4 は、2000 年に発見され、慢性または急性の炎症で産生されることが分かっており、歯周組織では、低酸素状態において ANGPTL4 が産生されることが確認されている。ANGPTL4 は、低酸素状態で低酸素誘導性因子 HIF-1 $\alpha$  を誘導し、特定のインテグリンと相互作用して活性酸素レベルを制御し、腫瘍形成を促進することが近年明らかになった。一方で歯周炎における ANGPTL4 の役割は明らかではない。そこで今回、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. 対象および方法

### 1. 実験動物

実験動物には 5 週齢雄性、Sprague-Dawley (SD) ラット (日本 SLC, 静岡) を用いた。すべてのラットは温度 (24.0  $\pm$  1.0 $^{\circ}$ C)、湿度 (45 $\pm$ 10%) とともに一定の恒温動物室において、個別ケージ (260  $\times$  382  $\times$  200 mm、1 ケージ 3 匹) に収容し、12 時間の明暗周期で飼育をおこない、飲料水は水道水を自動供給装置によって与えた。今回の研究は愛知学院大学動物実験委員会による動物実験倫理委員会審査規定に基づき承認され、愛知学院大学歯学部動物実験実施規定に従って行われた (動物実験計画承認番号: AGUD429 号)。

### 2. 実験的歯周炎の誘導

5 週齢の雄性 SD ラットを、コントロール群と歯周炎群の 2 群に分け、三種混合麻酔 (塩酸メドトミジン (Meiji Seika ファルマ, 東京)、ミダゾラム (アステラス製薬, 東京)、酒石酸ブトルファンール (Meiji Seika ファルマ) 下で、上顎両側第二臼歯の歯頸部に縫合用ナイロン糸 (3-0 Surgilon; Tyco Healthcare, ニュージャージー, アメリカ) 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 SD ラット対照群 (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 CO<sub>2</sub> により屠殺した。左右側上顎を採取し、病理組織学的解析および 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、RNA が RNase により分解されるのを阻止するため、RNA protect Tissue Reagent (Qiagen, ヒルデン, ドイツ) に浸漬後、-80°C にて保存を行った。

#### 4. Micro CT による歯槽骨の撮像

4%パラホルムアルデヒドで固定した左側上顎骨に対しマイクロ CT (R<sub>m</sub>CT ; リガク, 東京) 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。撮影条件は管電流 88mA、管電圧 90kV、撮影時間 2 分間とし、50 $\mu$ m の幅で断層撮影を行った。撮影した画像は画像解析ソフト TRI/3D-BON (ラトックシステム, 東京) を用い、第二臼歯部の三次元画像を再構築後、矢状断像を作成し、第二臼歯の近心頰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

免疫組織染色のために、右側上顎を 4%パラホルムアルデヒドで 12 時間固定し、その後水洗を行い、固定した歯槽骨を含む歯周組織を 10%EDTA で 5 週間脱灰した後、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 $\mu$ m 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 (ab196746, Abcam, ケンブリッジ, イギリス) と抗 MMP13 抗体 (GTX100665, Genetex, カルフォルニア, アメリカ) 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。蛍光免疫染色におけるネガティブコントロールには、Isotype Control (ウサギ IgG コントロールポリクローナル抗体、Proteintech, イリノイ, アメリカ) を使用した。蛍光免疫染色では、画像解析ソフトである Image J (National Institute of Health, メリーランド, アメリカ) 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) (ScienCell Research Laboratories, カルフォルニア, アメリカ) を購入し、10%ウシ胎児血清 (GIBCO Laboratories, ニューヨーク, アメリカ)、100U/mL ペニシリン、100 $\mu$ g/mL ストレプトマイシン添加のダルベッコ改変イーグル培地 (富士フィルム和光純薬, 大阪) を使用して、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37°C にて培養した。6 穴プレートに hGF (2.0 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/dish) を播種し、細胞が 6 割コンフルエントになった時点で無血清培養を一晩実施した後に *P. gingivalis* LPS (InvivoGen, カルフォルニア, アメリカ) またはヒトリコンビナント ANGPTL4 (4487-AN, R&D Systems, ミネソタ, アメリカ) 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 Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて、ラット歯肉組織および hGF から、total RNA を抽出した。total RNA の純度と濃度は、蛍光分光計 (NanoDrop®ND-1000; NanoDrop Technologies, デラウェア, アメリカ) を用いて、260nm と 280nm で吸光度を測定することにより評価した。total RNA より、ReverTraAce (TOYOBO, 東京) を用いて cDNA を合成した。qPCR は LightCycler 480 system (Roche Diagnostics, バーゼル, スイス) を用い解析した。TaqMan® Real-Time PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ, アメリカ) と TaqMan® Assay (Thermo Fisher Scientific) を使用し、ANGPTL1 (Hs00559786\_m1)、ANGPTL2 (Hs00169867\_m1)、ANGPTL4 (Hs01101127\_m1)、ANGPTL5 (Hs00736991\_m1)、Integrin $\alpha$ 1 (ITG1) (Hs00235006\_m1)、Integrin $\alpha$ 5

(ITGα5)(Hs01547673\_m1 ) 、 Integrin β1 (ITGβ1)(Hs01127536\_m1 ) 、 Integrin β5 (ITGβ5)(Hs00174435\_m1 ) 、 Toll-like receptor 2 (TLR2)(Hs01872448\_m1) 、 Toll-like receptor 4 (TLR4)(Hs00152939\_m1) 、 Inducible nitric oxide synthase (iNOS)(Hs01075529\_m1) 、 Tumor necrosis factor (TNF)(Hs00174128\_m1) 、 MMP1 (Hs00899658\_m1) 、 MMP8 (Hs01029057\_m1) 、 MMP10 (Hs00233987\_m1) 、 MMP13 (Hs00233992\_m1) をターゲット遺伝子として解析した。内在性コントロールは β-actin (HumanACTB4352935E, Thermo Fisher Scientific) を用い、相対的な mRNA 発現量を  $\Delta\Delta Ct$  法により算出した。

#### 8. Western blot 解析

刺激を行った hGF をフェニルメチルスルホニルフルオリドプロテアーゼ阻害剤からなる RIPA 溶解バッファ (Beyotime Institute of Biotechnology, 上海, 中国) で細胞溶解し、溶解液のタンパク質濃度を BSA 測定キット (Thermo Fisher Scientific) で測定した。同サンプルを SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, カルフォルニア, アメリカ) を用い電気泳動し、PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories) に転写した。メンブレンに対し 5% スキムミルクバッファを用い 1.5 時間室温でブロッキングした後、ウサギ抗ヒト ANGPTL4 抗体 (1:100; ab196746, Abcam)、ウサギ抗ヒト β-アクチン抗体 (1:2000; ab227387, Abcam) を PBS-T で希釈し 4°C で一晩インキュベートした。PBS-T で 3 回の洗浄後、ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G (1:2500; ab6721, Abcam) と Can Get Signal Solution (Thermo Fisher Scientific) を使用し 37°C で 1.5 時間インキュベートした後、ECL Plus Western Blotting Detection System (Cytiva, 東京) を用いて発光した。ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories) を使用しメンブレン撮影を行った後、Image J (National Institutes of Health) を用いて定量した。

#### 9. RNA 干渉 (siRNA)

siRNA のトランスフェクションは、70~80% コンフルエントの hGF に、HiPerFect (Qiagen) を用いて、ANGPTL4 siRNA (S103057691, Qiagen) および non-targeting control siRNA (1027310, Qiagen) の形質導入を行った。24 時間の形質導入後の細胞に、*P. gingivalis* LPS を用いて 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) 刺激後の、遺伝子発現変動を qPCR にて解析した。また細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、抗 MMP13 抗体 (Genetex) を用いて免疫組織染色を行った。

#### 10. 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差 (S.E.) で表した。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  $p < 0.05$  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

実験的歯周炎を誘発する為にラット上顎第二臼歯に外科用ナイロン糸で結紮を行った。結紮 2 週後にラットの上顎左側臼歯のマイクロ CT 撮影を行い、歯槽骨の吸収状態を確認した。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ていた。また、歯周組織における炎症性細胞浸潤を評価するために H-E 染色を行い評価したところ、対照群と比較し歯周炎群で歯肉組織への炎症性細胞の強い浸潤を認めた。

#### 2. 実験的歯周炎による歯肉の ANGPTL4 発現解析

実験的歯周炎を誘発した 2 週後に試料を採取し、歯肉における ANGPTL4 の産生を検討した。歯周組織における ANGPTL4 のタンパク発現は、組織切片の蛍光免疫染色により評価した。ANGPTL4 の発現は、歯周炎群において対照群と比較し増加していた。ImageJ による定量的評価では、歯周炎群におけ ANGPTL4 の発現量は、対照群と比較し 6.4 倍の有意な増加を認めた ( $p<0.001$ )。遺伝子発現解析の結果、歯肉における ANGPTL4 の mRNA 発現は、歯周炎群では対照群に比べて 6.6 倍の有意な増加を認めた ( $p<0.01$ )。

### 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 が hGF の ANGPTL 産生に影響を及ぼすかどうかを検討した。hGF を *P. gingivalis* LPS (100、250、500 ng/mL) で刺激し、4 時間後の ANGPTL4 遺伝子発現を検討したところ、100ng/mL の *P. gingivalis* LPS 刺激において ANGPTL4 の遺伝子発現が有意に増加することが観察された為、以降の実験では 100 ng/mL *P. gingivalis* LPS を刺激に用いた。*P. gingivalis* LPS はコントロールと比較して、ANGPTL4 の遺伝子発現を 2.2 倍 ( $p<0.01$ ) 有意に増加させたが、ANGPTL2 や ANGPTL5 の遺伝子発現には変化を認めなかった。次に、ANGPTL4 の受容体と考えられる ITG1 と ITG5 に関して評価を行ったが、*P. gingivalis* LPS はこれらの ANGPTL4 受容体発現に対して影響を与えなかった。また、LPS 認識に関与するレセプターである TLR2、TLR4 の遺伝子発現に関しても *P. gingivalis* LPS の影響を受けないことを確認した。炎症性サイトカインである iNOS、TNF- $\alpha$  に関しては *P. gingivalis* LPS の刺激により TNF- $\alpha$  は 2.8 倍 ( $p<0.001$ )、iNOS は 2.3 倍 ( $p<0.05$ ) の有意な遺伝子発現増加を認めた。次に *P. gingivalis* LPS による ANGPTL4 のタンパク発現変動を検討した。その結果、*P. gingivalis* LPS の 14 時間刺激により、ANGPTL4 のタンパク発現は対照群に比べ 3.8 倍 ( $p<0.01$ ) 有意に増加した。

### 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 ( $p<0.05$ )、MMP1、MMP8、MMP10 に関しては、変化を認めなかった。

### 5. 実験的歯周炎による歯肉の MMP13 の発現解析

実験的歯周炎が歯肉における MMP13 の発現を誘導するかどうかを検討した。実験的歯周炎を誘発した 2 週後の歯肉では MMP13 発現が増加しており、定量的解析の結果、歯肉における MMP13 のタンパク質発現は、対照群に比べ歯周炎群では 2.6 倍と有意に増加していた ( $p<0.01$ )。さらに、歯肉の MMP13 遺伝子発現は、歯周炎では対照群と比較して 2.8 倍有意に増加していた ( $p<0.001$ )。

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

*P. gingivalis* LPS 刺激による MMP 発現増加において ANGPTL4 が関与しているかを明らかにするため、ANGPTL4 siRNA を用いて hGF における ANGPTL4 をノックダウンし、以降の実験を行った。免疫組織学的染色により、*P. gingivalis* LPS は hGF における MMP13 の発現を増加させ、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。これらの結果は、*P. gingivalis* LPS が ANGPTL4 の発現増加を介して MMP13 の発現を誘導することを示唆している。

## 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。これまでの研究で、ANGPTL4 は炎症時や低酸素状態で、産生されることが示唆されているが、歯周炎における ANGPTL4 の関与と役割については解明されていない。本研究では、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。また、hGF に対する *P. gingivalis* LPS 刺激は、ANGPTL4 発現を有意に増加させた。さらに、*P. gingivalis* LPS 刺激 hGF では、ANGPTL4 を介して、MMP13 が産生される可能性が明らかになった。

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。hGF の役割は、歯肉結合組織におけるコラーゲン代謝だけでなく、免疫にも関与している。今回 hGF を用い、*P. gingivalis* LPS が ANGPTL4 とその受容体発現に影響を与えるかどうかを検討した。その結果、*P. gingivalis* LPS 刺激は hGF において ANGPTL4 の遺伝子およびタンパク質の発現を増加させた。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 はタンパク質分解酵素であり、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る。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。MMP は、創傷治癒や発生などの生理的プロセスにおいて重要な役割を担っていることが知られている。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。歯周病重症度が高くなるにつれて歯肉溝滲出液中の MMP1 濃度が上昇したという報告や、唾液中の MMP8 濃度が、健常者と比較して慢性歯周炎患者でより高いレベルが検出されたという報告がある。更に *P. gingivalis* に感染した口腔扁平上皮癌は、MMP1 および MMP10 の産生を増強することが示されている。MMP ファミリーで特に重要と考えられている MMP13 に関しては歯肉基底膜のラミニン 5 $\gamma$ 2 鎖などの細胞外マトリックス成分を切断することができる。MMP9 と MMP13 の歯肉溝滲出液濃度は、中等度以上の慢性歯周炎患者における歯周炎進行を診断するための有用なバイオマーカーである可能性が示唆されており、更に MMP13 に関しては、proMMP9 を活性化することが報告されている。MMP13 の発現は歯周炎の進行により産生される IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインにより増加する。今回の実験では、*in vivo* および *in vitro* の実験により、実験的歯周炎による ANGPTL4 の産生が MMP13 産生増加に関与している可能性が示唆された。実際、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。これはリコンビナント ANGPTL4 刺激が間葉系幹細胞の MMP13 遺伝子発現を増加させた以前の報告と一致する。今回 *P. gingivalis* LPS 刺激は、hGF における ANGPTL4 と MMP13 の遺伝子発現を増加させた。hGF において、siRNA を用い ANGPTL4 をノックダウンすると、*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。また、関節リウマチ患者における ANGPTL4 の発現は、病的な骨吸収と関連しているという報告もある。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。

本研究では、100 ng/mL *P. gingivalis* LPS の 4 時間刺激により hGF における ANGPTL4 遺伝子の発現が有意に増加したが、それ以上の濃度の *P. gingivalis* LPS では増加しなかった。一方、100 ng/mL *P. gingivalis* LPS は hGF の TLR2 および TLR4 の遺伝子発現に影響を与えなかった。以前の報告では、1 $\mu$ g/mL の *P. gingivalis* LPS で 24 時間刺激すると、ヒト歯根膜細胞の TLR4 の発現が増加することが示されている。別の研究では、0.1 または 1 $\mu$ g/mL の *P. gingivalis* LPS によりヒト口腔上皮細胞を 24 時間刺激しても TLR4 の発現は変化しないが、TLR2 の発現が有意に増加することが示された。これらの結果は、*P. gingivalis* LPS の作用が濃度、培養時間、細胞の種類によって異なることを示唆している。これまでの研究では、*P. gingivalis* LPS の刺激濃度範囲は 100 ng/mL から 50 $\mu$ g/mL までとさまざまであった。*P. gingivalis* LPS の血清濃度は不明であるが、歯周炎の歯肉における *P. gingivalis* LPS の局所濃度は、健常者の血清や歯肉における濃度よりも高いと考えられる。今回の研究では、先行研究を鑑みても、比較的低濃度である 100 ng/mL *P. gingivalis* LPS を使用して実験を行った。本研究において、我々は歯周炎における *P. gingivalis* LPS 刺激が ANGPTL4 を介して MMP13 を増加させる可能性を明らかにした。しかし、ANGPTL4 ノックアウト動物を用いた *in vivo* での実験は行っておらず、ANGPTL4 の歯周炎におけるより明確な役割に関しては、さらなる研究が必要である。

## V. 結論

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 刺激は歯肉線維芽細胞における 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、I型コラーゲンを分解し組織破壊を促進する MMP13 の発現を促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。