

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

大野 祐

論文題目

歯周病病態における歯肉上皮細胞に対する
Angiopoietin-like protein 2 の役割についての基礎
的検討

I. 緒言

歯周病は、*Porphyromonas gingivalis* を代表とする歯周病原細菌によって引き起こされる慢性炎症性疾患である。また歯周病は糖尿病や心臓血管疾患、がんといった慢性炎症を基盤とする疾患との関連性が報告されており、このような歯周病と全身疾患との関わりは、ペリオドンタルメディスンと総称され注目されている。

近年、慢性炎症を基盤病態とする疾患において Angiopoitein-like proteins (ANGPTLs) が注目されている。ANGPTLs はこれまでに8種類報告されており、その1つである ANGPTL2 は炎症反応の増悪や組織恒常性の維持に関与していることが知られている。また、現在 ANGPTL2 の受容体としては、炎症性サイトカインの産生に関与するインテグリン $\alpha 5\beta 1$ と免疫細胞活性の調節に関与する leukocyte immunoglobulin-like receptor B2 (LILRB2) が報告されている。さらに、ANGPTL2 の過剰発現は、糖尿病、動脈硬化、がんといった病態において、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ を介したオートクライン作用により、炎症を遷延化することで過剰な組織リモデリングを引き起こし、病態形成に関与すると報告されている。しかしながら、これまでに歯周病原細菌感染による慢性炎症性疾患である歯周病と ANGPTL2 との関連性についての報告はないため、本研究では歯周病病態における ANGPTL2 の役割を明らかにする基礎的研究として、歯肉上皮細胞株を用いて検討を行った。

II. 材料および方法

1. 被験者

被験者は、以下の要件を満たし、同意の得られた46名を対象とした。

- 1) 歯周病に影響を及ぼす全身疾患（糖尿病、骨粗鬆症など）がない
- 2) 5年以内に喫煙していない
- 3) 6ヶ月以内に抗菌薬を服用していない
- 4) 妊娠していない

46名のうち、6歯以上に6mm以上の Probing Pocket Depth (PPD) および6mm以上の Clinical Attachment Level (CAL) を認めた24名を歯周炎患者群とし、全顎的に PPD が3mm以下でプロービング時の出血が10%未満の22名を健常者群とした。なお、本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認のもとに行った（承認番号：383）。

2. 歯肉溝滲出液(GCF)の採取方法

GCF サンプル採取には吸湿採取法を用いた。GCF サンプルは被験者の単根歯の頬側近心、中央、遠心の3部位より採取した。

3. 歯肉上皮細胞の培養，刺激方法

ヒト口腔上皮細胞株である Ca9-22 細胞およびヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGECs) に対してリコンビナントヒト (rh) interferon (IFN)- γ (50 ng/ml) を添加し、over night 培養の後に *P.gingivalis* LPS (0-1 μ g/ml) 刺激を行った。

4. Real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

Ca9-22 細胞または HGECS より Total RNA を抽出し、18S rRNA、*ANGPTL2*、*IL1B*、*IL8*、*TNF*、*MMP2*、*MMP9*、*MMP13* プライマープローブを用い測定した。データ解析は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて行った。

5. Western Blot 解析

LPS 刺激を行った Ca9-22 細胞を融解し、サンプルを回収した。その後、*ANGPTL2* 抗体、 β -actin 抗体を用いてタンパク質発現量を検出した。

6. RNA 干渉 (siRNA)

TLR2、TLR4、*ANGPTL2*、control siRNA を Ca9-22 細胞に作用させ、形質導入後、細胞を播種し LPS 刺激を行った。

7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 解析

GCF サンプルまたは細胞培養上清を用いて、*ANGPTL2*、interleukin (IL)-1 β 、IL-8 および tumor necrosis factor (TNF)- α のタンパク質産生量を定量した。

8. フローサイトメトリー

LPS および rh*ANGPTL2* 刺激を行った Ca9-22 細胞に対して anti-CD282 phycoerythrin (PE)、anti-CD284 allophycocytin、anti-CD49e PE、anti-CD85d PE および isotype control 抗体にて染色を行い、解析した。

9. rh*ANGPTL2* 添加試験

Ca9-22 細胞の培養時に rh*ANGPTL2* (1-100 ng/ml) を添加し培養した。その後、培養上清および Total RNA を回収し、解析を行った。

10. インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体添加試験

Ca9-22 細胞に対して、LPS または rhANGPTL2 刺激の 1 時間前に 1 ng/ml 抗インテグリン $\alpha 5\beta 1$ モノクローナル抗体を添加して培養した。

その後、培養上清を回収し、解析を行った。

1 1. 統計学的解析

全てのデータは、平均値 \pm 標準偏差で表した。統計学的解析には統計解析ソフト SPSS ver.18 を用いた。検定には、one-way ANOVA と Bonferroni multiple comparison test を用い、危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。

III. 結果

1. 歯周炎患者と健常者の GCF 中における ANGPTL2 産生量

GCF 中の ANGPTL2 タンパク質量は、健常者群と比較し歯周炎患者群で有意に増加していた。

2. 歯肉上皮細胞における LPS 刺激による ANGPTL2 産生

Ca9-22 細胞に LPS 刺激を行ったところ、刺激濃度 30 ng/ml、刺激 24 時間後において ANGPTL2 mRNA 発現が最も亢進した。また HGECs に対しても同様の刺激を行ったところ、刺激後 24 時間をピークとした ANGPTL2 mRNA の有意な発現増強が認められた。さらに、LPS 刺激後、24、48 時間において ANGPTL2 タンパク質産生が増加した。

3. TLR2, TLR4 siRNA による ANGPTL2 産生への影響

TLR2 または TLR4 siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群に LPS 刺激を行ったところ、ANGPTL2 mRNA 発現の有意な抑制およびタンパク質産生の抑

制が認められた。

4. rhANGPTL2 刺激による炎症性サイトカインの産生

Ca9-22 細胞に rhANGPTL2 を添加したところ、10 ng/ml の刺激濃度において IL-1 β 、IL-8、TNF- α mRNA 発現増強およびタンパク質産生の有意な増加が認められた。また、この IL-1 β 、IL-8、TNF- α タンパク質産生の増加は、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ の中和抗体添加により rhANGPTL2 刺激前と同程度まで抑制された。一方 LILRB2 に関しては、Ca9-22 細胞において発現は認められなかった。

5. ANGPTL2 siRNA による炎症性サイトカイン産生への影響

ANGPTL2 siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群において LPS 刺激を行ったところ、IL-1 β 、IL-8、TNF- α mRNA 発現およびタンパク質産生において有意な抑制が認められた。

6. インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体による炎症性サイトカイン産生への影響

Ca9-22 細胞にインテグリン $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体を添加し、LPS 刺激を行ったところ、IL-1 β 、IL-8、TNF- α のタンパク質産生は有意に抑制された。

7. rhANGPTL2 刺激による MMPs の遺伝子発現

Ca9-22 細胞に rhANGPTL2 刺激を行ったところ、刺激後 24 時間をピークとした MMP2, MMP9, MMP13 の mRNA 発現の有意な増強が認められた。

IV. 考察

本研究において、健常者と比較して歯周炎患者の GCF 中における ANGPTL2 レベルの有意な増加がはじめて確認された。さらに歯周炎局所において ANGPTL2 が産生されるかについて確認するため、歯肉上皮細胞に歯周病原因子である *P.gingivalis* LPS 刺激を行ったところ、ANGPTL2 の産生が有意に増加し、またその経路としては TLR2 および TLR4 を介することが示唆された。

歯肉上皮細胞において、RNA 干渉により ANGPTL2 をノックダウンさせた場合および中和抗体によりインテグリン $\alpha 5\beta 1$ をブロックした場合において、LPS 刺激により増強されていた炎症性サイトカイン産生が部分的に抑制された。これらの結果より、これまでに明らかにされている炎症性サイトカイン産生経路とは別経路として、歯肉上皮細胞より産生される ANGPTL2 または血流を介した全身性の ANGPTL2 が、歯周病の進行過程において、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ を介してオートクラインに作用にする事により、歯周炎局所において炎症を遷延化させる可能性が示唆された。さらには歯周炎局所にて産生された ANGPTL2 が血流を介して種々の全身疾患に影響を及ぼすことが考えられるが、これらを明らかにするためには、全身疾患の有無、歯周病の有無を考慮し、GCF と血清中の ANGPTL2 濃度との相関関係を検討する必要がある。

V. まとめ

ANGPTL2 は歯周炎における炎症反応を制御し、歯周組織破壊に関与する

(論文内容の要旨)

No. 7

愛知学院大学

事が示唆された。また歯周病と全身疾患との関連性を結びつける1因子として機能する可能性が示唆されたため、今後さらなる検討が必要と考えられる。