

学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 号	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	

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

大野 祐

愛知学院大学歯学部歯周病学講座
(主任・指導：三谷 章雄 教授)

愛知学院大学大学院歯学研究科博士（歯学）学位申請論文

Fundamental study on the role of Angiopoietin-like protein 2
on human gingival epithelial cells in pathogenesis of periodontal disease

Tasuku Ohno

Department of Periodontology,
School of Dentistry, Aichi Gakuin University
(Chief and Director : Prof. Akio Mitani)

The thesis submitted to the Graduate Faculty, School of Dentistry,
Aichi Gakuin University for Ph.D. degree

本論文の基盤論文は、次のような論文です。

タイトル : Angiopoietin-like protein 2 regulates *Porphyromonas gingivalis*
lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival
epithelial cells

掲載誌名 : PLoS One : 2017 Sep 21 ; 12 (9) : e0184825.

著 者 : Tasuku Ohno¹⁾, Genta Yamamoto¹⁾, Jun-ichiro Hayashi¹⁾,
Eisaku Nishida¹⁾, Hisashi Goto¹⁾, Yasuyuki Sasaki¹⁾,
Takeshi Kikuchi¹⁾, Mitsuo Fukuda¹⁾, Yoshiaki Hasegawa²⁾,
Makio Mogi³⁾, and Akio Mitani¹⁾

所 属 : ¹⁾ Department of Periodontology, School of Dentistry,
Aichi Gakuin University, 2-11 Suemori-dori,
Chikusa-ku, Nagoya 464-8651, Japan

²⁾ Department of Microbiology, School of Dentistry, Aichi
Gakuin University, 1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku,
Nagoya 464-8650, Japan

³⁾ Department of Integrative Education of Pharmacy,
School of Pharmacy, Aichi Gakuin University,
1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya
464-8650, Japan

目 次

I. 緒 言	1
II. 材料および方法	1
1. 被験者	1
2. 歯肉溝滲出液 (GCF) の採取方法	1
3. 歯肉上皮細胞の培養、刺激方法	2
4. Real-time quantitative PCR (qPCR) 解析	2
5. Western Blot 解析	2
6. RNA 干渉 (siRNA)	2
7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 解析	2
8. フローサイトメトリー	3
9. rhANGPTL2 添加試験	3
10. インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 中和抗体添加試験	3
11. 統計学的解析	3
III. 結 果	3
1. 歯周炎患者と健常者の GCF 中における ANGPTL2 産生量	3
2. 歯肉上皮細胞における <i>P. gingivalis</i> LPS 刺激による ANGPTL2 産生	3
3. TLR2, TLR4 siRNA による ANGPTL2 産生への影響	4
4. rhANGPTL2 刺激による炎症性サイトカインの産生	5
5. ANGPTL2 siRNA による炎症性サイトカイン産生への影響	7
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	7
7. rhANGPTL2 刺激による MMPs の遺伝子発現	8
IV. 考 察	8
V. ま と め	11
謝 辞	11
文 献	11

I. 緒 言

歯周病は、歯周病原細菌感染による上皮性付着の喪失や歯肉結合組織、歯根膜、歯槽骨の破壊を特徴とし、最終的には歯の喪失にいたる慢性炎症性疾患である^{1, 2)}。歯周病の病態において、歯周組織構成細胞である歯肉上皮細胞は、細菌感染に対して最初のバリアとして働き、感染防御を担っていることが知られている³⁾。歯周病原細菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* はグラム陰性偏性嫌気性菌であり、主な病原因子としてリポポリサッカライド (LPS) を有しているが、歯肉上皮細胞において、*P.gingivalis* LPS は Toll-like receptor (TLR) 4 および TLR2 を介して炎症反応を誘導することが報告されている⁴⁾。また歯周病は、口腔局所の感染症としてのみでなく、細菌あるいは炎症性サイトカインなどの供給源として、末梢の様々な臓器に影響を及ぼすと考えられている。臨床研究において糖尿病、心臓血管疾患、メタボリックシンドローム、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いる⁵⁻¹⁰⁾。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おり、全身と歯周局所を繋ぐ因子についてのエビデンスの集積がすすめられている。

近年、慢性炎症を基盤病態とする疾患において Angiopoietin-like proteins (ANGPTLs) が注目されている。ANGPTLs は血管新生や幹細胞の維持に重要な機能を有するアンジオポエチンと同様に、フィブリノーゲン様ドメインとコイルドコイルドメインという2つの構造的特徴を持ち、一方でアンジオポエチンの受容体である Tie1 および Tie2 とは結合しない分泌型糖タンパク質である¹¹⁾。ANGPTLs はこれまでに8種類報告されており¹²⁾、その1つである ANGPTL2 は、炎症反応の増悪だけでなく、組織の恒常性維持にも関与していることが知られている^{11, 13)}。現在、ANGPTL2 の受容体としてフィブロネクチンを認識するインテグリン $\alpha 5\beta 1$ と MHC クラス I 分子を認識する leukocyte immunoglobulin-like receptor B2 (LILRB2) が報告されているが、主にインテグリン $\alpha 5\beta 1$ が炎症性サイトカインの産生に、LILRB2 が免疫細胞活性の調節に関与すると考えられている^{14, 15)}。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 $\alpha 5\beta 1$ を介してオートクラインまたはパラクラインに作用し、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^{16, 17)} が、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は、これまでに報告はない。そこで、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ための基礎的研究として、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、2015年1月1日から2016年12月31日の期間に、愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科に来院し、以下の要件を満たし、本研究の主旨を理解した上で、書面を用い同意の得られたもの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、骨粗鬆症等）に罹患していない
- 2) 過去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

上記の条件を満たしている者で、6歯以上に6mm以上の Probing Pocket Depth (PPD) および6mm以上の Clinical Attachment Level (CAL) を有する者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%未満の者を健常者群とした。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

歯肉溝滲出液 (GCF) サンプル採取には吸湿採取法を用いた。被験者の単根歯の頬側の近心、中央、遠心のポケットの3部位に対してロールワッテで簡易防湿し、唾液の混入を防いだ後、綿球にて歯肉縁上プラークを可及的に除去した。スリーウェイシリンジで軽く乾燥後、ペーパーストリップス (Oraflow, NY, USA) を歯肉溝に挿入、30秒間静置、GCFを吸湿採取し、Periotron8000 (Oraflow) を用いて GCF サンプル量を定量した。採取後、ペーパーストリップスに0.5%牛血清アルブミン (BSA; Sigma-Aldrich, MO, USA) 入りのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 日本製薬株式会社、東京) 100 μ l を加え、20分間連続的に振盪し、ペーパーストリップスに含まれる GCF を十分に PBS に溶出させ、可及的に GCF を含む PBS を回収し、10分間 10,000 rpm にて遠心処理後、その上清のみを GCF サンプルとした。なお、GCF サンプルは、測定までの間 -80°C にて保存した。

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 (RIKEN BRC Cell Bank, 筑波) を 10% 牛胎仔血清 (Hyclone Laboratories, Inc., UT, USA)、ペニシリン (100 μ g/mL, GIBCO-BRL, NY, USA) 添加の Dulbecco's modified Eagle's medium を用い、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ インキュベーターにて 3 日間培養、またヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGECs; CELLnTEC, Bern, Switzerland) を CnT-Prime epithelial culture medium (CELLnTEC) を用い 5 日間培養した。その後、12-well プレートに 1well あたり 1×10^5 cells/ml で播種し、48 時間培養した後、リコンビナント ヒト (rh) interferon (IFN) - γ (50ng/ml; PeproTech Rocky Hill, NJ, USA) を添加し、over night 培養の後に *P.gingivalis* 1690 (penta-acylated lipid A) LPS (0-1 μ g/ml; Astarte Biologics, PA, USA) 刺激を行った。

4. Real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

回収した細胞より total RNA を NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel Inc., PA, USA) を用いて抽出した。total RNA の純度および濃度評価は、Fluorospectrometer (NanoDrop[®] ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., DE, USA) を用い A230/A260、A260/A280 比を測定して評価した。その後、通法に従い Superscript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, USA) を用いて cDNA を合成し、TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) および TaqMan[®] Gene Expression Assays *ANGPTL2* (Hs00171912_m1)、*IL1B* (Hs01555410_m1)、*IL8* (Hs00174103_m1)、*TNF* (Hs00174128_m1)、*MMP2* (Hs01548727_m1)、*MMP9* (Hs00957562_m1)、*MMP13* (Hs00233992_m1)、18S rRNA (Hs99999901_s1) (Applied Biosystems) を用い、95 $^{\circ}$ C 1 分、52 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 30 秒における 45 サイクルの反応を、ABI Prism7000 (Applied Biosystems) にて測定した。データ解析は Ct 値の差から相対定量を行う $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて行った。すなわち、内在性コントロールとして 18S rRNA 特異的プライマーを用い、*ANGPTL2*、*IL1B*、*IL8*、*TNF*、*MMP2*、*MMP9* および *MMP13* の遺伝子発現について次のように計算し、解析した。標的遺伝子の相対的発現量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 、 $\Delta\Delta$ Ct = [(標的遺伝子の Ct 値 - 内在性コントロール (18S rRNA) の Ct 値 (実験群)) - (標的遺伝子の Ct 値 - 内在性コントロール (18S rRNA) の Ct 値 (コントロー

ル群))]。

5. Western Blot 解析

刺激を行った Ca9-22 細胞を、1% protease inhibitor cocktail (ナカライテスク、京都) を添加した CellyticM (Sigma-Aldrich) を用い、細胞を融解しサンプルを回収した。同サンプルを SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用い電気泳動し、PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories) に転写した後、1% BSA (Sigma-Aldrich) 入り Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T; Bio-Rad Laboratories) を用いて 1 時間ブロッキング処理した。その後、ウサギ抗ヒト ANGPTL2 抗体 (Proteintech Group, IL, USA)、マウス抗ヒト β -actin 抗体 (Cell Signaling Technologies, MA, USA) を TBS-T で希釈し、4 $^{\circ}$ C で over night 反応させた。そして、TBS-T で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体 (Cell Signaling Technologies) およびヤギ抗マウス抗体 (Cell Signaling Technologies) を TBS-T で希釈した溶液で 1 時間反応させた。その後、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE ヘルスケアバイオサイエンス、東京) で検出した。

6. RNA 干渉 (siRNA)

Ca9-22 細胞を 6-well プレート上に 1×10^6 cells/well にて播種し、24 時間培養した。その後、TLR2、TLR4、ANGPTL2 siRNA (Stealth Select RNAi) および control siRNA (RNAi Negative Control Medium; Invitrogen) と Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を混和し、24 時間細胞に作用させ、同細胞へ形質導入した。形質導入後、細胞を回収し、12-well プレート上に 1×10^5 cells/well にて、TLR2、4 または ANGPTL2 が RNA 干渉された細胞を播種し、*P.gingivalis* LPS 刺激を行った。

7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 解析

ANGPTL2、interleukin (IL) -1 β 、IL-8 および tumor necrosis factor (TNF) - α のタンパク質産生量は、GCF サンプルまたは細胞培養上清を用い、Kit を用いた ELISA 法にて定量した (ANGPTL2: ANGPTL2 enzyme-linked immunosorbent assay ELISA kit (免疫生物研究所、群馬)、IL-1 β 、IL-8、TNF- α : Quantikine ELISA kit (R&D Systems, MN, USA))。

8. フローサイトメトリー

刺激を行った Ca9-22 細胞に対して anti-CD282 phycoerythrin (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)、anti-CD284 allophycoerythrin (Miltenyi Biotec)、anti-CD49e phycoerythrin (Miltenyi Biotec)、anti-CD85d phycoerythrin (Miltenyi Biotec) および isotype control antibody (Miltenyi Biotec) にて染色を行い、MACSQuant analyzer および MACSQuantify software version 2.4 (Miltenyi Biotec) を用いて解析を行った。

9. rhANGPTL2 添加試験

Ca9-22 細胞の培養時に rhANGPTL2 (1-100ng/ml; ProSpec, Ness-Ziona, Israel) を添加し、1-12 時間培養した。その後、培養上清および Total RNA を前述に従い回収し、qPCR にて IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、matrix metalloproteinase (MMP) 2、MMP9、MMP13 の遺伝子発現を、また ELISA 法にて IL-1 β 、IL-8、TNF- α のタンパク質産生を測定した。

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、*P.gingivalis* 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 (Millipore, Darmstadt, Germany) を添加して培養した。*P.gingivalis* LPS 刺激 24 時間後または rhANGPTL2 刺激 9 時間後に培養上清を回収し、IL-1 β 、IL-8、TNF- α のタンパク質定量を ELISA 法にて行った。

11. 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 (SPSS Japan Inc., 東京) 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

歯周炎と ANGPTL2 の関連性について検討するにあたり、まず歯周組織局所に ANGPTL2 が存在しているか確認するために、22 名の健常者と 24 名の歯周炎患者より採取した GCF 中の ANGPTL2 タンパク質量を比較した。その結果、GCF 中の歯周炎患者群

ANGPTL2 タンパク質量が、健常者群よりも有意に増加していることが確認された (図 1)。



図 1. GCF 中の ANGPTL2 タンパク質産生量
健常者群 (n=22) と歯周炎患者群 (n=24) における ANGPTL2 のタンパク質産生量の比較。バーは平均値 \pm 標準偏差を表している。
* $p < 0.05$ vs. 健常者群

2. 歯肉上皮細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激による ANGPTL2 産生

GCF 中にて ANGPTL2 が検出されたため、歯周炎局所において ANGPTL2 が産生されるかについて検討を行うこととした。初期の歯周病原細菌感染状態を想定し、Ca9-22 細胞に rhIFN- γ で前処理後、*P.gingivalis* LPS 刺激を行ったところ、30 ng/ml の *P.gingivalis* LPS 刺激において ANGPTL2 mRNA 発現が最も亢進していた (図 2A)。次に 30 ng/ml *P.gingivalis* LPS の刺激時間による変化を確認したところ、刺激後 24 時間をピークとした ANGPTL2 mRNA 発現の有意な発現増強が認められた (図 2B)。また HGECSs に対しても同様の刺激 (30 ng/ml *P.gingivalis* LPS) 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 (図 2C)。さらに、タンパク質産生において *P.gingivalis* LPS (30 ng/ml) 刺激後、24、48 時間において ANGPTL2 タンパク質産生が増加し (図 2D)、Ca9-22 細胞および HGECSs 培養上清中の ANGPTL2 タンパク質産生も同様に 24、48 時間において有意なタンパク質産生の増加が認められた (図 2E、F)。以上の結果より、*P.gingivalis* LPS 刺激に対する Ca9-22 細胞および HGECSs の反応において、同様の傾向が認められたため、後の実験において Ca9-22 細胞を用い検討した。

基盤論文参照

(PLoS One : 2017 Sep 21 ; 12 (9) : e0184825.)

- 図 2. Ca9-22 細胞および HGECs における *P.gingivalis* LPS 刺激による ANGPTL2 産生
- A、B) Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激濃度の変化 (0 ~ 1000 ng/ml; 24h) または時間の変化 (30 ng/ml; 0 ~ 48h) による ANGPTL2 mRNA 遺伝子発現。平均値 ± 標準偏差, n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. コントロール群
- C) HGECs における *P.gingivalis* LPS 刺激 (30 ng/ml) による各時間毎の ANGPTL2 mRNA 遺伝子発現。平均値 ± 標準偏差, n=3, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. コントロール群
- D) Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激 (30 ng/ml) による ANGPTL2 タンパク質産生 (60 kDa)
- E) Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激 (30 ng/ml) による細胞培養上清中の ANGPTL2 タンパク質産生量。平均値 ± 標準偏差, n=4, ** $p < 0.01$ vs. コントロール群
- F) HGECs における *P.gingivalis* LPS 刺激 (30 ng/ml) による細胞培養上清中の ANGPTL2 タンパク質産生量。平均値 ± 標準偏差, n=4, * $p < 0.05$ vs. コントロール群

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

P.gingivalis LPS 刺激により ANGPTL2 が産生されることが確認されたが、*P.gingivalis* LPS は TLR4 のみならず TLR2 にも反応するため、この ANGPTL2 の産生はどちらの TLR を介したのかを調べるために、TLR2 または TLR4 をノックダウンし、*P.gingivalis* LPS 刺激における ANGPTL2 産生の変化を確認した。control siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群 (コントロール群) と比較し TLR2 または TLR4 siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群 (TLR2 および TLR4 ノックダウン群) において、TLR2、TLR4 それぞれの発

現が低下していた (図 3A、B)。次にコントロール群および TLR2、TLR4 ノックダウン群に対して rhIFN- γ にて前処理後、*P.gingivalis* LPS (30 ng/ml) 刺激を行ったところ、コントロール群と比較して TLR2、TLR4 ノックダウン群において ANGPTL2 mRNA 発現の有意な抑制が認められた (図 3C、D)。ANGPTL2 タンパク質産生においても TLR2、TLR4 ノックダウン群におけるタンパク質産生が抑制されていた (図 3E、F)。また ANGPTL2 mRNA 発現ならびにタンパク質産生の抑制効果は、TLR2 ノックダウンのほうが大きかった。

基盤論文参照

(PLoS One : 2017 Sep 21 ; 12 (9) : e0184825.)

- 図 3. siTLR2 または siTLR4 を行った Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激による ANGPTL2 産生
- A、B) siTLR2 または siTLR4 を行った Ca9-22 細胞における TLR2 または TLR4 の発現レベルの変化
- C、D) siTLR2 または siTLR4 を行った Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激 (30 ng/ml) による ANGPTL2 遺伝子発現。平均値 ± 標準偏差、n=3、* $p < 0.05$ vs. コントロール群
- E、F) siTLR2 または siTLR4 を行った Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激 (30 ng/ml) による ANGPTL2 タンパク質産生 (60kDa)

4. rhANGPTL2 刺激による炎症性サイトカインの産生

上記結果より、Ca9-22 細胞において、*P.gingivalis* LPS 刺激により TLR2 および TLR4 を介して ANGPTL2 が産生されることが確認できた。そこで次に ANGPTL2 が歯肉上皮細胞である Ca9-22 細胞にどのような影響を及ぼすか確認した。Ca9-22 細胞に rhANGPTL2 (0-100 ng/ml) を添加し、1 時間後の IL-1 β 、IL-8、TNF- α mRNA 発現を解析したところ、10 ng/ml の rhANGPTL2 添加により、これらすべての mRNA 発現は有意に増加していた (図 4A-C)。次にタンパク質レベルで確認したところ、rhANGPTL2

(10 ng/ml) 刺激 9 時間後において、IL-1 β 、IL-8、TNF- α タンパク質産生は有意に増加していた (図 4D-F)。ANGPTL2 の受容体は、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ と LILRB2 が報告されているが、その 1 つであるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の中和抗体を添加することで、rhANGPTL2 (10 ng/ml) 刺激により亢進していた IL-1 β 、IL-8、TNF- α タンパク質産生は有意に抑制された (図 4G-I)。もう 1 つの ANGPTL2 受容体である LILRB2 に関しては、無刺激あるいは *P.gingivalis* LPS、rhANGPTL2 刺激したいずれの Ca9-22 細胞においても LILRB2 の発現は認められなかった (図 5A-C)。



図 4. Ca9-22 細胞における rhANGPTL2 刺激による炎症性サイトカイン産生

- A-C) rhANGPTL2 刺激濃度 (0 ~ 100 ng/ml; 1h) における炎症性サイトカイン (IL-1 β (A)、IL-8 (B)、TNF- α (C)) の遺伝子発現。平均値 \pm 標準偏差、n=3、* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001 vs. コントロール群
- D-F) rhANGPTL2 刺激 (10 ng/ml) における炎症性サイトカイン (IL-1 β (D)、IL-8 (E)、TNF- α (F)) のタンパク質産生。平均値 \pm 標準偏差、n=3、** p < 0.01、*** p < 0.001 vs. コントロール群
- G-I) インテグリン α 5 β 1 中和抗体を添加した Ca9-22 細胞における rhANGPTL2 刺激 (10 ng/ml) による炎症性サイトカイン (IL-1 β (G)、IL-8 (H)、TNF- α (I)) のタンパク質産生。N.D: 未検出、平均値 \pm 標準偏差、n=3、* p < 0.05



図 5. Ca9-22 細胞における LILRB2 の発現レベル

- A) 無刺激時の LILRB2 の発現レベル B) *P.gingivalis* LPS 刺激時の LILRB2 の発現レベル
C) rhANGPTL2 刺激時の LILRB2 の発現レベル

5. ANGPTL2 siRNA による炎症性サイトカイン産生への影響

次に、内在性の ANGPTL2 が Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生に対してどのような影響を及ぼすかを、ANGPTL2 をノックダウンすることで検討した。control siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群（コントロール群）と比較し、ANGPTL2 siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群（ANGPTL2 ノックダウン群）において、ANGPTL2 タンパク質産生が著明に低下している事を確認した（図 6A）。さらに RNA 干渉を行った Ca9-22 細胞に rhIFN- γ の前処理を行い、*P.gingivalis* LPS (30 ng/ml) 刺激を行ったところ、コントロール群と比較して ANGPTL2 ノックダウン群において IL-1 β 、IL-8、TNF- α mRNA 発現は有意に抑制され

ていた（図 6B-D）。またタンパク質産生においてもコントロール群と比較して ANGPTL2 ノックダウン群において有意な抑制が認められた（図 6E-G）。

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

さらに菌周炎局所において、LPS 刺激された歯肉上皮細胞由来の ANGPTL2 がオートクラインに作用し、炎症性サイトカイン産生に関与するかどうかを検討した。すなわち、Ca9-22 細胞に rhIFN- γ にて前処理後、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 中和抗体を添加し、*P.gingivalis* LPS (30 ng/ml) 刺激を行い、炎症性サイトカイン産生を調べた。その結果、IL-1 β 、IL-8、TNF- α のタンパク質産生は有意に抑制されることが確認された（図 7A-C）。

基盤論文参照

(PLoS One : 2017 Sep 21 ; 12 (9) : e0184825.)

図 6. ANGPTL2 ノックダウンを行った Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生

- A) RNA 干渉を行った際の ANGPTL2 のタンパク質産生 (60 kDa)
- B-D) ANGPTL2 ノックダウンを行った Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激 (30 ng/ml) 24 時間後の炎症性サイトカイン (IL-1 β (B)、IL-8 (C)、TNF- α (D)) の遺伝子発現。平均値 \pm 標準偏差、n=3、** $p < 0.01$ vs. コントロール群
- E-G) ANGPTL2 ノックダウンを行った Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激 (30 ng/ml) 24 時間後の炎症性サイトカイン (IL-1 β (E)、IL-8 (F)、TNF- α (G)) のタンパク質産生。平均値 \pm 標準偏差、n=4、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. コントロール群

基盤論文参照

(PLoS One : 2017 Sep 21 ; 12 (9) : e0184825.)

図7. インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体を添加した Ca9-22 細胞における *P.gingivalis* LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生

A-C) インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 中和抗体を添加した Ca9-22 細胞に *P.gingivalis* LPS 刺激 (30 ng/ml) 24 時間時の炎症性サイトカイン (IL-1 β (A)、IL-8 (B)、TNF- α (C)) タンパク質産生。N.D: 未検出、平均値 \pm 標準偏差、n=4、* $p < 0.05$

7. rhANGPTL2 刺激による MMPs の遺伝子発現

さらに歯肉上皮細胞により産生された ANGPTL2 が、炎症性サイトカイン以外のメディエーター産生に関与し、組織破壊に関与するかを検討した。すなわち Ca9-22 細胞の ANGPTL2 刺激による MMPs の遺伝子発現を検討した。Ca9-22 細胞に rhANGPTL2 刺激 (100 ng/ml) 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 (図 8A-C)。

IV. 考 察

GCF 中には、サイトカイン (ILs、TNF- α 、オステオプロテゲリン) や脂質 (プロスタグランジン E2 やロイコトリエン) といった歯周病の進行または活性に関与する

様々な物質が検出されており^{18, 19)}、そのいくつかは歯周病のマーカーとしての有用性が確認されている^{20, 21)}。しかし、これまでに慢性炎症を基盤病態とする疾患において注目されている ANGPTL2 と歯周病との関係性についての報告はない。そこで本研究では、歯周炎患者の GCF 中において、ANGPTL2 が検出されるかの検討を行った。その結果、健常者ならびに歯周炎患者の GCF において、ともに ANGPTL2 が検出されることされることがはじめてわかった。さらに健常者と比較し歯周炎患者の GCF において、ANGPTL2 レベルの有意な増加が確認された。次に歯周炎局所において ANGPTL2 が産生されるか否か、また ANGPTL2 が歯周組織に及ぼす影響についてヒト歯肉上皮細胞を用い基礎的検討を行った。

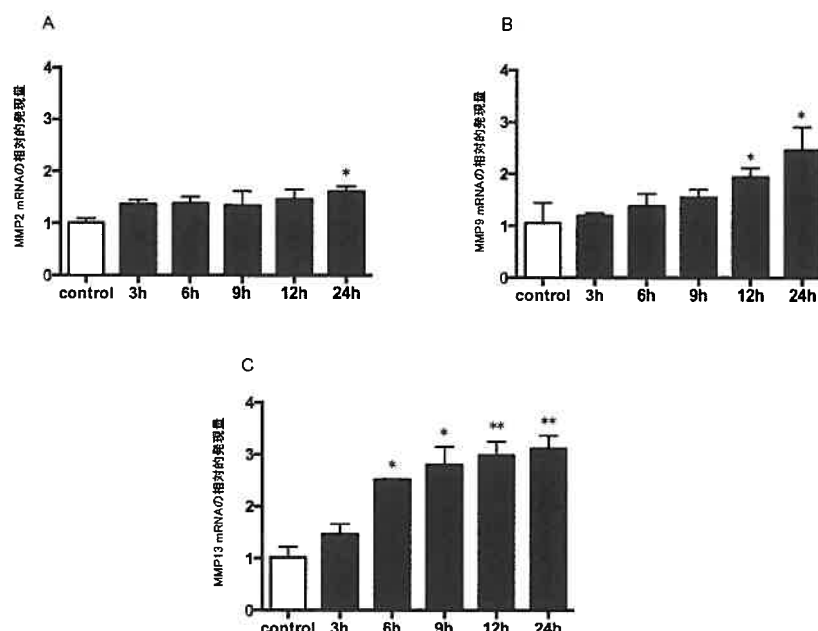


図8. Ca9-22細胞におけるrhANGPTL2刺激によるMMPsの遺伝子発現
A-C) rhANGPTL2刺激(100 ng/ml)におけるMMP2 (A)、MMP9 (B)、MMP13 (C)の
mRNA発現。平均値 ± 標準偏差、n=3、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. コントロール群

これまでに、ヒト網膜色素上皮細胞において *Escherichia coli* LPS 刺激による ANGPTL2 産生誘導が報告されている²²⁾。本研究では、ヒト歯肉上皮細胞からの ANGPTL2 産生について検討したところ、歯周病原因子である *P.gingivalis* LPS 刺激により、ANGPTL2 mRNA およびタンパク質レベルの有意な増加が確認された。これらの結果より、歯周病の発症および進行において歯肉上皮細胞から ANGPTL2 が産生される可能性が示唆された。また現在までに歯周組織における ANGPTL2 シグナル伝達カスケードの存在の報告はない。そこで炎症や免疫反応の調節に関与している TLR に着目し検討を行うこととした。TLRs は、様々な細胞表面または細胞内小胞上に発現している。TLR2 および TLR4 は、これまでに歯周組織構成細胞においても発現が確認されており、歯周組織の免疫応答に関与していることが報告されている^{23, 24)}。また *P.gingivalis* LPS の構成成分である lipid A は、構造の違いにより TLR2 および TLR4 のリガンドとして特異的に作用し、炎症性サイトカインを産生することも報告されている²⁵⁾。そこで本研究において TLR2 および TLR4 ノックダウンを行ったところ、両ノックダウン群とも ANGPTL2 タンパク質産生の有意な抑制を示した。さ

らに、TLR2 ノックダウンは、TLR4 ノックダウンに比べより強い ANGPTL2 タンパク質産生の抑制を示した。したがって、歯肉上皮細胞における *P.gingivalis* LPS による ANGPTL2 産生は、TLR2 および TLR4 を介することが示され、その経路としては TLR2 が優位であることが示唆された。

ANGPTL2 の受容体としてインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ と LILRB2 が知られているが、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ については、ヒト血管内皮細胞および末梢血単核細胞において ANGPTL2 がそれに結合することで、様々な炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告されている¹⁴⁾。そのため、ANGPTL2 レベルの上昇がインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介して作用し、炎症を遷延化させる可能性が考えられている。本研究において、Ca9-22 細胞には、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ が恒常的に発現していることが確認できた。そこで、ANGPTL2 の受容体であるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の中和抗体によりブロックし検討したところ、rhANGPTL2 刺激においては、亢進していた炎症性サイトカインがコントロール群と同程度まで抑制された。しかしながら *P.gingivalis* LPS 刺激においては、亢進していた炎症性サイトカインの産生抑制が部分的であった(図4G-I、図7A-C)。これらの結果より、これまでに明らかにされて

いる歯肉上皮細胞における TLR2,4 を介した *P.gingivalis* LPS による直接的な炎症性サイトカイン産生経路とは別に、*P.gingivalis* LPS によって誘導された ANGPTL2 が、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介してオートクラインに作用することで間接的に炎症性サイトカインを産生する経路が存在し、炎症の遷延化に関与する可能性が示唆された。一方、ANGPTL2 のもう 1 つの受容体として報告されている LILRB2 に関しては、Ca9-22 細胞に発現が認められなかった。すなわち LILRB2 は、Ca9-22 細胞における ANGPTL2 が関連した炎症性サイトカインの産生に関与していないことが示唆された (図 5A-C)。

歯周病の病態において考えられる ANGPTL2 の関与について図 9 に示す。本研究では、歯周病病態での歯肉上皮細胞における *P.gingivalis* LPS による炎症性サイトカインの産生の主要経路として考えられている経路とは異なる ANGPTL2 を介する新たな炎症性サイトカインの産生経路を発見した。さらに、歯周病の進行過程において、産生された ANGPTL2 がインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介してオートクラインに作用する事により、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。また ANGPTL2 は健常者の血液中に恒常的に存在し、糖尿病や動脈硬化疾患を有している患者において血中濃度が上昇していることが報告されており²⁶⁾、全身性の

ANGPTL2 が歯周炎局所に及ぼす影響も考えられる。歯周病と全身疾患との関係のなかでも、歯周病と糖尿病との間には双方向の関係が存在し、全身および歯周炎局所において産生される TNF- α がインスリン抵抗性に関与することが知られている²⁷⁾。本研究において ANGPTL2 は GCF 中で検出され、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、歯周炎局所にて炎症性サイトカイン産生や MMPs の活性を引き起こし、歯周組織の破壊に関与すると推測される。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。ANGPTL2 が歯周病と全身疾患との関連性を繋ぐ因子となり得るかに、今後さらなる研究が必要である。

V. まとめ

ANGPTL2 は歯周病における炎症反応を制御し、歯周組織破壊に関与する事が示唆された。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。

基盤論文参照

(PLoS One : 2017 Sep 21 ; 12 (9) : e0184825.)

図 9. 歯肉上皮細胞における ANGPTL2 を介した炎症の遷延化について推測される作用機序
太字の線は、これまでに明らかにされている歯周病原細菌 (今回は *P.gingivalis* LPS) による炎症性サイトカイン産生の主要経路である。細字の線が今回報告した ANGPTL2 を介した炎症性サイトカイン産生の新規経路で、ANGPTL2 が炎症反応を遷延化させる可能性を示唆している。また点字の線に示すように ANGPTL2 が歯周病と全身疾患とを結びつける 1 つのメディエーターになる可能性を示している。

謝辞 本稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御閲覧を賜りました、愛知学院大学歯学部歯周病学講座、三谷章雄教授に深甚なる謝辞を表します。また、終始日頃から格別な御指導と御校閲を賜りました、愛知学院大学歯学部歯周病学講座、山本弦太講師に深謝致します。最後に、本研究に御理解と御協力を頂きました愛知学院大学歯学部歯周病学講座の諸先生各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B: Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol*, **27** (12): 897-903, 2000.
- 2) Socransky SS, Haffajee AD: Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontol Res*, **26** (3 Pt 2): 195-212, 1991.
- 3) Kinane DF, Galicia JC, Gorr SU, Stathopoulou PG, Benakanakere M: *P. gingivalis* interactions with epithelial cells. *Front Biosci*, **13**: 966-984, 2008.
- 4) Graves DT, Cochran D: The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, **74** (3): 391-401, 2003.
- 5) Lalla E, Papapanou PN: Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*, **7** (12): 738-748, 2011.
- 6) Chapple IL, Genco R, working group 2 of the joint EFPAAPw: Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the joint EFP/AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. *J Periodontol*, **84** (4 Suppl): S106-112, 2013.
- 7) Arbes SJ, Jr., Slade GD, Beck JD: Association between extent of periodontal attachment loss and self-reported history of heart attack: an analysis of NHANES III data. *J Dent Res*, **78** (12): 1777-1782, 1999.
- 8) Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M: Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med*, **23** (12): 2079-2086, 2008.
- 9) Nibali L, Tatarakis N, Needleman I, Tu YK, D'Aiuto F, Rizzo M, Donos N: Clinical review: Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, **98** (3): 913-920, 2013.
- 10) Michaud DS, Liu Y, Meyer M, Giovannucci E, Joshipura K: Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. *Lancet Oncol*, **9** (6): 550-558, 2008.
- 11) Kim I, Moon SO, Koh KN, Kim H, Uhm CS, Kwak HJ, Kim NG, Koh GY: Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein. angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem*, **274** (37): 26523-26528, 1999.
- 12) Santulli G: Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **5**: 4, 2014.
- 13) Kubota Y, Oike Y, Satoh S, Tabata Y, Niikura Y, Morisada T, Akao M, Urano T, Ito Y, Miyamoto T, Nagai N, Koh GY, Watanabe S, Suda T: Cooperative interaction of angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102** (38): 13502-13507, 2005.
- 14) Kadomatsu T, Endo M, Miyata K, Oike Y: Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. *Trends Endocrinol Metab*, **25** (5): 245-254, 2014.
- 15) Deng M, Lu Z, Zheng J, Wan X, Chen X, Hirayasu K, Sun H, Lam Y, Chen L, Wang Q, Song C, Huang N, Gao GF, Jiang Y, Arase H, Zhang CC: A motif in LILRB2 critical for Angptl2 binding and activation. *Blood*, **124** (6): 924-935, 2014.
- 16) Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Kuroda H, Mikami S, Hato T, Aoi J, Horiguchi H, Miyata K, Odagiri H, Masuda T, Harada M, Horio H, Hishima T, Nomori H, Ito T, Yamamoto Y, Minami T, Okada S, Takahashi T, Mochizuki N, Iwase H, Oike Y: Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis. *Cancer Res*, **72** (7): 1784-1794, 2012.
- 17) Odagiri H, Kadomatsu T, Endo M, Masuda T, Morioka MS, Fukuhara S, Miyamoto T, Kobayashi E, Miyata K, Aoi J, Horiguchi H, Nishimura N, Terada K, Yakushiji T, Manabe I, Mochizuki N, Mizuta H, Oike Y: The secreted protein ANGPTL2 promotes metastasis of osteosarcoma cells through integrin alpha5beta1, p38 MAPK, and matrix metalloproteinases. *Sci Signal*, **7** (309): ra7, 2014.
- 18) Mogi M, Otogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K: Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol*, **44** (6): 535-539, 1999.
- 19) Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A: Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*, **83** (2): 166-169, 2004.
- 20) Armitage GC: Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontol 2000*, **34**: 109-119, 2004.
- 21) Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S: Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases.

- Periodontol 2000, **31** :167-180, 2003.
- 22) Kanda A, Noda K, Oike Y, Ishida S: Angiopoietin-like protein 2 mediates endotoxin-induced acute inflammation in the eye. *Lab Invest*, **92** (11) :1553-1563, 2012.
- 23) Tabeta K, Yamazaki K, Akashi S, Miyake K, Kumada H, Umemoto T, Yoshie H: Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. *Infect Immun*, **68** (6) :3731-3735, 2000.
- 24) Mahanonda R, Pichyangkul S: Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000, **43** :41-55, 2007.
- 25) Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun*, **72** (9) :5041-5051, 2004.
- 26) Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y: Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab*, **10** (3) :178-188, 2009.
- 27) Singhal S, Pradeep AR, Kanoriya D, Garg V: Human soluble receptor for advanced glycation end products and tumor necrosis factor-alpha as gingival crevicular fluid and serum markers of inflammation in chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Oral Sci*, **58** (4) :547-553, 2016.

論文提出先：愛知学院大学大学院歯学研究科委員会
(名古屋市千種区楠元町 1-100)

