

Title	歯周組織構成細胞におけるTLRを介した炎症反応制御の解析
Author(s)	森, 健太
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34355">https://doi.org/10.18910/34355</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

学位 論文

歯周組織構成細胞における  
TLR を介した炎症反応制御の解析

大阪大学 大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻(歯周病分子病態学)

森 健太

(指導教官：村上 伸也教授)

## 緒言

歯周炎は、歯周病原性細菌を含むバイオフィルムが原因となり発症し、歯周組織の破壊に至る慢性炎症性疾患である<sup>1,2</sup>。バイオフィルムが形成されると歯周病原性細菌の完全な除去が困難となり、ポケットに残存する歯周病原性細菌による感染が歯周組織において持続する。その結果として惹起される、継続的で時として過剰な免疫応答・炎症反応が歯周組織の破壊に関与すると考えられている<sup>3</sup>。歯周組織は歯肉・セメント質・歯根膜・歯槽骨から構成されており、さらに歯肉は主として歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞により構成されている。一般に上皮細胞は外界との物理的バリアとして外来異物の侵入を防ぐ役割を果たしているのみならず、病原体関連分子パターン(Pathogen-Associated Molecular Patterns:以下PAMPsと略す)を認識することにより炎症性サイトカイン、ケモカインを分泌したり alarmin と総称される細胞損傷に関連した分子群を放出することで免疫応答の制御に関与していることが明らかとなっている<sup>4-6</sup>。歯肉上皮細胞においても歯周病原性細菌の生菌や菌体構成成分による刺激を感知し、様々な炎症性サイトカインを産生することが報告されている<sup>7-9</sup>。一方、線維芽細胞は結合組織中に存在し、各種細胞外基質を分泌することで結合組織の構造を維持している。また、上皮細胞との間で栄養因子を交換し、組織損傷時には細胞外基質を多量に産生し同組織の治癒に重要な役割を果たしている<sup>10,11</sup>。さらに線維芽細胞は細菌由来のリポポリサッカライド(Lipopolysaccharide:以下LPSと略す)等の刺激により活性化され、局所の炎症反応にも積極的に関与することが示唆されている<sup>6,12</sup>。歯肉線維芽細胞においても歯周病原性細菌由来の菌体成分による刺激を受けることで炎症性サイトカインを産生するとの報告<sup>13,14</sup>やリンパ球との細胞間相互作用により炎症性サイトカイン発現が増加するとの報告がある<sup>15</sup>。

生体内において、組織の恒常性維持に伴う生理的反応、感染やストレスおよび外傷等により細胞死が生じる<sup>16</sup>。一般に、生理的に生じる死細胞は“eat-me signal”を介し、マクロファージなどの食細胞により炎症を惹起することなく除去される<sup>17</sup>。しかしながら、組織の壊死に伴い大量の細胞死が生じると、その細胞によりダメージ関連分子パターン(Damage-Associated Molecular Patterns:以下DAMPsと略す)が放出され、これらが周囲の細胞内外の受容体に認識され炎症反応を惹起すると考えられている<sup>18-20</sup>。High Mobility Group Box 1 protein(以下HMGB1と略す)<sup>21</sup>、Biglycan<sup>22</sup>、Versican<sup>23</sup>、mRNA<sup>24</sup>、Small nuclear RNA<sup>25</sup>などがDAMPsとして知られており、壊死細胞よりこれらの分子が放出され、炎症を引き起こす。そしてDAMPsを認識するレセプターとしてP2X Receptors、Receptor for advanced glycation end products(以下RAGE

と略す)、Toll like receptor(以下 TLR と略す)が知られている<sup>26</sup>。また、様々な疾患において、DAMPs が炎症の遷延化に関与しているとの報告もなされている。例えば、慢性閉塞性肺疾患(COPD:Chronic Obstructive Pulmonary Disease)において、肺へ炎症性細胞が浸潤し酸化ストレスが生じると、肺胞上皮細胞や血管内皮細胞が細胞死に陥り、炎症の増悪に関与するとの報告<sup>27,28</sup>や、慢性関節炎では細胞死に伴い放出される HMGB1 が炎症部に認められ、HMGB1 抗体を投与することで炎症が緩和されたとの報告がある<sup>29</sup>。また日焼けに伴う炎症には紫外線により損傷を受けた自己の keratinocyte 由来の RNA が内因性のリガンドとして、周囲の keratinocyte に TLR3 を介して認識され、炎症を惹起するメカニズムが提示されている<sup>30</sup>。歯周炎罹患患者の病変部においても炎症性細胞浸潤、歯槽骨の破壊等に加え、歯肉上皮の断裂・壊死などが病理組織学的に認められる。しかしながら、歯周組織における壊死細胞由来物質が歯周炎の病態形成にどのように関連するのかについての報告はこれまでのところなされていない。

そこで本研究では、DAMPs の受容体であり、細菌やウイルス固有の PAMPs も認識し、細菌感染症である歯周炎においても注目されている TLR に焦点を当て、歯周組織構成細胞がその壊死細胞から放出される自己核酸に曝露されることにより、どのような炎症反応および免疫応答を惹起するかについて検討した。

## 材料および方法

### 1. 細胞培養

ヒト歯肉線維芽細胞(human gingival fibroblast:以下 HGF と略す)は以下の方法で樹立した。すなわち、研究目的について十分な説明を行いインフォームドコンセントが得られた健常人ボランティアより採取した健康歯肉組織を、60 µg/ml カナマイシン(和光純薬工業、大阪、日本)を加えた $\alpha$ -Modification of Eagle's Medium(和光純薬工業、以下  $\alpha$ -MEM と略す)中で細切し 3 回洗浄した後、レイTONチューブに移し、10 %ウシ胎仔血清(Life Technologies、Carlsbad、CA、USA、以下 FCS と略す)を加えた $\alpha$ -MEM 培地にて培養した。培養は、5 % CO<sub>2</sub>、37°C、湿度 95 %の気相下で行った。細切組織片より増殖してきた細胞を 0.05 %トリプシン 0.02 %EDTA(Life Technologies)を加えたリン酸緩衝生理食塩水(和光純薬工業、以下 PBS と略す)で処理し、付着細胞を遊離させ継代培養を行い、得られた細胞を HGF として実験に供した。

ヒト歯肉上皮細胞(human gingival epithelial cell:以下 HGEC と略す)は、Oda らの方法<sup>31</sup>に準じて単離、培養した。すなわち、本研究の主旨を理解し実験に参加することを同意した歯周炎患者より、歯周外科時に歯肉組織片を得て、0.4 %Dispase II (Roche Diagnostics GmbH、Mannheim、Germany)、150 U/ml ペニシリンおよび 150 U/ml ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich Inc.、St. Louis、MO、USA) で 4°C 10 時間浸漬し、上皮細胞層を剥離した。その上皮層を細切後、0.05 %トリプシン 0.02 %EDTA(Life Technologies)を加えた PBS にて 5 %CO<sub>2</sub>、37°C、100 % 湿潤下にて反応させ、Hanks' 緩衝生理食塩水(Sigma-Aldrich Inc.)にて洗浄した。ついで、表皮角化細胞増殖用培地(Humedia-KG2<sup>®</sup>、倉敷紡績株式会社、大阪、日本: 以下 Humedia-KG2<sup>®</sup>と略す)を用いて培養し、増殖してきた細胞を HGEC とした。なお、継代培養を行う場合は、増殖用培地に増殖添加剤として、4 %(v/v)ウシ脳下垂体抽出液、10 µg/ml インスリン、0.1 ng/ml ヒト組換え型上皮細胞成長因子、0.5 µg/ml ハイドロコチゾン、ならびに抗菌剤(50 mg/ml ゲンタマイシン、50 µg/ml アンフォテリシン B )をそれぞれ最終濃度となるように添加して用いた。

HGEC は継代数 4、5 代までの培養しかできないため、2 代継代培養したものに、国立感染症研究所遺伝子資源室より恵与された Simian Virus 40 T 抗原(以下 SV40 T 抗原と略す)を遺伝子導入したプラスミドベクター(pMT10D)を、リン酸カルシウム法<sup>32</sup>を用いて導入した。得られた細胞を Humedia-KG2<sup>®</sup>培地を用いて培養を続け、SV40 T 抗原遺伝子を導入していない親細胞の継代数をはるかにこえて培養可能となった細胞を長期継代培養可能なヒト歯肉上皮細胞株(以

下 epi 4 と略す)として実験に供した。

## 2. 壊死細胞上清

壊死細胞上清の作製は Diana らの方法<sup>33</sup>に従った。すなわち、epi 4 および HGF をそれぞれの培地に  $1 \times 10^6$  個/ml となるよう懸濁し凍結融解を 5 回繰り返した。その後、遠心分離(1500 rpm、4°C、5分)することで得られた上清を Necrosis Cell Supernatant(以下 NCS と略す)として実験に供した。

## 3. 試薬

Pam3CysSerLys4(以下 Pam3CSK4 と略す)、*Porphyromonas gingivalis* LPS(以下 *P.g.* LPS と略す)、Polyinosine-polycytidylic acid(以下 Poly(I:C)と略す)、*Salmonella typhimurium* flagellin(以下 ST-FLA と略す)、Pam2CGDPKHPKSF(以下 FSL-1 と略す)、CpG ODN1826(以下 CpG と略す)(InvivoGen、San Diego、CA、USA)、human Interferon Beta 1a(PBL interferon source、Piscataway、NJ、USA:以下 IFN $\beta$ と略す)を実験に供した。

## 4. 全 RNA の抽出

6 穴用培養プレート(Corning Inc.、Corning、NY、USA)にてサブコンフルエントになるように培養した epi 4 および HGF に対して種々の刺激を行った後、全 RNA の抽出を行った。全 RNA の分離は RNA Bee<sup>TM</sup>(TEL-TEST、Inc.、Friendswood、TX、USA)を用いて行った。すなわち、各細胞を回収後 RNA Bee<sup>TM</sup> を加えホモジナイズし、1/5 容量のクロロホルムを添加後、遠心分離(12000 g、4°C、15分)した。分離された水層から RNA をイソプロパノールの添加によって沈殿させ、75 %エタノールによる洗浄の後、得られた全 RNA 沈殿を 20  $\mu$ l のジエチルピロカルボン酸(diethyl pyrocarbonate:以下 DEPC と略す)処理水(和光純薬工業)に溶解し、全 RNA 量を NanoDrop ND-1000(Thermo Fisher Scientific、Waitham、MA、USA)を用いて計測した。

## 5. 相補鎖 DNA (以下 cDNA と略す) の作製

全 RNA をもとに逆転写を行って cDNA を作製した。すなわち 65°C で熱処理された各 RNA 検体 1  $\mu$ g に、52.5 mM トリス塩酸緩衝液(pH8.3)、3 mM MgCl<sub>2</sub>、75.5 mM KCl、1 mM Dithiothreitol (Life Technologies)、1.1 U/ $\mu$ l リボヌクレアーゼ阻害剤(タカラバイオ、大津、日本)、0.5 mM dNTP 混合液(タカラバイオ)、5 U/ $\mu$ l Moloney-Mouse leukemia Virus 逆転写酵素(Life Technologies)、55 ng/ $\mu$ l Random Hexamers (pd(N)<sub>6</sub>:Pharmacia Biotech、

Milwaukee, WI, USA) と最終濃度になるように調整した試薬を加え、DEPC 処理水で全量 40  $\mu$ l の反応液を調合した。反応液は 37°C にて 60 分間保温後、99°C にて 5 分間処理し残留酵素を失活させ、cDNA を調製した。

## 6. Polymerase Chain Reaction(以下 PCR と略す) 法による cDNA の増幅及び検出

合成された cDNA を鋳型として TLR RT-Primer Set(InvivoGen) 、および表 1 に示すハウスキーピング遺伝子であるヒト Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase(HPRT)遺伝子特異的なアンチセンスプライマー、センスプライマー(Clontech Laboratories、 Palo Alto、 CA、 USA)を使用し、PCR 法による増幅を行った。すなわち、10 mM トリス塩酸緩衝液(pH8.3)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM KCl、0.15 mM dNTP 混合液、1.25 U AmpliTaq Gold™(Perkin Elmer、 Foster City、 CA、 USA)と最終濃度になるように調整し、cDNA 溶液を 5  $\mu$ l、そして検出する mRNA に特異的なプライマーを最終濃度各 0.2  $\mu$ M ずつ加え、DEPC 処理水で全量 50  $\mu$ l の反応液を調合した。95°C、2 分間の熱処理後 95°C、30 秒間の熱変性、60°C、30 秒間のアニーリング、72°C、2 分間の伸長反応を 1 サイクルとし、Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research Inc、 Waltham、 MA、 USA)を用いて cDNA 増幅を行った。これらの PCR 産物を、2 %アガロースゲル(Nippon Gene Company、東京、日本)に電気泳動後、エチジウムブロマイド(Nippon Gene Company)DNA 染色を行った。

表 1 本研究で使用した RT-PCR 用プライマー

遺伝子	プライマー
<i>HPRT</i>	5'- CGAGATGTGATGAAGGAGATGGG -3'
	5'- GCCTGACCAAGGAAAGCAAAGTC -3'

## 7. Real-time PCR 解析

細胞の cDNA を鋳型として表 2 に示す各遺伝子特異的な Real-time PCR 用プライマー(タカラバイオ)を使用し Real-time PCR 解析を行った。PCR 反応は Power PCR SYBR® Master Mix (Applied Biosystems、 Foster city、 CA、 USA) を用いて 7300 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) にて行った。epi 4 および HGF における各 mRNA 転写は、HPRT 遺伝子を用いてノーマライゼーションし、定量化を図った。

表 2 本研究で使用した Real-time PCR 用プライマーの一覧

遺伝子	プライマー
<i>TLR2</i>	5'- GTGTTGCAAGCAGGATCCAAAG -3'
	5'- CACAAAGTATGTGGCATTGTCCAG -3'
<i>TLR3</i>	5'- TGTCTGGAAGAAAGGGACTTTGA -3'
	5'- CTTGTTGAACTGCATGATGTACCTT -3'
<i>TLR4</i>	5'- AGGATGATGCCAGGATGATGTC -3'
	5'- TCAGGTCCAGGTTCTTGGTTGAG -3'
<i>TLR5</i>	5'- CAGTATTTGAGGTGGCCTGAGGA -3'
	5'- TGCTACAGTTTGCAACGGAATGTTA -3'
<i>TLR6</i>	5'- CTGTCTGCATTAGCCCTTCCTTG -3'
	5'- TGTGGAAGAATGTGCCGTTTG -3'
<i>HPRT</i>	5'- GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA -3'
	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC -3'

## 8. ELISA 法による培養上清中の IL-6、IL-8、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ タンパク量の測定

24 穴用培養プレート(Corning Inc.)にてサブコンフルエントになるように培養した細胞に対して、増殖添加剤、FCS を除いたものに培地交換した。その後これら細胞に各種刺激を加え、培養終了後に培養上清を回収し、同上清中に含まれる IL-6、IL-8、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ タンパク量の測定を、ELISA キット (IL-6、IL-8: Eli-pair<sup>TM</sup>、(Abcam、Cambridge、MA、USA)、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ : (PBL interferon source)) を用いて、micro plate reader (Model 680: Biorad、Hercules、CA、USA)を用いて行った。

## 9. フローサイトメトリー法による細胞表面 TLR2 および細胞内 TLR3 の発現解析

細胞を回収した後に 1 %FCS、0.02 %アジ化ナトリウム(和光純薬工業)含有 PBS(以下 FACS buffer と略す)にて洗浄後、以下に記す抗体をそれぞれ至適濃度で加え、4°C、30 分間、暗所条件下にて反応させた。反応終了後再び FACS buffer で洗浄し、細胞を浮遊させた後、FACSCalibur(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA)を用いて蛍光強度を測定した。用いた抗体は PE 標識マウス抗-ヒト TLR2 抗体(eBioscience、San Diego、CA、USA)、PE 標識マウス抗-ヒト TLR3 抗体(eBioscience)、及びアイソタイプコントロールとして PE 標識マウス IgG1 アイソタイプコントロール抗体(eBioscience)、PE 標識マウス IgG2a アイソタイプコントロール抗体(eBioscience)である。また、細胞内染色の際には Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>(BD)を使用して、細胞内を標識した。



## 10. TLR3 si RNA の導入

抗菌剤を除いた Humedia-KG2®培地と 10 %FCS 含有 $\alpha$ -MEM をそれぞれ epi 4 と HGF に用いて 24 穴培養プレート(Corning Inc.)に播種した。5 nM TLR3 siRNA (5'-GGAUAGGUGCCUUUCGUCA<sub>tt</sub>-3')、あるいは Silencer® Select Negative Control siRNA(Applied Biosystems)を Lipofectamine® RNAiMAX(Applied Biosystems)存在下にて reverse transfection 法にてこれら細胞に導入した。6 時間後に抗菌剤を添加した Humedia-KG2®培地もしくは 10 %FCS 含有 $\alpha$ -MEM と培地交換し、細胞をサブコンフルエントまで培養し実験に用いた。

## 11. 統計学的解析

実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析(ANOVA)を行った後に *post-hoc* として tukey 検定を用いて行い、有意水準を 1 %に設定し、*p* 値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

## 結果

### 1. NCS の歯周組織構成細胞に与える影響

壊死細胞が放出する内因性起炎因子が歯周組織構成細胞の炎症反応に及ぼす影響について検討するため、歯肉上皮細胞株 epi 4 および歯肉線維芽細胞 HGF を NCS 存在・非存在下で 24 時間培養し、培養上清中に含まれる IL-6、IL-8 タンパク産生量を ELISA 法にて測定した。NCS に対する control として、培地のみを凍結融解したものを用いた。その結果 epi 4 および HGF 共に NCS 濃度依存的に IL-6、IL-8 産生量の増加が認められた(図 1A、B)。

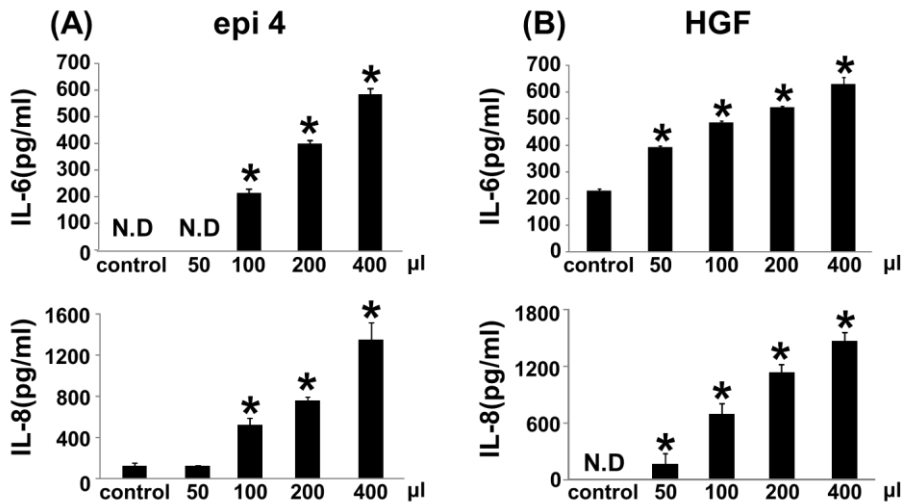


図 1 epi 4 および HGF における NCS 刺激による IL-6、IL-8 産生

24 穴用培養プレートにて epi 4(A)および HGF(B)をサブコンフルエントまで培養し、NCS(50~400 μl)による刺激を行い 24 時間後に培養上清を回収し、培養上清中に含まれる IL-6、IL-8 タンパク量の測定を ELISA 法にて測定した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control)

### 2. epi 4 および HGF における TLR mRNA 発現

内因性起炎因子を認識するレセプターとして、自然免疫における代表的なレセプターである TLR が知られており、中でも NCS に多く含まれると想定される核酸を認識するレセプターとしては TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 が知られている。そこで、epi 4 および HGF における TLR mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討した。その結果、epi 4 において、TLR2、TLR3、TLR5、TLR6、TLR9、HGF において TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR9 の mRNA 転写がそれぞれ明らかになった(図 2)。すなわち epi 4 および HGF において、核酸を認識するレセプターとして TLR3 および TLR9 の mRNA 発現が確認された。

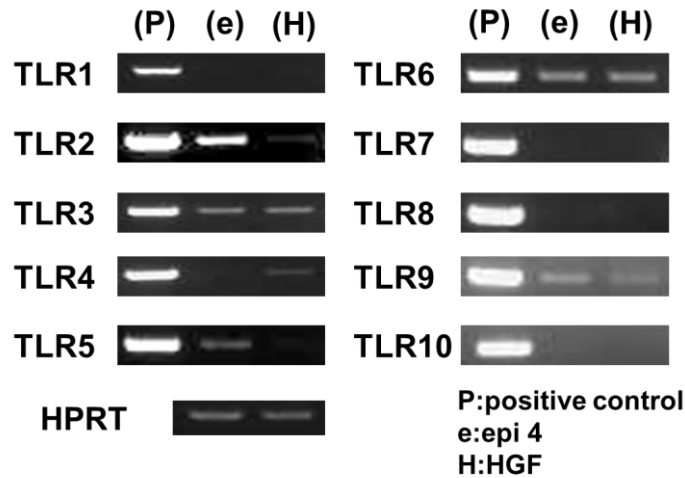


図 2 epi 4 および HGF における *TLR* mRNA 転写比較

epi 4 および HGF より全 RNA を抽出、精製し、RT-PCR 法により *TLR* mRNA の転写の検討を行った。陽性対照として *TLR* RT-Primer Set (InvivoGen) 付属の Positive control を用いた。PCR 法におけるサイクル数は、すべて 40 サイクルである。

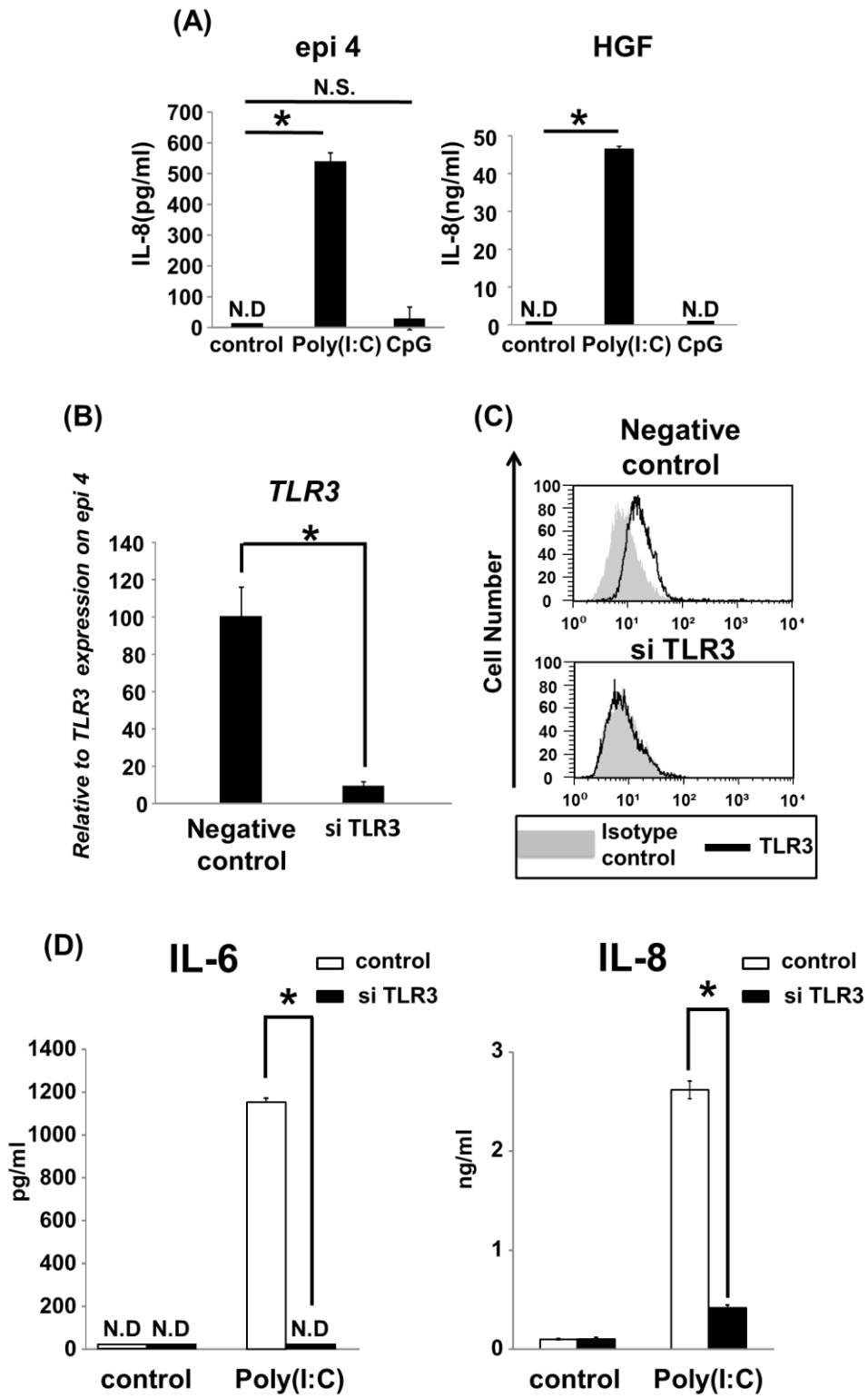
### 3. epi 4 および HGF における NCS 誘導性サイトカインへの *TLR* の関与

epi 4 および HGF が核酸を認識するレセプターとして発現している *TLR3* および *TLR9* の機能を検討するため、*TLR3* および *TLR9* のリガンドである Poly(I:C) および CpG 存在・非存在下で epi 4 および HGF を培養し、24 時間後の培養上清中に含まれる IL-8 タンパク産生量を ELISA 法を用いて検討した。epi 4 および HGF 共に Poly(I:C) で刺激した群において IL-8 産生を認めた一方、CpG で刺激した群においては IL-8 タンパク産生をほとんど認めなかった(図 3(A))。なおヒト骨髄系細胞株 MUTZ-3 を用い CpG 存在下で培養したところ IL-8 産生を認めた(結果には示さない)。以上の結果は epi 4 および HGF において *TLR9* mRNA は発現しているものの、CpG 刺激を介した IL-8 タンパク産生に影響を及ぼさないことから、タンパクレベルでの *TLR9* の機能を有していない可能性が示唆された。そこで、機能の認められた *TLR3* が NCS 誘導性サイトカイン産生に関与しているとの仮説をたて、*TLR3* 特異的 si RNA を導入し *TLR3* を knock down すると、NCS 誘導性サイトカインの産生量にどのような影響が及ぼされるかを検討することとした。まず、epi 4 に *TLR3* 特異的 si RNA を材料と方法に示した通り導入し、*TLR3* mRNA 発現が抑制されていることを Real-time PCR 法にて確認した(図 3(B))。さらに *TLR3* タンパク発現が抑制されていることをフローサイトメトリー法にて確認した(図 3(C))。この *TLR3* 発現抑制株を用いて Poly(I:C) 刺激による IL-6、IL-8 タンパク産生量を ELISA 法

にて測定したところ、TLR3 発現に影響を及ぼさない negative control 株では IL-6、IL-8 タンパク産生の亢進が認められた一方、TLR3 発現抑制株において IL-6、IL-8 タンパク産生は有意に抑制された(図 3(D))。同様に NCS 刺激による IL-6、IL-8 タンパク産生量を ELISA 法にて測定したところ、negative control 株では IL-6、IL-8 タンパク産生誘導が認められ、TLR3 発現抑制株では IL-6、IL-8 タンパク産生は抑制された(図 3(E))。

歯周炎罹患患者の病変部においては、歯周組織の断裂・壊死が生じ上皮細胞から放出される内因性起炎因子が歯肉線維芽細胞に影響を及ぼすこと、また歯肉線維芽細胞から放出される内因性起炎因子が上皮細胞に影響を及ぼすことが想定される。そこで、epi 4 に HGF 由来の NCS(図 3(F))、HGF に epi 4 由来の NCS を作用させ(図 3(G))、24 時間後の培養上清中に含まれる IL-6 タンパク産生量を ELISA 法にて測定した。epi 4 に HGF 由来の NCS、HGF に epi 4 由来の NCS を作用させた群において IL-6 タンパク産生が誘導され、TLR3 発現抑制株においては IL-6 タンパク産生は有意に抑制された(図 3(F、G))。

これらの結果より、歯周組織構成細胞から放出される内因性起炎因子は少なくとも部分的に TLR3 を介して歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞より炎症性サイトカインを産生誘導する可能性が示唆された。



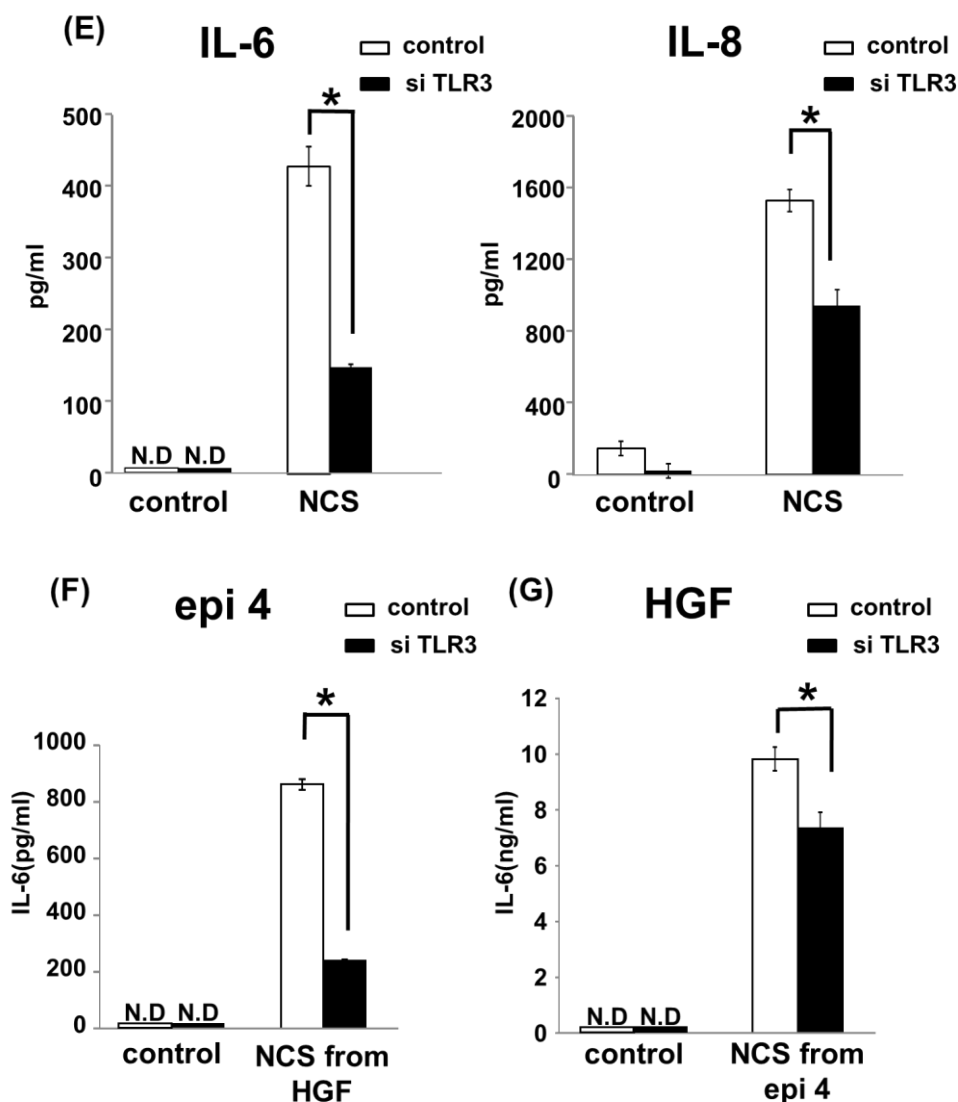


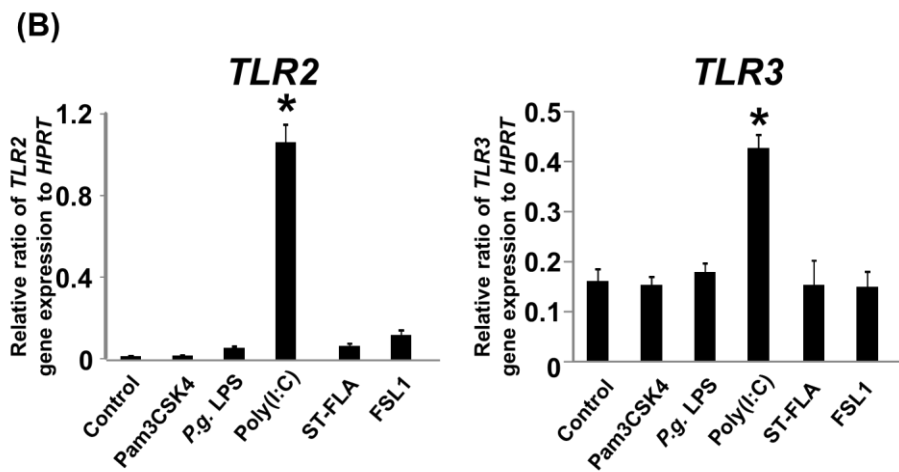
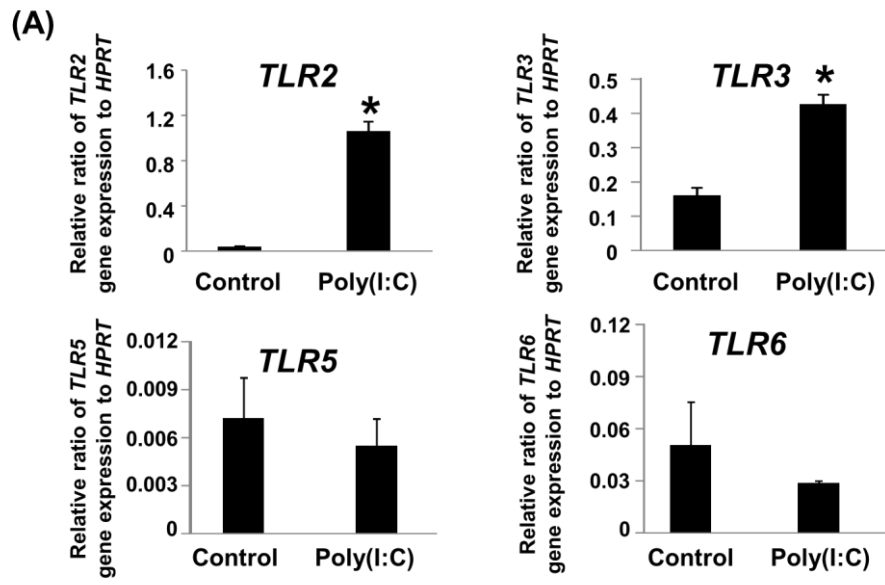
図 3 epi 4 および HGF における NCS 誘導性サイトカインへの TLR3 抑制が与える影響

- (A) epi 4 および HGF を 5  $\mu$ g/ml Poly(I:C)あるいは 5  $\mu$ M CpG にて刺激し、24 時間後の培養上清を回収し、ELISA 法にて IL-8 産生量を測定した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control、N.D : not detected、 N.S. : not significant)
- (B) Negative control および *TLR3* 特異的 si RNA を reverse transfection 法にて epi 4 に導入し knock down 効果を Real-time PCR 法にて検討した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control)
- (C) Negative control および *TLR3* 特異的 si RNA を reverse transfection 法にて epi 4 に導入し 96 時間後における *TLR3* タンパク発現をフローサイトメトリー法にて検討した。
- (D) Negative control および *TLR3* 特異的 si RNA を導入した epi 4 を 5  $\mu$ g/ml Poly(I:C)にて刺激を行い 24 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法にて IL-6 および IL-8 産生量を測定した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control、 N.D : not detected)

- (E) Negative control および *TLR3* 特異的 si RNA を導入した epi 4 を 400 $\mu$ l の NCS にて刺激を行い 24 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法にて IL-6 および IL-8 産生量を測定した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control、N.D : not detected)
- (F) Negative control および *TLR3* 特異的 si RNA を導入した epi 4 を 400 $\mu$ l の HGF 由来の NCS にて刺激を行い 24 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法にて IL-6 産生量を測定した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control、N.D : not detected)
- (G) Negative control および *TLR3* 特異的 si RNA を導入した HGF を 400 $\mu$ l の epi 4 由来の NCS にて刺激を行い 24 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法にて IL-6 産生量を測定した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control、N.D : not detected)

#### 4. *TLR3* 刺激が歯周組織構成細胞の *TLR* 発現に与える影響

近年、気管支上皮細胞において *TLR3* 刺激により *TLR2* の発現が上昇することが明らかにされている<sup>34</sup>。一方、歯周組織において、健常者と比較して歯周病患者の歯周組織では *TLR2* の発現が上昇しているとの報告がなされている<sup>35</sup>。そこで、歯周組織構成細胞において *TLR3* を刺激することによって他の *TLR* の発現状態が変化する可能性について検討した。epi 4 を Poly(I:C)で刺激して 24 時間後の RNA を回収し、図 2 で epi 4 において発現の認められた *TLR2*、*TLR3*、*TLR5*、*TLR6* mRNA 発現の変化を Real-time PCR 法にて検討した。その結果、Poly(I:C)で刺激した epi 4 において *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現の上昇を認めた(図 4(A))。また、Poly(I:C)以外の *TLR* リガンド刺激による *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現を検討するため Pam3CSK4、*P.g.* LPS、Poly(I:C)、ST-FLA、FSL-1 を用いて epi 4 を刺激し 24 時間後の RNA を回収し *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現を Real-time PCR にて検討した。その結果、Poly(I:C)以外に *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現を上昇させる *TLR* リガンドは認めなかった(図 4(B))。次に HGF においても epi 4 と同様に Poly(I:C)で刺激して 24 時間後の RNA を回収し発現の認められた *TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR6* mRNA の発現変化を Real-time PCR 法にて検討した。その結果、HGF において Poly(I:C)刺激により *TLR2*、*TLR3*、*TLR4* mRNA 発現の上昇を認めた(図 4(C))。次に *TLR* リガンド刺激による *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現を検討したところ epi 4 と同様に Poly(I:C)で刺激した HGF において *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現は著しく上昇した(図 4(D))。また、Pam3CSK4 で刺激した HGF においても *TLR2* mRNA 発現は有意に上昇したものの、Poly(I:C)刺激時に認められた程の発現上昇ではなかった。これらの結果より epi 4 および HGF は *TLR3* を刺激することにより *TLR2* mRNA 発現および *TLR3* mRNA 発現を上昇させることが明らかとなった。





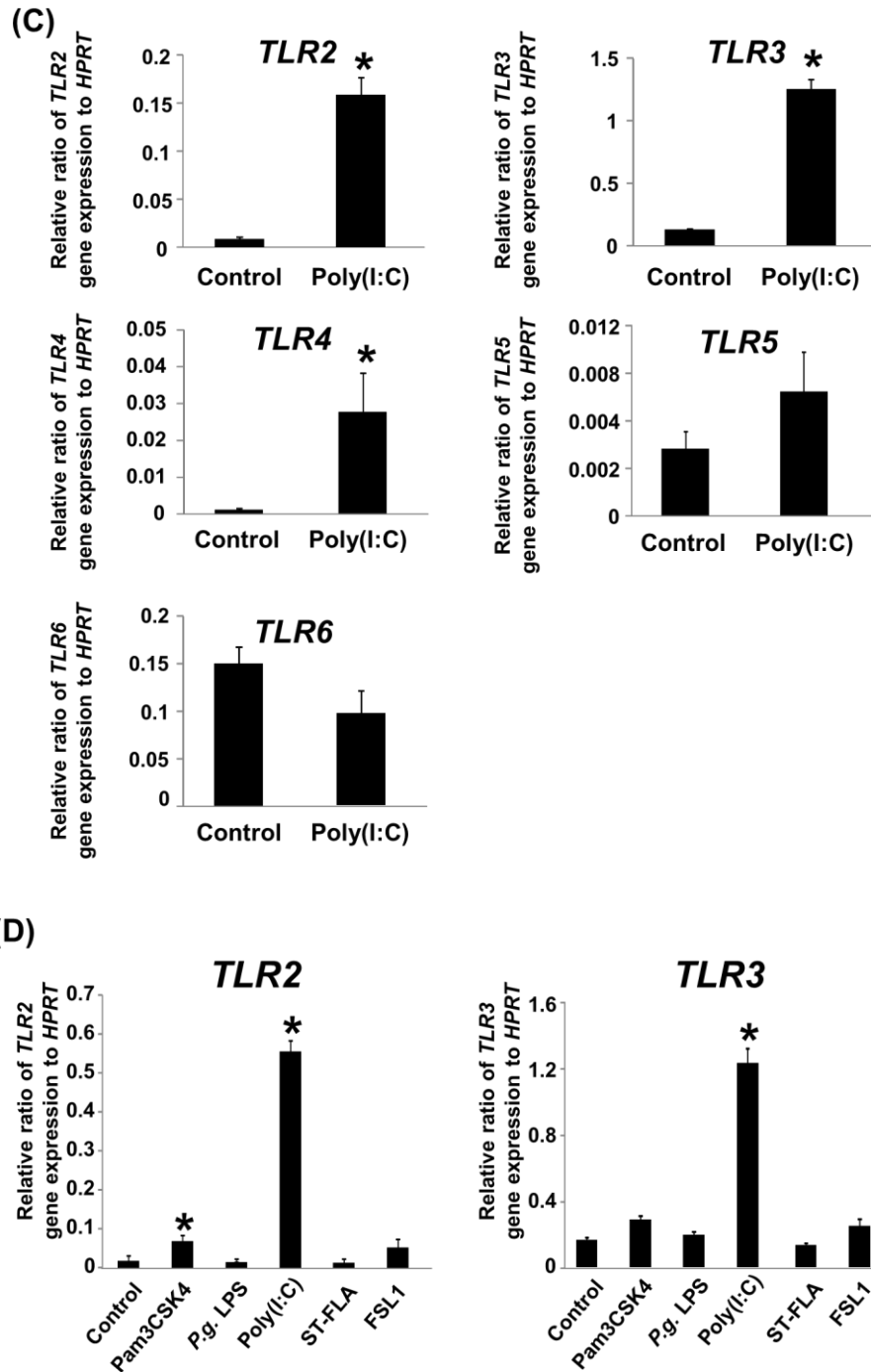


図 4 epi 4 および HGF における TLR3 刺激による TLR 発現の変化

- (A) epi 4 を 5  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C)にて刺激して、24 時間後の RNA を回収し、Real-time PCR 法にて *TLR2*, *TLR3*, *TLR5*, *TLR6* mRNA 発現を検討した。(n=3, \* :  $p < 0.01$  vs control)
- (B) epi 4 を 0.5  $\mu\text{g/ml}$  Pam3CSK4, 1  $\mu\text{g/ml}$  *P.g.* LPS, 5  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C), 1  $\mu\text{g/ml}$  ST-FLA, 1  $\mu\text{g/ml}$  FSL-1 にて刺激し、24 時間後に RNA を回収し、Real-time PCR 法にて *TLR2*, *TLR3* mRNA 発現を検討した。(n=3, \* :  $p < 0.01$  vs control)

- (C) HGF を 5  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C)にて刺激し、24 時間後の RNA を回収し、Real-time PCR 法にて *TLR2*、*TLR3*、*TLR5*、*TLR6* mRNA 発現を検討した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control)
- (D) HGF を 0.5  $\mu\text{g/ml}$  Pam3CSK4、1  $\mu\text{g/ml}$  *P.g.* LPS、5  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C)、1  $\mu\text{g/ml}$  ST-FLA、1  $\mu\text{g/ml}$  FSL-1 にて刺激し、24 時間後に RNA を回収し、Real-time PCR 法にて *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現を検討した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control)

## 5. TLR3 刺激により発現誘導された TLR2 の機能

TLR3 を刺激することにより、歯周病原性細菌である *P.g.* の LPS を認識する TLR2 の発現が亢進することから<sup>36</sup>、TLR3 依存的に TLR2 の発現が亢進することにより、歯周組織構成細胞の *P.g.* LPS への感受性が高まるのではないかと考えた。そこでまず epi 4 および HGF を Poly(I:C)存在下で 48 時間培養した後の TLR2 発現をフローサイトメトリー法にて測定した。その結果 epi 4 において TLR3 刺激による TLR2 タンパク発現の上昇を認めた(図 5(A))。一方、HGF においては TLR3 刺激による TLR2 のタンパクレベルでの発現上昇を検出できなかった(図 5(A))。次に TLR3 依存的に発現誘導された epi 4 上の TLR2 の機能を検討することとした。Poly(I:C)で 48 時間前処理した epi 4 をさらに *P.g.* LPS で刺激し、24 時間後の培養上清中に含まれる IL-6、IL-8 タンパク産生量を ELISA 法にて測定した。その結果、Poly(I:C)で前処理した epi 4 において Poly(I:C)処理されていない epi 4 と比較して、*P.g.* LPS 刺激により産生誘導される IL-6、IL-8 タンパク量はさらに増加した(図 5(B))。

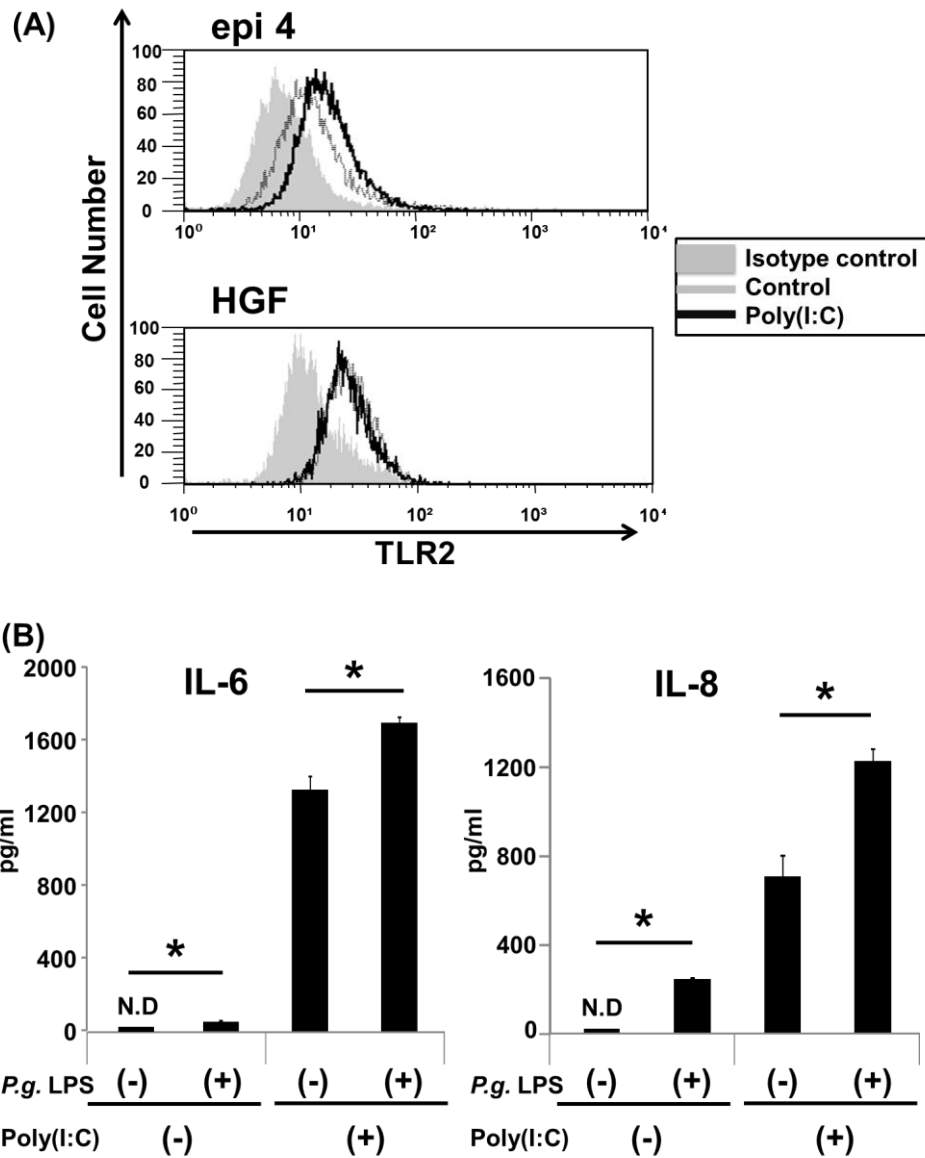


図5 TLR3 刺激による TLR2 タンパク発現および機能

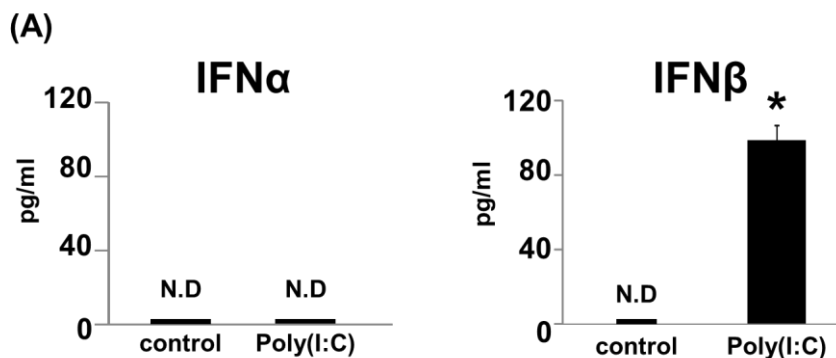
(A) epi 4 を 5  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C)にて刺激して 48 時間後の TLR2 発現をフローサイトメトリー法にて検討した。

(B) epi 4 を 5  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C)にて 48 時間前処理を行い、さらに 1  $\mu\text{g/ml}$  *P.g.* LPS にて刺激し 24 時間後の培養上清を回収し ELISA 法にて IL-6、IL-8 産生量を測定した。(n=3、

\* :  $p < 0.01$  vs *P.g.* LPS 非添加群)

## 6. TLR3 依存性の TLR2 発現上昇に対する IFN の関与

次に、TLR3 刺激による TLR2 発現誘導メカニズムについて検討することとした。本研究で用いた TLR のリガンドの中で Poly(I:C)のみが IFN 産生を誘導することが報告されている<sup>37-39</sup>。そこで、TLR3 刺激によって誘導される TLR2 発現の上昇には IFN が関与しているのではないかとの仮説をたてた。まず、上皮細胞からの産生が報告されている I 型 IFN(IFN $\alpha$ ・IFN $\beta$ )<sup>40</sup>の発現について検討することとした。epi 4 を Poly(I:C)で刺激して 8 時間後の培養上清中に含まれる IFN $\alpha$ および IFN $\beta$ タンパク産生量を ELISA 法にて測定した。その結果、Poly(I:C)刺激した epi 4 において IFN $\alpha$ の産生は認めなかったが、IFN $\beta$ の産生が認められた(図 6(A))。次に、IFN $\beta$ の TLR2 発現への影響を検討するため、epi 4 を IFN $\beta$ で刺激し、24 時間後の RNA を回収し *TLR2* mRNA 発現を Real-time PCR 法にて検討した。その結果、epi 4 において IFN $\beta$ 濃度依存的に *TLR2* mRNA の発現は上昇した(図 6(B))。また、IFN $\beta$ による TLR2 タンパク発現を検討するため、epi 4 を IFN $\beta$ にて刺激し 48 時間後の TLR2 発現をフローサイトメトリー法にて検討した。その結果、IFN $\beta$ 刺激により epi 4 上に TLR2 タンパク発現が上昇することが確認された(図 6(C))。さらに IFN $\beta$ により発現誘導される TLR2 の機能を検討するため、IFN $\beta$ で 48 時間前処理した epi 4 を *P.g.* LPS にて刺激し、24 時間後の培養上清中に含まれる IL-6、IL-8 産生量を ELISA 法にて測定した。その結果、*P.g.* LPS 刺激により epi 4 から産生される IL-6、IL-8 は IFN $\beta$ の前処理によりさらに増加した(図 6(D))。



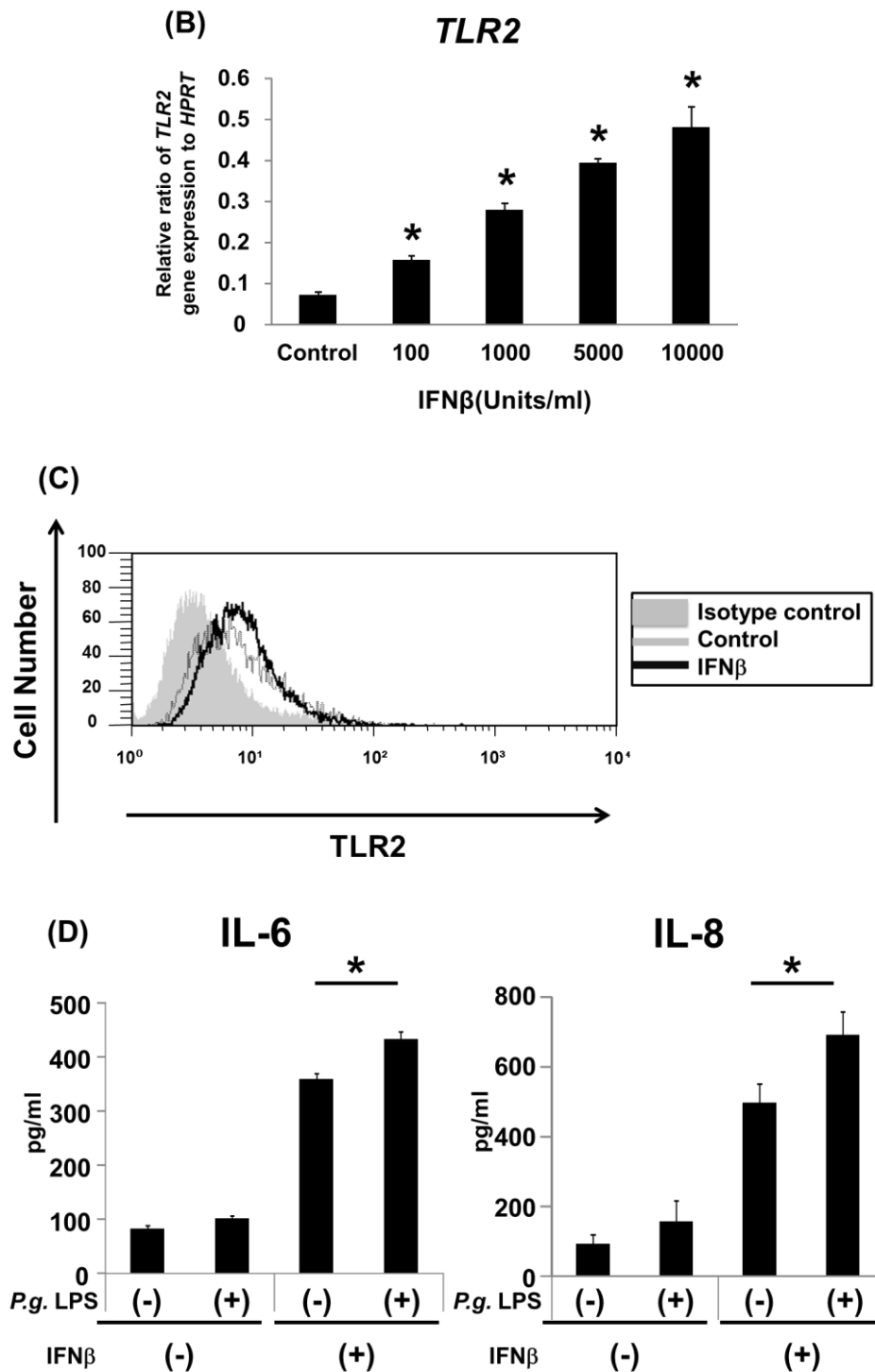


図 6 epi 4 における TLR2 発現上昇に対する IFNβ の関与

A) epi 4 を 5 μg/ml Poly(I:C)にて刺激し、8 時間後の培養上清を回収し、ELISA 法にて IFNβ 産生量を測定した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control、N.D : not detected)

B) epi 4 を IFNβ(100~10000 units/ml)にて刺激し、24 時間後の RNA を回収し、Real-time

PCR 法にて *TLR2* mRNA 発現を検討した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs control)

- C) epi 4 を 5000 units/ml IFN $\beta$ にて刺激し、48 時間後の *TLR2* 発現をフローサイトメトリー法にて検討した。
- D) epi 4 を 5000 units/ml IFN $\beta$ にて 48 時間前処理後、1  $\mu$ g/ml *P.g.* LPS にて刺激し、24 時間後の培養上清を回収し ELISA 法にて IL-6、IL-8 産生量を測定した。(n=3、\* :  $p < 0.01$  vs *P.g.* LPS 非添加群)

## 考察

本研究では感染、ストレス、外傷等によって歯周組織に生じた細胞壊死が、周囲の歯周組織構成細胞に及ぼす影響について検討を行った。自然免疫の代表的なレセプターであり内因性起炎因子の認識にも関与する TLR に着目し、歯周組織構成細胞より放出される内因性起炎因子を認識する可能性のある TLR を検討し、その関与が強く示唆された TLR3 に焦点をあて、TLR3 刺激によってさらに誘導される TLR 発現への影響について解析したものである。

近年、様々な全身の慢性炎症疾患の病変部において細胞死が生じ、その結果内因性起炎因子が放出されることとなり、さらなる炎症の増悪を惹起するとの報告がある<sup>27,28,33,41</sup>。すなわち、細胞壊死が生じると、その細胞より DAMPs が放出され、これが細胞内外の受容体に認識され炎症反応を惹起すると考えられている<sup>19,20</sup>。*in vitro*にて細胞壊死を人為的に誘導する方法として、細胞を凍結融解を繰り返すことが行われている<sup>42,43</sup>。本研究ではこの手法を用いて epi 4 および HGF の細胞壊死を誘導し、NCS を得た。epi 4 および HGF をこの NCS 存在下で培養した結果、培養上清中に NCS 濃度依存的に IL-6、IL-8 産生を認めた(図 1(A)、(B))。NCS 中に存在すると考えられる DAMPs の受容体としては、TLR、NLRs(Nod-like receptors)、RLRs(RIG-I-like receptors)等、様々な分子が報告されている<sup>19</sup>。そして、歯周組織構成細胞においても TLR の発現が報告されている<sup>44</sup>。本研究では、歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞における TLR の mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討し、epi 4 は *TLR2*、*TLR3*、*TLR5*、*TLR6*、*TLR9*、HGF は *TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR6*、*TLR9* の mRNA 発現を認めた(図 2)。DAMPs には HMGB1、尿酸、ATP(adenosine triphosphate)、HSPs(heat shock protein)の他に、DNA、RNA といった核酸が含まれており<sup>19,45</sup>、特に mRNA は TLR3 により認識されているとの報告が Kariko らによってなされている<sup>24</sup>。本研究で用いた NCS 中にも RNA が約 30 ng/ml の濃度で存在していることを確認している(結果には示さない)。本研究では、*TLR3* 特異的 si RNA を epi 4 および HGF に導入した *TLR3* mRNA 抑制株を用いることで、自己由来の核酸を認識し炎症性サイトカイン産生に関与する TLR として TLR3 が重要な役割を果たしている可能性を示唆するデータを得た(図 3)。しかしながら、*TLR3* mRNA 抑制株において IL-6、IL-8 産生量が完全には抑制されていない。この結果は、NCS 中に核酸以外の HMGB1 等の内因性起炎因子が存在する可能性や、TLR3 以外の核酸を認識する受容体分子が存在する可能性を示唆している。また、HGF に epi 4 由来の NCS を作用させることで産生される IL-6 は *TLR3* 特異的 si RNA を導入することにより有意に抑制された。しかしながら、その抑制効果は *TLR3* 特異的 si RNA を導入した epi 4 に epi 4 由来の NCS

あるいは HGF 由来の NCS を作用させた群において認められた抑制効果と比較すると少ない(図 3(E)、(F)、(G))。このことは、HGF においては内因性起炎因子を認識する際に TLR3 以外の受容体の果たす役割が epi 4 に対して相対的に大きいことを示唆している。HMGB1 を認識するレセプターとしては TLR2、TLR4<sup>46</sup> および RAGE<sup>26</sup> が知られている。TLR2 および TLR4 は細菌構成成分を認識し炎症反応・免疫応答に関与することが明らかとなっており、歯周病原性細菌では *P.g.* LPS は TLR2 に認識され<sup>36</sup>、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS (以下 *A.a.* LPS と略す) は TLR4 に認識される<sup>47,48</sup> ことが知られている。また、糖尿病により増悪される歯周炎に RAGE が関与しているとの報告もあり<sup>49</sup>、これら歯周炎との関連が報告されている受容体と内因性起炎因子の関係については今後の詳細な検討が必要である。

近年、様々な粘膜組織・細胞において、感染、老化、疾患に伴い TLR の発現が変化することが報告されている。例えば、胃粘膜上皮では *Helicobacter pylori* 感染により TLR2、TLR4、TLR5、TLR9 の発現が上昇し<sup>50</sup> 小腸上皮細胞においては加齢により TLR3 の発現が上昇し Rotavirus 易感染性となることが報告されている<sup>51</sup>。Dry eye disease では角膜上皮および間質における TLR4 の発現が上昇し、TLR4 を介した刺激が乾燥による炎症を引き起こすと報告されている<sup>52</sup>。また喫煙者の末梢気道上皮では TLR5 の発現が低下することにより、喫煙に伴う気道感染を惹起するリスクを高めていることが報告されている<sup>53</sup>。さらに、口腔粘膜上皮における TLR3 および TLR5 の発現の低下が再発性アフタ性口内炎の一因になる可能性も報告されている<sup>54</sup>。歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞が発現している TLR の中で、TLR2 は *P.g.* LPS<sup>36</sup>、TLR4 は *A.a.* LPS<sup>47,48</sup>、TLR5 は *Treponema denticola* の Flagella を認識し<sup>55</sup>、また、TLR1 および TLR6 は TLR2 とヘテロダイマーを形成することで、グラム陰性菌のリポペプチドとグラム陽性菌のリポペプチドをそれぞれ認識し<sup>56</sup> 炎症を惹起することが知られている。しかしながら、歯周組織構成細胞において TLR3 のリガンドとして Poly(I:C)以外の物質で検討した報告はこれまで皆無である。本研究ではまず、歯周組織構成細胞において核酸を含む内因性起炎因子の認識に TLR3 が関与していることを明らかにし、さらに TLR3 を刺激することによる他の TLR の発現誘導について検討した。epi 4 において TLR3 を刺激することにより *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現の上昇を認めたものの、他の TLR リガンド刺激では *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現の上昇は認めなかった(図 4(A)、(B))。また、HGF においては TLR3 を刺激することにより *TLR2*、*TLR3*、*TLR4* mRNA 発現の上昇を認め、他の TLR リガンド刺激では *TLR2*、*TLR3* mRNA 発現の上昇は認めなかった(図 4(C)、(D))。先述したように、歯周病原性細菌である *P.g.* の LPS は TLR2 により認識されることが知られている<sup>36</sup>。本研究において、epi 4 および HGF 共に

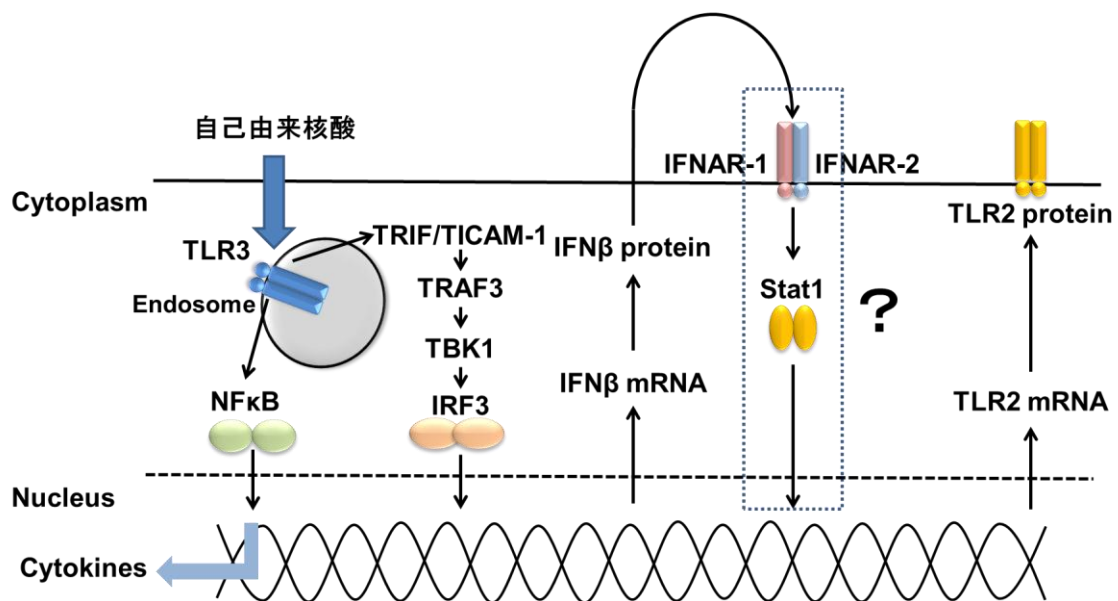


TLR3 刺激により *TLR2* mRNA 発現が上昇することに着目し、そのタンパク発現についても検討を行ったところ、epi 4 においてのみ TLR3 刺激により TLR2 タンパク発現の上昇が確認された(図 5(A))。一方、TLR3 刺激後に HGF において認められた *TLR4* mRNA 発現の上昇に関しては、今回の研究ではさらなる検討を行っていないが、歯肉線維芽細胞において TLR3 刺激後に *A.a.* LPS 等の TLR4 のリガンドに対して感受性が高まっている可能性が示唆される。*TLR2* mRNA 発現の変化がタンパクレベルの発現の変化と一致しない事実は、TLR2 タンパク発現の制御には RNA の転写後、細胞種により異なるメカニズムが存在する可能性を示唆しており、今後の詳細な解析が必要である。

TLR3 刺激によりタンパクレベルでの TLR2 発現の上昇が認められた epi 4 において、*P.g.* LPS 誘導性 IL-6 および IL-8 産生量が増加することが明らかになった(図 5(B))。このことから、感染、ストレス、障害など何らかの原因で壊死した細胞が TLR3 と結合する核酸物質を放出することで、同壊死細胞周囲の歯肉上皮細胞に発現する TLR3 を刺激し、それにより TLR2 発現が上昇して *P.g.* LPS に対する感受性が高まり、*P.g.* LPS 誘導性炎症性サイトカインの産生増加、ひいては歯周炎の増悪につながる可能性が示唆された。Beklen らの報告によると歯周炎患者の歯周組織において歯肉上皮組織内の有棘層と基底層および結合組織における TLR2 発現の上昇が認められている<sup>44</sup>。本研究結果では、TLR3 刺激時において歯肉上皮細胞の TLR2 発現が上昇したが、歯肉線維芽細胞においてはタンパクレベルでの TLR2 発現上昇の検出には至らなかった。すなわち、歯肉線維芽細胞における TLR2 発現制御については、TLR3 を介する刺激以外の別の周囲環境が必要である可能性が示唆された。Nawarat らは歯周炎罹患患者の歯周組織において、健常者の歯周組織と比較し *TLR2*、*TLR4*、*TLR9* mRNA 発現が上昇しており歯肉線維芽細胞における *TLR2* mRNA 発現の上昇に関しては *P.g.* LPS により産生誘導される TNF $\alpha$  の関与を指摘している<sup>35</sup>。しかしながら、タンパクレベルでの発現上昇に関しては報告がなく、今後のさらなる検討が必要である。

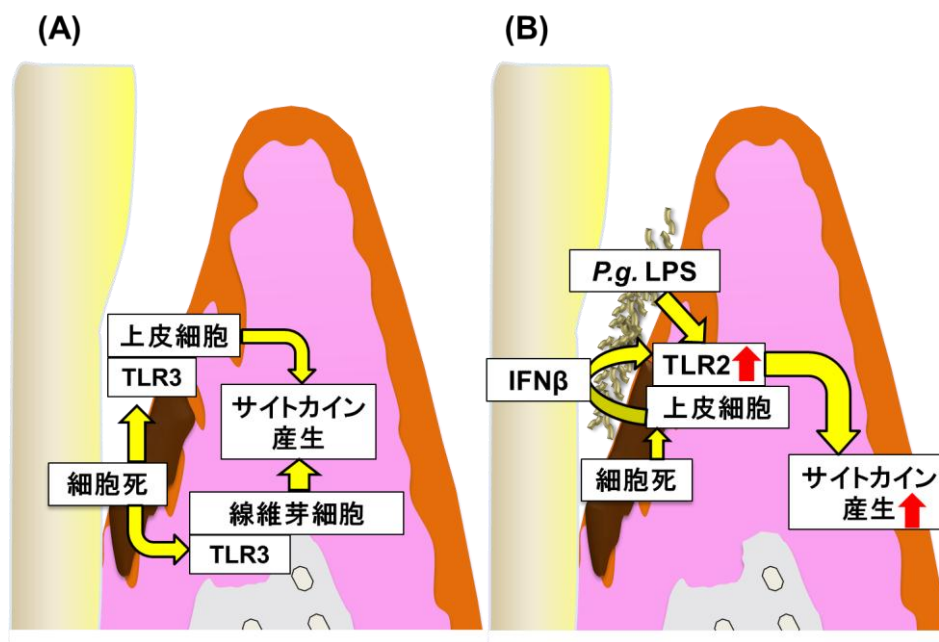
本研究において用いた TLR のリガンドの中で Poly(I:C)のみが IFN を産生する事が知られている<sup>37-39</sup>。また、IFN は主要組織適合遺伝子複合体(MHC: major histocompatibility complex)や TLR などの膜タンパク発現に影響を与える<sup>57,58</sup>ことが知られている。IFN は I 型 IFN である IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、II 型 IFN である IFN $\gamma$ 、III 型 IFN である IFN $\lambda$  が知られており、上皮細胞より産生誘導される IFN としては I 型 IFN である IFN $\alpha$  および IFN $\beta$  が知られている<sup>40</sup>。そこで epi 4 において TLR3 刺激時における IFN $\alpha$  および IFN $\beta$  の産生について検討を行ったところ、TLR3 刺激 8 時間後の培養上清中に IFN $\beta$  の産生を認めた。一方、IFN $\alpha$  については十数種類のサブタイプが知られており<sup>59</sup>、この内の複数のサブタイ

プを認識する ELISA kit (PBL interferon source)を用いて検討を行ったが、これらの産生は確認されなかった(図 6(A))。一方、IFN $\beta$ 処理により TLR2 発現は上昇し(図 6(B)、(C))、*P.g.* LPS 誘導性の IL-6、IL-8 産生量も増加した(図 6(D))。このことから、歯周炎病巣部で放出された DAMPs により歯肉上皮細胞が活性化されることにより *P.g.* LPS 誘導性の炎症性サイトカイン産生が増加することで歯周炎が増悪する可能性が示唆された。Temene らは気管支上皮細胞において TLR3 刺激により産生される IL-6 が Stat3 を介して TLR2 の発現を誘導すると報告している<sup>34</sup>。本研究では、歯肉上皮細胞における TLR3 刺激による TLR2 発現誘導に関して、IFN $\beta$ の関与が示唆されたが下流のシグナルに関しては検討を行っていない。これまでの報告では、TLR3 は double-stranded RNA を認識すると NF $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B)を活性化することでサイトカインの産生を促進することが知られている<sup>60</sup>。さらに別経路として、TLR3 を介したシグナルは細胞内アダプター分子である TRIF(Toll and IL-1R domain containing adaptor inducing interferon  $\beta$ )/TICAM-1(Toll and IL-1R containing adaptor molecule-1)を活性化し、その TRIF/TICAM-1 は TRAF3(TNF receptor associated factor 3)を介して TBK1(TANK binding kinase 1)を活性化することで IRF-3(interferon regulatory factor 3)をリン酸化することも明らかにされている。その結果、同 IRF-3 がダイマーを形成し核内に移行して *IFN* mRNA の転写が行われる<sup>61</sup>。産生された IFN $\beta$  は Interferon  $\alpha/\beta$  receptor 1(IFNAR1)/IFNAR2 により認識され IL-6 と同様に JAK-STAT 経路を活性化させることが知られている<sup>62</sup>。歯肉上皮細胞における IFN $\beta$  を介した TLR3 依存性の TLR2 発現誘導にも同様の経路が関与している可能性が想定される。この点に関しては、今後の詳細な解析が必要である(図 7)。



**図 7 TLR3 刺激時の歯肉上皮細胞における IFN $\beta$  を介した TLR2 発現誘導機序**  
 歯肉上皮細胞において TLR3 を刺激することにより IFN $\beta$  が産生された。また、歯肉上皮細胞を IFN $\beta$  で刺激することにより TLR2 の発現が上昇したことから、歯肉上皮細胞において TLR3 刺激により IFN $\beta$  が産生され autocrine に作用し、TLR2 発現制御への関連が報告されている JAK-STAT 経路の活性化を伴い TLR2 発現の上昇が生じる可能性が示唆された。また、TLR3 に関しても同経路の関与が疑われる。

今回の研究において、我々は歯周炎における壊死細胞由来の内因性起炎因子が周囲の歯周組織構成細胞である歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞に与える影響を検討した。その結果、歯周組織構成細胞は壊死細胞由来の内因性起炎因子を TLR3 を介して認識し、炎症性サイトカインを産生することを明らかにした。また、歯肉上皮細胞においては TLR3 誘導性に IFN $\beta$  を産生することにより TLR2 発現が上昇し、同細胞からの *P.g.* LPS 誘導性の炎症性サイトカイン産生量を増加させることにより、歯周炎を遷延化・増悪をきたす可能性が示唆された(図 8)。今後、上皮細胞、線維芽細胞のみならず、リンパ球、抗原提示細胞といった多様な細胞種間においても細胞壊死に端を発する歯周病発症・遷延化・増悪の病態メカニズムが存在するか否かを明らかにすることで歯周病の病態解明がさらに進み、新しい歯周病の診断法・治療法、あるいは歯周病に対する新規創薬開発につながる基礎情報が得られるものと期待される。



**図 8 歯周組織における壊死細胞由来内因性起炎因子の影響**

A) 歯周組織において、歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞は TLR3 を介して壊死細胞由来の内因性起炎因子を認識し、炎症性サイトカインを産生する可能性が考えられる。

- B) 歯肉上皮細胞において、TLR3 刺激により IFN $\beta$ の産生が誘導され、TLR2 発現が上昇することで *P.g. LPS* 誘導性炎症性サイトカイン産生量が増加し、歯周炎の増悪へつながる可能性が考えられる。

## 結論

本研究により以下の結論を得た。

1. 歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞において、内因性起炎因子は少なくとも部分的に TLR3 を介して認識されることで IL-6、IL-8 産生を誘導した。
2. 歯肉上皮細胞は TLR3 を介した刺激を受けることにより TLR2 発現を上昇させ、*P.g. LPS* に対する反応性を高めた。
3. 歯肉上皮細胞は TLR3 を介した刺激を受けることにより IFN $\beta$ を産生誘導し、その IFN $\beta$ 刺激を受けることで TLR2 発現を上昇させた。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導と御校閲を賜りました大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の進行にあたり直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座、柳田学助教に心より感謝申し上げます。

そして、本研究の遂行に対してさまざまな御協力を頂きました大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座(口腔治療学教室)の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文献

1. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:7-19.
2. Johnson DA, Chen CL, Dombrowski JC, Nowotny A. Role of bacterial products in periodontitis. I. Endotoxin content and immunogenicity of human plaque. *Journal of periodontal research* 1976;11:349-59.
3. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000 1997;14:33-53.

4. Swamy M, Jamora C, Havran W, Hayday A. Epithelial decision makers: in search of the 'epimmunome'. *Nature immunology* 2010;11:656-65.
5. Vroling AB, Fokkens WJ, van Drunen CM. How epithelial cells detect danger: aiding the immune response. *Allergy* 2008;63:1110-23.
6. Standiford TJ, Strieter RM, Kasahara K, Kunkel SL. Disparate regulation of interleukin 8 gene expression from blood monocytes, endothelial cells, and fibroblasts by interleukin 4. *Biochemical and biophysical research communications* 1990;171:531-6.
7. Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infection and immunity* 1997;65:1980-4.
8. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papapanou PN. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *Journal of dental research* 2000;79:1808-14.
9. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *Journal of periodontology* 2004;75:370-9.
10. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2002;3:349-63.
11. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends in immunology* 2005;26:150-6.
12. Yoshimura T, Leonard EJ. Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of gene JE. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1990;144:2377-83.
13. Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides lipopolysaccharides*. *Infection and immunity* 1991;59:295-301.
14. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infection and immunity* 1992;60:4932-7.
15. Murakami S, Hino E, Shimabukuro Y, et al. Direct interaction between gingival fibroblasts and lymphoid cells induces inflammatory cytokine mRNA expression in gingival fibroblasts. *Journal of dental research*

1999;78:69-76.

16. Griffith TS, Ferguson TA. Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells. *Immunity* 2011;35:456-66.

17. Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell* 2001;104:325-8.

18. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature medicine* 2007;13:851-6.

19. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* 2010;140:798-804.

20. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends in immunology* 2011;32:157-64.

21. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191-5.

22. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, et al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:24035-48.

23. Kim S, Takahashi H, Lin WW, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 2009;457:102-6.

24. Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:12542-50.

25. Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *The Journal of experimental medicine* 2005;202:1575-85.

26. Van Crombruggen K, Jacob F, Zhang N, Bachert C. Damage-associated molecular patterns and their receptors in upper airway pathologies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2013;70:4307-21.

27. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011;378:1015-26.

28. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory research* 2006;7:53.

29. Schierbeck H, Lundback P, Palmblad K, et al. Monoclonal anti-HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1) antibody protection in two experimental arthritis models. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2011;17:1039-44.
30. Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T, et al. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nature medicine* 2012;18:1286-90.
31. Oda D, Watson E. Human oral epithelial cell culture I. Improved conditions for reproducible culture in serum-free medium. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 1990;26:589-95.
32. Prasad KN, Edwards-Prasad J, Carvalho E, et al. Establishment of primary cultures of rat and human parotid epithelial cells for transfection experiments. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 1992;28a:493-9.
33. Lim DM, Wang ML. Toll-like receptor 3 signaling enables human esophageal epithelial cells to sense endogenous danger signals released by necrotic cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2011;301:G91-9.
34. Melkamu T, Kita H, O'Grady SM. TLR3 activation evokes IL-6 secretion, autocrine regulation of Stat3 signaling and TLR2 expression in human bronchial epithelial cells. *Journal of cell communication and signaling* 2013;7:109-18.
35. Wara-aswapati N, Chayasodom A, Surarit R, et al. Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of periodontology* 2013;84:1010-8.
36. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, et al. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and immunity* 2001;69:1477-82.
37. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology letters* 2003;85:85-95.
38. Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002;17:251-63.
39. Slavica L, Nordstrom I, Karlsson MN, et al. TLR3 impairment in human newborns. *Journal of leukocyte biology* 2013;94:1003-11.
40. Rauch I, Muller M, Decker T. The regulation of inflammation by

interferons and their STATs. *Jak-stat* 2013;2:e23820.

41. Seki E, Park E, Fujimoto J. Toll-like receptor signaling in liver regeneration, fibrosis and carcinogenesis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2011;41:597-610.

42. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nature medicine* 1999;5:1249-55.

43. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2000;191:423-34.

44. Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. *Oral microbiology and immunology* 2008;23:425-31.

45. Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nature reviews Immunology* 2011;11:807-22.

46. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:7370-7.

47. Suzuki T, Kobayashi M, Isatsu K, et al. Mechanisms involved in apoptosis of human macrophages induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the presence of cycloheximide. *Infection and immunity* 2004;72:1856-65.

48. Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infection and immunity* 2002;70:218-25.

49. Lalla E, Lamster IB, Feit M, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *The Journal of clinical investigation* 2000;105:1117-24.

50. Lagunes-Servin H, Torres J, Maldonado-Bernal C, et al. Toll-like receptors and cytokines are upregulated during *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter* 2013;18:423-32.

51. Pott J, Stockinger S, Torow N, et al. Age-dependent TLR3 expression of the intestinal epithelium contributes to rotavirus susceptibility. *PLoS pathogens* 2012;8:e1002670.



52. Lee HS, Hattori T, Park EY, Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Expression of toll-like receptor 4 contributes to corneal inflammation in experimental dry eye disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012;53:5632-40.
53. Wang R, Ahmed J, Wang G, et al. Airway epithelial expression of TLR5 is downregulated in healthy smokers and smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2012;189:2217-25.
54. Gallo C, Barros F, Sugaya N, Nunes F, Borra R. Differential expression of toll-like receptor mRNAs in recurrent aphthous ulceration. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2012;41:80-5.
55. Beklen A, Sorsa T, Konttinen YT. Toll-like receptors 2 and 5 in human gingival epithelial cells co-operate with T-cell cytokine interleukin-17. *Oral microbiology and immunology* 2009;24:38-42.
56. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002;169:10-4.
57. Rhodes J, Jones DH, Bleehen NM. Increased expression of human monocyte HLA-DR antigens and Fc gamma receptors in response to human interferon in vivo. *Clinical and experimental immunology* 1983;53:739-43.
58. Miettinen M, Sareneva T, Julkunen I, Matikainen S. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes and immunity* 2001;2:349-55.
59. Gibbert K, Schlaak JF, Yang D, Dittmer U. IFN-alpha subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. *British journal of pharmacology* 2013;168:1048-58.
60. Ueta M, Hamuro J, Kiyono H, Kinoshita S. Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:285-94.
61. Zhang SY, Herman M, Ciancanelli MJ, et al. TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Current opinion in immunology* 2013;25:19-33.
62. Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cellular microbiology* 2006;8:907-22.