The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯根膜特異的分子PLAP-1によるTLR2およびTLR4を介した免疫応答制御機構の解明
Author(s)	山羽, 聡子
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52342
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　山羽　聡子　　）	
論文題名	歯根膜特異的分子PLAP-1によるTLR2およびTLR4を介した免疫応答制御機構の解明

論文内容の要旨

【研究目的】

歯周炎は、歯周病原性細菌をはじめとする様々な細菌により形成されるバイオフィルムを原因とする慢性炎症性疾患である。歯周病原性細菌による持続的な感染は過剰な免疫反応を惹起し、歯周組織破壊に深く関与するとされている。一方、PLAP-1/asporinは当教室においてヒト歯根膜cDNAライブラリーより単離・同定された新規細胞外基質タンパク(ECM)であり、歯根膜に高頻度に発現することが明らかにされている。PLAP-1は、その構造よりsmall leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family class Iに属し、DecorinおよびBiglycanと非常に高い相同性を持っている。ECMは、細胞の足場として、組織・器官の形態形成や維持に重要な働きを担っているばかりでなく、シグナル分子のリザーバーとして細胞分化や増殖などに深く関わっている。さらにECMは、特定の病原体の侵入を感知し生体防御に繋げるシステムである自然免疫において、様々な分子と相互作用することで炎症、免疫反応を制御していることが近年示されている。例えばDecorin、Biglycanは共に、TLR2およびTLR4を介して炎症性サイトカインの産生を誘導し、炎症免疫反応を促進することが報告されており、SLRP family class I タンパクによる免疫制御機構が注目されている。歯周炎においては、*Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) をはじめとする様々な歯周病原性細菌がToll-like-receptors（TLR）2およびTLR4に認識され、歯周炎病態を活性化することから、SLRP family class I タンパクがTLR2およびTLR4を介した炎症反応を制御することで、歯周病原性細菌刺激に依存する歯周炎病態形成に関与している可能性が考えられる。そこで、本研究ではTLR2およびTLR4を介した炎症免疫反応におけるPLAP-1の機能について解析を行った。

【材料と方法】

1) マウス実験的歯周炎モデルにおけるPLAP-1タンパクの発現解析

8週齢C57BL/6J雄性マウスの上顎第2臼歯に5-0絹糸を結紮した。結紮2日後、6日後に上顎骨を回収、マイクロCTを撮影し、得られた画像よりセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を計測することで歯槽骨吸収量を評価した。同上顎組織より凍結薄切標本を作製し、HE染色、抗PLAP-1抗体を用いた免疫組織化学染色法にて組織学的解析およびPLAP-1の発現解析を行った。

2) 歯根膜細胞におけるTLR2およびTLR4を介したPLAP-1の炎症性サイトカイン発現制御機構の解析

PLAP-1発現アデノウイルス感染によりPLAP-1を強発現したマウス歯根膜細胞MPDL6を、TLR2アゴニストである*P. g.* LPS 2μg/mlにて刺激した。刺激後8時間まで経時的に全RNAと上清を回収し、IL-6とCXCL10の遺伝子発現およびタンパク産生をそれぞれReal-Time PCR法とELISA法にて解析した。また、PLAP-1発現アデノウイルス感染によりPLAP-1を強発現したMPDL6を、TLR4アゴニストである*Escherichia coli* (*E. coli*) LPS 200 ng/mlにて刺激した。刺激後8時間まで経時的に全RNAと上清を回収し、炎症性サイトカインIL-6とCXCL10の遺伝子発現およびタンパク産生をそれぞれReal-Time PCR法とELISA法にて解析した。

3) マクロファージにおけるTLR2およびTLR4を介したPLAP-1の炎症性サイトカイン発現制御機構の解析

8週齢C57BL/6J雄性マウスの腹腔内に4%thioglycollate培地を注射し、3日後に腹腔内を洗浄し、腹腔内の浮遊細胞を回収した。同細胞を播種し、プレートに接着した細胞をマクロファージとして実験に用いた。マクロファージをリコンビナントPLAP-1を含むコンディションメディウム(PLAP-1 CM)にて1時間前処理した後、*P. g.* LPS 1 μg/mlあるいは*E. coli* LPS 25 ng/mlにて刺激し、刺激後24時間までの経時的なTNF-αとCXCL10の遺伝子発現およびタンパク産生をそれぞれReal-Time PCR法とELISA法にて解析した。

4) PLAP-1がTLR2およびTLR4誘導性のNF-κB活性化に及ぼす影響の解析

TLR2遺伝子と共にNF-κB誘導性のSEAP(secreted embryonic alkaline phosphatase)レポーター遺伝子を安定的に発現す

るように設計されたHEK Blue hTLR2細胞を、PLAP-1 CM存在下でTLR2アゴニストであるPam3CSK4あるいは*P. g.* LPSにて刺激し、同細胞群の24時間後のSEAP活性を測定した。同様に、TLR4遺伝子とSEAPレポーター遺伝子を発現したHEK Blue hTLR4細胞を、PLAP-1 CM存在下でTLR4アゴニストである*E. coli* LPSにて刺激し、同細胞群の24時間後のSEAP活性を測定した。

5) PLAP-1とTLR2およびTLR4との免疫沈降解析

HEK293細胞にFLAG標識PLAP-1遺伝子発現ベクターおよびHA標識TLR2遺伝子発現ベクターを遺伝子導入し、48時間後に回収した全細胞画分を抗FLAG抗体ビーズあるいは抗HA抗体ビーズにて免疫沈降した。免疫沈降複合体をSDS-PAGEにて展開後、抗HA抗体あるいは抗FLAG抗体にてウェスタンブロッティングを行った。同様に、HEK293細胞にFLAG標識PLAP-1遺伝子発現ベクターおよびHA標識TLR4遺伝子発現ベクターを遺伝子導入し、回収した全細胞画分を抗FLAG抗体ビーズあるいは抗HA抗体ビーズにて免疫沈降し、抗HA抗体あるいは抗FLAG抗体にてウェスタンブロッティングを行った。

6) リコンビナントPLAP-1固相化プレートを用いたTLR2との結合解析

リコンビナントPLAP-1を固相化したプレートに、Fcタンパク融合リコンビナントTLR2を添加した。洗浄後、マウス抗Fc抗体、HRP標識抗マウスIgG抗体を添加しHRP活性値を測定することで、リコンビナントPLAP-1に結合したリコンビナントTLR2を検出した

【結果】

1) マイクロCTより得られた画像から、マウスの上顎第2臼歯に絹糸を結紮することにより、6日後には根尖に及ぶ骨吸収を伴う歯周炎が惹起された。組織学的解析およびPLAP-1の発現解析より、結紮前の歯周組織には炎症性細胞浸潤は認められず、PLAP-1は歯根膜に恒常的に発現していた。結紮2日後には、絹糸に接する歯肉上皮を中心に炎症性細胞浸潤および軽度の骨吸収を認め、PLAP-1は炎症性細胞が集積した部分に接した歯根膜において発現していた。結紮6日後では、根尖部に及ぶ著明な炎症性細胞浸潤および骨吸収を伴う歯周組織破壊が認められた。PLAP-1は炎症による歯根膜の破壊のため発現面積は減少したものの、残存した歯根膜においては発現が維持されていた。

2) MPDL6にPLAP-1を強発現させることにより、*P. g.* LPS誘導性の*Il-6*、*Cxcl10*の遺伝子発現およびCXCL10のタンパク産生は、対照群と比較して、有意に抑制された。さらに、MPDL6にPLAP-1を強発現させることにより、*E. coli* LPS誘導性のIL-6、CXCL10の遺伝子発現およびタンパク産生が有意に抑制された。

3)マクロファージをPLAP-1 CMにて前処理することにより、対照群と比較して*P. g.* LPS誘導性の*Tnf-α*と*Cxcl10*の遺伝子発現およびCXCL10のタンパク産生、*E. coli* LPS誘導性のTNF-αとCXCL10の遺伝子発現およびタンパク産生が有意に抑制された。

4) PLAP-1 CM存在下で、Pam3CSK4および*P. g.* LPSにてHEK Blue hTLR2細胞を刺激すると、対照群と比較してSEAP活性が有意に抑制された。さらに、PLAP-1 CM存在下で、*E. coli* LPSにてHEK Blue hTLR4細胞を刺激すると、SEAP活性が有意に抑制された。

5) FLAG標識PLAP-1遺伝子発現ベクターとHA標識TLR2遺伝子発現ベクターを遺伝子導入した実験群において、全細胞画分を抗FLAG抗体ビーズにて免疫沈降し、抗HA抗体にてブロッティングするとHA標識TLR2が検出された。一方、全細胞画分を抗HA抗体ビーズにて免疫沈降し、抗FLAG抗体にてブロッティングするとFLAG標識PLAP-1の共沈が検出された。同様に、FLAG標識PLAP-1遺伝子発現ベクターとHA標識TLR4遺伝子発現ベクターを遺伝子導入した実験群において、全細胞画分を抗FLAG抗体ビーズにて免疫沈降し、抗HA抗体にてブロッティングするとHA標識TLR4の共沈が検出された。一方、全細胞画分を抗HA抗体ビーズにて免疫沈降し、抗FLAG抗体にてブロッティングするとFLAG標識PLAP-1が検出された

6) リコンビナントPLAP-1を固相化したプレートに添加したリコンビナントTLR2は、濃度依存的にPLAP-1に結合することが示された。

【結論と考察】

歯周組織構成細胞である歯根膜細胞と免疫担当細胞であるマクロファージの双方において、TLR2およびTLR4を介した炎症反応をPLAP-1が抑制することが明らかとなった。すなわち炎症歯周組織において、PLAP-1はTLR2およびTLR4に直接結合することで、歯周病原性細菌により惹起される炎症反応を制御し、歯周炎などの病態形成に関与している可能性が示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　山羽　聡子）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	村上　伸也
	副 査	教授	天野　敦雄
	副 査	准教授	野杁　由一郎
	副 査	講師	野村　良太

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周組織の歯根膜に特徴的な発現を示す PLAP-1 の免疫応答制御機能について分子レベルで検討を行ったものである。

その結果、PLAP-1 がマウス実験的歯周炎モデルにおいて恒常的に発現していること、組織構成細胞である歯根膜細胞と免疫担当細胞であるマクロファージに対して、PLAP-1 が TLR2 および TLR4 誘導性の炎症性サイトカイン発現を抑制すること、PLAP-1 が TLR2 および TLR4 誘導性の NF-κB 活性化を抑制すること、PLAP-1 が TLR2 および TLR4 に結合することが明らかとなった。

以上の知見は、歯周炎の病態制御における PLAP-1 の機能を明らかにするうえで極めて有益な新規情報を提供するものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。