OUKA
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

学位論文

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

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）

山羽　聡子

（指導教官：村上 伸也 教授）

本論文の要旨は、The 91th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research（2013 年 3 月 23 日、Seattle、USA）、第 139 回日本歯科保存学会度秋季大会（2013 年 10 月 18 日、秋田）、第 57 回日本歯周病学会春季学術大会（2014 年 5 月 23 日、岐阜）において発表した。

緒言

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[1,2]。ポケット内のバイオフィルムを完全に除去することは極めて困難であり、歯周病原性細菌による持続的な感染は継続的で時として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理解されている[3]。歯周病原性細菌における、*Porphyromonas gingivalis*（*P. g.*）lipopolysaccharide（LPS）[4]、FimA、Mfa1[5]、*Tannerella forsythia*（*T. f.*） BspA[6]、*Treponema denticola*（*T. d.*） MSP[7]、*Fusobacterium nucleatum*（*F. n.*） FomA[8]、*Prevotella intermedia*（*P. i.*）、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（*A. a.*）[9]などの菌体成分は Toll-like-receptors（TLR）2 により、*T. f.* LPS[10]、*T. d.* LOS[7]、*F. n.*[11]、*P. i.* lipidA[12]、*Peptostreptococcus micros*[11]、*A. a.* LPS[13]などの菌体成分は TLR4 により認識されることで炎症反応を惹起することが明らかとなっている。さらに、重度歯周炎患者の歯肉では正常歯肉と比較し、TLR2 および TLR4 の発現が上昇していることが報告されており[14-16]、TLR2 および TLR4 が歯周病原性細菌を認識することで、歯周組織における炎症反応を修飾しているものと考えられる。

一方、PLAP-1/Asporin は当教室においてヒト歯根膜 cDNA ライブラリーより発見された新規細胞外基質タンパク（ECM）であり、歯周組織において歯根膜に特異的な発現を示すことが明らかにされている[17,18]。PLAP-1 は N 末端領域に 4 つ、C 末端領域に 2 つのシステイン残基を含むコンセンサスモチーフを有し、中央部には 10 個の leucine-rich repeat ドメインを持つ分子量約 40 kDa のプロテオグリカン様分子であり、Decorin、Biglycan と共に small leucine-rich repeat proteoglycan（SLRP）family class I に属している[19]。我々はこれまでに、PLAP-1 が BMP-2 分子と直接結合することで、BMP-2 によるシグナル伝達を阻害し、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を負に制御することを明らかにしている[18,20,21]。さらに PLAP-1/Asporin は、軟骨細胞の主要な成長因子である TGF–βと直接結合し、軟骨の分化誘導および基質産生を強く抑制することで TGF-βの機能を抑制し、変形性関節症の病態に大きく関与していることが報告されている[22]。

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[23]。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[24-29]。例えば、PLAP-1 と同じ SLRP class I に属する Decorin は TLR2 および TLR4 に結合し、TLR シグナルを誘導することで、炎症反応を惹起することが報告されている[30]。また、Decorin は *in vivo* の炎症状態において高い発現を示し、Decorin 欠損マウスは

Escherichia coli（*E. coli*） LPS 誘導性敗血性ショックに抵抗性を示し、野生型マウスと比較して血中のサイトカイン濃度が抑制される [30]。さらに Biglycan は TLR2 および TLR4 に結合し、炎症反応を誘導すること [31]、Biglycan 欠損マウスは Zymosan および *E. coli* LPS 誘導性敗血性ショックに抵抗性を示し、野生型マウスと比較して血中のサイトカイン濃度が抑制されることが報告されている [31,32]。すなわち、Decorin、Biglycan は TLR2 および TLR4 に認識されることで、炎症反応を促進することが示されている。これらの事実は、Decorin、Biglycan と相同性の高い PLAP-1 も、TLR2 および TLR4 を介した炎症反応を制御し、歯周炎の病態形成に何らかの影響を及ぼしている可能性を強く示唆している。

そこで本研究では、まずマウス実験的歯周炎モデルにおける PLAP-1 の発現局在を解析した。さらに、PLAP-1 の免疫応答制御機能を解析するために、組織構成細胞である歯根膜細胞と代表的な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に及ぼす影響、PLAP-1 が TLR2 および TLR4 誘導性の NF-κB 活性化に及ぼす影響、さらに PLAP-1 と TLR2 および TLR4 との結合能について詳細な解析を行った。

材料および方法

1. 絹糸結紮によるマウス実験的歯周炎モデル

本研究における全ての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号: 動歯 22-013-0、および動歯 24-021-0）。絹糸結紮によるマウス実験的歯周炎モデルは Abe[33] らの方法に準じて行った。すなわち、ペントバルビタールナトリウム麻酔下の 8 週齢 C57BL/6J 雄性マウス（日本 SLC 株式会社、浜松、静岡、日本）の上顎第 2 臼歯に、5-0 絹糸（Johnson & Johnson Services, Inc.、New Brunswick、NJ、USA）を結紮した。絹糸結紮 2 日後、6 日後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（PFA、和光純薬工業株式会社、大阪、大阪、日本）を用いて灌流固定したマウスより上顎第 2 臼歯を含む上顎を採取した。同組織について、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2（リガク株式会社、昭島、東京、日本）を用いて断層撮影を行い、得られた 3 次元画像を 3 次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON（ラトックシステムエンジニアリング株式会社、文京区、東京、日本）にて 2 次元化した。2 次元化した画像をもとにセメントエナメル境から歯槽骨頂までの根尖方向の距離を、画像解析ソフトウェア winroof（三谷商事株式会社、福井、福井、日本）を用いて数値化することで、歯槽骨吸収量を評価した。

2. 組織学的解析

上記マイクロ CT 解析後の上顎歯周組織を PFA にて 12 時間、浸漬固定を行った。その後モース液にて 24 時間脱灰処理後、15%、20%、25%ショ糖（和光純薬工業株式会社）含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS、和光純薬工業株式会社）にそれぞれ 24 時間浸漬し、さらに O.C.T.コンパウンド（サクラファインテックジャパン株式会社、中央区、東京、日本）を用いて凍結包埋した。クライオスタット Leica CM3050 S（Leica Microsystems GmbH、Wetzlar、Germany）を用いて厚さ 8.0 μm の凍結薄切切片を作製した。薄切標本は、マイヤー・ヘマトキシリン（武藤化学株式会社、文京区、東京、日本）および 1%エオシン Y 液（和光純薬工業株式会社）を用いてヘマトキシリン・エオシン（H-E）染色を行い、形態学的に評価した。薄切切片を乾燥後、蒸留水にて 0.3%に調整した過酸化水素（和光純薬工業株式会社）にて室温で 30 分間処理し内在性ペルオキシダーゼを不活化し、PBS にて 1.0%に調整したブタ正常血清（Vector Laboratories, Inc.、Burlingame、CA、USA）およびウシ血清アルブミン（BSA、Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.、Gaithersburg、MD、USA）と 0.1%に調整したポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル（和光純薬工業株式会社）を用いて室温にて 30 分間ブロッキングを行った。PBS にて洗浄後、1 次抗体としてヤギ抗ヒト PLAP-1 抗体（1: 400、

Abcam plc.、Cambridge、MA、USA）を 4℃にて 18 時間反応させた。PBS にて洗浄後、2 次抗体としてビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体（1: 300、Vector Laboratories, Inc.）を室温にて 30 分間反応させた。VECTASTAIN Elite ABC Standard kit（Vector Laboratories, Inc.）を用いた ABC 法にて増感し、3, 3'-diaminobenzidine（和光純薬工業株式会社）にて染色を行った。対比染色はマイヤー・ヘマトキシリンを用いて行った。なお、今回 1 次抗体として用いたヤギ抗ヒト PLAP-1 抗体については、当研究室にて樹立した PLAP-1 遺伝子欠損マウスの上顎歯周組織切片をコントロールとして用いることにより PLAP-1 特異的な反応を示すことを確認した。

3. 細胞培養と実験試薬

マウス歯根膜細胞は、当教室においてクローン化した MPDL6[18] を実験に用いた。ヒト腎臓細胞株 HEK293 細胞は、American Type Culture Collection より購入し、10%ウシ胎仔血清（FCS）含有ダルベッコ変法イーグル培地（D-MEM、Life Technologies、Carlsbad、CA、USA）培地にて培養した。HEK-Blue hTLR2 細胞（InvivoGen, Inc.、San Diego、CA、USA）および HEK-Blue hTLR4 細胞（InvivoGen, Inc.）は、10%FCS、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液（Life Technologies）、ノルモシン（InvivoGen, Inc.）含有 D-MEM 培地にて培養した。InvivoGen, Inc.から購入した *Porphyromonas gingivalis*（*P. g*） lipopolysaccharide（LPS）、*Escherichia coli*（*E. coli*） LPS、Pam3CysSerLys4（Pam3CSK4）を実験に供した。

4. マウス腹腔マクロファージの採取

マウス腹腔マクロファージは以下の方法を用いて調整した[34]。8 週齢 C57BL/6J 雄性マウスの腹腔内に 4%チオグリコレート培地（Becton, Dickinson and Company、Franklin Lakes、NJ、USA）2 ml を注射し、3 日後に 10 ml ハンクス平衡塩溶液（HBSS）（Life Technologies）を用いて腹腔内を洗浄し、腹腔内の浮遊細胞を回収した。回収した細胞を 1 穴あたり $4x10^6$ 個になるように調整して 6 穴プレート（Corning, Inc.、Corning、NY、USA）に播種した。2 時間後 HBSS 2 ml にて洗浄し浮遊物を除去し、10%FCS 含有 D-MEM 培地に交換した。プレートに接着した細胞をマクロファージとして以後の実験に用いた。プレートに播種する前の腹腔内の細胞におけるマクロファージマーカー F4/80[35] の発現を、以下に示すフローサイトメトリー法にて確認した。マウス腹腔より回収した細胞 $1x10^6$ 個を 1%FCS、0.02%アジ化ナトリウム（和光純薬工業株式会社）含有 PBS（FACS buffer）にて洗浄後、一次抗体としてラット抗マウス F4/80 抗体（1: 400、Abcam plc.）を添加し、4℃にて 30 分間反応させた。FACS buffer にて洗浄後、2 次抗体として FITC 標識ヤギ抗ラット IgG（1: 400、SouthernBiotech、Birmingham、AL、USA）

を加え4℃にて30分間反応させた。FACS bufferにて洗浄後、FACS Calibur（Becton, Dickinson and Company）を用いてFL-1の蛍光強度を測定した。

5. PLAP-1発現アデノウイルスの作製

アデノウイルスの構築はアデノウイルス作製キット（タカラバイオ株式会社、大津、滋賀、日本）を用いて行った。FLAG標識マウスPLAP-1遺伝子を組み込んだコスミドベクターをアデノウイルスパッケージング細胞HEK293細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの7‐14日後、HEK293細胞で相同組み換えにより得られたアデノウイルスクローンを回収し、陽性クローンを選別した。得られたクローンを順次、感染を繰り返し、第4次ウイルスを作製して、MPDL6への感染実験に使用した。また、コントロールウイルスとしてLacZ遺伝子発現アデノウイルスを使用した。

6. PLAP-1含有コンディションメディウムの作製

マウス腹腔マクロファージを用いた*P. g.* LPS、*E. coli* LPS刺激実験には以下の方法にて調整したコンディションメディウムを使用した。10 cmプレート（Corning, Inc.）上でD-MEM培地にて培養したMPDL6にFLAG標識マウスPLAP-1遺伝子発現アデノウイルスおよびコントロールとしてLacZ遺伝子発現アデノウイルスを感染させ、48時間後に上清を回収し、コンディションメディウムとして用いた。HEK-Blue hTLR2細胞およびHEK-Blue hTLR4細胞を用いたレポーターアッセイには以下の方法にて調整したコンディションメディウムを使用した。FLAG標識マウスPLAP-1遺伝子発現コスミドベクターを制限酵素SalI（New England Biolabs Ltd.、Herts、England）にて切断することでアデノウイルス領域が除去されたFLAG標識マウスPLAP-1遺伝子発現ベクターを作製した。10 cmプレート上でHyClone SFM4HEK293（Life Technologies）培地にて培養したHEK293細胞に、FLAG標識マウスPLAP-1遺伝子発現ベクター（24 μg）およびcDNA未導入のコントロールベクター（24 μg）を、Lipofectaime2000（Life Technologies）を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入72時間後に上清を回収し、コンディションメディウムとして用いた。作製したコンディションメディウム中のPLAP-1の発現を確認するため、コンディションメディウムを10%SDS-PAGEにて電気泳動を行い、HRP標識マウス抗FLAG抗体（Sigma-Aldrich Co.、St. Louis、MO、USA）を用いたウェスタンブロッティングにより、コンディションメディウム中のPLAP-1タンパクを検出した。

7. Real-Time PCR解析

RNAは培養細胞よりPureLink RNA Mini Kit（Life Technologies）を用いて全

RNA を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit（Life Technologies）にて逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型として、表に示す各遺伝子特異的な Real-Time PCR 用プライマーを用いて Real-Time PCR 解析を行った。PCR 反応は Fast SYBR Green Master Mix（Life Technologies）を用いて StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）にて行った。*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*（*Hprt*）遺伝子をコントロールとして用いた。

表 1 本研究で使用した Real-Time PCR 用プライマー

遺伝子	プライマー
mouse Il-6	5'- CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA -3' 5'- GCAAGTGCATCATCGTTGTTCATAC -3'
mouse Cxcl10	5'- GGCCATCAAGAATTTACTGAAAGCA -3' 5'- TCTGTGTGGTCCATCCTTGGAA -3'
mouse Tnf-α	5'- AGGGTCTGGGCCATAGAACT -3' 5'- CCACCACFCTCTTCTGTCTAC -3'
mouse Hprt	5'- TTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTA -3' 5'- AGGCAGATGGCCACAGGACTA -3'

8. ELISA 法による上清中の IL-6、CXCL10、TNF-αタンパク量の測定

上清中の IL-6、CXCL10、TNF-αタンパク量の測定は、ELISA キット Mouse IL-6 DuoSet、Mouse CXCL10 DuoSet、Mouse TNF-α DuoSet（R&D Systems, Inc.、Minneapolis、MN、USA）をそれぞれ用いて行った。吸光度計測はマイクロプレートリーダー（BIO-RAD Laboratories, Inc.、Hercules、CA、USA）を用いた。

9. HEK-Blue hTLR2 細胞および HEK-Blue hTLR4 細胞を用いたレポーターアッセイ

Pam3CSK4 は濃度が 0.1 ng/ml、1 ng/ml、10 ng/ml となるようにエンドトキシンを含まない滅菌水（和光純薬工業株式会社）にて調整し、*P. g.* LPS は 125 ng/ml、250 ng/ml、500 ng/ml、1,000 ng/ml となるように滅菌水にて調整した。96 穴プレート（Corning, Inc.）に各濃度の Pam3CSK4、各濃度の *P. g.* LPS、滅菌水を 10 µl、FLAG 標識マウス PLAP-1 遺伝子発現ベクターを遺伝子導入した細胞より得た上

清あるいはコントロールベクターを遺伝子導入した細胞より得た上清を 10 μl 添加し、その上から D-MEM 培地にて $5x10^4$ 個/ml になるように調整した HEK-Blue hTLR2 細胞懸濁液 180 μl を播種した。24 時間培養後、上清を 20 μl 回収し、QUANTI-Blue（InvivoGen, Inc.）180 μl と混和し 2 時間培養後、波長 630 nm の吸光度を測定し、コントロール群に対する相対値を計算した。同様に、96 穴プレートに 100 ng/ml となるように滅菌水にて調整した *E. coli* LPS あるいは滅菌水を 10 μl、FLAG 標識マウス PLAP-1 遺伝子発現ベクターを遺伝子導入した細胞より得た上清あるいはコントロールベクターを遺伝子導入した細胞より得た上清を 10 μl 添加し、その上から D-MEM 培地にて $2.5x10^4$ 個/ml になるように調整した HEK-Blue hTLR4 細胞懸濁液 180 μl を播種した。24 時間培養後、上清を 20 μl 回収し、QUANTI-Blue 180 μl と混和し 2 時間培養後、波長 630 nm の吸光度を測定し、コントロール群に対する相対値を計算した。

10. PLAP-1 と TLR2、あるいは PLAP-1 と TLR4 の共免疫沈降とウェスタンブロッティング

6 穴プレート上の HEK293 細胞の培地を D-MEM 培地から HyClone SFM4HEK293 培地に交換、2 時間後に Lipofectamine3000（Life Technologies）を用いて FLAG 標識マウス PLAP-1 遺伝子発現ベクター（1.25 μg）、HA 標識 TLR2 遺伝子発現ベクター（1.25 μg、InvivoGen, Inc.）を遺伝子導入した。2 日間培養後プロテアーゼインヒビターカクテル錠（Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA）を加えた RIPA Lysis Buffer（Millipore、Billerica、MA、USA）を用いて全細胞画分を回収した。回収した細胞画分に抗 FLAG 抗体結合ビーズ（Sigma-Aldrich Co.）あるいは抗 HA 抗体結合ビーズ（Sigma-Aldrich Co.）とプロテアーゼインヒビターカクテル錠を加えたトリス緩衝生理食塩水（TBS、50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl）を加え 4℃にて 1 時間混和し、遠心分離（8,000 g、1 分間）により、免疫沈降複合体を回収し、TBS にて 3 回洗浄した。サンプルは 7.5%および 10%SDS-PAGE にて電気泳動を行い、PVDF トランスファーメンブレン（GE Healthcare1、Buckinghamshire、England）ブロッティング装置（BIO-RAD Laboratories, Inc.）を用いて 2 時間、75 V にて転写した。メンブレンは 5%スキムミルク（森永乳業株式会社、港区、東京、日本）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート溶液（和光純薬工業株式会社）を含む TBS に 2 時間浸してブロッキングを行った。FLAG 標識マウス PLAP-1 の検出は 1 次抗体には HRP 標識マウス抗 FLAG 抗体（1: 10,000、Sigma-Aldrich Co.）、HA 標識 TLR2 の検出はマウス抗 HA 抗体（1: 1,000、InvivoGen, Inc.）を用いた。抗 HA 抗体に対する二次抗体には、HRP 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体（1: 5,000、GE Healthcare1）を用いた。その後、メンブレンを SuperSignal West Pico

Chemiluminescent Substrate（Life Technologies）を用いて発光シグナルを増幅し、ImageQuant LAS 4000（GE Healthcare1）にて特異的バンドを検出した。同様に、HEK293 細胞に Lipofectamine3000 を用いて FLAG 標識マウス PLAP-1 遺伝子発現ベクター（1.25 μg）、HA 標識 TLR4 遺伝子発現ベクター（1.25 μg）を遺伝子導入した。2 日間培養後全細胞画分を回収し、回収した細胞画分に抗 FLAG 抗体結合ビーズあるいは抗 HA 抗体結合ビーズ（Sigma-Aldrich Co.）を加え 4℃にて 1 時間混和し、遠心分離（8,000 g、1 分間）により、免疫沈降複合体を回収した。サンプルは 7.5%および 10%SDS-PAGE にて電気泳動を行い、PVDF トランスファーメンブレン、ブロッティング装置を用いて転写した。メンブレンは 5%スキムミルク含有 TBS に 2 時間浸してブロッキングを行った。FLAG 標識マウス PLAP-1 の検出は 1 次抗体には HRP 標識マウス抗 FLAG 抗体（1: 10,000）、HA 標識 TLR4 の検出はマウス抗 HA 抗体（1: 1,000）を用いた。抗 HA 抗体に対する二次抗体には、HRP 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体（1: 5,000）を用いた。その後、メンブレンを SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate を用いて発光シグナルを増幅し、ImageQuant LAS 4000 にて特異的バンドを検出した。

11. リコンビナント PLAP-1 固相化プレートを用いたリコンビナント PLAP-1 とリコンビナント TLR2 の結合解析

バキュロウイルスを感染させたカイコより作製したリコンビナントマウス PLAP-1 タンパク [18]（20 μg/ml）100 μl あるいはコントロールとして Elution buffer（8 mM Tris-HCl pH8.0、0.012 M NaCl、10 mM Imidazol、0.4%Glycerol、0.004%Zwittergent 3-14、0.002%2-mercaptoethanol）100 μl を、96 穴プレートに添加し 4℃にて同上タンパクを一晩固相化を行った後に、5%BSA（Sigma-Aldrich Co.）を含む PBS にてブロッキングを行った。濃度を 2.5、5、10 μg/ml に調整した Fc タンパク融合リコンビナント TLR2（R&D Systems, Inc.）100 μl を添加し 37℃にて 2 時間反応させ、その後マウス抗ヒト IgG_1 Fc region 抗体（1: 500、R&D Systems, Inc.）を添加し室温で 2 時間反応させた。続いて HRP 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体（1: 5,000）を添加し 1 時間反応させ、3, 3’, 5, 5’-tetramethylbenzidine（R&D Systems, Inc.）を添加し 20 分間反応させた。その後反応停止薬として 1M H_2SO_4（和光純薬工業株式会社）を添加し、マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm の吸光度を計測した。

12. 統計処理

実験データは 3 群の平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較は t 検定を、多群比較は Bonferroni 検定を用いて行い、$p < 0.05$ を有意差があるものとした。

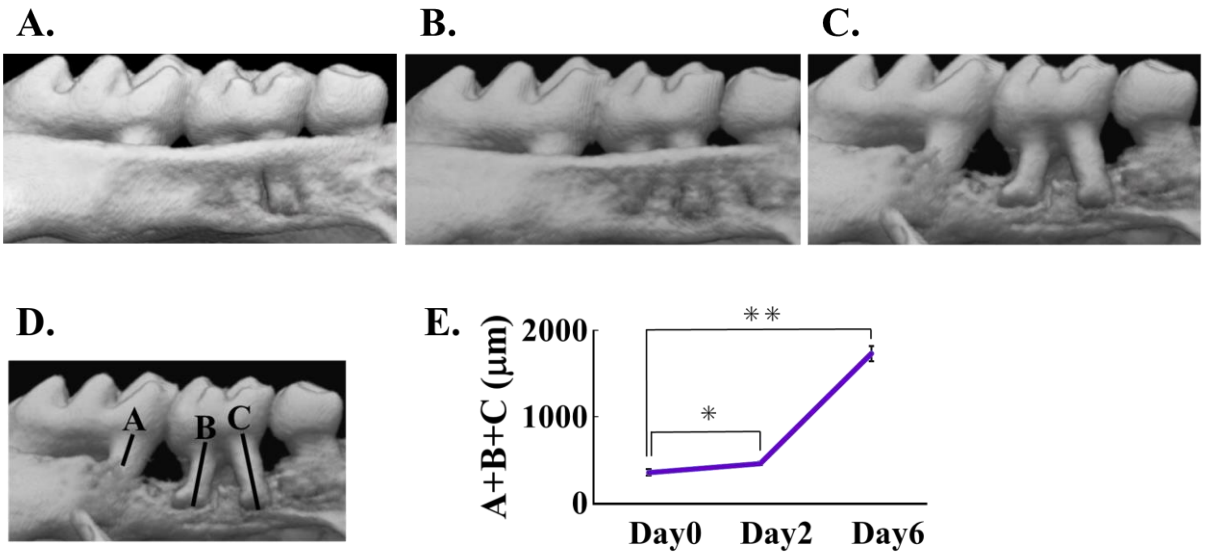
結果

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

炎症状態における PLAP-1 の発現を検討するため、絹糸結紮を用いてマウス実験的歯周炎モデルを作製した。マイクロ CT により得られた画像から、マウスの第 2 臼歯歯頸部に絹糸を結紮することにより、結紮 6 日後には根尖に及ぶ歯槽骨吸収を伴う歯周炎が惹起されることが確認された（図 1A-E）。

同モデルの組織学的解析および PLAP-1 の発現解析のため、矢状断薄切標本を作製し H-E 染色、抗 PLAP-1 抗体を用いた免疫組織化学による染色を行った。結紮前の歯周組織には炎症性細胞浸潤は認められず（図 1F）、PLAP-1 は歯根膜に恒常的に発現していた（図 1I、L）。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（図 1G）、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（図 1J、M）。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（図 1H）。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（図 1K、N）。

以上の結果から、PLAP-1 はマウス実験的歯周炎モデルにおいて、炎症歯根膜組織においても、発現が維持されていることが明らかとなった。



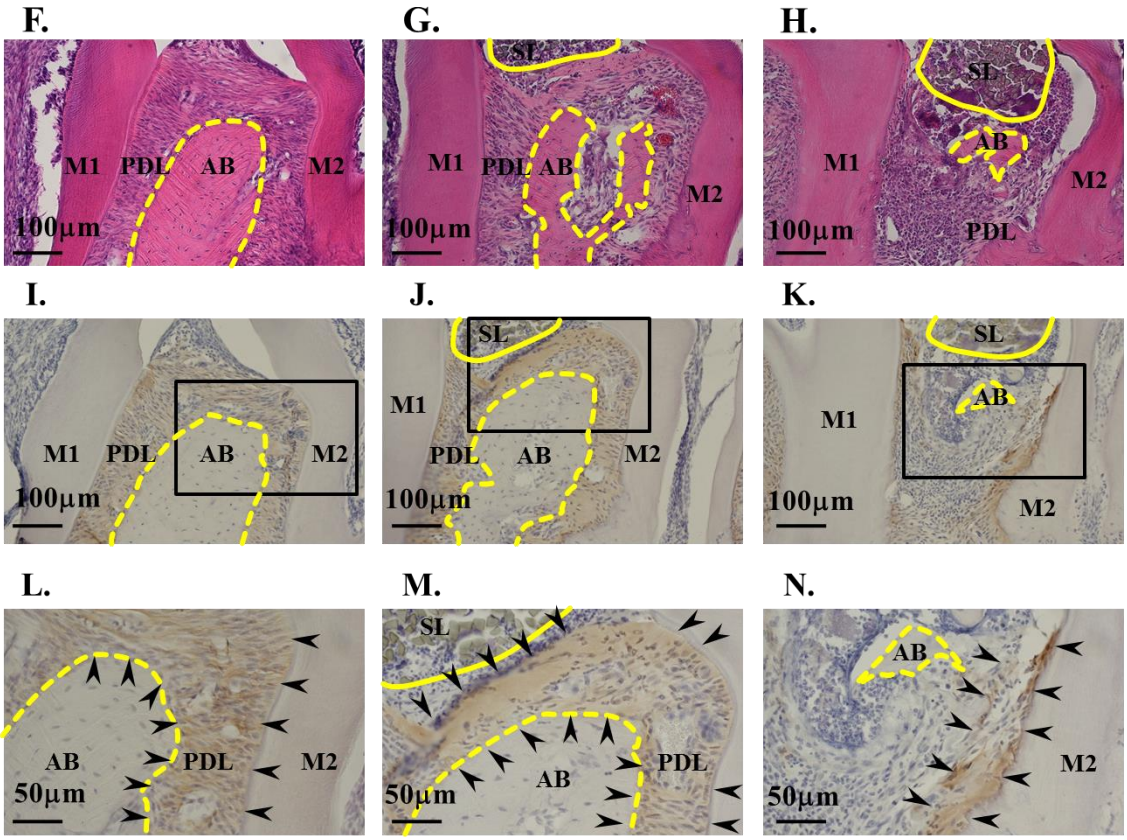


図 1　マウス実験的歯周炎モデルにおける PLAP-1 タンパクの発現

8 週齢 C57BL/6J マウスの第 2 臼歯に絹糸を結紮し、2 日後および 6 日後に上顎骨を回収し、マイクロ CT 解析、H-E 染色、抗 PLAP-1 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。結紮前（A)、結紮 2 日後（B)、結紮 6 日後（C）のマイクロ CT 像を示す。

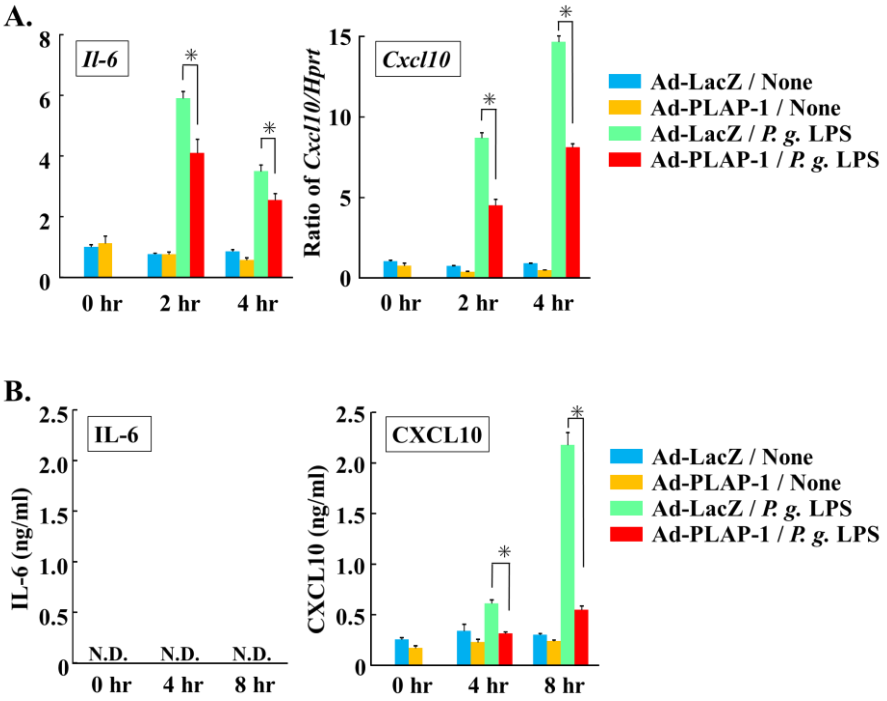
（D）歯槽骨吸収量の測定方法: A+B+C で得られる距離の和を歯槽骨吸収量とした。(E）歯槽骨吸収量の経時点変化を平均値±標準誤差（n=3）で示した。*, $p < 0.05$、**, $p < 0.01$

結紮前（F)、結紮 2 日後（G)、結紮 6 日後（H）の H-E 染色、結紮前（I、L)、結紮 2 日後（J、M)、結紮 6 日後（K、N）の抗 PLAP-1 抗体を用いた免疫組織化学染色像およびその拡大像。矢頭: PLAP-1 の発現が認められた部位を示す。M1: 第 1 臼歯、M2: 第 2 臼歯、PDL: 歯根膜、AB: 歯槽骨（黄色点線)、SL: 絹糸（黄色実線）

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 遺伝子発現アデノウイルスを感染させることで PLAP-1 を強発現した MPDL6 を TLR2 のリガンドである *P. g.* LPS を用いて刺激し、IL-6 および CXCL10 の発現を解析した。その結果、LacZ 遺伝子発現アデノウイルスを感染させたコントロール群を *P. g.* LPS にて刺激すると *Il-6*、*Cxcl10* の遺伝子発現および CXCL10 のタンパク発現が上昇した（図 2A、B）。一方、PLAP-1 を強発現した MPDL6 においては、コントロール群と比較し、*Il-6*、*Cxcl10* の遺伝子発現誘導および CXCL10 のタンパク産生量が抑制された。また、IL-6 の上清中のタンパク量は低く、検出圏外であった（図 2A、B）。

次に TLR4 のリガンドである *E. coli* LPS を用いて TLR4 への影響を解析した。PLAP-1 を強発現した MPDL6 においては、LacZ 遺伝子発現アデノウイルスを感染させたコントロール群と比較し、有意に *E. coli* LPS 誘導性の IL-6、CXCL10 の遺伝子発現およびタンパク発現の抑制が認められた（図 2C、D）。



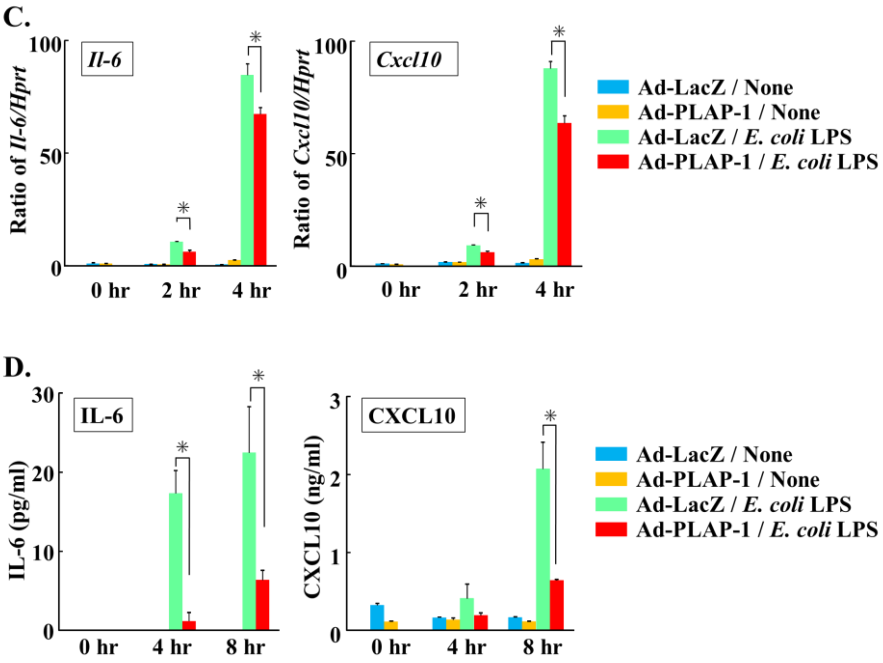


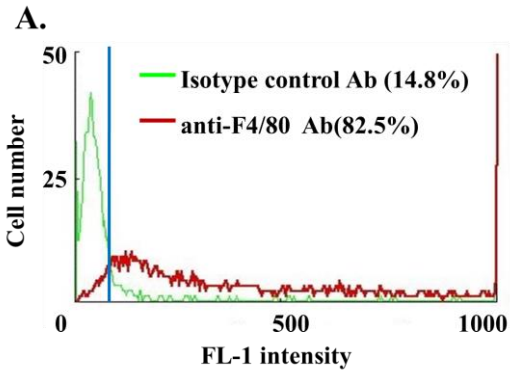
図 2　MPDL6 において、PLAP-1 強発現が *P. g.* LPS および *E. coli* LPS 誘導性の炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響

A. PLAP-1 遺伝子発現アデノウイルスを感染させることで PLAP-1 を強発現した MPDL6 を *P. g.* LPS（2 μg/ml）にて刺激し、4 時間までの *Il-6*、*Cxcl10* の遺伝子発現を Real-Time PCR 法により解析を行った。B. PLAP-1 遺伝子発現アデノウイルスを感染させることで PLAP-1 を強発現した MPDL6 を *P. g.* LPS（2 μg/ml）にて刺激し、8 時間までの IL-6、CXCL10 の上清中のタンパク量を ELISA 法により解析を行った。Ad-LacZ / None: 無刺激の LacZ 遺伝子発現アデノウイルス感染群、Ad-PLAP-1 / None: 無刺激の PLAP-1 遺伝子発現アデノウイルス感染群、Ad-LacZ / *P. g.* LPS: *P. g.* LPS にて刺激した LacZ 遺伝子発現アデノウイルス感染群、Ad-PLAP-1 / *P. g.* LPS: *P. g.* LPS にて刺激した PLAP-1 遺伝子発現アデノウイルス感染群、N.D.: Not Detected　C. PLAP-1 遺伝子発現アデノウイルスを感染させることで PLAP-1 を強発現した MPDL6 を *E. coli* LPS（200 ng/ml）にて刺激し、4 時間までの *Il-6*、*Cxcl10* の遺伝子発現を Real-Time PCR 法により解析を行った。D. PLAP-1 遺伝子発現アデノウイルスを感染させることで PLAP-1 を強発現した MPDL6 を *E. coli* LPS（200 ng/ml）にて刺激し、8 時間までの IL-6、CXCL10 の上清中のタンパク量を ELISA 法により解析を行った。Ad-LacZ / None: 無刺激の LacZ 発現アデノウイルス感染群、Ad-PLAP-1 / None: 無刺激の PLAP-1 発現アデノウイルス感染群、Ad-LacZ / *E. coli* LPS: *E. coli* LPS にて刺激した LacZ 発現アデノウイルス感染群、Ad-PLAP-1 / *E. coli* LPS: *E. coli* LPS にて刺激した PLAP-1 発現アデノウイルス感染群

解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。*，$p < 0.01$

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

歯周炎に罹患した歯周組織において、慢性的に免疫担当細胞が遊走・定着することが、同部の炎症の遷延化に寄与していると考えられている。さらに、浸潤したマクロファージが炎症性サイトカインを過剰に産生することが、歯周組織破壊に深く関与していると報告されている[5]。そこでマクロファージにおいて PLAP-1 が TLR2 および TLR4 を介した炎症性サイトカイン発現に与える影響について解析を行った。なお、マクロファージは PLAP-1 を発現していないため、PLAP-1 遺伝子発現アデノウイルスを感染させた細胞の上清（PLAP-1 CM）にて前処理することで PLAP-1 を外因的に作用し、PLAP-1 によるマクロファージの機能制御を解析した。採取したマウス腹腔内の細胞におけるマクロファージマーカーF4/80 の発現を抗 F4/80 抗体を用いたフローサイトメトリー法にて解析した結果、82.5%の細胞がマクロファージマーカーF4/80 を発現していた（図 3A）。同細胞をプレートに播種し、2 時間培養後洗浄して浮遊物を除去し、プレートに接着した細胞をマウス腹腔マクロファージとして以下の実験に用いた。マウス腹腔マクロファージを PLAP-1 CM にて 1 時間前処理し、その後 *P. g.* LPS にて刺激し、TNF-αおよび CXCL10 の発現を解析した。その結果、コントロールとして LacZ 遺伝子発現アデノウイルスを感染させた細胞の上清にて前処理した腹腔マクロファージを *P. g.* LPS にて刺激すると *Tnf-α*、*Cxcl10* の遺伝子発現および CXCL10 のタンパク発現が上昇した（図 3B、C）。一方、PLAP-1 CM にて前処理した腹腔マクロファージはコントロール群と比較し *Tnf-α*、*Cxcl10* の遺伝子発現誘導および CXCL10 のタンパク産生量は有意に抑制された（図 3B、C）。TNF-α の上清中のタンパク濃度は低く検出圏外であった。次に *E. coli* LPS を用いて TLR4 への影響を解析した。その結果、PLAP-1 CM にて前処理した腹腔マクロファージにおいて、コントロール群と比較し、*E. coli* LPS 誘導性の TNF-α、CXCL10 の遺伝子発現およびタンパク発現の有意な抑制が認められた（図 3D、E）。



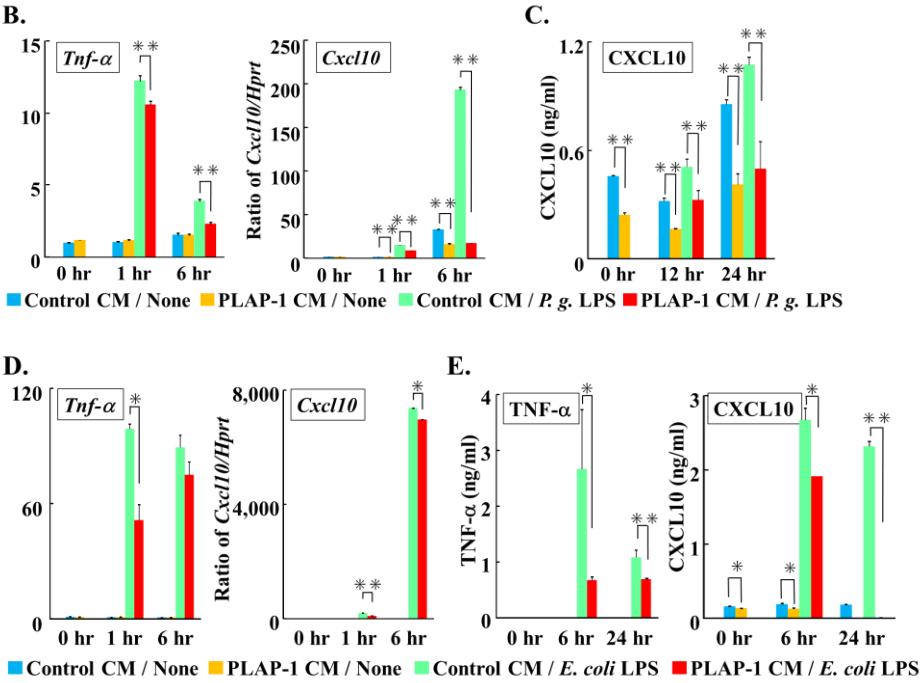


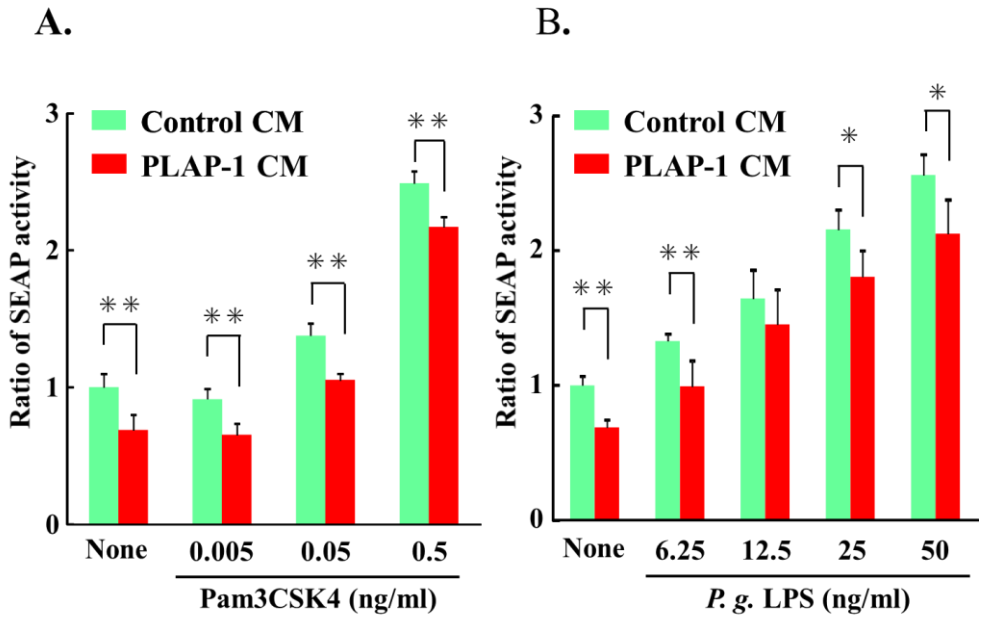
図 3　マウス腹腔マクロファージにおいて、PLAP-1 前処理が *P. g.* LPS および *E. coli* LPS 誘導性の炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響

A.　thioglycollate 培地をマウス腹腔内に投与し、3 日後に腹腔内の浮遊細胞を回収した。回収した細胞におけるマクロファージマーカーF4/80 の発現をフローサイトメトリー法にて解析した。Isotype control Ab: 非特異的ラット IgG 抗体染色群、anti-F4/80 Ab: ラット抗 F4/80 抗体染色群　B. PLAP-1 遺伝子発現アデノウイルスを感染させた細胞の上清（PLAP-1 CM）にて前処理したマウス腹腔マクロファージを *P. g.* LPS（1 μg/ml）にて刺激し、6 時間までの *Tnf-α*、*Cxcl10* の遺伝子発現を Real-Time PCR 法により解析を行った。C. PLAP-1 CM にて前処理したマウス腹腔マクロファージを *P. g.* LPS（1 μg/ml）にて刺激し、24 時間までの CXCL10 の上清中のタンパク量を ELISA 法により解析を行った。Control CM / None: 無刺激の LacZ 遺伝子発現アデノウイルスを感染させた細胞の上清（Control CM）による前処理群、PLAP-1 CM / None: 無刺激の PLAP-1 CM による前処理群、Control CM / *P. g.* LPS: *P. g.* LPS にて刺激した Control CM による前処理群、PLAP-1 CM / *P. g.* LPS: *P. g.* LPS にて刺激した PLAP-1 CM による前処理群　D.　PLAP-1 CM にて前処理したマウス腹腔マクロファージを *E. coli* LPS（25 ng/ml）にて刺激し、*Tnf-α*、*Cxcl10* の 6 時間までの遺伝子発現を Real-Time PCR 法により解析を行った。E. PLAP-1 CM にて前処理したマウス腹腔マクロファージを *E. coli* LPS（25 ng/ml）にて刺激し、24 時間までの上清中のタンパク量を ELISA 法により解析を行った。Control CM / None: 無刺激の Control CM による前処理群、PLAP-1 CM / None: 無刺激の PLAP-1 CM による前処理群、Control CM / *E. coli* LPS: *E. coli* LPS にて刺激した Control CM による前処理群、PLAP-1 CM / *E. coli* LPS: *E. coli* LPS にて刺激した PLAP-1 CM による前処理群

解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。*, $p < 0.05$、**, $p < 0.01$

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

NF-κB は TLR シグナル伝達において最も重要な転写因子の一つであり、IL-6、TNF-αを含む多くの炎症性サイトカインの産生に関与している[36]。これまでの実験結果より、PLAP-1 は TLR2 および TLR4 誘導性の炎症性サイトカインの発現を抑制することが明らかとなった。そこで、PLAP-1 が TLR2 および TLR4 の下流の細胞内シグナルである NF-κB 転写活性に及ぼす影響について解析を行った。TLR2 及び NF-κB 誘導性 SEAP レポーター遺伝子を安定的に発現した HEK-Blue hTLR2 細胞を、PLAP-1 CM 存在下で TLR2 のリガンドである Pam3CSK4 あるいは *P. g.* LPS にて刺激し、24 時間後の SEAP 活性を計測した。その結果、コントロールベクターを遺伝子導入した細胞より得た上清の存在下で HEK-Blue hTLR2 細胞を Pam3CSK4 あるいは *P. g.* LPS にて刺激すると、SEAP 活性が濃度依存的に誘導された（図 4A、B）。一方、PLAP-1 遺伝子発現ベクターを遺伝子導入した細胞の上清（PLAP-1 CM）存在下では SEAP 活性誘導が抑制された（図 4A、B）。同様に、TLR4、MD-2、CD14 および SEAP レポーター遺伝子を安定的に発現した HEK-Blue hTLR4 細胞を PLAP-1 CM 存在下で *E. coli* LPS にて刺激し、24 時間後の SEAP 活性を計測した。その結果、PLAP-1 CM は *E. coli* LPS 誘導性の SEAP 活性を有意に抑制した（図 4C）。



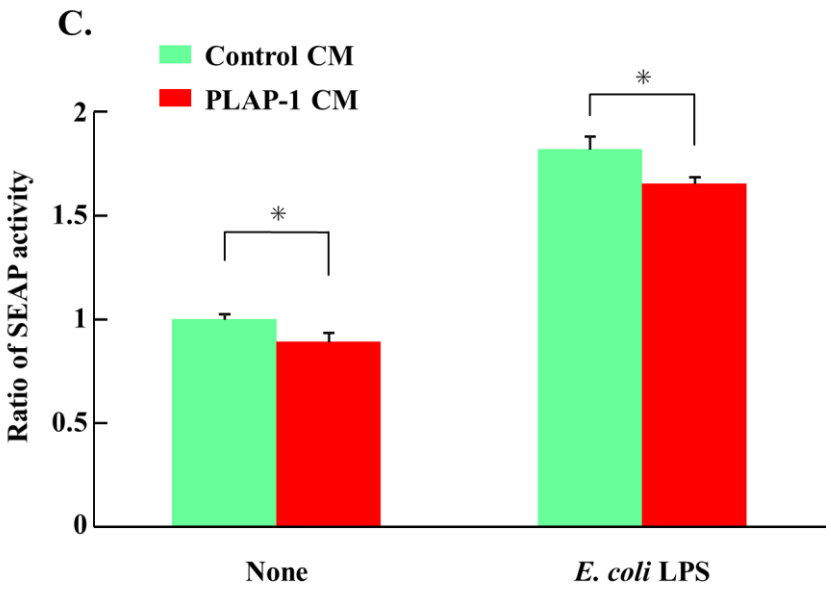


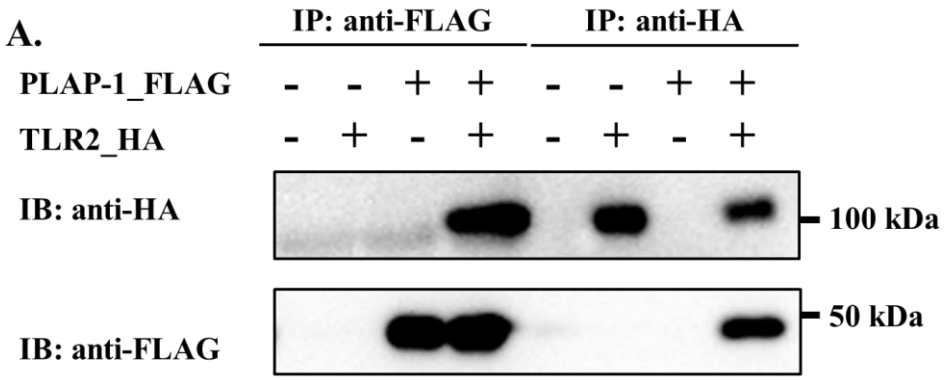
図 4　PLAP-1 が TLR2 および TLR4 誘導性の NF-κB 活性化に及ぼす影響

A. PLAP-1 遺伝子発現ベクターを遺伝子導入した細胞の上清（PLAP-1 CM）存在下で HEK-Blue hTLR2 細胞を Pam3CSK4（0.005、0.05、0.5 ng/ml）にて刺激し、24 時間後の SEAP 活性を測定した。B. PLAP-1 CM 存在下で HEK-Blue hTLR2 細胞を *P. g.* LPS（6.25、12.5、25、50 ng/ml）にて刺激し、24 時間後の SEAP 活性を測定した。C. PLAP-1 CM 存在下で HEK-Blue hTLR4 細胞を *E. coli* LPS（5 ng/ml）にて刺激し、24 時間後の SEAP 活性を測定した。Control CM: コントロールベクターを遺伝子導入した細胞より得た上清にて培養した群、PLAP-1 CM: PLAP-1 CM にて培養した群

解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。*, $p < 0.05$、**, $p < 0.01$

5. PLAP-1 と TLR2 および TLR4 との免疫沈降解析

PLAP-1 と TLR2 および TLR4 との結合能を解析することにより、抑制機能の分子機序を解明することを試みた。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。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（図 5A）。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（図 5A）。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。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（図 5B）。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（図 5B）。以上の結果から、HEK293 細胞において PLAP-1 が TLR2 および TLR4 と結合することが示された。



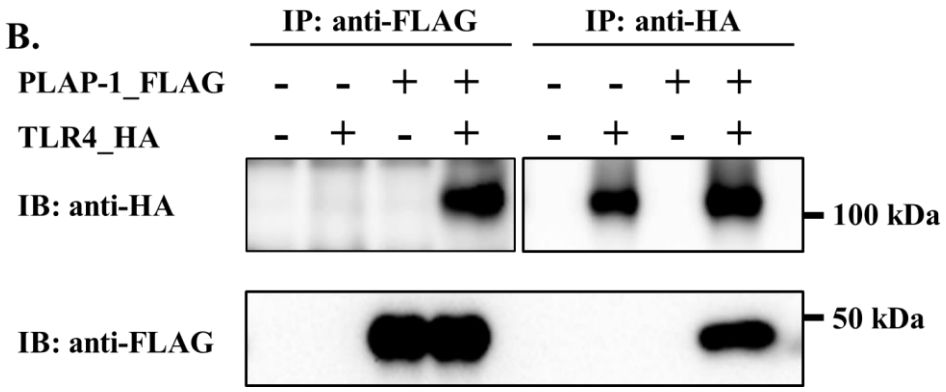


図 5　PLAP-1 と TLR2 および TLR4 との結合解析

A. HEK293 細胞に FLAG 標識 PLAP-1 遺伝子発現ベクター（1.25 μg）および HA 標識 TLR2 遺伝子発現ベクター（1.25 μg）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た。それぞれを SDS-PAGE にて展開し、PVDF メンブレンに転写後、抗 HA 抗体および抗 FLAG 抗体にてブロッティングを行った。B. HEK293 細胞に FLAG 標識 PLAP-1 遺伝子発現ベクター（1.25 μg）および HA 標識 TLR4 遺伝子発現ベクター（1.25 μg）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た。それぞれを SDS-PAGE にて展開し、PVDF メンブレンに転写後、抗 HA 抗体および抗 FLAG 抗体にてブロッティングを行った。3 回の実験で得られた同様の結果のうち，代表的なものを示す。PLAP-1_FLAG: FLAG 標識 PLAP-1 遺伝子発現ベクター遺伝子導入群、TLR2_HA: HA 標識 TLR2 遺伝子発現ベクター遺伝子導入群、TLR4_HA: HA 標識 TLR4 遺伝子発現ベクター遺伝子導入群、IB: anti-HA: 抗 HA 抗体によるブロッティング、IB: anti-FLAG: 抗 FLAG 抗体によるブロッティング、IP: anti-HA: 抗 HA 抗体ビーズによる免疫沈降、IP: anti-FLAG: 抗 FLAG 抗体ビーズによる免疫沈降

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

PLAP-1 と TLR2 との直接的な結合を詳細に検証するため、リコンビナント PLAP-1 を固相化したプレートを用いて解析を行った。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（図 6）。その結果、リコンビナント TLR2 は濃度依存的にリコンビナント PLAP-1 に結合することが示された。

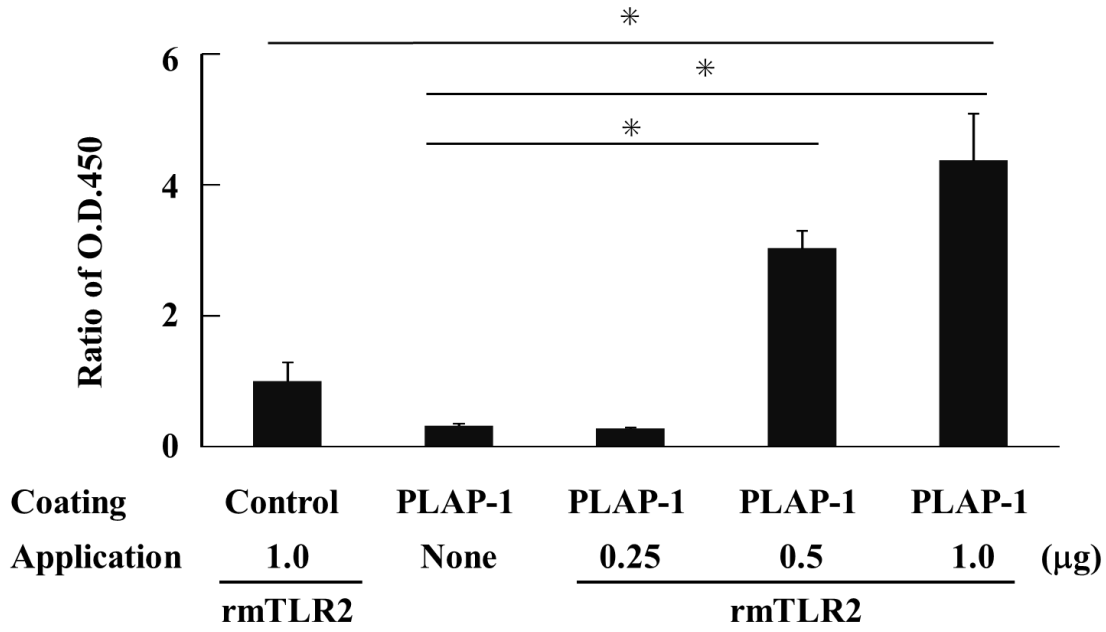


図 6　リコンビナント PLAP-1 固相化プレートを用いた TLR2 と PLAP-1 の結合解析

リコンビナント PLAP-1（20 μg/ml）を固相化した 96 穴プレートに Fc タンパク融合リコンビナント TLR2（2.5、5、10 μg/ml）100 μl を加え、洗浄後マウス抗 Fc 抗体、HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて、リコンビナント PLAP-1 に結合したリコンビナント Fc タンパク融合リコンビナント TLR2 を検出した。Control: Elution buffer（8 mM Tris-HCl pH8.0、0.012 M NaCl、10 mM Imidazol、0.4%Glycerol、0.004%Zwittergent 3-14、0.002% 2-mercaptoethanol）のみの群、PLAP-1: リコンビナント PLAP-1 による固相化を行った群、rmTLR2: Fc タンパク融合リコンビナント TLR2

解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。*****, $p < 0.01$

考察

本研究は、歯根膜に特徴的に発現する分子である PLAP-1 が TLR2 および TLR4 を介した炎症反応に及ぼす影響を解析したものである。

マウス実験的歯周炎モデルにおいて、PLAP-1 は炎症性細胞浸潤が認められる炎症歯根膜にて減弱することなく発現が維持されていることが示された。Jiao *et al.*の報告から絹糸結紮によるマウス実験的歯周炎モデルにおける歯槽骨吸収は、絹糸中に形成された細菌叢により引き起こされることが明らかとなっている[37]。したがって、本研究のマウス実験的歯周炎モデルにおいても、マウス口腔内細菌による侵襲を受けた炎症性細胞浸潤を伴う炎症歯周組織において、絹糸中の細菌叢、歯根膜組織の産生する PLAP-1 分子および炎症組織に浸潤した免疫担当細胞との直接的な相互作用が誘導され、PLAP-1 が歯周炎病態における炎症反応に関与している可能性が考えられる。

PLAP-1 は当研究室において、ヒト歯根膜組織 3'末端 cDNA ライブラリーを構築し、*in vivo* でのヒト歯根膜組織遺伝子発現プロフィールを作製し、解析を行うことにより単離・同定された新規のタンパクであり[17]、歯周組織において歯根膜組織に特異的な発現を認める。一方、PLAP-1 と同じ SLRP class I に属する Decorin は歯周組織に広く検出され、象牙質の形成や歯根膜の形成を制御していることが示唆されている[38,39]。また、Biglycan も歯周組織において象牙芽細胞やエナメル芽細胞に発現し、その分化に関与していることが示唆されている[40-42]。歯根膜組織 cDNA ライブラリーにおける総数 1752 個の配列のうち、PLAP-1 は出現頻度が 7 と高い発現を認めた一方、Decorin、Biglycan はともに頻度 1 の発現しか示さず、歯根膜において PLAP-1 が Decorin、Biglycan と異なった発現制御および機能を有する分子であることが推測される。分子構造上の相違点として Decorin、Biglycan はそれぞれ 1 ヶ所および 2 ヶ所の glycosaminoglycan（GAG）領域を有するプロテオグリカン分子である一方、PLAP-1 は全く GAG 結合領域を有しておらずプロテオグリカン分子ではないこと、さらに N 末端領域に特有のアスパラギン酸の繰り返し構造を有することが示されている[19,43]。さらに BMP ファミリー分子のシグナル伝達に対する機能において、3 分子ともに BMP およびその受容体への結合能を有しながら Decorin、PLAP-1 は抑制的に、Biglycan は促進的に機能することが明らかとなっている[44-46]。免疫応答反応に関しては、Decorin および Biglycan は、TLR2 および TLR4 誘導性の炎症反応を促進することが報告されている[30-32]。一方、今回の結果より PLAP-1 は TLR2 および TLR4 誘導性の炎症反応を抑制することが明らかとなった。したがって、TLR シグナルにおいても、PLAP-1 が GAG 領域の有無などの分子構造上の違いにより Decorin、Biglycan と相反する機能を有するものと考えている。また、Biglycan

は TLR2 および TLR4 以外の TLR ファミリーに対して活性化を行わないことが報告されている[31]。すなわち PLAP-1 が TLR ファミリーのうち TLR2 および TLR4 に対してのみ抑制作用を持つ可能性が考えられる。今後は PLAP-1 による他の TLR を介した免疫応答反応への影響について、詳細な解析を行っていく予定である。

当研究室ではこれまでに、歯根膜において特徴的に発現する PLAP-1 が BMP-2 による歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化シグナル伝達を阻害することを明らかとしている[18]。PLAP-1 は歯根膜において硬組織形成を抑制することで、高い硬組織形成能を有しながらも生理的条件下では軟組織として機能する歯根膜の組織恒常性維持に重要な役割を果たしている。一方、慢性炎症巣においては、組織を構成する細胞と免疫担当細胞は、サイトカインやケモカインなどの炎症メディエーターを介して相互作用する。組織構成細胞から産生される炎症性サイトカインは血管からの免疫担当細胞浸潤を誘導し[47-49]、遊走を果たした免疫担当細胞から過剰に産生された炎症性サイトカインは、組織構成細胞に作用することにより、種々のストレス応答反応が活性化され組織破壊が進むとされている[50]。慢性炎症では長期に及ぶストレス応答のために炎症反応が遷延化し、恒常性が破綻する。このように組織構成細胞と免疫担当細胞間での炎症メディエーターを介した相互作用は、慢性炎症疾患である歯周炎における組織破壊においても関与していると考えられる。そして本研究成果は、PLAP-1 は双方から産生される炎症性サイトカインの作用を制御することで、過剰なストレス応答による組織破壊を抑制している可能性を示唆するものである。

歯周炎においては自然免疫と適応免疫が相互に作用し合うことで免疫機能を制御している[51]。自然免疫においては今回検証したマクロファージのみならず好中球が重要な役割をもつが、好中球は TLR3 を除くすべての TLR を発現しており、活性化することによりサイトカインを産生することが報告されている[52]。一方、適応免疫においては T 細胞および B 細胞が重要な役割を有するが、T 細胞における TLR の活性化は、直接的に適応免疫応答の活性化を果たすこと[53]、B 細胞のもつ抗体産生機能においては、T 細胞による活性化のみならず TLR シグナルが必要であることが明らかとされている[54]。このように、TLR シグナルは自然免疫と適応免疫の双方において多様な機能を有し、炎症免疫応答において重要な役割を果たしている。したがって、歯周組織において PLAP-1 はマクロファージのみならず、好中球、T 細胞、B 細胞などの免疫担当細胞においても TLR 活性化を抑制することで、過剰な炎症免疫応答を負に制御する可能性が高いものと考えられる。

口腔内には多種多様な細菌が存在し、歯周組織は恒常的に細菌に曝露されている。恒常状態においては免疫システムが適切に機能することにより、細菌と

TLR などの病因センサーが平衡状態を維持し、細菌に感染することなく、過剰な免疫反応を制御することで組織恒常性を維持している。一方、歯周炎では、バイオフィルムの蓄積の結果、平衡状態が破綻し、免疫担当細胞の遊走および炎症性サイトカインの持続的な産生により炎症の遷延化および慢性化が惹起される。生体は細菌などの外来性起炎因子のみならず、死細胞など細胞外へと放出される内因性起炎因子からの侵襲を受け、TLR2 および TLR4 はこのような内因性因子を感知し炎症反応を惹起することが知られている[55]。すなわち細菌などの外因性因子と病因センサーが平衡状態にあるように、内因性因子と病因センサーの間にも平衡状態が存在し、組織の恒常性の維持に貢献していると考えられる。TLR2 および TLR4 のリガンドとなる内因性因子にはこれまでに Necrotic cells[56,57]、HGMB1[58]、SAA[59,60]、Decorin[30] および Biglycan[31,32] などが報告されている。今回、HEK-Blue hTLR2 細胞および HEK-Blue hTLR4 細胞を用いた実験結果から、リガンドを添加していない群においても、PLAP-1 は TLR2 および TLR4 誘導性の NF-κB 活性化を抑制するという結果が得られたことから、PLAP-1 は、恒常状態においても外因性および内因性因子による TLR2 および TLR4 活性化を抑制することで、組織恒常性維持に関与し、歯周炎においては過剰な炎症反応を抑制していると考えられる。

TLR シグナルは生体にとって有害な病因因子を排除するために様々な炎症性サイトカインを誘導するが、過剰なシグナル伝達は恒常性を破綻させ、宿主破壊的に作用し自己免疫疾患などを誘発しうるため、生体内には様々な抑制機構が恒常的に機能している。TLR シグナル抑制機序にはこれまでに soluble TLR に代表される TLR とそのリガンドとの結合を阻害するもの[61]、SIGIRR（single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor）に代表される細胞内における TLR の TIR ドメインと MyD88 などのアダプター分子との会合を阻害するもの[62]、LF（Lactoferrin）に代表される TRAF6 などの TLR シグナル伝達分子を分解するもの[63]、ATF3（Activating transcription factor-3）に代表される炎症性サイトカンの転写を抑制するものなどが挙げられる[64,65]。PLAP-1 は分泌型の ECM タンパクであり、細胞外から TLR に結合し、TLR とリガンドとの結合を阻害している可能性が考えられる。細胞外から TLR に結合して TLR シグナル伝達を阻害する内因性分子についての報告はなく、新規のメカニズムとなる。今後は TLR の外因性リガンドである LPS および内因性リガンドである Decorin、Biglycan との競合実験や TLR との結合部位の決定などの実験を行うことで、PLAP-1 の TLR 抑制メカニズムについて詳細に解明していく予定である。

当研究室にて *PLAP-1* 遺伝子がヒト歯根膜遺伝子発現プロフィールから見出されたとほぼ同時期に、Asporin と命名された PLAP-1 と同一の分子が、Henry らおよび Lorenzo らの異なる 2 つのグループから、それぞれ、マウスの軟骨細胞

ATDC5 と、ヒトの膝関節の軟骨および腱より単離され、報告がなされた [19,43]。当研究室において、マウス組織より抽出した全 RNA を用いた RT-PCR 解析の結果、歯根膜組織を含む上顎骨において *Plap-1* 遺伝子の非常に高い発現が認められた一方、大腿骨、心臓、肺、子宮、脂肪、肝臓、大腸において、上顎骨における発現と比較すると低いものの *Plap-1* 遺伝子の発現が認められた（結果に示さず）。また、PLAP-1 は乳ガン [66]、膵臓ガン [67] において、健常組織と比較し発現が上昇することが報告されている。以上のことより、PLAP-1 が歯周組織のみならず、他の組織においても発現し、重要な機能を担っている可能性が考えられる。最近、興味深いことに、PLAP-1 がスキルス性胃ガンにおいてガンの転移、浸潤に関与していることが報告された [68]。ガン周囲のガン線維芽細胞において PLAP-1 が高発現しており、同 PLAP-1 がガン細胞上の CD44 に結合することでガン細胞の運動性が亢進され、ガンの転移、浸潤が促進することが示されている。また、当研究室にて行った予備実験において、PLAP-1 が好中球およびマクロファージの細胞遊走を促進する結果が得られている。このように、PLAP-1 は TLR を介した抗炎症機能を有するだけでなく、免疫担当細胞の遊走や浸潤にも関与している可能性が示唆され、今後、多面的な PLAP-1 の機能解析が必要と思われる。

歯周炎は多因子疾患であり、病原因子、環境因子とともに宿主の遺伝的素因は歯周炎の発症、進行に影響を及ぼす重要なリスク因子と考えられている。これまでに IL-1 遺伝子多型 [69]、Fc レセプター遺伝子多型 [70,71]、HLA 遺伝子多型 [72] などの免疫・炎症に関わる遺伝子多型と歯周炎の疾患感受性との関連性が報告されている。今回用いたマウス PLAP-1 には、遺伝子多型についての報告はない。一方、ヒト PLAP-1 には、N 末端のアスパラギン酸の繰り返し数が異なるという遺伝子多型が報告されている [22]。当研究室では、これまでに歯根膜における機能解析を行った結果、アスパラギン酸数が 14 である D14 型 PLAP-1 は、アスパラギン酸数が 13 である D13 型 PLAP-1 と比較して、BMP-2 抑制作用がより高いことを示した [73]。一方、最近の予備実験の結果より、歯根膜細胞において D14 型 PLAP-1 は D13 型 PLAP-1 と比較し、LPS 誘導性の炎症性サイトカイン抑制作用が低いことが示唆されており、歯周病原性細菌に罹患した歯周炎の発症進行に、同遺伝子多型が関係する可能性が考えられる。現在、歯周炎の中でも特に遺伝的素因の関与が高いと考えられる侵襲性歯周炎患者を対象にした PLAP-1 遺伝子多型解析を進めており、同遺伝子多型と疾患感受性との関連についても、さらなる解析が期待される。

最後に歯周炎病態における PLAP-1 の機能について考察する。PLAP-1 は歯根膜に恒常的に発現しており、BMP-2 などによる硬組織形成および TLR による炎症反応を抑制することで歯根膜の恒常性維持に関与している。一方、歯周炎に

おいては、バイオフィルム中の細菌成分を感知し炎症反応を誘導する TLR を抑制することで炎症性細胞浸潤および過剰に産生される炎症性サイトカインによる組織破壊を抑制することで歯周組織に対して防御的に作用しているのではないかと考えられる（図 7）。今後、PLAP-1 による TLR 抑制作用機序の解明、*in vivo* における実験的歯周炎モデルを用いた PLAP-1 の機能解析、ヒト歯周炎における PLAP-1 の発現について詳細な解析を行うことで、PLAP-1 が将来的に抗炎症作用を持つ新たな歯周炎に対する創薬ターゲットとなることが期待される。

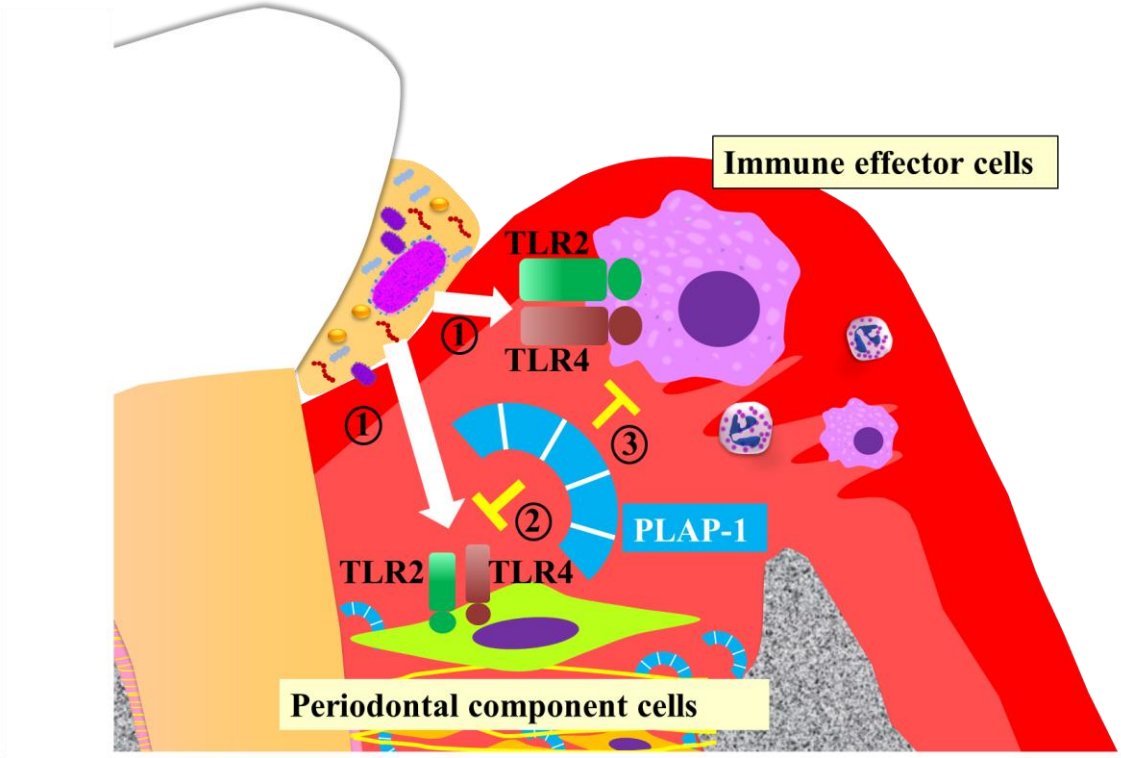


図 7　歯周炎病態における PLAP-1 の機能

歯周炎において、①バイオフィルム中の細菌が歯周組織構成細胞および免疫担当細胞に発現する TLR に感知され炎症反応が惹起される。②PLAP-1 は TLR 活性化を抑制することで歯周組織構成細胞における炎症反応を抑制する。③さらに免疫担当細胞による炎症性サイトカイン産生を抑制することで歯周炎における組織破壊に対して防御的に作用する。

結論

本研究結果より以下の結論を得た。

1. PLAP-1 はマウス実験的歯周炎モデルの歯根膜において、恒常的に発現していた。
2. PLAP-1 は TLR2 および TLR4 誘導性の炎症反応を抑制した。
3. PLAP-1 は TLR2 および TLR4 と結合能を有した。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御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山田　聡講師に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々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. *Ann Periodontol* 1999;4(1):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. *J Periodontal Res* 1976;11(6):349-359.
3. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000 1997;14:33-53.
4. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 2001;69(3):1477-1482.

5. Papadopoulos G, Weinberg EO, Massari P, Gibson FC, 3rd, Wetzler LM, Morgan EF, Genco CA. Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. *J Immunol* 2013;190(3):1148-1157.
6. Onishi S, Honma K, Liang S, Stathopoulou P, Kinane D, Hajishengallis G, Sharma A. Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by the *Tannerella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. *Infect Immun* 2008;76(1):198-205.
7. Nussbaum G, Ben-Adi S, Genzler T, Sela M, Rosen G. Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in the innate immune response to *Treponema denticola* and its outer sheath components. *Infect Immun* 2009;77(9):3939-3947.
8. Toussi DN, Liu X, Massari P. The FomA porin from *Fusobacterium nucleatum* is a Toll-like receptor 2 agonist with immune adjuvant activity. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19(7):1093-1101.
9. Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, van Winkelhoff AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(3):145-151.
10. Posch G, Andrukhov O, Vinogradov E, Lindner B, Messner P, Holst O, Schaffer C. Structure and immunogenicity of the rough-type lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20(6):945-953.
11. Hou L, Sasaki H, Stashenko P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. *Infect Immun* 2000;68(8):4681-4687.
12. Hashimoto M, Asai Y, Tamai R, Jinno T, Umatani K, Ogawa T. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 lipopolysaccharide. *FEBS Lett* 2003;543(1-3):98-102.
13. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 1999;20:136-167.
14. 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 Microbiol Immunol* 2009;24(1):38-42.
15. Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(1):54-58.
16. Fatemi K, Radvar M, Rezaee A, Rafatpanah H, Azangoo khiavi H, Dadpour Y,

Radvar N. Comparison of relative TLR-2 and TLR-4 expression level of disease and healthy gingival tissue of smoking and non-smoking patients and periodontally healthy control patients. *Aust Dent J* 2013;58(3):315-320.

17. Yamada S, Murakami S, Matoba R, Ozawa Y, Yokokoji T, Nakahira Y, Ikezawa K, Takayama S, Matsubara K, Okada H. Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene* 2001;275(2):279-286.
18. Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa K, Ikegawa S, Saito M, Toyosawa S, Murakami S. PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem* 2007;282(32):23070-23080.
19. Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrugghe B, Hook M, Mayne R. Expression pattern and gene characterization of asporin. a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem* 2001;276(15):12212-12221.
20. Tomoeda M, Yamada S, Shirai H, Ozawa Y, Yanagita M, Murakami S. PLAP-1/asporin inhibits activation of BMP receptor via its leucine-rich repeat motif. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371(2):191-196.
21. Yamada S, Kitamura M, Murakami S. PLAP-1: A novel molecule regulating homeostasis of periodontal tissues. *Japanese Dental Science Review* 2008;44(2):137-144.
22. Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, Mabuchi A, Kotani A, Kawakami A, Yamamoto S, Uchida A, Nakamura K, Notoya K, Nakamura Y, Ikegawa S. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 2005;37(2):138-144.
23. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;326(5957):1216-1219.
24. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420(6917):846-852.
25. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002;195(1):99-111.
26. Comalada M, Cardo M, Xaus J, Valledor AF, Lloberas J, Ventura F, Celada A. Decorin reverses the repressive effect of autocrine-produced TGF-beta on mouse macrophage activation. *J Immunol* 2003;170(9):4450-4456.
27. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC,

Strauss JF, 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001;276(13):10229-10233.

28. He YW, Li H, Zhang J, Hsu CL, Lin E, Zhang N, Guo J, Forbush KA, Bevan MJ. The extracellular matrix protein mindin is a pattern-recognition molecule for microbial pathogens. *Nat Immunol* 2004;5(1):88-97.
29. Jameson JM, Cauvi G, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. Gammadelta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J Exp Med* 2005;201(8):1269-1279.
30. Merline R, Moreth K, Beckmann J, Nastase MV, Zeng-Brouwers J, Tralhao JG, Lemarchand P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Iozzo RV, Schaefer L. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal* 2011;4(199):ra75.
31. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Gotte M, Malle E, Schaefer RM, Grone HJ. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 2005;115(8):2223-2233.
32. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF, Bruckner P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Grone HJ, Schaefer L. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem* 2009;284(36):24035-24048.
33. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods* 2013;394(1-2):49-54.
34. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11(4):443-451.
35. Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 1981;11(10):805-815.
36. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):725-734.
37. Jiao Y, Darzi Y, Tawaratsumida K, Marchesan JT, Hasegawa M, Moon H, Chen GY, Nunez G, Giannobile WV, Raes J, Inohara N. Induction of bone loss by pathobiont-mediated Nod1 signaling in the oral cavity. *Cell Host Microbe* 2013;13(5):595-601.
38. Tenorio DM, Santos MF, Zorn TM. Distribution of biglycan and decorin in rat

dental tissue. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(8):1061-1065.

39. Hakkinen L, Westermarck J, Kahari VM, Larjava H. Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF-beta 1. *J Dent Res* 1996;75(10):1767-1778.
40. Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997;32(2):141-174.
41. Fisher LW, Termine JD, Dejter SW, Jr., Whitson SW, Yanagishita M, Kimura JH, Hascall VC, Kleinman HK, Hassell JR, Nilsson B. Proteoglycans of developing bone. *J Biol Chem* 1983;258(10):6588-6594.
42. Waddington RJ, Embery G. Structural characterization of human alveolar bone proteoglycans. *Arch Oral Biol* 1991;36(12):859-866.
43. Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegard D. Identification and characterization of asporin. a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem* 2001;276(15):12201-12211.
44. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990;346(6281):281-284.
45. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 1994;302 (Pt 2):527-534.
46. Chen XD, Fisher LW, Robey PG, Young MF. The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *Faseb j* 2004;18(9):948-958.
47. Murakami M, Okuyama Y, Ogura H, Asano S, Arima Y, Tsuruoka M, Harada M, Kanamoto M, Sawa Y, Iwakura Y, Takatsu K, Kamimura D, Hirano T. Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J Exp Med* 2011;208(1):103-114.
48. Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Kanamoto M, Nishihara M, Iwakura Y, Hirano T. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* 2008;29(4):628-636.
49. Lee J, Nakagiri T, Kamimura D, Harada M, Oto T, Susaki Y, Shintani Y, Inoue M, Miyoshi S, Morii E, Hirano T, Murakami M, Okumura M. IL-6 amplifier

activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *Int Immunol* 2013;25(5):319-332.

50. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454(7203):428-435.
51. Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci* 2011;53(3):263-271.
52. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003;102(7):2660-2669.
53. MacLeod H, Wetzler LM. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response. *Sci STKE* 2007;2007(402):pe48.
54. Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005;438(7066):364-368.
55. Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007;19(1):3-10.
56. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* 2010;140(6):798-804.
57. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, Vandenabeele P. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* 2011;32(4):157-164.
58. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418(6894):191-195.
59. Eklund KK, Niemi K, Kovanen PT. Immune functions of serum amyloid A. *Crit Rev Immunol* 2012;32(4):335-348.
60. O'Reilly S, Cant R, Ciechomska M, Finnigan J, Oakley F, Hambleton S, van Laar JM. Serum amyloid A induces interleukin-6 in dermal fibroblasts via Toll-like receptor 2, interleukin-1 receptor-associated kinase 4 and nuclear factor-kappaB. *Immunology* 2014;143(3):331-340.
61. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, Griffin GE, Ferrara P, Schiffrin EJ, Morgan BP, Labeta MO. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 2003;171(12):6680-6689.
62. Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2003;4(9):920-927.
63. Inubushi T, Kawazoe A, Miyauchi M, Kudo Y, Ao M, Ishikado A, Makino T, Takata T. Molecular mechanisms of the inhibitory effects of bovine lactoferrin

on lipopolysaccharide-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2012;287(28):23527-23536.

64. Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol* 2012;33(9):449-458.
65. Anwar MA, Basith S, Choi S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp Mol Med* 2013;45:e11.
66. Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, Wei W, Dziechciarkova M, Ehrmann J, Klein J, Fridman E, Skarda J, Srovnal J, Hajduch M, Murray P, Kolar Z. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer* 2007;7:55.
67. Turtoi A, Musmeci D, Wang Y, Dumont B, Somja J, Bevilacqua G, De Pauw E, Delvenne P, Castronovo V. Identification of novel accessible proteins bearing diagnostic and therapeutic potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Proteome Res* 2011;10(9):4302-4313.
68. Satoyoshi R, Kuriyama S, Aiba N, Yashiro M, Tanaka M. Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 2014.
69. Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol* 2008;35(9):754-767.
70. Kobayashi T, Ito S, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, Narita I, Sumida T, Gejyo F, Yoshie H. The interleukin-1 and Fcgamma receptor gene polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol* 2007;78(12):2311-2318.
71. Nibali L, O'Dea M, Bouma G, Parkar M, Thrasher AJ, Burns S, Donos N. Genetic variants associated with neutrophil function in aggressive periodontitis and healthy controls. *J Periodontol* 2010;81(4):527-534.
72. Stein JM, Machulla HK, Smeets R, Lampert F, Reichert S. Human leukocyte antigen polymorphism in chronic and aggressive periodontitis among Caucasians: a meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2008;35(3):183-192.
73. Kajikawa T, Yamada S, Tauchi T, Awata T, Yamaba S, Fujihara C, Murakami S. Inhibitory effects of PLAP-1/asporin on periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2014;93(4):400-405.