



Title	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, 聰子; 村上, 伸也; 山田, 聰
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2016, 61(1), p. 5-7
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/60666
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

山羽聰子*, 山田 聰*, 村上伸也*

(平成 28 年 1 月 25 日受付)

はじめに

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^{1,2)}。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 と非常に高い相同意を持っています。ECM は、細胞の足場として、組織・器官の形態形成や維持、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^{3,4)}。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。

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

まず歯周組織構成細胞である歯根膜細胞において、PLAP-1 が TLR2 および TLR4 誘導性の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。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 および TLR4 アゴニストである *Escherichia coli* (*E. coli*) LPS にて刺激、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。その結果、PLAP-1 を強発現させることにより、対照群と比較して *P. g.* LPS 誘導性の *Il6* 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 IL-6 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。続いて、免疫担当細胞であるマクロファージを用いて、PLAP-1 が TLR2 および TLR4 誘導性の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。マウス腹腔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

* 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)

本総説の一部内容は The 91th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 第 139 回日本歯科保存学会度秋季大会、第 57 回日本歯周病学会春季学術大会にて発表しました。本研究は JSPS 科研費 23249086, 26293437 の助成を受けたものです。

間前処理した後, *P. g.* LPS あるいは *E. coli* LPS にて刺激し, TNF- α と CXCL10 の遺伝子発現およびタンパク産生を解析した。その結果, 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* 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。以上のことで, PLAP-1 は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 誘導性の炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。

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

次に, PLAP-1 が TLR2 および TLR4 の下流の細胞内シグナルである NF- κ b 活性化に及ぼす影響について解析を行った。TLR2 遺伝子と共に NF- κ b 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 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 *E. coli* LPS にて刺激し, 同細胞群の SEAP 活性を測定した。その結果, 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。同様に, 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。さらに, RAW264.7 細胞を PLAP-1 CM にて 1 時間前処理した後, *E. coli* LPS にて刺激し, ウエスタンブロッティング法を用いて I κ B α の発現を解析した。その結果, PLAP-1 CM にて前処理することにより, 対照群と比較して *E. coli* LPS 誘導性の I κ B α の分解は抑制された。以上のことで, PLAP-1 は TLR2 および TLR4 誘導性の NF- κ B 活性化を抑制することが明らかとなった。

PLAP-1 と TLR2 および TLR4 との結合解析

続いて 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 PLAP-1 遺伝子発現ベク

ターおよび TLR2 遺伝子発現ベクターを遺伝子導入し, 免疫沈降解析を行った。同様に, PLAP-1 遺伝子発現ベクターおよび TLR4 遺伝子発現ベクターを遺伝子導入し, 免疫沈降解析を行った。その結果, PLAP-1 が TLR2 および TLR4 と結合した。

おわりに

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, 本研究では, PLAP-1 による TLR2 および TLR4 を介した炎症反応制御の分子機構を解明した。その結果, 分子構造において相同性の高い Decorin, Biglycan とは異なり, PLAP-1 は TLR2 および TLR4 を介した炎症反応を負に制御することが明らかとなった。これは PLAP-1 が生物学的に重要な特異性を有しつつ炎症反応を制御していることを示唆している。歯周病原性細菌の LPS は宿主細胞の TLR に認識されることで, 免疫系を賦活化する。TLR2 および TLR4 を介した炎症反応を PLAP-1 が制御することは, 歯周組織において PLAP-1 が歯周炎の病態形成に影響を及ぼしている可能性を示唆するものであり, 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產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。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

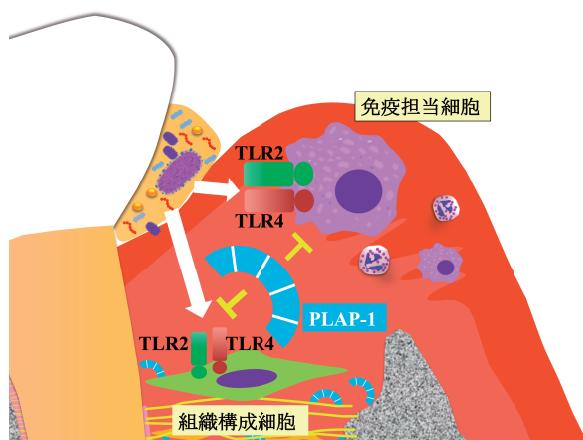


図 歯周炎病態における PLAP-1 の機能

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。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科口腔治療学教室の教員各位に厚く御礼申し上げます

参考文献

- 1) Yamada S, Murakami S, Matoba R, Ozawa Y, Yokokoji T, Nakahira Y, Ikezawa K, Takayama S, Matsubara K, Okada H. (2001): Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene*, 275, 279–286
- 2) Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa K, Ikegawa S, Saito M, Toyosawa S, Murakami S. (2007): PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J BiolChem*, 282, 23070–23080
- 3) Merline R, Moreth K, Beckmann J, Nastase MV, Zeng-Brouwers J, Tralhao JG, Lemarchand P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Iozzo RV, Schaefer L. (2011): Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal*, 4, ra75
- 4) 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. (2005): The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*, 115, 2223–2233