



Title	Loeys-Dietz症候群モデルマウスを用いた歯周病の分子病態解析
Author(s)	津島, 賢一郎
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61648">https://doi.org/10.18910/61648</a>
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

# Loeys-Dietz 症候群モデルマウスを用いた 歯周病の分子病態解析

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）

津島 賢一郎

（指導教官：村上 伸也教授）



本論文の要旨は、第 58 回日本歯周病学会春季学術大会（2015 年 5 月 15、16 日、千葉）、第 63 回国際歯科学研究学会（JADR、2015 年 10 月 30 日、福岡）、The 95<sup>th</sup> General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research（2017 年 3 月 24 日、San Francisco）において発表した。

## 緒言

マルファン症候群 (Marfan syndrome、以下 MFS と略す) は、多彩な表現型をもつ全身疾患であり、*Fibrillin-1* の遺伝子変異により発症する常染色体優性遺伝の全身結合組織疾患である<sup>(1)</sup>。その発症頻度は、軽症例を含め 5,000 人に 1 人程度と言われている<sup>(1)</sup>。特に骨格系 (骨の過形成、関節の弛緩、高身長、クモ状指、脊柱側彎など)、心血管系 (大動脈瘤、僧帽弁逸脱症など)、眼系 (水晶体亜脱臼など) に特徴的な病変を来す<sup>(2)</sup>。*Fibrillin-1* は、細胞外マトリックスの microfibril の構成成分であり<sup>(3)</sup>、活性型トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor、以下 TGF と略す) - $\beta$  の制御に関わっている<sup>(4)</sup>。TGF- $\beta$  は、細胞の増殖・分化を制御すると共に、細胞死を促すことが知られているサイトカインであり<sup>(5)</sup>、特に、コラーゲンの産生や細胞外マトリックスのリモデリングを促進させる<sup>(6)</sup>。一方で MFS においては、*Fibrillin-1* の変異により血清中の TGF- $\beta$  が過剰になることで、MFS の様々な症状が起こると言われている<sup>(7)</sup>。さらに、TGF- $\beta$  シグナルの異常によっておこる MFS 類縁疾患として、*Fibrillin-2* の変異により生じる Beals 症候群<sup>(8)</sup>、*TGFBR1* または *TGFBR2* の変異により生じる Loays-Dietz 症候群<sup>(9-11)</sup> (以下 LDS と略す)、TGF- $\beta$  シグナル伝達因子である Smad4 の変異により生じる Juvenile polyposis 症候群<sup>(12)</sup>、Smad シグナルの抑制遺伝子である SKI の遺伝変異により生じる Shprintzen-Goldberg 症候群<sup>(13)</sup>などが報告されている。

MFS と歯周炎については、重度の歯周炎を伴った MFS 患者の症例報告や<sup>(14-17)</sup>、MFS 患者は健常者と比べて歯周病の罹患率・重症度がともに高くなっていたという実態調査の報告がこれまでになされている<sup>(18)</sup>。MFS における歯周炎の症例報告では、高口蓋、歯列不正を伴い、重度の慢性歯周炎が起こっているという報告がなされている。しかしながら、MFS およびその類縁疾患の遺伝変異と歯周炎との関連性についての詳細については未だ十分に明らかにされていない。

そこで本研究では、まず MFS およびその類縁疾患と歯周炎との関連性について検討するため、国立循環器病研究センターとの共同研究により両疾患の実態調査を行った。その結果、LDS 患者 1 名において、侵襲性歯周炎様の病態を呈する患者を見出した。歯周炎は環境因子や遺伝因子などさまざまな影響を受けて進行する疾患であり、大きく慢性歯周炎と侵襲性歯周炎とに分けられる。慢性歯周炎と比較して侵襲性歯周炎は遺伝的因子により大きな影響を受けると言われている<sup>(19)</sup>。

LDS は、*TGFBR1* または *TGFBR2* の変異により発症する<sup>(9)</sup>。LDS は MFS と多くの共通の臨床症状 (大動脈病変として基部拡張・大動脈瘤・大動脈解離

など、骨格系病変として脊柱側彎・関節の弛緩・クモ状指など）を示すが、MFS では見られない所見（口蓋裂、二分口蓋垂、眼間解離などの特徴的な顔貌、全身血管の蛇行、頭蓋骨早期癒合、先天性心疾患、精神発達遅滞など）を高率に認めることが報告されている<sup>(10)</sup>。LDS 患者から採取した血管平滑筋細胞において、*in vitro* では TGF- $\beta$  シグナルが減弱化しているが<sup>(20)</sup>、大動脈の組織においてはそれを補うため TGF- $\beta$  シグナルが過剰に発現しており、その結果、大動脈瘤や大動脈解離などの心臓血管系の症状が現れるのではないかと考察されている<sup>(9, 20)</sup>。そこで我々は、侵襲性歯周炎の様相を呈したこの LDS 患者に着目し、その遺伝変異を再現した遺伝子改変マウスを作製し、LDS および歯周炎の病態を解析することで、TGF- $\beta$  関連遺伝子の変異が歯周炎に与える影響について解析を行った。

## 材料および方法

### 1. MFS および類縁疾患における歯周病実態調査

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を得て行った（承認番号：H22-E10）。被験者は、国立循環器病研究センターの患者で、MFS およびその類縁疾患であると診断を受けた者 120 名（男性 56 名、女性 64 名、平均年齢 38.6 歳）であった。同病院に歯周病外来を開設し、6 点法のポケット測定を含む歯周組織検査、パノラマエックス線撮影を行った。上顎右側大臼歯、上顎右側中切歯、上顎左側大臼歯、下顎左側大臼歯、下顎左側中切歯、下顎右側大臼歯の 6 群において、それぞれ最も深いポケット深さ（以下 PD と略す）を選択し、全被験者に占める 4 mm 以上の PD を有する者の割合、および全被験者に占める 6 mm 以上の PD を有する者の割合を算出した。対照として、厚生労働省の 2011 年歯科疾患実態調査の結果と比較した。

### 2. LDS 患者のゲノム遺伝子変異解析

本実態調査に先立ち、臨床的に大動脈瘤・大動脈解離など MFS あるいは類縁疾患である LDS の臨床所見を示す患者について、同意を得て末梢白血球を採取した。ゲノム DNA を調整し、*FBN1* 遺伝子、*TGFBR1* 遺伝子および *TGFBR2* 遺伝子などの疾患の病因遺伝子について全エクソンならびに周辺イントロン領域を PCR 法にて断片を増幅し、当該領域の DNA 配列をサンガー法にて ABI3770 シークエンサーにより配列解析を行った。

### 3. LDS モデルマウスの作製

本研究におけるすべての動物実験は、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 24-021-0）。マウス *Tgfb1* 遺伝子の第 3 エクソンの第 188 番目のコドン（グリシン）において、第 563 塩基のグアニンをチミンに置き換え（GGG→GTG、Gly→Val）、第 4 イントロンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入した *Tgfb1* 遺伝子組み換えベクター（*Tgfb1-neo vector*）を構築した。構築したベクターを C57BL/6 マウス由来の胚性幹細胞（ES 細胞）へエレクトロポレーションにてトランスフェクションし、遺伝子導入を行った。ネオマイシン薬剤選択により、*Tgfb1-neo vector* 遺伝子陽性の ES 細胞を単離した。同クローンを C57BL/6 マウス胚盤胞へマイクロインジェクション後に偽妊娠 ICR マウスの子宮に移植した後、産生仔の毛色により、キメラマウスを選別した。キメラオスマウスをメスの C57BL/6 マウスと交配し、germ line transmission を経た *Tgfb1* ヘテロ（F1）マウスを得た。そして、F1 マウスと Cre マウスを交配させることで、ネオマイシン耐性遺伝子が排除された

*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>-Cre マウスを作製した。その後、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>-Cre マウスと野生型 (Wild Type、以下 WT と略す) マウスと交配させることで Cre を排除した *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスを樹立した。マウスジェノタイピングは、後肢より採取した足指を proteinase K (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) にて処理し、抽出したゲノム DNA を鋳型として、表 1 に示す *Tgfb $\beta$ 1* 対立遺伝子と loxP を含む変異型 *Tgfb $\beta$ 1* 対立遺伝子とを識別するプライマーを用いたゲノム Polymerase Chain Reaction (以下 PCR と略す) 法にて行った。PCR 反応は 95°C・10 分間の熱処理後、94°C・30 秒間の熱変性、60°C・1 分間のアニーリング、72°C・1 分間の伸長反応を 1 サイクルとし、Peltier Thermal Cycler PTC-200

(Amersham Pharmacia Biotech、Milwaukee、WT、USA) を用いて 25 サイクルにて PCR 反応を行った。PCR 産物は 1.5%アガロースゲル (ニッポンジー、東京、日本) にて電気泳動後、エチジウムブロマイド (ニッポンジー) により DNA を蛍光染色した。また、LDS モデルマウスの表現型については、同腹仔である WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスを用いて解析を行った。

表 1 本研究で使用した Genotyping PCR 用プライマー

	プライマー	Tm 値
プライマーF	5'-CTAAGAGAAGTGTGCCTCCTTTACA-3'	63.5
プライマーR	5'-CCAAAGTCATAGAGCATGTGTTAGA-3'	63.1

#### 4. 累積生存率の比較

WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスの 180 日間の生存率については、 Kaplan-Meier の生存曲線で示すことにより、比較した。

#### 5. マウス大動脈の組織学的解析

24 週齢オスの WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスより胸部大動脈を回収し、4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (和光純薬工業株式会社、以下 PFA と略す) にて 12 時間、浸漬固定を行った。各組織をパラフィンで包埋し、LEICA RM2245 (Leica Microsystems、Wetzlar、Germany) を用いて厚さ 5.0  $\mu$ m の薄切切片を作製した。薄切切片は、エラスチカ・ワンギーソン染色 (以下 EVG 染色と略す) を行った。EVG 染色は以下の手順で行った。切片を脱パラフィン、脱キシレン、水洗した後、1%塩酸含有 70%エタノール溶液に浸し、前田変法レゾルシンフクシン液 (武藤化学株式会社、東京、日本) にて 60 分弾性線維を染色した。



その後、100%エタノールで分別し、余剰染色液を除去後、流水水洗し、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液（武藤化学株式会社）に 5 分浸漬後、10 分間水洗した。その後、ワンギーソン A 液、B 液（武藤化学株式会社）を等量混合した液に 10 分浸漬後、水洗した後、封入作業を行った。光学顕微鏡 ECLIPSE Ci（Nikon、東京、日本）にて観察および写真撮影を行った。

## 6. マウス各組織および培養細胞における遺伝子発現解析

6 週齢オスの WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスより大動脈、上顎骨を採取した。採取した組織より RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN、Hilden、Germany) を用いて全 RNA を抽出した。また、各培養細胞から PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies、California、USA) を用いて RNA を抽出した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems、California、USA) を用いて逆転写反応を行い、相補鎖 DNA (cDNA) を作製した。得られた cDNA を鋳型として表 2 に示す各遺伝子特異的プライマーを用いて Real-time PCR 法にて解析を行った。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。その際、*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*（以下 *Hprt* と略す）遺伝子の発現を内在性コントロールとして用いた。

表 2 本研究で使した Real-time PCR 用プライマー

GenBank Acc.	遺伝子	プライマー	Tm 値
NM_009370	mouse <i>Tgfb1</i>	5'-GATGTCAGCTCTGGGCAAAGATTAG-3' 5'-CAGGCTGAGCTTCATGCCTTTAC-3'	64.5 64.5
NM_009371	mouse <i>Tgfb2</i>	5'-AATGGTTGCACCACAAGCAAGA-3' 5'-TTCCAGGGCTGAGATGATAAGAG-3'	65.0 64.9
NM_009368	mouse <i>Tgfb3</i>	5'-CAGCGCTACATAGGTGGCAAGA-3' 5'-TGATTTCCAGACCCAAGTTGGAC-3'	64.7 64.5
NM_009370	mouse <i>Tgfb1</i>	5'-GATGTCAGCTCTGGGCAAAGATTAG-3' 5'-CAGGCTGAGCTTCATGCCTTTAC-3'	64.5 64.5
NM_007742	mouse <i>Col1a1</i>	5'-CAGGGTATTGCTGGACAACGTG-3' 5'-GGACCTTGTTTGCCAGGTTCA-3'	64.8 64.5
NM_008871	mouse <i>Serpine1</i>	5'-TGCTGAACTCATCAGACAATGGAAG-3' 5'-TCGGCCAGGGTTGCACTAA-3'	64.9 65.0
NM_025711	mouse <i>PLAP-1</i>	5'-CCATATCAGGATCGCTGAAGCA-3' 5'-TCTGTGATTCTGTTGTTTCCAAGAC-3'	64.6 61.8
NM_015784	mouse <i>Postn</i>	5'-AAATATACCAGGATTTCCACAGGAG-3' 5'-CAATGAACTTTGTGACCTTGGAG-3'	60.8 60.9
NM_013693	mouse <i>Tnf</i>	5'-CAGGAGGGAGAACAGAACTCCA-3' 5'-CCTGGTTGGCTGCTTGCTT-3'	64.1 63.8
NM_031168	mouse <i>Il6</i>	5'-CCACTTCACAAAGTCGGAGGCTTA-3' 5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC-3'	64.8 64.9
NM_013556	mouse <i>Hprt</i>	5'-TTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTA-3' 5'-AGGCAGATGGCCACAGGACTA-3'	63.7 64.3

## 7. 細胞培養

ヒト腎臓細胞株 (以下 293 細胞と略す) は、American Type Culture Collection (以下 ATCC と略す) より購入した。マウス胎仔線維芽細胞 (以下 MEFs と略す) は後述の方法でマウスより分離した。293 細胞および MEFs は、10% ウシ胎仔血清 (Equiteck Bio、Texas、USA、以下 FBS と略す) および 60  $\mu$ g/mL カナマイシン (和光純薬工業株式会社) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Life Technologies、以下 D-MEM と略す) にて培養した。

## 8. 293 細胞への *Tgfb1* 遺伝子導入

*Tgfb1*<sup>WT</sup>、*Tgfb1*<sup>G188V</sup> をそれぞれ強発現させた 293 細胞を以下の方法により作製した。マウス *Tgfb1* 遺伝子において、Horton らによるオーバーラップ伸長による 2 サイドスプライシング法<sup>(21)</sup>により第 563 塩基のグアニンをチミンに置き換え、*Tgfb1*<sup>G188V</sup> の変異ベクターを作製した。*Tgfb1*<sup>WT</sup>、*Tgfb1*<sup>G188V</sup> を

それぞれ p3XFLAG-CMV<sup>TM</sup>-14 Expression Vector (SIGMA-Aldrich, St.Louis, MO, USA) に導入し、それぞれの強発現ベクターを作製し、コントロールとして何も導入しないベクターを使用した。293 細胞を 10%FBS および 60 µg/mL カナマイシン含有 D-MEM を用いて 12 穴培養プレート (Corning, Inc.、Corning, NY, USA) へ播種し、24 時間後にそれぞれのベクターを、同量の Signal SMAD Reporter Assay Kit (LUC) の Transcription Factor Reporter とともに Polyethylenimine HCl MAX, Linear, Mw 4,000 (Polyscience, Inc.、Warrington, PA, USA) 存在下にて transfection 法にて導入した。48 時間後に FBS 非存在下で 24 時間培養後、リコンビナントヒト TGF-β (R&D System, Minneapolis, MN, USA) にて刺激した。

## 9. MEFs の分離

*Tgfb<sup>1</sup>*<sup>G188V/+</sup>マウス同士を交配させた妊娠後 14.5 日目の *Tgfb<sup>1</sup>*<sup>G188V/+</sup>マウスを安楽死させた後に開腹し、胎仔を取り出してダルベッコ-リン酸緩衝生理食塩水 (和光純薬工業株式会社、以下 D-PBS と略す) にて洗浄した。同胎仔の頭部、内臓、手足を取り除き、体幹部のみを細切後、0.05% Trypsin・0.02% EDTA (Life Technologies) を加えた D-PBS で反応させた (37°C、15 分)。その後、等量の FBS を加えて Trypsin の活性を止めた。セルストレーナー (BD Biosciences, San jose, CA, USA) を用いて同液を濾過し、遠心 (270g、4°C、5 分) および上清吸引後、10%FBS および 60 µg/mL カナマイシン含有 D-MEM にて培養を行い、同細胞を MEFs とした。MEFs の遺伝子型解析は、各胎仔から取り除いた頭部からゲノム DNA を抽出し、PCR 法にて解析した。それぞれの MEFs を継代数 3~5 で実験に供した。

## 10. ウェスタンブロッティング解析

培養細胞を 4°C の D-PBS にて 2 回洗浄した後に Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)、10 mM フッ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社)、1mM オルトバナジン酸ナトリウム (SIGMA-Aldrich)、10 mM β-グリセロリン酸 (和光純薬工業株式会社) を加えた RIPA Lysis Buffer (Millipore, Billerica, MA, USA) を用いて全細胞画分を回収し、Bradford 法<sup>(22)</sup>にてタンパク量を算出した後、同値の濃度に調整した。次に 2-Mercaptoethanol (BIO RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) 含有 Laemmli<sup>(23)</sup> の 5×サンプルバッファーにてサンプルを調整し、10%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に展開した。そして PVDF トランスファーメンブレン (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) ブロッティング装置 (BIO RAD Laboratories) を用いて 8 時間、30V にて転写した。メンブレンは

5%スキムミルク（森永乳業、東京、日本）、0.1%Tween 20（和光純薬工業株式会社）を含むトリス緩衝生理食塩水（50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM 塩化ナトリウム（和光純薬工業株式会社）、以下 TBS と略す）に室温にて 1 時間、浸透させブロッキングを行った。一次抗体には、ウサギ抗-マウス TGFβR1 抗体（1:1000、Santa Cruz Biotechnology, Inc.、Santa Cruz、CA、USA）、マウス抗-ヒト β-actin 抗体（1:10,000、SIGMA-Aldrich）、ウサギ抗-マウスリン酸化 Smad2 抗体（1:1,000、Millipore）、ウサギ抗-マウス Smad2 抗体（1:1,000、Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA）を用いて 4℃にて一晩反応させた。二次抗体には、Horseradish Peroxidase（以下 HRP と略す）標識したヒツジ抗-マウス IgG 抗体（1:10,000、GE Healthcare）、HRP 標識したロバ抗-ウサギ IgG 抗体（1:10,000、GE Healthcare）を室温で 2 時間反応させた。メンブレンを 0.1% Tween-TBS で洗浄後に基質である SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA）を用いて発光シグナルを増幅し、ImageQuant LAS 4000（GE Healthcare）にて特異的バンドを検出した。

## 11. micro Computed Tomography（以下マイクロ CT と略す）による歯槽骨吸収量の定量解析

6 週齢、24 週齢オスの WT および *Tgfb<sup>r1</sup>*<sup>G188V/+</sup>マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔後、上顎組織を摘出し、PFA に浸漬した。そして、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R\_mCT2（リガク、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、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と歯槽骨頂の間の面積を、画像解析ソフトウェア winroof（三谷商事株式会社、福井、日本）を用いて数値化することで、歯槽骨吸収量を比較した。

## 12. 細菌培養と *Porphyromonas gingivalis* 経口投与によるマウス実験的歯周炎モデル

*Porphyromonas gingivalis*（以下 *P.g* と略す） W83 株を、変法 GAM ブイヨン（日水製薬株式会社、東京、日本）に接種し、ガスパック 100 嫌気システム（Becton, Dickinson and Company、Franklin Lakes、NJ、USA）、アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学株式会社、東京、日本）を使用し、嫌氣的条件下で、37℃、48 時間培養した。

*P.g* 経口投与によるマウス実験的歯周炎モデルは Baker らの方法に準じて行った<sup>(24)</sup>。すなわち、8 週齢オスの WT および *Tgfb<sup>r1</sup>*<sup>G188V/+</sup>マウスに、10<sup>9</sup> CFU

の *P.g* を 2% carboxymethyl cellulose (和光純薬工業株式会社) 含有 D-PBS 100  $\mu$ L に懸濁し、フレキシブル経口ゾンデマウス用 (日本クレア株式会社、東京、日本) を用いて経口投与を行った。*P.g* 投与は、3 日に 1 回、合計 10 回行った。対照群として、溶媒のみを投与したマウスを使用した。最終投与日の翌日に各組織を採取し、解析した。

### 13. マウス歯周組織の組織学的解析

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、各組織をパラフィンで包埋し、LEICA RM2245 を用いて厚さ 8.0  $\mu$ m の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) 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 (HE) 染色を行い、形態学的に評価した。また、歯槽骨に近接した破骨細胞の発現について検討するため、薄切切片を TRAP / ALP 染色キット (和光純薬株式会社) を用いて Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (以下 TRAP と略す) 染色を行い解析した。破骨細胞の発現数について定量的に解析するため、第 1 第 2 臼歯間、第 2 第 3 臼歯間の歯槽骨表面における破骨細胞数を数え、観察した歯槽骨表面の長さで除した結果で比較した。測定した部位は図 8D-G の赤線で示す。

### 14. 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<sup>(25)</sup>。8 週齢の WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスの腹腔内に 4% チオグリコレート培地 (Becton, Dickinson and Company) 2 mL を注射し、3 日後に 10 mL ハンクス平衡塩溶液 (Life Technologies、以下 HBSS と略す) 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  $4 \times 10^6$  個になるように調整して 6 穴培養プレート (Corning, Inc.) 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% FBS および 60  $\mu$ g/mL カナマイシン含有 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、*Escherichia coli* (以下 *E. coli* と略す) Lipopolysaccharide (InvivoGen, Inc., San Diego, CA, USA、以下 LPS と略す) にて刺激した。

### 15. 統計処理

実験データは 3 群の平均値  $\pm$  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、 $p < 0.05$  を有意差があるものとした。

## 結果

### 1. MFS および類縁疾患患者と歯周炎との実態調査

本実態調査における MFS および類縁疾患患者の年齢分布（表 3）、各疾患の人数分布（表 4）、初診時の歯周組織検査の結果（表 5）を示す。4 mm以上の PD を有する者の割合を 2011 年歯科疾患実態調査の結果と比較したところ、10-54 歳においてはその割合が有意に高いことが明らかとなった（図 1A）。さらに、6 mm以上の PD を有する者の割合は、10-44 歳において有意に高いことが示された（図 1B）。

次に、各症例についてそれぞれの口腔内写真、パノラマエックス線写真を解析したところ、MFS、LDS とともに歯周炎に罹患していると考えられる症例では、プラークコントロールが比較的悪く、水平性の骨吸収を示している像が観察され、慢性歯周炎の病状を呈していると考えられた（図 2A、2B）。その中で、1 名の LDS の患者において、プラークコントロールは比較的良好であるが限局した垂直性の骨吸収部位が多数みられる、侵襲性歯周炎様の病状を呈していると考えられる患者を見出した（図 2C）。

本患者は 44 歳女性、LDS と診断された女性で、大動脈解離により大動脈置換術の既往があり、現在はアンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬であるニューロタンを服用している。プラークコントロールは 13%と良好であるものの、限局した著しい垂直性の骨吸収が散見され（図 2C 円）、同部に 4 mm以上の PD が見られた。全顎的にプロービング時の出血（Bleeding on probing、以下 BOP と略す）はほとんど見られなかった。以上の理由により、本患者は侵襲性歯周炎の病状を呈していると考えられた。

我々は、遺伝的要因が大きいと言われている侵襲性歯周炎の様相を呈している患者について注目し、本患者における遺伝変異と歯周炎との関係性について、さらなる検討を行うこととした。

表 3 被験者年齢分布

年齢（歳）	総数	男	女
10-24	15	7	8
25-34	28	16	12
35-44	41	18	23
45-54	25	12	13
55-64	7	2	5
65 以上	4	1	3
合計	120	56	64

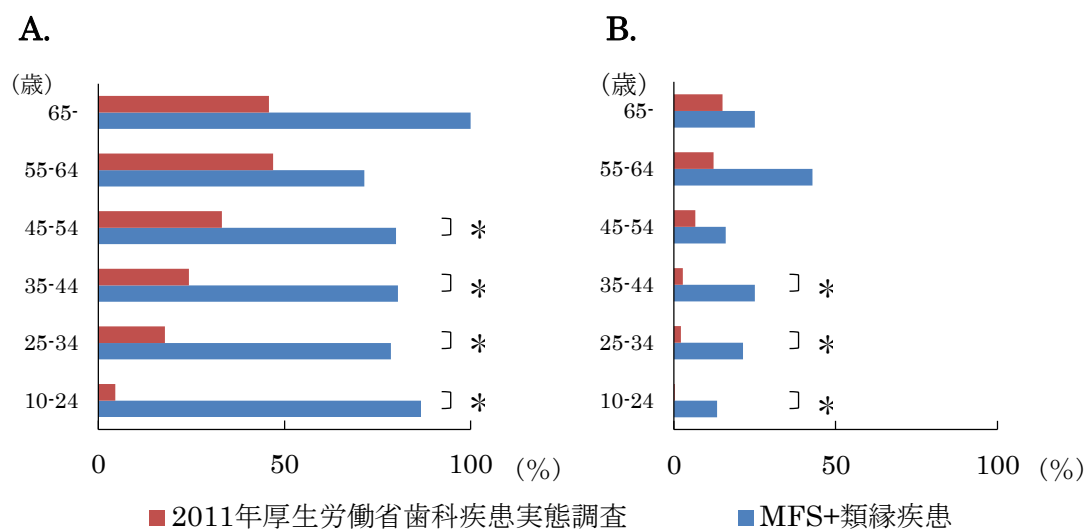
表 4 被験者疾患分布

症候群	総数	男	女
Marfan	96	43	53
Loeys-Diet	6	4	2
Beals	2	1	1
Unknown	16	9	7
合計	120	56	64

表 5 歯周組織検査結果

検査項目	平均値
現在歯数（歯）	27.3
平均 PD（mm）	2.6
平均 BOP 歯率（%）	29.0
4mm 以上 PD（%）*	8.0

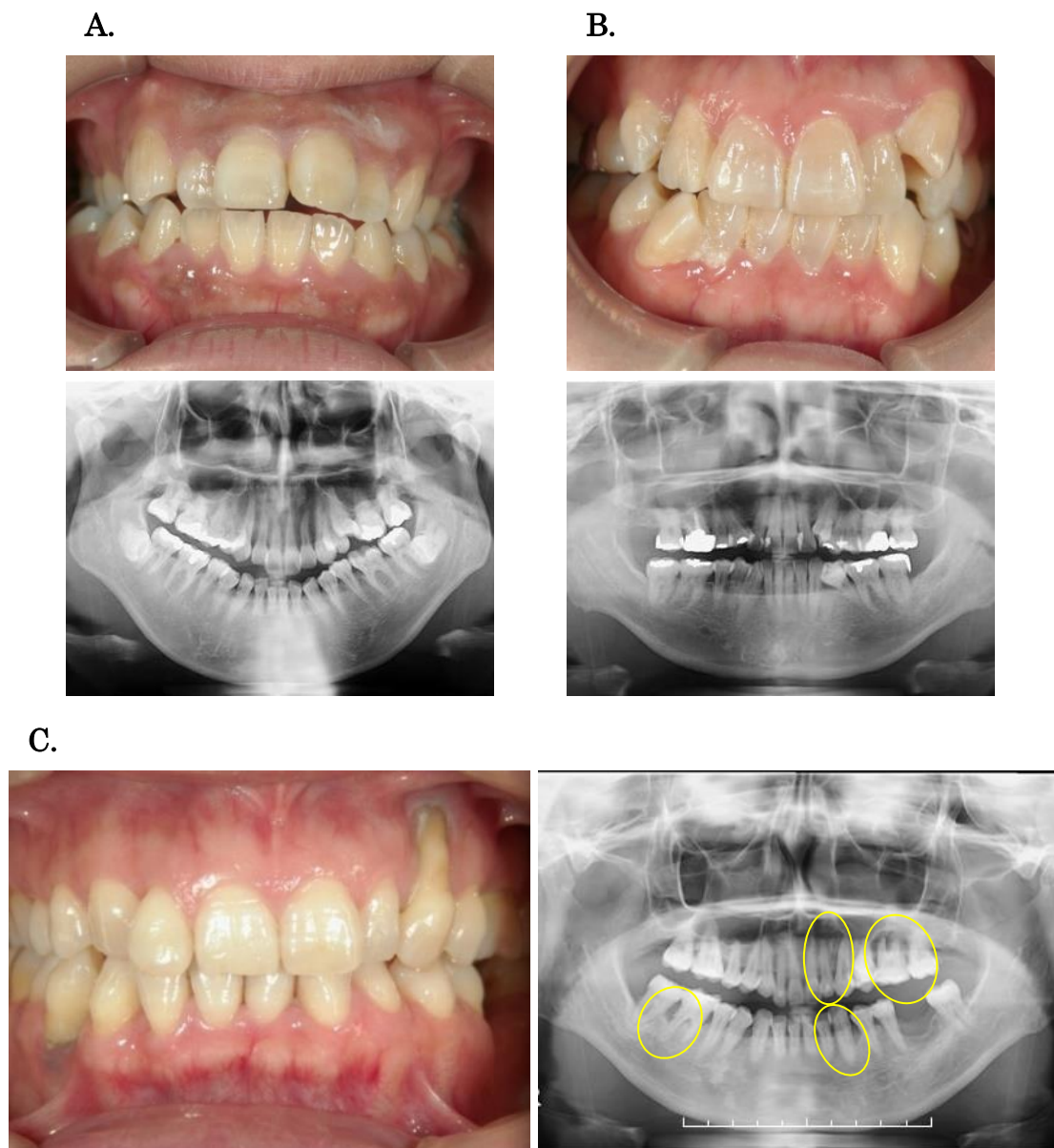
\* 4mm 以上の PD の割合



**図 1 MFS および類縁疾患患者と 2011 年厚生労働省歯科疾患実態調査との比較**

(A) MFS および類縁疾患患者と 2011 年厚生労働省歯科疾患実態調査における 4 mm 以上の PD を有する者の割合の比較 (B) MFS および類縁疾患患者と 2011 年厚生労働省歯科疾患実態調査における 6 mm 以上の PD を有する者の割合の比較

\*:  $p < 0.001$



**図2 MFSおよびLDS患者における口腔内写真とパノラマX線写真**

(A) (B) 代表的な MFS 患者の口腔内写真とパノラマエックス線写真、(C) 侵襲性歯周炎様病態を伴う LDS 患者の口腔内写真とパノラマエックス線写真。円：垂直性の骨吸収部位



## 2. 侵襲性歯周炎様病態を伴う LDS 患者の遺伝変異解析結果と LDS モデルマウスの作製

図 2 (C) の患者におけるゲノムシーケンスの結果、*TGFBR1* の第 3 エクソンにある Glysin、Serine リッチドメイン (以下 GS ドメインと略す) において、第 563 塩基にあるグアニンがチミンに変異することで、第 188 番にあるグリシンがバリンに変化していることが明らかとなった (図 3A)。そこでマウスの遺伝子において、同患者での変異部位に相当する配列を検出し、同様の変異を導入することとした (図 3B)。マウスジェノタイピングは、後肢より採取した足指から抽出したゲノム DNA を鋳型として、*Tgfbr1* 対立遺伝子と loxP 配列を含む変異型 *Tgfbr1* 対立遺伝子とを識別するプライマーを用いた PCR 法にて行った (図 2C)。

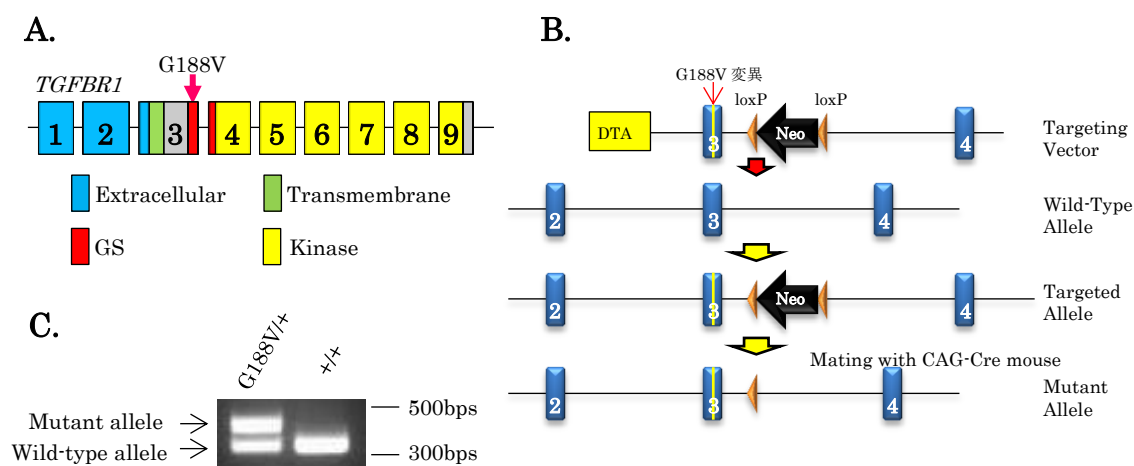


図 3 侵襲性歯周炎様病態を伴う LDS 患者の遺伝変異解析結果と LDS モデルマウスの作製

(A) 侵襲性歯周炎様病態を伴う LDS 患者における遺伝子変異を示す。(B) *Tgfbr1* 遺伝子の第 3 エクソンの第 563 塩基のグアニンをチミンに置き換え、第 4 イントロンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入した *Tgfbr1* 遺伝子組み換えベクターを構築し、C57BL/6 マウス由来の ES 細胞へトランスフェクションし、遺伝子相同組み換えを行った。(C) 足指から抽出したゲノム DNA を鋳型として、*Tgfbr1* 対立遺伝子 (増幅塩基数: 304 base pairs) と loxP 配列を含む変異型 *Tgfbr1* 対立遺伝子 (増幅塩基数: 394 base pairs) とを識別するプライマーを用いた PCR 解析を示す。

### 3. LDS モデルマウスのジェノタイピング解析

WT、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/G188V</sup> マウスそれぞれの胎生 14.5 日の写真 (図 4A)、WT、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスの生後 6 週齢オスの写真 (図 4B) を示す。胎生期において、大きさ、血管の状態など明らかな差は認められなかった。また、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスは正常に生まれ、繁殖、系統維持が可能であり、生後 6 週齢では、外見上の異常を認めなかった。

*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウス同士を交配させて得られたマウスを胎生 13.5 日、14.5 日、出生後においてジェノタイピングを行ったところ、胎生 13.5 日、14.5 日時点では WT、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/G188V</sup> マウスはそれぞれ存在していたが、出生数においては *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/G188V</sup> マウスは 1 例のみであり、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/G188V</sup> の変異は胎生 14.5 日以降に胎生致死を引き起こす変異であることが明らかとなった (表 6)。そこで、LDS モデルマウスとして、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスを解析した。

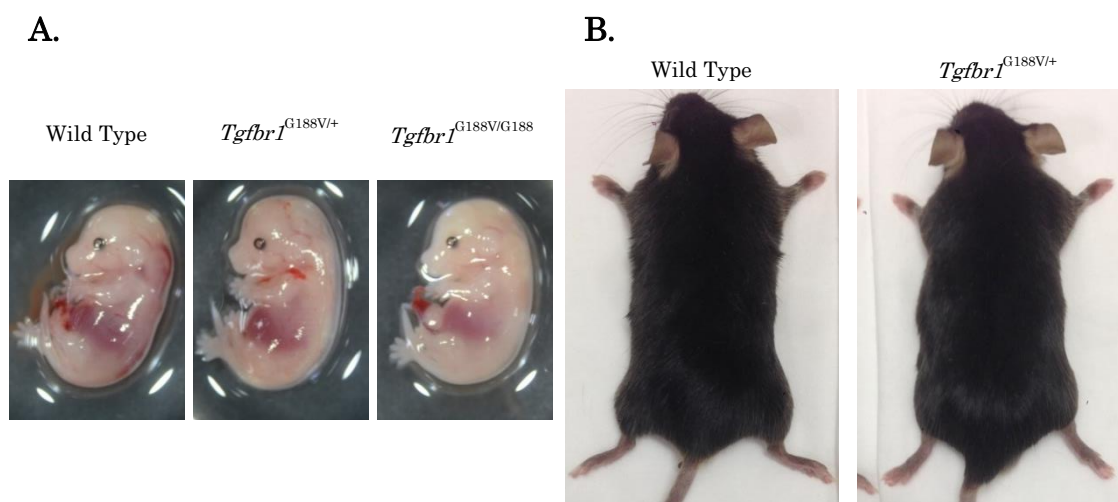


図 4 LDS モデルマウスの胎生期、出生後の外観

(A) WT、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスおよび *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/G188V</sup> マウスの胎仔 (胎生 14.5 日) の外観を示す。(B) WT、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウス (生後 6 週齢オス) の外観を示す。

表 6 マウス遺伝子型解析の結果

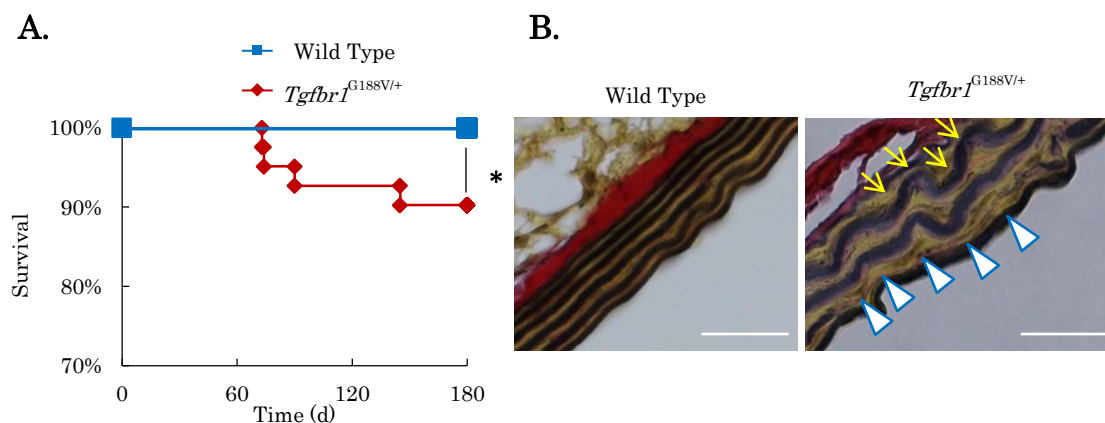
Genotype	E13.5	E14.5	出生数
Wild Type	12 (24%)	15 (29%)	63 (31%)
<i>Tgfb<math>\beta</math>1</i> <sup>G188V/+</sup>	25 (51%)	23 (45%)	139 (68.5%)
<i>Tgfb<math>\beta</math>1</i> <sup>G188V/G188V</sup>	12 (24%)	13 (26%)	1 (0.5%)*

\* $p < 0.001$  vs E13.5, E14.5

#### 4. LDS モデルマウスの病態解析

*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスの生存率について Kaplan-Meier の生存曲線にて 180 日間観察し、表したところ、WT と比較して有意に早逝であることが示された (図 5A)。そこで、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスが早逝であることの原因について解析するため、マウスの大動脈の組織切片を作製し、弾性線維を観察した。24 週齢オス WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスより大動脈を採取、体軸断薄切標本を作製し、EVG 染色を行った。その結果、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスの大動脈において、弾性線維がねじれている像 (図 5B、矢印) や、弾性線維の微細な断裂像を認めた (図 5B、矢頭)。

次に、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスの大動脈において、TGF- $\beta$  関連遺伝子の発現に関して解析を行った。6 週齢オスの WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスの大動脈を採取し、TGF- $\beta$  遺伝子である *Tgfb1*、*Tgfb2*、*Tgfb3*、TGF- $\beta$  受容体遺伝子の *Tgfb $\beta$ 1*、*Tgfb $\beta$ 2*、TGF- $\beta$  反応性遺伝子の *Col1a1*、*Serpine1* の mRNA 発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、有意差はないものの、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスにおいて、WT と比較して TGF- $\beta$  遺伝子の *Tgfb1*、*Tgfb3* の発現、TGF- $\beta$  反応性遺伝子の *Col1a1*、*Serpine1* の遺伝子発現が上昇している傾向が認められた (図 5C)。



C.

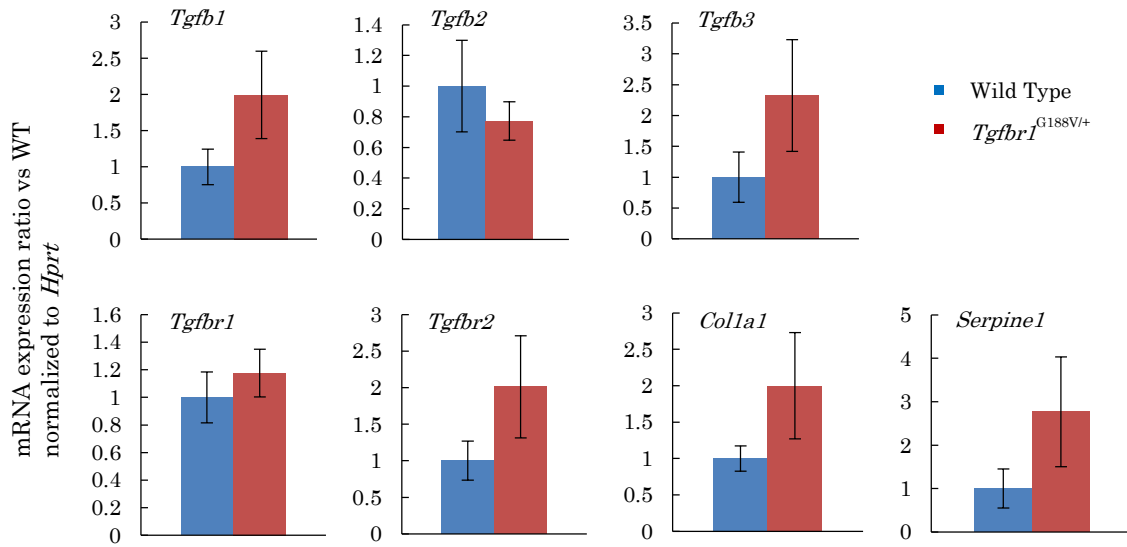


図5 LDSモデルマウスの病態解析

(A) WT および *Tgfb1*<sup>G188V/+</sup> マウスの180日間の Kaplan-Meier の生存曲線を示す。  
 \* :  $p < 0.05$  vs WT (B) 24 週齢の WT および *Tgfb1*<sup>G188V/+</sup> マウスの大動脈の EVG 染色像を示す。矢印：弾性線維のねじれ、矢頭：弾性線維の微細な断裂像。Scale bar: 25  $\mu$ m。 (C) 大動脈組織から mRNA を抽出し、細胞外マトリックスの遺伝子発現を、内在性コントロールとして *Hprt* を用いた Real-time PCR 法にて解析した。なお、*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup> マウスにおける各遺伝子の発現量は、WT における発現量を 1 としたときの相対値として示す。各群 n=4。解析結果は、それぞれの平均値  $\pm$  標準誤差で示す。

## 5. *Tgfbr1*<sup>G188V</sup> 変異による TGF- $\beta$ に対する反応性変化の解析

*Tgfbr1*<sup>WT</sup> ベクター、*Tgfbr1*<sup>G188V</sup> ベクターの 293 細胞へのトランスフェクション群では、ウェスタンブロット法の結果、同程度に TGF- $\beta$  I 型受容体が強発現していることが確認された (図 6A)。次にルシフェラーゼアッセイの結果、野生型 TGF- $\beta$  I 型受容体を強発現した群では、TGF- $\beta$  刺激を行った際に誘導されるルシフェラーゼ活性が有意に上昇し、変異型 TGF- $\beta$  I 型受容体を強発現した群では有意にルシフェラーゼ活性が抑制された (図 6B)。

次に、マウス由来の MEFs を用いて、*Tgfbr1*<sup>G188V</sup> 変異による TGF- $\beta$  に対する反応性の変化を解析した。各遺伝子型の MEFs を 24 時間 FBS 非存在下で培養後、TGF- $\beta$  (0~5 ng/mL) で刺激し、12 時間後の TGF- $\beta$  誘導性 *Serpine1* 遺伝子の発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、WT MEFs においては、TGF- $\beta$  濃度依存的に *Serpine1* の発現上昇を認めたが、*Tgfbr1*<sup>G188V/+</sup>、*Tgfbr1*<sup>G188V/G188V</sup> MEFs において、TGF- $\beta$  による *Serpine1* の発現上昇が有意に低下した (図 6C)。続いて、MEFs における TGF- $\beta$  の細胞内シグナル伝達解析を行った。MEFs を 24 時間 FBS 非存在下で培養後、TGF- $\beta$  (0~10 ng/mL) で刺激し、30 分後に細胞を回収し、Smad2 のリン酸化をウェスタンブロット法にて検討した。その結果、WT MEFs では TGF- $\beta$  濃度依存的に Smad2 のリン酸化が亢進していたが、*Tgfbr1*<sup>G188V/+</sup>、*Tgfbr1*<sup>G188V/G188V</sup> MEFs において、WT と比較して Smad2 のリン酸化が低下していることが示された (図 6D)。

以上のことから、*Tgfbr1*<sup>G188V</sup> 変異により、細胞の TGF- $\beta$  に対する反応性が低下することが示された。

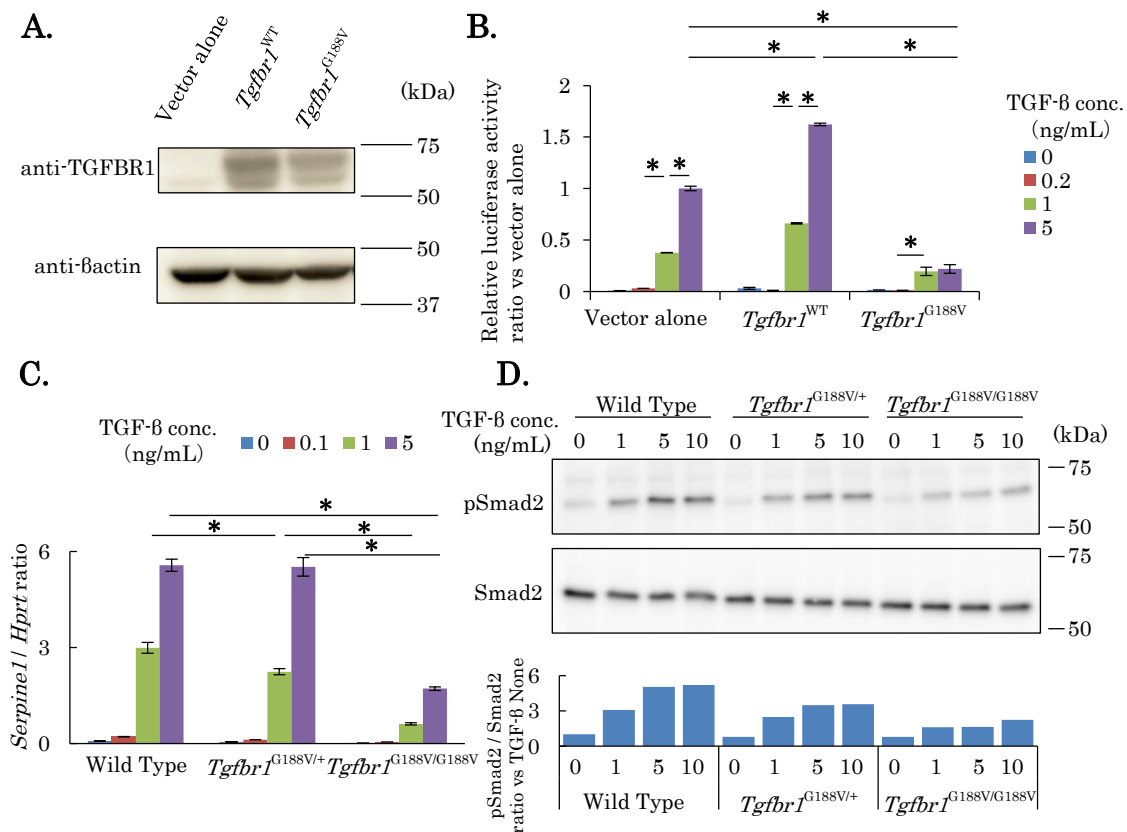


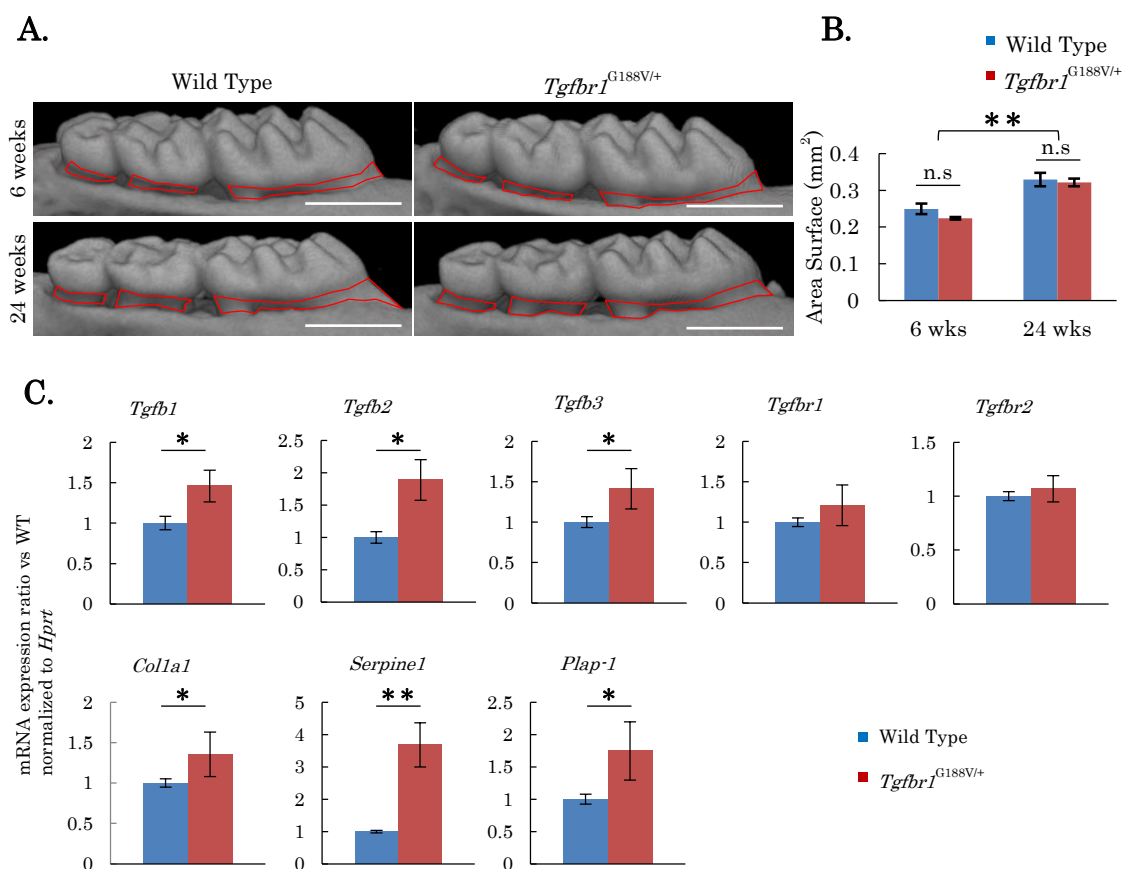
図6 *Tgfbri*<sup>G188V</sup>変異によるTGF-βに対する反応性の変化

*Tgfbri*<sup>WT</sup>ベクター、*Tgfbri*<sup>G188V</sup>ベクターを作製し、293細胞へトランスフェクションし、それぞれの細胞をTGF-β (0~5 ng/mL)で刺激した。(A) 刺激前のタンパクを回収し、TGF-β R1の発現をウェスタンブロット法にて検討した。(B) 刺激8時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。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。解析結果は、それぞれ3群の平均値±標準誤差で示す。\*:  $p < 0.05$  (C) WT、*Tgfbri*<sup>G188V/+</sup>、*Tgfbri*<sup>G188V/G188V</sup> MEFsをTGF-β (0~5 ng/mL)で刺激し、12時間後に誘導される*Serpine1*の遺伝子発現をReal-time PCR法にて解析した。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。解析結果は、それぞれ3群の平均値±標準誤差で示す。\*:  $p < 0.05$  (D) WT、*Tgfbri*<sup>G188V/+</sup>、*Tgfbri*<sup>G188V/G188V</sup> MEFsをTGF-β (0~10 ng/mL)で刺激し、30分後に誘導されるSmad2のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。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。下のグラフはリン酸化Smad2のバンドの密度の値をSmad2のバンドの密度の値で除して比較したものである。

## 6. LDS モデルマウスの歯周組織における表現型の解析

WT、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスから採取した上顎歯槽骨のマイクロ CT 撮影を行い、歯槽骨吸収の評価を行った。歯槽骨吸収量は、セメント-エナメル境から歯槽骨頂の間の面積を測定し（図 7A 赤線）、第 1 臼歯、第 2 臼歯、第 3 臼歯における測定値の合計とした。測定の結果、WT、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスともに加齢により有意に骨吸収が増大していることが示されたが、WT、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスを比較したところ、歯槽骨吸収量に有意な差異は認められなかった（図 7B）。

次に、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスの歯周組織において、TGF- $\beta$  関連遺伝子の発現に関して解析を行った。6 週齢オスの WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスの歯周組織を採取し、TGF- $\beta$  関連遺伝子の mRNA 発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスにおいて、WT と比較して TGF- $\beta$  遺伝子の *Tgfb1*、*Tgfb2*、*Tgfb3* の発現、TGF- $\beta$  反応性遺伝子の *Colla1*、*Serpine1*、*Plap-1* の遺伝子発現が WT と比較して有意に増加していることが示された（図 7C）。



### 図 7 *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスの歯周組織における表現型の解析

(A) 6 週齢、24 週齢の WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスの上顎歯槽骨マイクロ CT 像を示す。Scale bar: 1,000  $\mu$ m. (B) 歯槽骨吸収量はセメントエナメル境から歯槽骨頂の間の面積を測定し、第 1 臼歯、第 2 臼歯、第 3 臼歯における測定値の合計として示す。6 週齢 Wild Type: n=6、6 週齢 *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>: n=8、24 週齢 Wild Type: n=20、24 週齢 *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>: n=14. (C) 歯周組織から RNA を抽出し、細胞外基質の遺伝子発現を、内在性コントロールとして *Hprt* を用いた Real-time PCR 法にて解析した。

*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスにおける各遺伝子の発現量を、WT における発現量を 1 としたときの相対値として示す。各群 n=4。解析結果は、それぞれの平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。

\*:  $p < 0.05$ 、\*:  $p < 0.01$

## 7. 歯周病原性細菌投与による歯周組織の変化の解析

WT、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスに侵襲を加えることで歯周組織に生じる変化を解析するため、*P.g* を経口投与し、実験的歯周炎モデルを作製した。*P.g* 投与後、マウスの上顎骨を回収し、歯周組織のマイクロ CT 撮影、切片の作製を行った。マイクロ CT 像により歯槽骨吸収の評価を行ったところ、WT マウスでは *P.g* 投与群における歯槽骨吸収は対照群と比べ明らかな差異は認められなかった。一方、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスでは *P.g* 投与により対照群に比べて有意に骨吸収が起こっていることが明らかとなった。また、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスにおいて、WT と比較して *P.g* 投与により有意に骨吸収が起こっていることが明らかとなった (図 8A)。歯周組織切片を作製し、HE 染色を行ったところ、*P.g* 投与群の WT および *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスにおいて、歯槽骨に近接した多核細胞が観察された (図 8B、C)。そこで、歯槽骨に近接した破骨細胞の発現について観察するため、それぞれの歯周組織の切片を作製し、TRAP 染色を行った。その結果、*P.g* 投与群において、歯槽骨に近接した位置に破骨細胞が赤く染まっている像 (矢頭) が確認された (図 8D-G)。破骨細胞の発現数を定量的に解析するため、第 1 第 2 臼歯間、第 2 第 3 臼歯間の歯槽骨に近接する破骨細胞数を数え、歯槽骨表面の長さ (図 8D-G の赤線) で除した結果で比較したところ、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスでは *P.g* 投与により破骨細胞数が有意に増加していることが明らかとなった。また、WT に比べ *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup> マウスにおいて *P.g* 投与により有意に破骨細胞数が増加していることが明らかとなった (図 8H)。



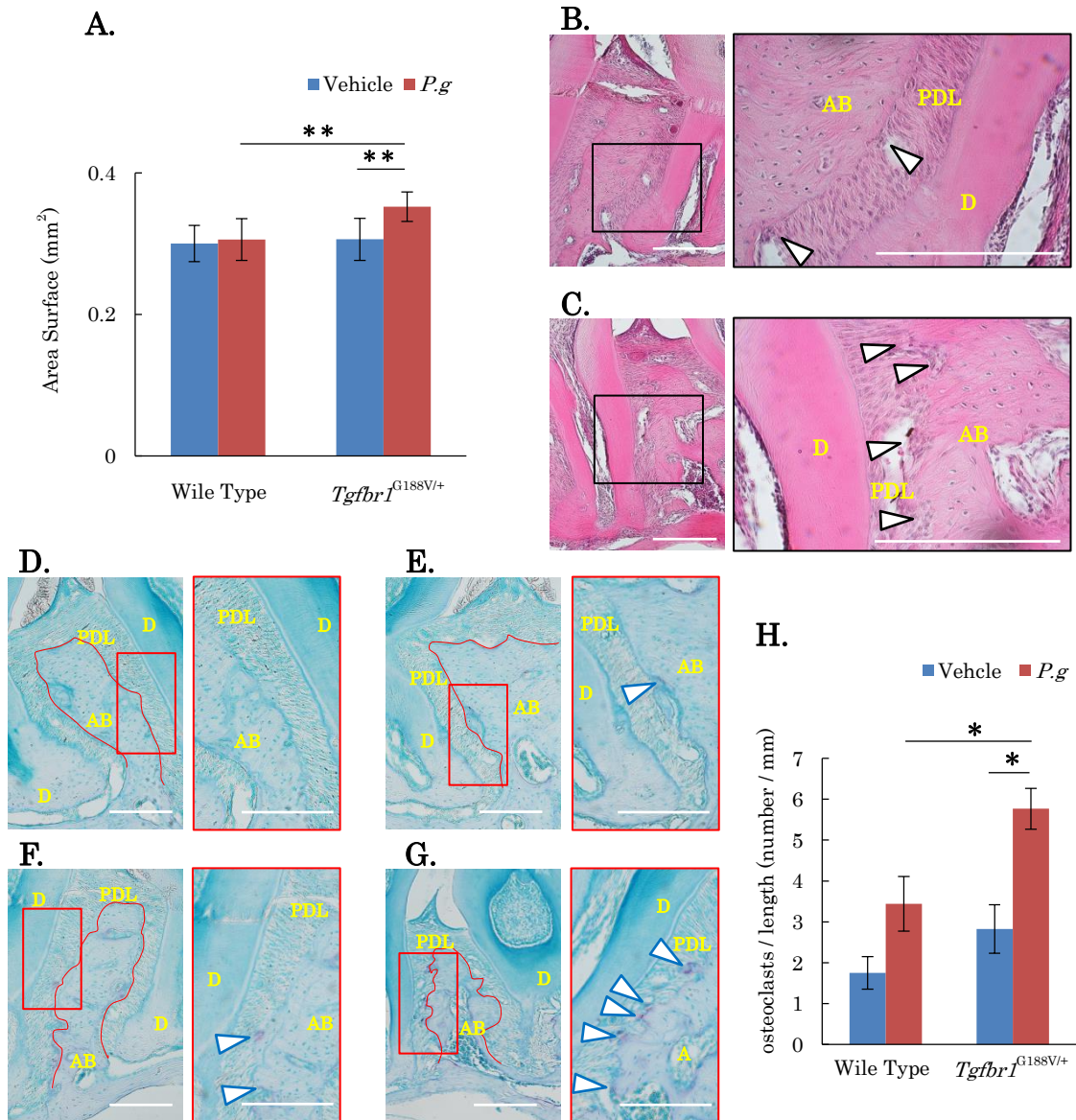


図8 *P.g*投与後の *Tgfbri*<sup>G188V/+</sup>マウスの歯周組織における表現型の解析

(A) *P.g*投与群、対照群の WT、*Tgfbri*<sup>G188V/+</sup>マウス歯周組織のセメント-エナメル境から歯槽骨頂の間の面積を測定し、第1臼歯、第2臼歯、第3臼歯における測定値の合計を歯槽骨吸収量として示す。対照群: n=11、*P.g*投与群: n=6。解析結果は、それぞれの平均値±標準誤差で示す。(B) WT *P.g*投与群、(C) *Tgfbri*<sup>G188V/+</sup> *P.g*投与群の歯周組織の HE 染色像およびその拡大像を示す。矢頭: 歯槽骨に近接する多核細胞。

Scale bar: 200 μm。(D) WT 対照群、(E) *Tgfbri*<sup>G188V/+</sup>対照群、(F) WT *P.g*投与群、(G) *Tgfbri*<sup>G188V/+</sup> *P.g*投与群の歯周組織の TRAP 染色像およびその拡大像を示す。矢頭: 破骨細胞が赤く染まっている像 (H) 第1臼歯第2臼歯間、第2臼歯第3臼歯間の歯槽骨に近接する破骨細胞数を数え、歯槽骨表面の長さ (D-G の赤線) で除した結果を示す。対照群 WT: n=3、*Tgfbri*<sup>G188V/+</sup>: n=4、*P.g*投与 WT: n=5、*Tgfbri*<sup>G188V/+</sup>: n=6。解析結果は、それぞれの平均値±標準誤差で示す。Scale bar: 200 μm。

AB: alveolar bone、D: dentin、PDL: periodontal ligament \*: p < 0.05、\*: p < 0.01

## 8. LDS モデルマウスのマクロファージにおける炎症応答の解析

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。また、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。そこで WT、*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスのマクロファージの炎症応答について解析を行った。WT、*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスそれぞれから採取したマクロファージを *E.coli* LPS (25 ng/mL) にて刺激した。刺激前のマクロファージの TGF- $\beta$  関連遺伝子の mRNA 発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マクロファージにおいて、*Tgfb2*、*Tgfb3*、*Serpine1* の mRNA 発現が WT と比べて有意に低いことが明らかとなった (図 9A)。また、24 時間までの *Tnf*、*Il-6* の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析を行った結果、*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マクロファージにおいて *E.coli* LPS 刺激により WT と比較して有意に *Tnf* および *Il-6* の遺伝子発現が上昇した (図 9B)。

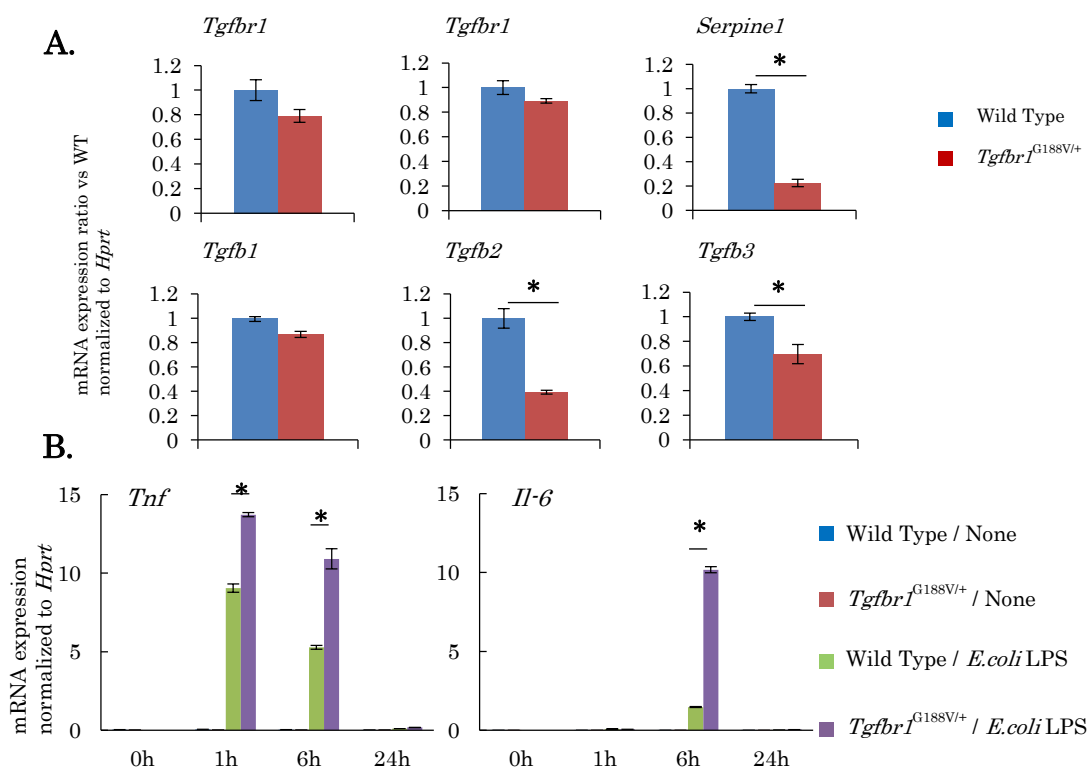


図9 *Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウス腹腔内マクロファージにおける LPS 誘導性の炎症性サイトカイン発現

(A) thioglycollate 培地を WT および *Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>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。*E.coli* LPS 刺激前マクロファージの TGF- $\beta$  関連遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析を行った。(B) 採取したマクロファージを *E.coli* LPS (25 ng/mL) にて刺激し、24 時間までの *Tnf*、*Il-6* の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析を行った。None: 無刺激群 解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示す。\*:  $p < 0.05$

## 考察

本研究における MFS およびその類縁疾患と歯周炎との実態調査の結果から、MFS およびその類縁疾患の患者は、健常者と比較して歯周炎の罹患率が高く、かつ重症化していることが示された。これまでに報告された MFS と歯周炎との実態調査においては、MFS 患者は、歯周炎の罹患率が高くなることが報告されており<sup>(18)</sup>、本研究の結果と一致している。MFS 患者における重度の歯周炎の症例も報告されていることから<sup>(14)</sup>、MFS の遺伝変異は歯周炎のリスクファクターとなっていることが示唆された。

MFS は、細胞外マトリックスの microfibril の成分であり活性型 TGF- $\beta$  の制御に関わる *Fibrillin-1* の遺伝子変異により発症する。TGF- $\beta$  は latency associated protein (LAP) タンパクと結合し、small latent complex (SLC) を形成することで潜在型として分泌される。SLC は、各組織において latent TGF- $\beta$  binding protein-1 (LTBP) と結合し、large latent complex (LLC) を形成する。LTBP は microfibril と結合しており、microfibril の働きにより必要に応じて TGF- $\beta$  は活性型となり、各組織で機能を発揮する<sup>(26)</sup>。MFS 患者の大動脈組織では、*Fibrillin-1* に変異がおこることで、LTBP が microfibril と結合できなくなり、活性型 TGF- $\beta$  が過剰となる<sup>(7)</sup>。そして高濃度の TGF- $\beta$  は、エラスターゼやマトリックスメタロプロテアーゼ（以下 MMP と略す）-2、9 の発現を増加させる。その結果、発現上昇したエラスターゼおよび MMP がそれぞれエラスチン、弾性線維を分解する<sup>(27)</sup>。上記の結果、大動脈結合組織の弾性が減弱化し、大動脈壁が弱体化することにより、血流などの刺激によって経年的に大動脈組織の構造異常がおこると考えられている<sup>(26)</sup>。MFS の歯周組織においては、*Fibrillin-1* の変異により、歯根膜線維が脆弱になっており<sup>(28)</sup>、また、MFS 患者由来の歯根膜細胞は、マイクロフィブリルの構成が不十分であるという報告がなされている<sup>(29)</sup>。また、MFS の歯周組織においても、TGF- $\beta$  シグナルの発現が上昇していることが報告されている<sup>(28)</sup>。したがって、MFS の歯周組織も、大動脈組織と同様の機序で歯根膜が構造的に脆弱となり、歯周病菌を含むバイオフィルムにより慢性歯周炎が進行しやすい状態になっているのではないかと考えられる。以上のことから、MFS の病態は歯周病の発症・進行のリスクになるものの、日々のプラークコントロールや定期的なメンテナンスを励行することで MFS 患者の口腔保健を維持することは可能であると考えられる。

一方で、本実態調査で、1 名の LDS 患者において、プラークコントロールは比較的良好であるものの、限局した著しい垂直性の骨吸収を認め、侵襲性歯周炎の様相を呈している患者を見出した。侵襲性歯周炎は、遺伝的要因による影響が強く現れると言われており、日本における罹患率は 0.05~1%とされている

(30)。本実態調査の LDS 患者では、6 名中 1 名という高い確率で侵襲性歯周炎の様相を呈している患者が存在したことから、LDS の遺伝変異と歯周炎とに遺伝的に強い関わりがあると考えられた。

LDS の遺伝変異は、これまでに 40 種類以上の遺伝変異が報告されているが<sup>(10)</sup>、今回我々が見出した患者は *TGFBR1* の GS ドメインに G188V という変異を持ち、これまでに報告の無い新規の変異であった。TGF- $\beta$  は、細胞膜上に存在する 2 型受容体に結合する。TGF- $\beta$  と結合した 2 型受容体は、1 型受容体と複合体を形成する。2 型受容体は、細胞内領域にセリン・スレオニンキナーゼ活性を有しており、結合した 1 型受容体の細胞内にある GS ドメインをリン酸化する。1 型受容体は GS ドメインがリン酸化されることで、活性型キナーゼとなり、細胞内情報伝達分子である R-Smad を介して細胞内へシグナルを伝える<sup>(13)</sup>。本研究の LDS 患者の遺伝変異においては、Smad シグナルが減弱化していることが示された。*TGFBR1* の GS ドメインに構造変化が生じることで、GS ドメインのリン酸化が起こらなくなり、その結果シグナル伝達が不全になるのではないかと考えられる。しかしながらその詳細は不明であり、受容体の局在の変化や立体構造の変化などに関し、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

本研究で樹立した LDS モデルマウスにおいて、*Tgfbr1*<sup>G188V/G188V</sup> マウスは胎生致死を示すことが示され、LDS の患者にホモの患者が存在しないことと一致していた。したがって *Tgfbr1* は生存するために必須であると考えられる。一方、*Tgfbr1*<sup>G188V/+</sup> マウスでは、大動脈組織における弾性線維のねじれや微細な断裂像が確認され、早逝傾向を示すことが明らかとなった。大動脈の弾性線維の構造異常が起こり、大動脈瘤や大動脈解離などの病態が引き起こされ、早逝傾向を示すと考えられる。しかし、大動脈の構造異常と大動脈瘤などの病態との関係は検討できていないため、今後の検討が必要であると考えられる。

本研究において、*Tgfbr1*<sup>G188V/+</sup> マウスの MEFs では TGF- $\beta$  シグナルが減弱化しているものの、大動脈組織において TGF- $\beta$  関連遺伝子の発現が上昇している傾向が示された。大動脈組織における報告では、これまでに LDS 患者、LDS モデルマウスにおいて、TGF- $\beta$  シグナルが過剰に発現しているという報告がなされている<sup>(9, 10, 20)</sup>。TGF- $\beta$  シグナルは、Smad を介した canonical pathway と ERK や JNK などを経た non-canonical pathway が知られており、Smad シグナルによるフィードバック機構によりその発現が調整されている<sup>(31)</sup>。LDS においては、TGF- $\beta$  受容体の遺伝変異により、canonical pathway が選択的に減弱化される。その結果、TGF- $\beta$  の発現に対する負のフィードバック機構が阻害される。その結果、組織中の TGF- $\beta$  が増加することにより、canonical pathway が過大になる。さらに non-canonical pathway も、より過剰に働くことで大動

脈病変が起きると考えられている<sup>(31)</sup>。本研究における *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスにおいても同様のメカニズムで、大動脈弾性線維の異常が起きたものと考えられる。

一方で、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスの歯周組織は、WT マウスと比較して、TGF- $\beta$  関連遺伝子の発現が有意に上昇しているものの、歯槽骨吸収量、歯周組織の状態には明らかな差異は認められなかった。TGF- $\beta$  関連遺伝子の発現が上昇していることに関しては、大動脈組織と同様、細胞レベルでの TGF- $\beta$  シグナルの減少を補うため、組織中では TGF- $\beta$  が過剰に発現していると考えられるが、HE 染色では歯周組織の明らかな構造異常は認められなかった。したがって病的刺激を受けていない歯周組織では、過剰な TGF- $\beta$  シグナルによる異常は惹起されないことが示唆された。今後、歯周組織の構造異常の有無について、細胞、分子レベルでの詳細な解析が求められる。

一方、*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスにおける *P.g* 投与歯周炎モデルでは、WT と比較して有意に破骨細胞が増加し、歯槽骨吸収が有意に増加していることが示された。*P.g* 投与歯周炎モデルを使用した歯周炎の研究報告はこれまでに多くなされている<sup>(24, 32-34)</sup>。この実験的歯周炎モデルでは、*P.g* の経口投与により、腸内細菌叢に変化が起こる。その結果、全身的な炎症状態が惹起され、口腔内の免疫応答細胞の反応により、骨吸収がおこると言われている<sup>(24, 32)</sup>。*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスにおいても、*P.g* を経口投与することにより全身的な炎症状態が惹起された可能性が考えられる。

*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウス由来のマクロファージを用いた実験において、*E.coli* LPS 刺激に対するマクロファージの反応性が上昇していることが明らかとなった。つまり、局所でのマクロファージの働きが亢進した結果、骨吸収が有意に増大したと考えられる。マクロファージにおいて、TGF- $\beta$  シグナルは、myeloid differentiation factor 88 (以下 MyD88 と略す) を介して Toll-like Receptor (以下 TLR と略す) シグナルを抑制しているという報告がある<sup>(35)</sup>。*Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスのマクロファージにおいては、*Tgfb $\beta$ 1* に変異が生じることで、TGF- $\beta$  シグナルが減弱化することにより、TLR シグナルが促進され、LPS に対するマクロファージの反応性が上昇しているのではないかと考えられる。LDS 患者の血清中の TGF- $\beta$  濃度は、健常者に比べて高くなっているという報告があるが<sup>(36)</sup>、LDS において、活性型 TGF- $\beta$  の発現を制御している *Fibrillin-1* は正常であるため、血清中の TGF- $\beta$  は潜在型と考えられる。したがって、血清中のマクロファージは、長期間の高濃度活性型 TGF- $\beta$  による影響を受けておらず、LPS に対して高い反応性を示す結果、歯周組織の破壊が起こったと考えられる。今後、歯周病の病態を考えるにあたり、*P.g* LPS に対するマクロファージの反応性の解析が求められる。

以上のことから、*P.g* 投与歯周炎モデルの *Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスにおいては、全身的な炎症状態がおこることに加え、局所においてマクロファージなどの免疫応答細胞の反応性が上昇することで、有意な歯槽骨の吸収が起きたのではないかと考えられる。

*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスのマクロファージにおける TGF- $\beta$  シグナル伝達に関しては本研究では検討していない。しかしながら、10%FBS 含有 D-MEM 培養下では、*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスのマクロファージにおける TGF- $\beta$  反応性遺伝子 *Serpine1* の発現が減少していた。10%FBS 含有 D-MEM には ELISA 法にて 1 ng/ $\mu$ L の TGF- $\beta$  が存在することが報告されており<sup>(37)</sup>、*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスのマクロファージにおいても培養液中の TGF- $\beta$  に対する反応性は減少していると考えられる。また、TGF- $\beta$  のポジティブフィードバック機構についても報告されており<sup>(38)</sup>、反応性の減少により TGF- $\beta$  関連遺伝子 (*Tgfb2*、*Tgfb3*) の発現が低下したものと考えられる。今後、TGF- $\beta$  による刺激実験や、TGF- $\beta$  存在下における LPS に対する反応性に対する検討が必要である。また、TGF- $\beta$  は、炎症性マクロファージの発現を抑制するという報告があり<sup>(39)</sup>、LDS における遺伝変異により、マクロファージにおいて TGF- $\beta$  シグナルが抑制されることで、炎症性マクロファージの発現が増加しているという可能性も考えられる。したがって、骨髄由来幹細胞からマクロファージを分化誘導し、検討する必要があると考えられる。

Smad を介した TGF- $\beta$  シグナルは、骨芽細胞への分化を抑制している<sup>(40)</sup>。*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスの歯周組織においては、TGF- $\beta$  シグナルは過剰になっていることから、骨芽細胞、骨細胞への分化は抑制されていると考えられる。また、TGF- $\beta$  II 型受容体に変異を導入した LDS モデルマウスにおいては、大腿骨が細くなり、骨量が減少し、脆弱になっていると報告されている<sup>(41)</sup>。以上のことから、*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスにおいても、骨芽細胞、骨細胞への分化が抑制され、歯槽骨が脆弱になっている可能性が考えられる。

最後に、本研究の結果から、LDS における歯周炎の病態について考察する。本研究で見出した LDS 患者の遺伝変異を再現した *Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスの細胞においては、TGF- $\beta$  シグナルが減弱化している (図 10A①)。それを補うため、組織中の活性型 TGF- $\beta$  の発現が上昇し、結果として組織での TGF- $\beta$  シグナルが過剰になる (図 10B②)。その結果、大動脈組織においては、エラスターゼや MMP の発現が上昇し、弾性線維のねじれや断裂がおこる (図 10B③)。一方で、歯周組織においても TGF- $\beta$  シグナルが過剰になるが、明らかな構造の変化はおこっていない (図 10B④)。*Tgfb1*<sup>G188V/+</sup>マウスのマクロファージにおいては *Tgfb1*<sup>G188V</sup> 変異により TGF- $\beta$  シグナルが減弱化している。その結果、MyD88 を介した TLR の抑制機構も減弱化することで、LPS への反応性が促進する (図



10⑤)。 *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスに *P.g* を経口投与することで、全身的な炎症状態が引き起こされると同時に、局所において、反応性が促進されたマクロファージの働きにより、歯槽骨吸収が誘導される (図 10⑥)。

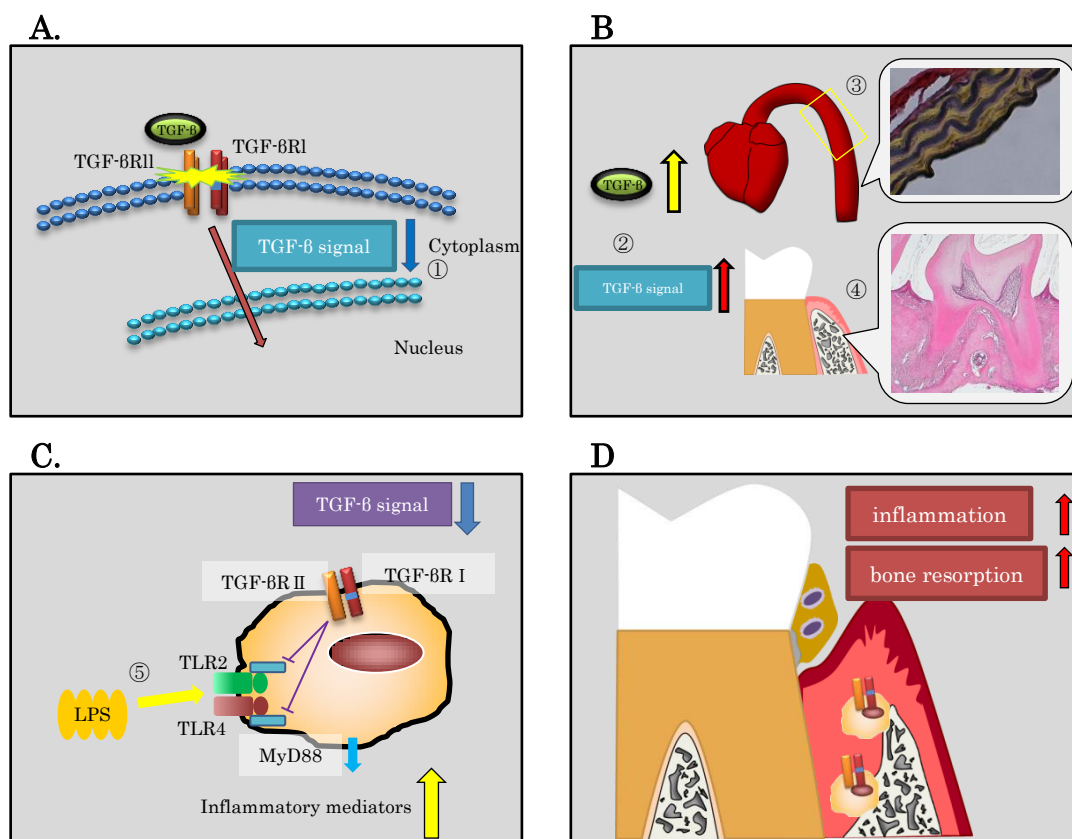


図 10 LDS モデルマウスにおけるシグナル異常とその病態 (作業仮説)

(A) ① *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>変異により、細胞レベルでは TGF- $\beta$  シグナルが伝達されにくくなる。(B) ②組織では細胞での伝達不全を補うため TGF- $\beta$  の発現が過剰になる。③TGF- $\beta$  シグナルが過剰になることで、大動脈の弾性線維のねじれや断裂などの構造異常が起こる。④歯周組織では TGF- $\beta$  シグナルが過剰になっているが、明らかな構造異常はおきていない。(C) ⑤ *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスのマクロファージでは、TGF- $\beta$  シグナルの減弱化により、MyD88 を介した TLR の抑制が減少し、LPS に対する反応性が促進する。

(D) ⑥ *Tgfb $\beta$ 1*<sup>G188V/+</sup>マウスに *P.g* を投与することで、反応性が亢進したマクロファージによる骨吸収がおこる。

## 結論

本研究結果より以下の結論を得た。

1. MFS およびその類縁疾患患者は、2011 年厚生労働省歯科疾患実態調査の結果と比較して歯周炎の罹患率、重症度が高くなっていた。
2. *Tgfbr1*<sup>G188V/+</sup>マウスの大動脈の弾性線維に構造異常が認められた。
3. *Tgfbr1*<sup>G188V</sup> 変異は、TGF- $\beta$  シグナル伝達を抑制した。
4. *Tgfbr1*<sup>G188V/+</sup>マウスに *P.g* を経口投与することで、WT マウスと比べて有意歯槽骨吸収が増加した。
5. *Tgfbr1*<sup>G188V/+</sup>のマクロファージは、WT と比較して LPS に対する応答性が亢進した。

## 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ご指導ならびにご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. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991;352(6333):337-9.
2. Schorr S, Braun K, and Wildman J. Congenital aneurysmal dilatation of the ascending aorta associated with arachnodactyly. *American Heart Journal*. 1951;42(4):610-6.
3. Godfrey M, Menashe V, Weleber RG, Koler RD, Bigley RH, Lovrien E, et al. Cosegregation of elastin-associated microfibrillar abnormalities with the Marfan phenotype in families. *Am J Hum Genet*. 1990;46(4):652-60.



4. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(3):407-11.
5. Huang F, and Chen YG. Regulation of TGF-beta receptor activity. *Cell Biosci.* 2012;2:9.
6. Dietz HC. *Am J Hum Genet.* United States; 2007:662-7.
7. Matt P, Schoenhoff F, Habashi J, Holm T, Van Erp C, Loch D, et al. Circulating transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Circulation.* 2009;120(6):526-32.
8. Putnam EA, Zhang H, Ramirez F, and Milewicz DM. Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nat Genet.* 1995;11(4):456-8.
9. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005;37(3):275-81.
10. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med.* 2006;355(8):788-98.
11. Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, Abifadel M, Harada N, Morisaki T, et al. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2004;36(8):855-60.
12. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science.* 1998;280(5366):1086-8.
13. Doyle AJ, Doyle JJ, Bessling SL, Maragh S, Lindsay ME, Schepers D, et al. Mutations in the TGF-beta repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2012;44(11):1249-54.
14. Straub AM, Grahame R, Scully C, and Tonetti MS. Severe periodontitis in Marfan's syndrome: a case report. *J Periodontol.* 2002;73(7):823-6.
15. De Coster PJ, Martens LC, and De Paepe A. Oral manifestations of patients with Marfan syndrome: a case-control study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(5):564-72.
16. Jain E, and Pandey RK. Marfan syndrome. *BMJ Case Rep.* 2013;2013.
17. Staufenbiel I, Hauschild C, Kahl-Nieke B, Vahle-Hinz E, von Kodolitsch Y, Berner M, et al. Periodontal conditions in patients with Marfan syndrome - a multicenter case control study. *BMC Oral Health.* 2013;13:59.

18. Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Aoyama N, Tada Y, et al. High incidence and severity of periodontitis in patients with Marfan syndrome in Japan. *Heart Vessels*. 2015;30(5):692-5.
19. Meng H, Xu L, Li Q, Han J, and Zhao Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007;43:133-59.
20. Gallo EM, Loch DC, Habashi JP, Calderon JF, Chen Y, Bedja D, et al. Angiotensin II-dependent TGF-beta signaling contributes to Loeys-Dietz syndrome vascular pathogenesis. *J Clin Invest*. 2014;124(1):448-60.
21. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, and Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. 1989;77(1):61-8.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
24. Baker PJ, Evans RT, and Roopenian DC. Oral infection with Porphyromonas gingivalis and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol*. 1994;39(12):1035-40.
25. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999;11(4):443-51.
26. Benke K, Agg B, Szilveszter B, Tarr F, Nagy ZB, Polos M, et al. The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Cardiol J*. 2013;20(3):227-34.
27. Chung AW, Au Yeung K, Sandor GG, Judge DP, Dietz HC, and van Breemen C. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res*. 2007;101(5):512-22.
28. Saito M, Kurokawa M, Oda M, Oshima M, Tsutsui K, Kosaka K, et al. ADAMTSL6beta protein rescues fibrillin-1 microfibril disorder in a Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. *J Biol Chem*. 2011;286(44):38602-13.
29. Shiga M, Saito M, Hattori M, Torii C, Kosaki K, Kiyono T, et al. Characteristic phenotype of immortalized periodontal cells isolated from a Marfan syndrome type I patient. *Cell Tissue Res*. 2008;331(2):461-72.
30. 特定非営利活動法人 日本歯周病学会：歯周治療の指針 2015、医歯薬出版、東京、2016

31. Lindsay ME, and Dietz HC. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature*. 2011;473(7347):308-16.
32. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep*. 2014;4:4828.
33. Suda N, Moriyama K, and Ganburged G. Effect of angiotensin II receptor blocker on experimental periodontitis in a mouse model of Marfan syndrome. *Infect Immun*. 2013;81(1):182-8.
34. Papathanasiou E, Kantarci A, Konstantinidis A, Gao H, and Van Dyke TE. SOCS-3 Regulates Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis. *J Dent Res*. 2016;95(9):1018-25.
35. Naiki Y, Michelsen KS, Zhang W, Chen S, Doherty TM, and Arditi M. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5491-5.
36. Hillebrand M, Millot N, Sheikhzadeh S, Rybczynski M, Gerth S, Kolbel T, et al. Total serum transforming growth factor-beta1 is elevated in the entire spectrum of genetic aortic syndromes. *Clin Cardiol*. 2014;37(11):672-9.
37. Oida T, and Weiner HL. Depletion of TGF-beta from fetal bovine serum. *J Immunol Methods*. 2010;362(1-2):195-8.
38. Rojas A, Zhang P, Wang Y, Foo WC, Munoz NM, Xiao L, et al. A positive TGF-beta/c-KIT feedback loop drives tumor progression in advanced primary liver cancer. *Neoplasia*. 2016;18(6):371-86.
39. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(5):255-65.
40. Borton AJ, Frederick JP, Datto MB, Wang XF, and Weinstein RS. The loss of Smad3 results in a lower rate of bone formation and osteopenia through dysregulation of osteoblast differentiation and apoptosis. *J Bone Miner Res*. 2001;16(10):1754-64.
41. Dewan AK, Tomlinson RE, Mitchell S, Goh BC, Yung RM, Kumar S, et al. Dysregulated TGF-beta signaling alters bone microstructure in a mouse model of Loeys-Dietz syndrome. *J Orthop Res*. 2015;33(10):1447-54.