



Title	酸化ストレスによるマクロファージ機能変化が歯周病の進行に与える影響
Author(s)	山口, 継乃
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/87973">https://doi.org/10.18910/87973</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

# 酸化ストレスによるマクロファージ機能変化が 歯周病の進行に与える影響

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻（歯周病分子病態学）

山口 継乃

（指導教官：村上 伸也 教授）



## 緒言

歯周病はデンタルプラークにより惹起された宿主の免疫・炎症応答が慢性化することで、歯周組織が破壊されていく慢性炎症性疾患である。発症・進行に関わる細菌側の因子としては、細菌が分泌するプロテアーゼやグラム陰性細菌の細胞壁成分であるエンドトキシン (LPS) などが知られる。一方、宿主の炎症反応は、細菌感染部位への好中球の遊走から始まり、マクロファージ・樹状細胞などの自然免疫から、T 細胞、B 細胞が主要な担当細胞である獲得免疫へと推移する。本来、そのように惹起された炎症反応は抗原である病原微生物の除去をもって消散、組織修復へと移行することになるが、生体外にあたる歯周ポケット内にデンタルプラークが長く残存することで、病的刺激が慢性化すると、プロテアーゼなどの酵素類や組織破壊に関与する炎症メディエーターの持続的かつ過剰な産生、それに続く破骨細胞の活性化などにより、歯周組織が破壊されることになる。免疫担当細胞の一つであるマクロファージは、炎症歯周組織において歯肉の炎症性サイトカイン産生を担う主要な細胞であることに加え、抗炎症性サイトカインや細胞外基質の産生による組織修復機能も有し、歯周病においては炎症の慢性化（長期化）と消散の分岐点で作用する細胞の一つとして注目を集めている<sup>1,2</sup>。

通常 LPS は、マクロファージをはじめ多くの細胞の細胞膜に存在する受容体の TLR4 (Toll like receptor 4) で認識され、MyD88 または TRIF 経路を介して各種炎症メディエーターなどの発現を亢進することで、炎症を惹起する。一方、興味深いことにマクロファージなどの myeloid 系免疫担当細胞には、継続的な LPS 刺激に対して、炎症を抑制し組織修復や抗炎症性サイトカイン産生を促進することで組織を保護する endotoxin tolerance (脱感作) といういわばネガティブフィードバック機構が存在する<sup>3</sup>。歯周炎に罹患した歯肉では健常者と比較して TLR4 の発現が亢進していることや、脱感作に対して抑制的に働く GM-CSF が歯肉溝浸出液(GCF)中で増加していることなどから、脱感作が抑制されていることが示唆されている<sup>4</sup>。さらに *in vitro* 解析から *Escherichia coli* (以下 *E.c* と略す) などのグラム陰性菌 LPS と比較して、歯周病原細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) 由来 LPS (以下、*P.g*LPS と略す) でマクロファージに誘導される脱感作では一部サイトカインの発現が抑制されず維持される結果、炎症が長期化する可能性が報告されている<sup>5</sup>。そのため、歯周病における歯肉での炎症の慢性化にマクロファージの脱感作抑制が関与する可能性が考えられるが、十分な検討がなされておらず未解明な点が多い。

脱感作の分子機序は未解明な点も多いが、LPS 刺激に伴い起こる、大きく以下の 4 つの

機序が知られている<sup>6</sup>。

①TLR シグナル経路の変化：TLR タンパク自体の発現低下、MyD88 経路中でシグナル伝達を担うキナーゼ IRAK1 の活性低下、MyD88 経路中の転写制御因子 NF- $\kappa$ B の活性変化など TLR シグナル経路中の因子の変化

②TLR シグナル抑制因子の発現亢進：不完全長 MyD88 で MyD88 のアンタゴニストとして働く MyD88sh、MyD88 経路中でシグナル伝達をする IRAK1/4 複合体の機能を阻害する IRAK-M、抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現を促進する転写制御因子 Twist2 などの TLR シグナル抑制因子の発現亢進

③エピジェネティクス制御：ヒストンデアセチラーゼによる染色体上の部位特異的なヒストン構造変化による遺伝子発現制御<sup>7</sup>

④miRNA 発現亢進：MyD88 経路中の IRAK1、TRAF6、NF- $\kappa$ B 構成因子の転写後制御を行う miR146, miR155, miR9 などの発現亢進

上記 4 機構の中でもとりわけ TLR シグナル抑制因子の発現に関しては、*P.g* LPS と *E.c* 由来の LPS（以下 *E.c* LPS と略す）では IRAK-M の発現誘導が異なるなど<sup>8</sup>、*P.g* LPS 特異的な脱感作誘導の機序である可能性が高く、歯周病の病態形成に深く関与していると考えられる。

一方、宿主応答に関与する外的因子の一つとして酸化ストレスがある。酸化ストレスは加齢に伴い全身で増加し、心疾患や腎疾患といった加齢性疾患のリスク因子となることが知られている<sup>9</sup>。歯周病においては加齢、喫煙、全身疾患、栄養状態など多くのリスク因子が報告されている<sup>10</sup>が、酸化ストレスはその中でも加齢、喫煙や一部の全身疾患など多くのリスク因子に共通する機構であり、歯肉結合組織の破壊や破骨細胞形成の促進などに関与することから大きな注目を集めている<sup>11</sup>。興味深いことにマクロファージの脱感作は酸化ストレスと同様に加齢に伴って低下することがマウスで示唆されているが<sup>12</sup>、脱感作抑制と酸化ストレスの関係性に関する詳細な機序は解明されていない。

生体は酸化ストレスの長期暴露に対してはその影響を減弱させるために適応を行うことなどが知られている<sup>13</sup>。そのため、*in vitro* での短期間の酸化ストレス応答と *in vivo* での同応答では、解析結果に乖離が生じる可能性が考えられ、生体における酸化ストレスの影響解析を行う場合には *in vivo* での検討も極めて重要となる。しかしながら、マウスはヒトと異なり強力な抗酸化剤であるアスコルビン酸を生合成できるため、加齢に伴う血中酸化ストレスの亢進がヒトほど顕著におこらず、本解析に正常マウスを用いることには限界がある。

そこで、酸化ストレスがマクロファージ脱感作を抑制し、歯周病悪化につながる、とい

う仮説の検証を行うこととした。本研究では *in vitro* 解析に加えて、アスコルビン酸生合成ができない遺伝子改変マウス (SMP30KO) <sup>14</sup> を用いて酸化ストレス亢進モデルマウスを構築し、酸化ストレスがマクロファージの脱感作に与える影響、及びマクロファージの脱感作が歯周病の進行に影響を及ぼす可能性を明らかにすることを目的に検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 試薬

アスコルビン酸ナトリウム（富士フィルム和光純薬；大阪、日本）アスコルビン酸リン酸マグネシウム（富士フィルム和光純薬）、N-アセチルシステイン(NAC) (Sigma Aldrich; Saint Louis, USA)、過酸化水素（富士フィルム和光純薬）、EDTA-2Na（同仁化学研究所；熊本、日本）、スクロース（富士フィルム和光純薬）は記載のメーカーより購入し、実験に供した。*P.g*LPS は invivogen 社 (San Diego, USA) 製 *tlrl-pglps* を購入した。*tlrl-pglps* は酵素などによる精製を行っていない標準純度品であり、リポプロテインの残存などもあるため TLR4 だけでなく TLR2 のリガンドとしても作用することが販売元より報告されている。

### 2. 腹腔マクロファージの単離

マウスはイソフルラン（ファイザー；東京、日本）吸入麻酔下で開腹し、5mlの氷冷 Dulbecco PBS (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA) で2回腹腔を洗浄した。腹腔洗浄液を回収後、遠心（300g 5min 4℃）した後、10% Fetal Bovine Serum (BioWest; Nuaille, France、以下FBSと略す)を含むRPMI1640 (Thermo Fisher Scientific)で細胞培養プレート（スミロン；東京、日本）上で1晩培養した。培養後、浮遊細胞を除去し、接着細胞のみにすることで腹腔マクロファージを得た。なお、本実験におけるすべての動物実験は、ライオン株式会社動物実験委員会の承認（2018-088, 2021-007）を得て行った。腹腔マクロファージは全ての実験において25週令のオスのマウスから採取した。*in vitro*解析にはC57BL6Nマウス（日本クレア；東京、日本）を、酸化ストレス亢進モデルマウスを用いた*ex vivo*解析には以下で記す、コントロールマウス、酸化マウス、NACマウスから、それぞれ同様の方法で腹腔マクロファージを採取した。

### 3. 細胞培養（脱感作アッセイ）

マウス腹腔マクロファージは 2% FBS 添加 RPMI1640（ブランク培地）またはそれに *P.g* LPS を  $1\mu\text{g/ml}$  となるように添加した培地（プライム培地）を用いてマルチウェルプレートで 24 時間培養し、培養上清を除去後、37℃に温めた PBS で 2 回洗浄した後、*P.g* LPS  $1\mu\text{g/ml}$  添加 FBS 無添加 RPMI1640 (LPS 刺激培地) または FBS 無添加 RPMI1640 (LPS(-)培地) を添加して、ELISA 解析用には 24 時間、遺伝子発現解析用には 6 時間培養した。ELISA は 24 時間と 48 時間、RNA 抽出には 6 時間と 12 時間培養で条件検討を

行い、十分なタンパク発現、遺伝子発現を認めた 24 時間、6 時間をそれぞれ選択した。図 1 に記載の通り、*P.g* 刺激を一切行わない群を「無刺激」、ブランク培地で培養した後、上清除去後に *P.g*LPS 刺激を行う群を「単回刺激」、*P.g*LPS 含有培地で培養した後、上清除去後に再度 *P.g*LPS 含有培地で培養する群を「脱感作誘導」とした。細胞培養上清解析用には 96-well プレートを用い、遺伝子発現解析用には 12-well プレートを用いた。ELISA 解析用のサンプルは、培養終了時に、ウェル内で軽く培地をピペッティングし、均一化した後に回収し、遠心により混入した細胞を除去して解析に供した。遺伝子発現解析用サンプルは、培養上清除去のために PBS でウェル及び細胞を一度洗浄し、PBS 溶液を廃棄後に定法に従い細胞溶解液を作製した。

*in vitro* での酸化ストレスの影響解析にはプライム培地、刺激培地、あるいはブランク培地に 50 または 100  $\mu$  M の  $H_2O_2$  を添加した群を作製した。*ex vivo* での脱感作アッセイでは以下で記す、コントロールマウス、酸化マウス、NAC マウスから採取した腹腔マクロファージを用いて上記方法の通りに「無刺激」「単回刺激」「脱感作誘導」の処置を行い解析に供した。

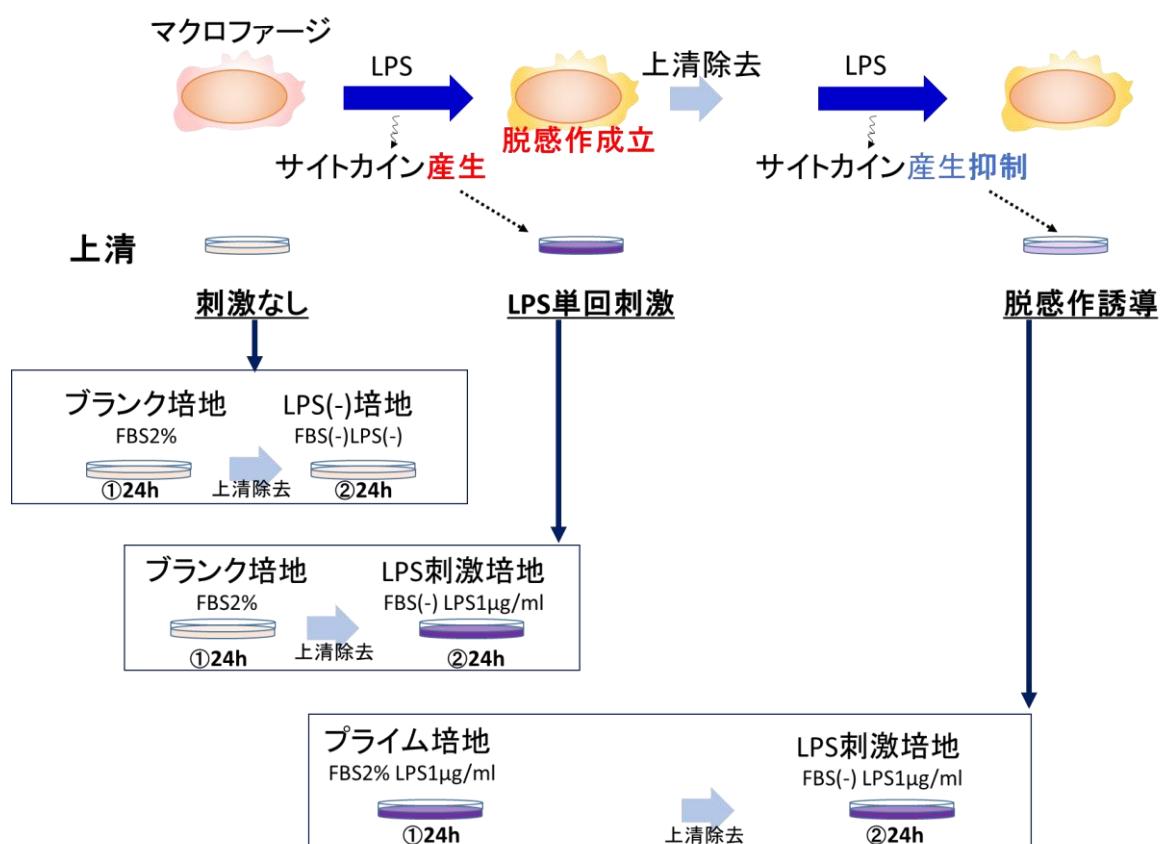


図 1 脱感作アッセイのプロトコール



#### 4. ELISA

細胞培養上清中の TNF- $\alpha$ 、IL-10 の定量は mouse ELISA MAX kit (Biolegend; San Diego, USA) を用いて、プロテインカルボニル量は OxiSelect™ カルボニル化タンパク質 ELISA kit (Cell Biolab; San Diego, USA) を用いて、それぞれキットのプロトコールに準じて行い、プレートリーダー SpectraMax (Molecular Device; San Jose, USA) で解析を行った。

#### 5. 培養細胞からの Total RNA の抽出及び cDNA の作製

培養細胞からの total RNA 抽出には、核酸抽出キット Nucleospin RNA (Macherey-Nagel; Düren, Germany) を用いた。抽出・精製した total RNA を鋳型として、PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ; 滋賀, 日本) を推奨のプロトコールの通り用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

#### 6. Real-time PCR 法による遺伝子発現解析

Real-time PCR 法による解析は、cDNA を鋳型として、表 1 に示す各遺伝子に特異的な Real-time PCR 用プライマーを用いて行った。PCR 反応は KOD SYBR® qPCRMix (Toyobo; 大阪, 日本) を用いて、CFX connect Realtime PCR 解析システム (Bio-rad; Hercules, USA) にて行った。なお、各遺伝子の発現量は、 $\beta$ -Actin (*Actb*) をコントロール遺伝子として同遺伝子の発現量に対する相対量として算出した。

表 1 本研究で使したプライマー一覧

Target gene (mouse)	Forward	Reverse
<i>Actb</i>	5'-ttgttaccaactgggacgac-3'	5'-gctggggtgtgaaggtc-3'
<i>Tnfa</i>	5'-tagccaggaggagaacaga-3'	5'-tcttttctggaggagatgtg-3'
<i>IL6</i>	5'-acaaagccagagtccttcagaga-3'	5'-aggagagcattggaaattggggt-3'
<i>IL1b</i>	5'-tgccaccttttgacagtgtgaga-3'	5'-tggtgatgtgctgtcgaga-3'
<i>Mmp8</i>	5'-accaggccaaggtattggagga-3'	5'-aggcaccaggatcagtggagt-3'
<i>Mmp9</i>	5'-gcctagaccaacttatccaga-3'	5'-gcagaccaagagggttttctt-3'
<i>IL10</i>	5'-gctcttactgactggcatgag-3'	5'-cgagctctaggagcatgtg-3'
<i>Tgfb</i>	5'-ggactctccacgtcaagac-3'	5'-gactggcgagccttagtttg-3'
<i>Irakm</i>	5'-tgtgtggcaacgaaggccaa-3'	5'-tcaaggacgtgggagggtct-3'
<i>MyD88sh</i>	5'-aggaactgggaggcatcacc-3'	5'-tcacattccttgctctgtagata-3'
<i>Socs3</i>	5'-aggccggagatttcgcttcg-3'	5'-gcgggaaacttgctgtgggt-3'
<i>Twist2</i>	5'-cgagcgtctcagctacgcct-3'	5'-ccgcatgcgcctgagatgt-3'
<i>Ho1</i>	5'-cctgagggtcaagcacagggtg-3'	5'-gcctctgacgaagtgcgcc-3'

## 7. 動物モデルの作製

SMP30KO マウスは遺伝子ターゲット法にて創出されたノックアウトマウス<sup>15</sup>であり、本研究では東京都健康長寿医療センター石神昭人先生より供与いただいたオスのマウスを使用した。生後4週で離乳させ、その後4週間は生存にアスコルビン酸補充が必須の為8.52mM アスコルビン酸 Na 水溶液を飲水とした。餌はアスコルビン酸欠乏食である CL-2（日本クレア）を投与して飼育した。

### 条件検討

生後8週から0.107mM, 0.213mM, 8.52mM のアスコルビン酸リン酸マグネシウム (APM) 水溶液またはアスコルビン酸を含まない水を飲水投与し、4週間、10週間、16週間後に解剖し、血中の酸化ストレス並びに骨異常、体重変化を解析した

## 本試験

SMP30KO マウスは 8 週令まで 8.52mM アスコルビン酸 Na 水溶液を飲水とし、アスコルビン酸欠乏食である CL-2（日本クレア）を投与して飼育した。その後コントロール群は 8.52mM のアスコルビン酸リン酸マグネシウム (APM) 水溶液を、酸化群は 0.107mM の APM 水溶液を、NAC 群は 0.107mM APM 水溶液に 2.7g/ L NAC を添加し、pH=7 に調製した水溶液をそれぞれ 16 週間投与し、24 週令の時点で、歯周病誘導処置または腹腔細胞の採取に供した。

なお、野生型の C57BL/6 マウスと 8.52mM APM 水溶液を投与した SMP30KO マウスの体重、血中酸化ストレス、歯周病誘導時の歯周組織には差がないことを事前の予備検討で確認し、条件を設定した。また、内臓組織に関しては Furusawa らによって C57BL/6 マウスと 8.52mM アスコルビン酸水溶液投与の SMP30KO マウスでアスコルビン酸量に差がないことが報告されている<sup>16</sup>。

## 歯周病誘導処置

マウス上顎臼歯に対する絹糸結紮処置は 24 週令の時点でペントバルビタール（ナカライテスク）*i.p.*投与による麻酔下で、上顎両側第 2 臼歯に 5-0 絹糸 (Ethicon; Bridgewater, USA) を結紮し、頬側に結び目を作製した。結紮 7 日処置群は結紮 7 日後にイソフルラン吸入麻酔下で下大静脈からの全採血により安楽死させ解剖を行った。回復 10 日処置のマウスに関しては、結紮 7 日後に再度ペントバルビタール麻酔を行い、結紮糸を除去し、そのまま 10 日間飼育を継続した後に上記の通りに解剖した。無処置マウスに関しては一切の処置を行わずに、25 週令まで飼育し同様に解剖した。いずれの群も、解剖の際には、全採血後に 1%ヘパリン添加 PBS で還流を行い、上顎片方を組織サンプル用に、反対側は RNA 解析用に口蓋及び頬側付着歯肉をはく離しサンプルを確保した。

## **8. $\mu$ -CT 解析**

マウスは各タイムポイントで CT に付属の吸入器 ISOREX I-200（新鋭工業；埼玉、日本）を用いたイソフルラン吸入麻酔下で、生体用 X 線イメージング装置 CosmoScan GX（Rigaku；東京、日本）を用いて断層画像を撮影し、画像の再構成、三次元構築を行った。さらに、骨吸収を定量的に評価するために、三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；東京、日本）を用いて、口蓋側歯槽骨体積の解析を行った。

## 9. 組織標本の作製および組織形態学的評価

4%マスキドホルム（日本ターナー；大阪、日本）にて 1 晩浸漬固定後、組織ブロックを 10% EDTA 溶液（pH=7.2）に 2 週間 4℃で浸漬することで脱灰処理を行った後、Xu らの方法に従い<sup>17</sup>、30%スクロース溶液に置換した後、凍結切片作製用に OCT コンパウンド（サクラファインテック；東京、日本）で包埋した。

組織ブロックは歯列方向に遠心から薄切し、第 2 臼歯部に達してから、7  $\mu$  m 厚の組織標本の作製を行った。その後、酒石酸耐性アルカリホスファターゼ染色キット（商品名：酸性ホスファターゼ、白血球（TRAP）Kit(Sigma Aldrich)）を用いて推奨プロトコールに従って、組織形態学的評価を行った。歯槽骨頂を中心とする骨及び結合組織部分に 300  $\mu$  m x 300  $\mu$  m の Region of Interest (ROI)を作製し、ROI 中の TRAP 陽性細胞数を計測した。

## 10. 歯肉からの Total RNA の抽出及び cDNA の作製

歯肉からの total RNA 抽出には、上顎の左右いずれかの第 1 臼歯から第 3 臼歯部の口蓋側歯肉及び、頬側付着歯肉を採取し、RNAlater (Thermo Fisher Scientific)中で 1 晩保存した後、核酸抽出キット NucleospinRNA (Macherey- Nagel; Düren, Germany)を用いて total RNA 作製、PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ)を用いた逆転写反応を行い、cDNA を作製した。両キットはいずれも推奨プロトコールに従って使用した。

## 11. 統計解析

実験データは全て平均値±標準偏差で示した。有意差検定は、図表説明に記載の通り ANOVA *post hoc* Tukey 検定、Tukey-Kramer検定、Steel Dwass検定またはDunnet検定を用いて行い、有意水準を5 %に設定し、*p*値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

## 結果

### 酸化ストレスによる脱感作変化の解析

酸化ストレスがマクロファージの脱感作機能に影響を与えるか否かを解析するため、*in vitro* でのマクロファージ脱感作アッセイに  $H_2O_2$  が与える影響を解析した。マクロファージに対して LPS 刺激を行った単回刺激処置では炎症性サイトカインである  $TNF-\alpha$  の産生が有意に亢進するが(Tukey;  $p<0.01$ )、2 度の LPS 刺激、すなわち長期暴露を受けた脱感作誘導処置では単回刺激と比較して有意な  $TNF-\alpha$  産生の低下(Tukey;  $p<0.05$ )に加え(図 2A)、抗炎症サイトカインである IL-10 産生の有意な亢進(Tukey;  $p<0.05$ )を認め(図 2B)、本実験系での脱感作誘導が確認された。さらに、 $H_2O_2$  は濃度依存的に脱感作誘導処置時の  $TNF-\alpha$  の産生を増加させ、IL-10 の産生を抑制しており、*P.g* LPS に対するマクロファージの脱感作を抑制することが示された。

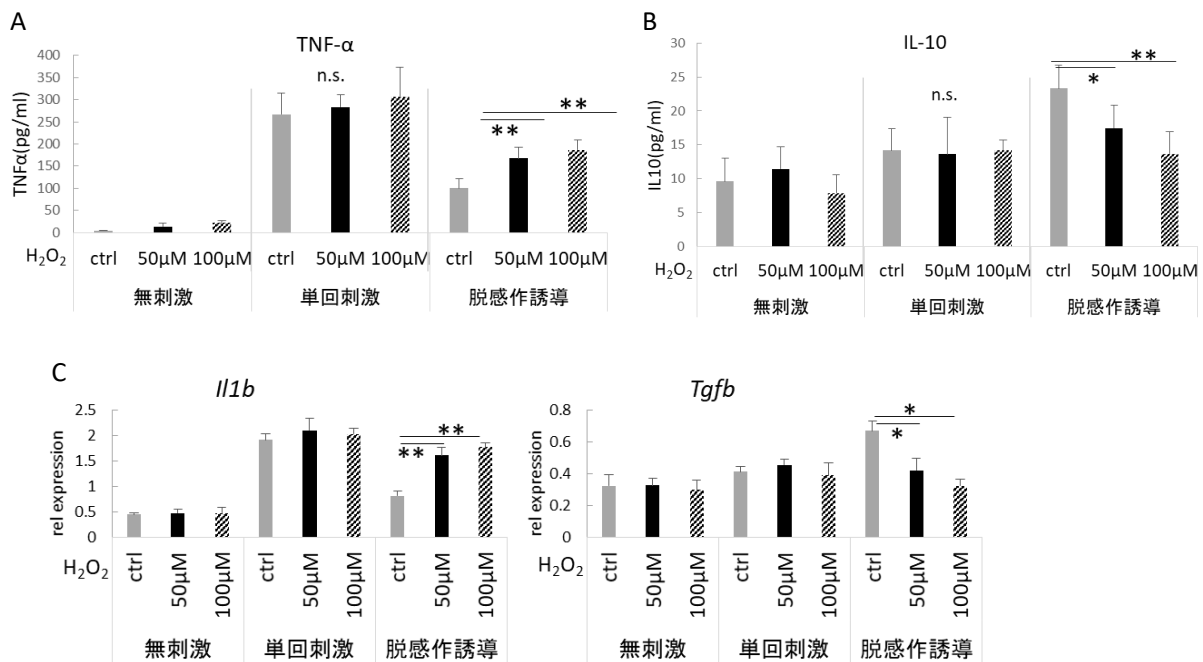


図2 酸化ストレスによるマクロファージ脱感作機能の変化

A, B. 腹腔マクロファージ脱感作アッセイ（無刺激/ 単回刺激/ 脱感作誘導培養時）の培養上清中における  $TNF-\alpha$  濃度(A)、IL-10 濃度(B)

C. 腹腔マクロファージ脱感作アッセイでの *Il1b*, *Tgfb* 遺伝子発現変化

ctrl は  $H_2O_2$  添加なし、50  $\mu$  M, 100  $\mu$  M は  $H_2O_2$  濃度を示す。

以上の実験はすべて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、それぞれ平均値±標準偏差で示す。

Dunnet test vs.同処置 ctrl 群, \*\*;  $p<0.01$ , \*;  $p<0.05$ , n.s.; Not significant

### 酸化ストレスによる TLR シグナル抑制因子発現の变化解析

酸化ストレスによるマクロファージ脱感作抑制の機序を解明する為に、脱感作機能発現の一つの機序である TLR シグナル抑制因子(図 3A)の遺伝子発現解析を行った。その結果、無刺激の場合と比較して、TLR シグナル伝達を抑制する *Irakm*, *Myd88sh*, *Socs3*, *Twist2* の発現が、LPS 刺激によって亢進しており、脱感作誘導機序の一端を TLR シグナル抑制因子の発現亢進が担っていることが本実験系においても示された。また  $H_2O_2$  は、濃度依存的に単回刺激時の TLR シグナル抑制因子の発現を抑制しており(図 3B)、酸化ストレスは TLR シグナル抑制因子の発現を低下させることで脱感作を抑制することが示唆された。

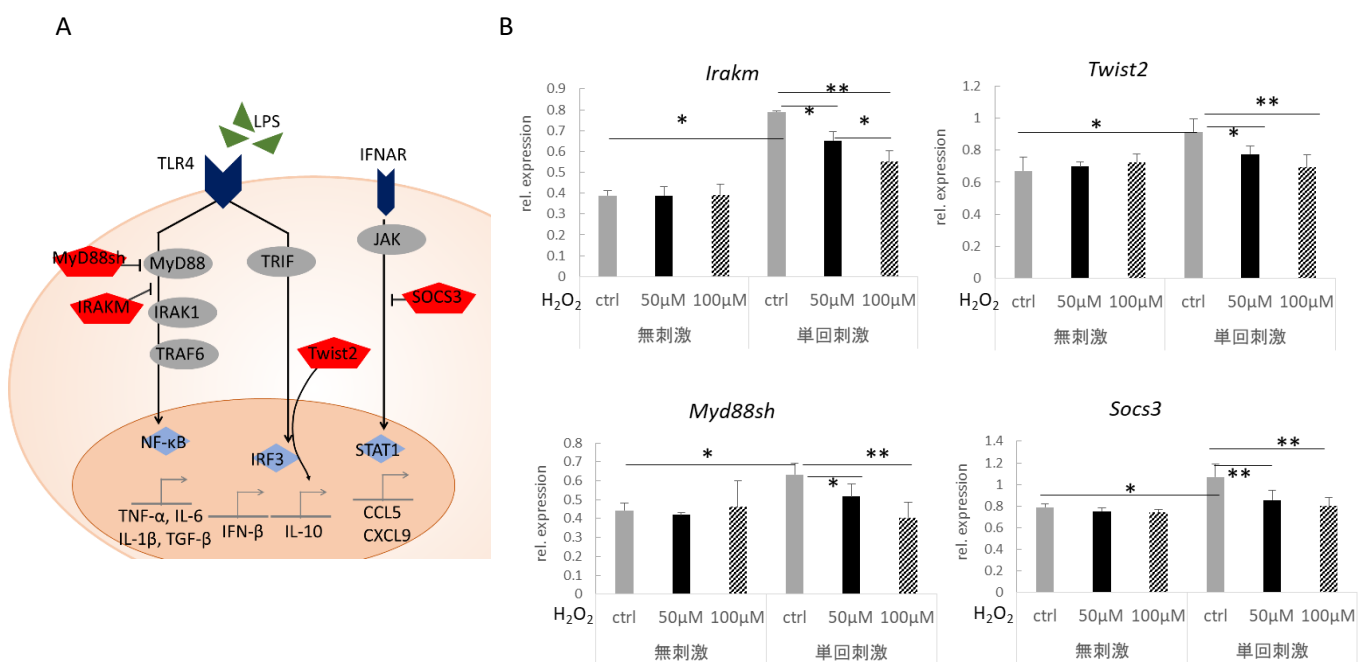


図 3 酸化ストレスによる TLR4 シグナル抑制因子の発現制御

#### A. TLR シグナル中の抑制因子

灰色楕円：TLR シグナル経路中の因子、青菱形：TLR シグナル経路中の転写制御因子、赤五角形：TLR シグナル抑制因子

#### B. 腹腔マクロファージの無刺激/ 単回刺激時の TLR シグナル抑制因子遺伝子発現と $H_2O_2$ 添加の影響

ctrl は  $H_2O_2$  添加なし、50  $\mu$  M, 100  $\mu$  M は  $H_2O_2$  濃度を示す。

以上の実験はすべて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。

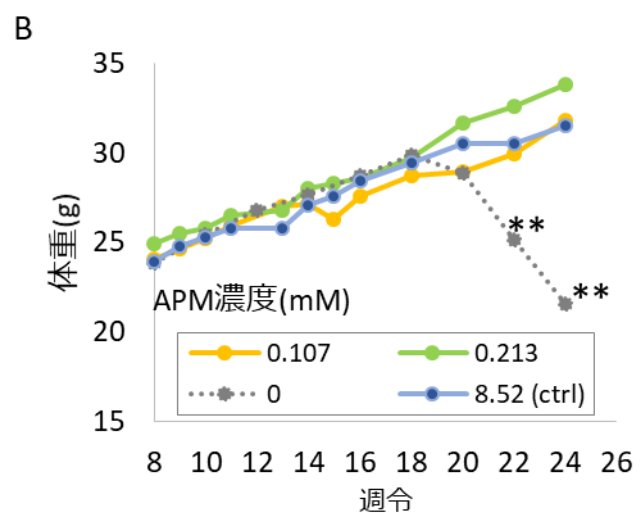
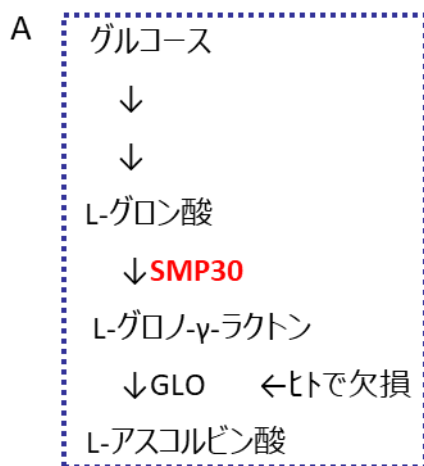
解析結果は、それぞれ平均値±標準偏差で示す。

ANOVA *post hoc* Tukey test \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$

### 酸化ストレス亢進モデルマウスの構築

アスコルビン酸生合成経路中の酵素 SMP30 の欠損により(図 4A)、ヒトと同様にアスコルビン酸生合成ができない SMP30KO マウスを使用し、壊血病を発症することなく酸化ストレスの亢進のみを認めるマウスモデル構築に向けて条件検討を行った。0.107mM, 0.213mM の APM を 4W, 10W, 16W いずれの期間飲水投与したマウスにおいても壊血病の発症基準である骨の異常、歩行異常、体重の低下、歯肉及び内臓からの出血を認めなかった(図 4B)。一方、血中の酸化ストレス指標である protein carbonyl 量は 0.107mM APM の 16W 投与でのみ、野生型と同等の酸化ストレス状態である 8.52mM APM 投与に対して有意な増加を認めたことから(図 4C)、以後の検討には 0.107mM APM 16W 投与を酸化マウスとして用いた。

さらに 0.107mM APM 16W 投与に対して酸化ストレスを健常と同等まで低減するモデルを作製するために 0.107mM APM+ 2.7g/L NAC を 16 週間投与した NAC マウス、野生型と同等の 8.52mM APM 16W 投与のコントロール(ctrl)を作製した。図 4D に示すように酸化・NAC・コントロールマウスはいずれも体重に有意な差はなかった。一方で、血中酸化ストレスは酸化マウスでのみ有意に亢進していた(図 4E)。また、酸化ストレス応答のグローバルレギュレーターであるヘムオキシゲナーゼ(*Ho1*)遺伝子の歯肉での発現は酸化マウスでのみ有意に高かった(図 4F)。



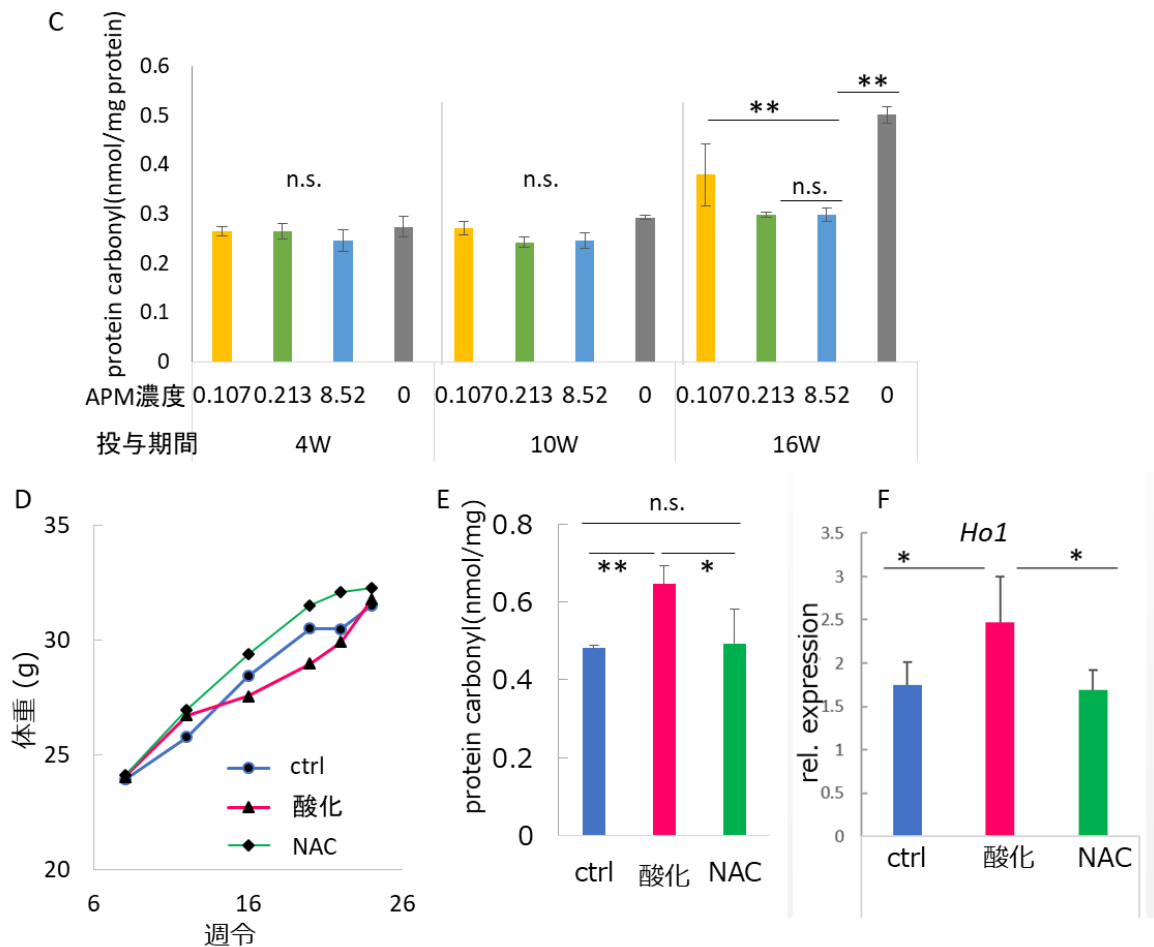


図4 酸化マウスおよびNACマウスの条件設定

A. アスコルビン酸生合成経路における SMP30 の機能

B. アスコルビン酸濃度・週令と体重変化

横軸は各濃度の APM 溶液の投与期間を示す. Dunnet test vs. 同週令 8.52mM 投与

C. アスコルビン酸濃度・投与期間と血中カルボニルタンパク濃度

横軸は投与した APM 濃度と投与期間を示す. Dunnet test vs. 同投与期間 8.52mM 投与

D. 各モデルマウスの体重変化

横軸は週令を示す. 全ての測定時点で有意差なし(ANOVA)

E. 各モデルマウス血中カルボニルタンパク濃度

n=4~8 Steel Dwass test

F. 各モデルマウスの歯肉における *Ho1* 遺伝子発現

縦軸は  $\beta$ -actin 遺伝子の発現量で補正した相対発現量. n=4 Steel Dwass test

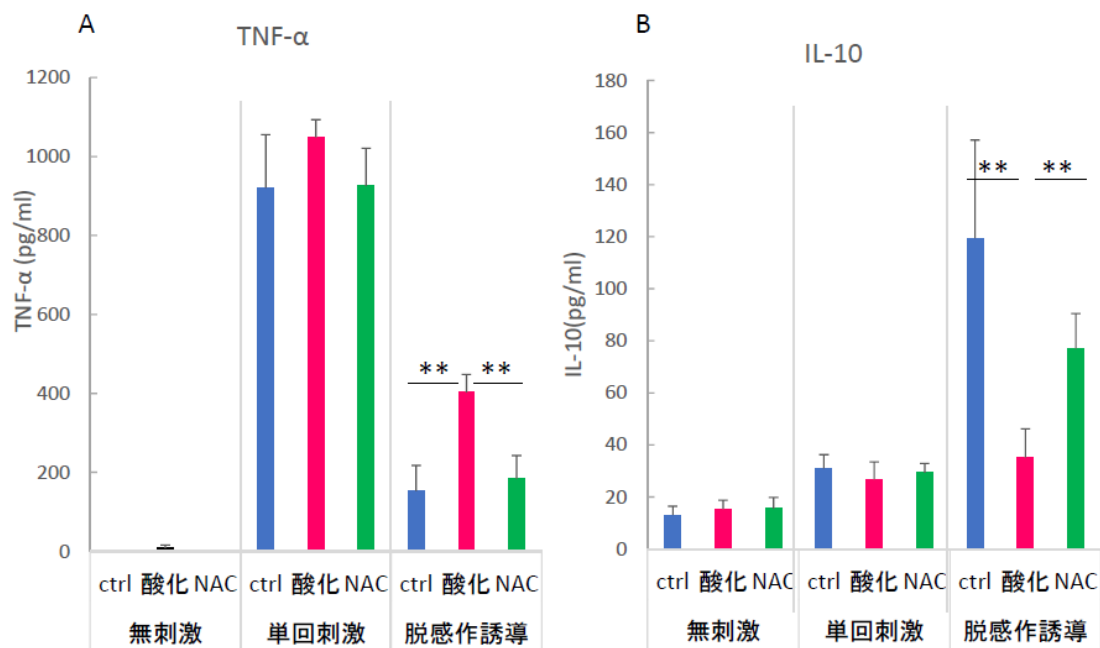
解析結果は、それぞれ記載の検体数の平均値±標準偏差で示す。

全て\*; $p<0.05$ , \*\*; $p<0.01$ , n.s. Not significant



## 酸化ストレス亢進モデルマウスにおけるマクロファージ脱感作機能の解析

*in vivo* で長期間酸化ストレス暴露を受けたマクロファージの脱感作変化を解明するため酸化マウスの腹腔マクロファージを用いた *ex vivo* 解析を、「材料および方法」の脱感作アッセイの方法の通りに行った。ctrl マウス、酸化マウス、および NAC マウス由来全ての腹腔マクロファージにおいて単回刺激と比較して、脱感作誘導処置では  $\text{TNF-}\alpha$  の産生が低下していた。一方、脱感作誘導処置の中で比較すると酸化マウスでは有意に  $\text{TNF-}\alpha$  の産生が亢進していた(Tukey;  $p<0.01$ )(図 5A)。さらに、IL-10 の産生に関しては、ctrl マウス、NAC マウスのマクロファージでは脱感作誘導処置によって産生が有意に増加した(Tukey;  $p<0.01$ )。しかしながら、酸化マウスでは IL-10 産生は増加せず、脱感作誘導処置の中で比較すると、酸化マウスは他の 2 群と比較して有意に IL-10 の産生が低下していた(図 5B)。その機序の一端を明らかにするために、同じ *ex vivo* 脱感作アッセイでの TLR シグナル抑制因遺伝子発現解析を行った。図 5C に示すように、酸化マウスでは他の 2 群と比較して *Myd88sh*, *Irakm*, *Twist2* の遺伝子発現が有意に低下していた。



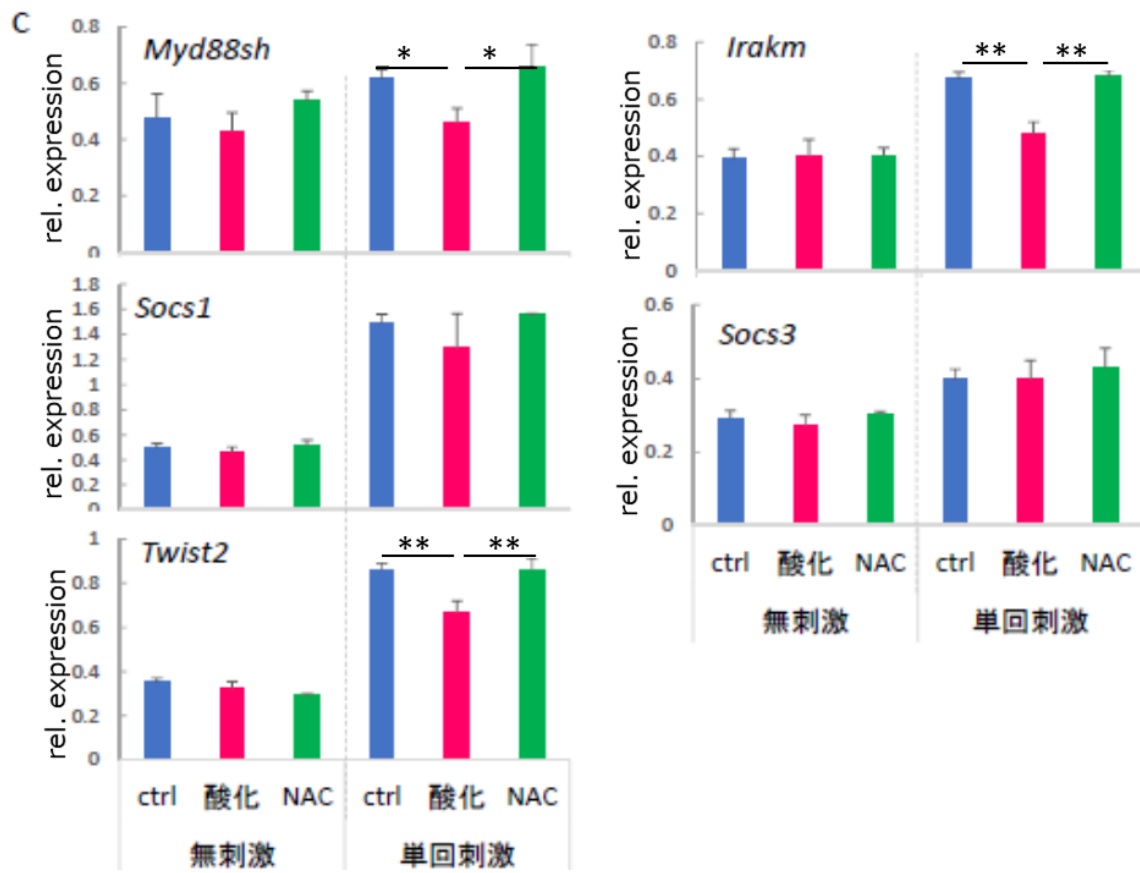


図5 酸化マウス腹腔マクロファージの脱感作機能

A, B. 各モデルマウス腹腔マクロファージの *ex vivo* 脱感作アッセイでの TNF- $\alpha$  (A), IL-10(B) 産生量 n=6~7 同処置群間 Steel Dwass test

C. 各モデルマウス由来腹腔マクロファージにおける TLR シグナル抑制因子遺伝子の発現量 n=3 同処置群間 ANOVA *post hoc* Tukey test

解析結果は、それぞれ記載の検体数の平均値±標準偏差で示す。

\*\*;  $p < 0.01$ , \*;  $p < 0.05$ , n.s. Not significant

### 酸化ストレス亢進モデルマウスにおける歯周病症状の解析

マクロファージの脱感作抑制が起きている酸化マウスでの歯周病症状変化を明らかにするために、ctrl, 酸化、および NAC マウスに「材料および方法」に記した方法に従い歯周病を誘導し、それぞれの歯周組織を解析した。第1臼歯遠心根から第3臼歯部の口蓋側歯槽骨量を定量した結果、絹糸結紮なし群では上記の3種のモデルマウス間に有意な差はなかったが、結紮7日後、回復10日後ともに酸化マウス歯槽骨量が ctrl と比較して有意に低く、NAC マウスの歯槽骨量は有意に酸化マウスの歯槽骨量よりも高かった(図 6A)。

TRAP 染色の結果を図 6B に、ROI あたりの TRAP 陽性細胞数を図 6C に示す。結紮 7 日の時点では TRAP 陽性細胞数に 3 種のモデルマウス間の差は見られなかったが、回復 10 日においては酸化マウスが他の 2 群より有意に同細胞数が多かった。

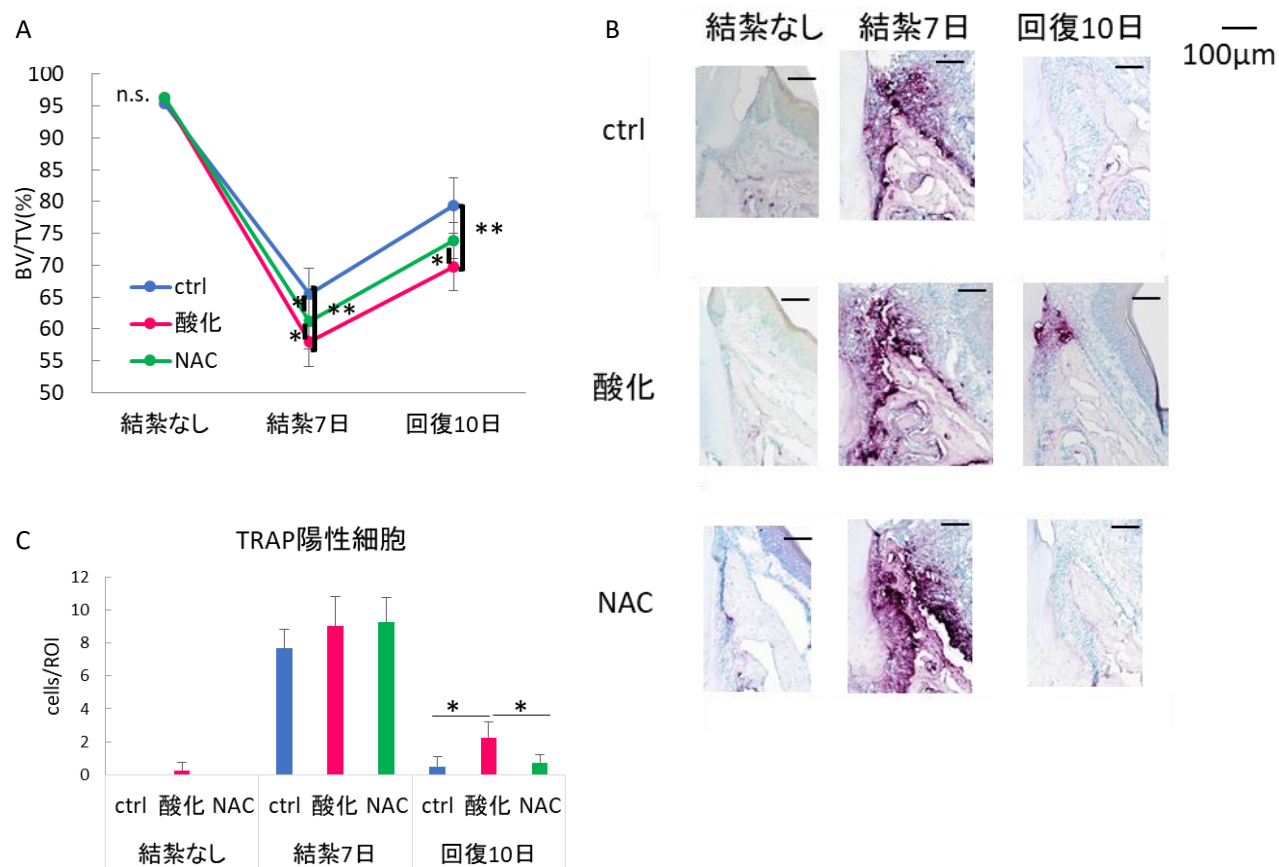


図 6 酸化マウスにおける歯周病症状の変化

A. 各モデルマウス歯周病誘導時における第 1 臼歯遠心根から第 3 臼歯部口蓋側歯槽骨量変化

BV/TV(Bone volume/ Total Volume); ROI 中の骨が占める体積の割合(%)

n= 4~8 同処置群間 ANOVA *post hoc* Tukey test

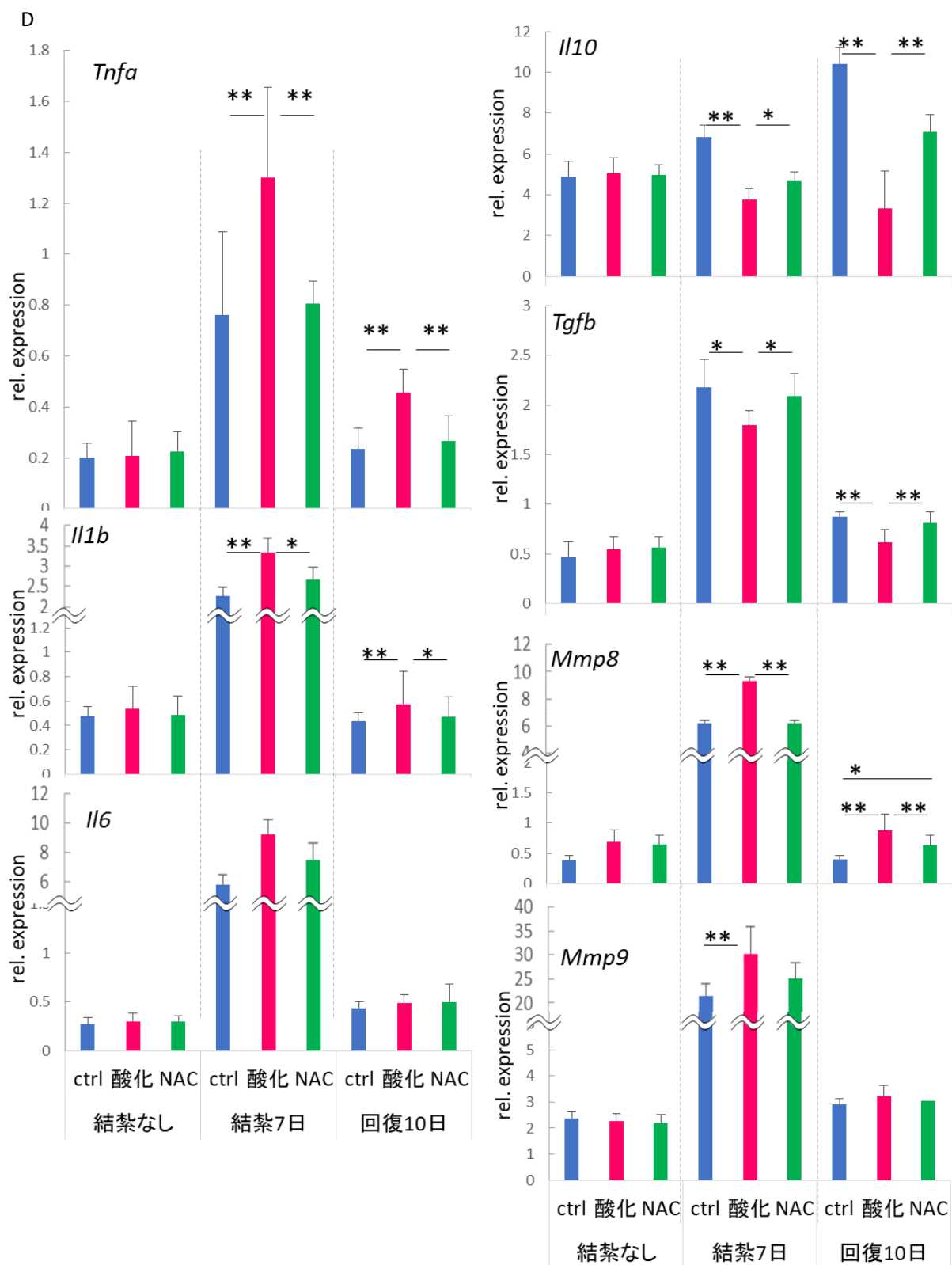
B, C. 各モデルマウスの歯周組織における TRAP 染色像(B)と、ROI あたりの TRAP 陽性細胞数(C) n=3~4 同処置群間 Tukey-Kramer test

D. 各モデルマウスの上顎歯肉における炎症関連遺伝子発現量

n=4~8 同処置群間 Tukey-Kramer test

解析結果は、それぞれ記載の検体数の平均値±標準偏差で示す。 \*\*;  $p<0.01$ , \*;  $p<0.05$ , n.s.

Not significant



歯周病誘導に伴う歯肉の炎症状態を上顎歯肉における各種遺伝子発現にて解析した(図6D)。いずれの遺伝子も結紮なしでは3種のモデルマウス間の差はなかった。しかし、酸

化マウスでは結紮 7 日に炎症性サイトカインの *Tnfa*, *Il1b* やプロテアーゼの *Mmp8*, *Mmp9* の発現が ctrl と比較して有意に増加 していた。*Tnfa*, *Il1b*, *Mmp8* に関しては回復 10 日 においても酸化マウスで有意に発現が亢進していた。一方、*Il10*, *Tgfb* は結紮 7 日と回復 10 日で酸化マウスにおいて ctrl よりも有意に発現が抑制されていた。酸化マウスで発現変動していた遺伝子はいずれも NAC マウスと酸化マウス間でも有意な差があり、回復 10 日後の *Mmp8* では NAC マウスと ctrl の間にも有意差を認めたが、*Mmp8* 以外の遺伝子・解析時点では両者の間には有意な差はなかった。

#### 酸化マウスの歯肉における TLR シグナル抑制因子の発現解析

歯周病誘導に伴い炎症の増悪と長期化を認めた酸化マウスの歯肉を用いて、脱感作の制御を行う TLR シグナル抑制因子の発現を解析した。検討したすべてのモデルマウス歯肉で、結紮なしと比較して結紮 7 日では *Myd88sh*, *Irakm*, *Socs3* の発現が亢進していた。一方、酸化マウスは他の 2 群のマウスと比較して、結紮 7 日において *Myd88sh*, *Irakm* の発現が、回復 10 日においては *Myd88sh*, *Irakm*, *Twist2* の発現がそれぞれ歯肉において抑制されていた。

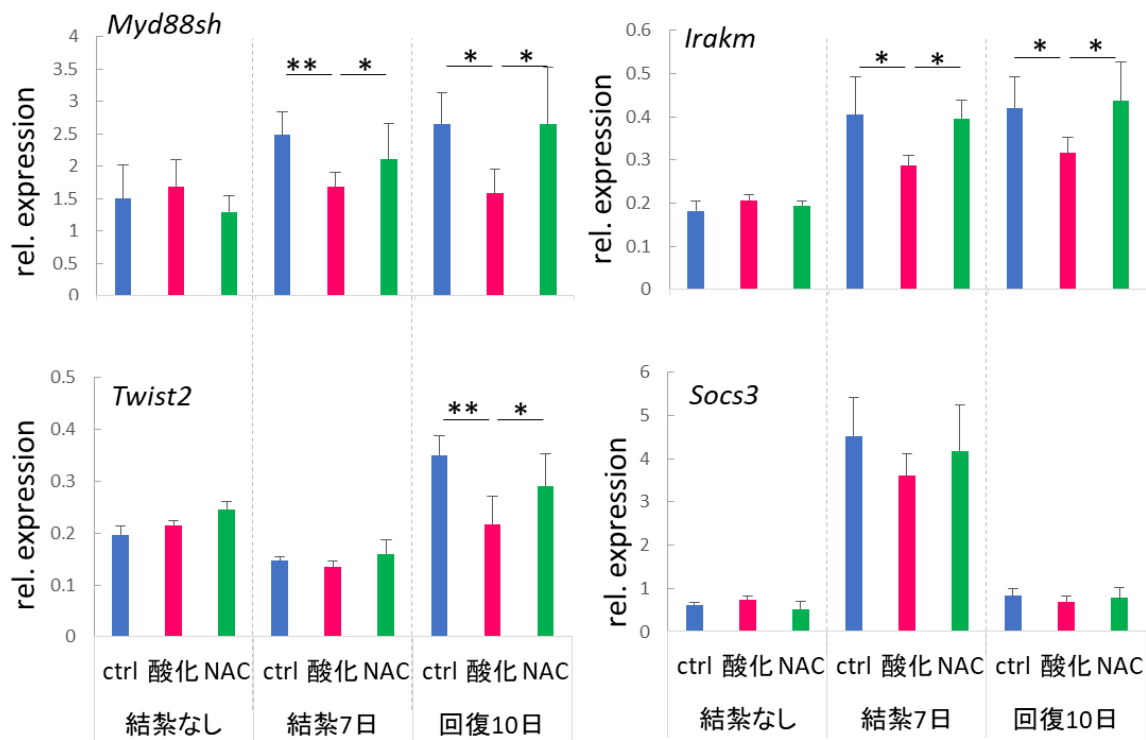


図7 各マウスモデルの歯肉における TLR シグナル抑制因子発現

各マウスモデルの上顎歯肉における TLR シグナル抑制因子の遺伝子発現量

同処置群間 Tukey Kramer test

解析結果は、n=4~8 の平均値±標準偏差で示す。 \*\*;  $p<0.01$ , \*;  $p<0.05$

## 考察

本研究では酸化ストレスがマクロファージの脱感作機能に与える影響を検討するために、*in vitro* 及び *in vivo* で酸化ストレスがマクロファージの *P.g* LPS に対する脱感作に与える影響を検討した。さらに、脱感作機能変化が歯周病の発症進行に与える影響をマウスモデルを用いて解析した。その結果、酸化ストレスによるマクロファージ脱感作機能低下、および、腹腔マクロファージの脱感作機能が低下している酸化マウスにおける歯周病症状の悪化と歯肉での脱感作抑制を示唆する結果を得た。

今回の結果より  $H_2O_2$  は濃度依存的にマクロファージの *P.g* LPS に対する脱感作を抑制することが明らかになった (図.2A, 2B)。一方、 $H_2O_2$  は LPS 単回刺激処置のサイトカイン産生には影響を与えなかったことから、脱感作誘導群で見られた酸化ストレスの影響は、 $H_2O_2$  による単純な酸化ストレスによる起炎ではなく、脱感作機能に対する作用であることが示唆された。マクロファージの研究では腹腔マクロファージを使用することが多い。その際、収量を上げるためにチオグリコール刺激を行うことがあるが、刺激により得られたマクロファージは炎症浸潤性であり、生理的な常在マクロファージとはサイトカイン産生や食食などの性質が異なることが報告されている<sup>18</sup>。そのため本研究では生理的なマクロファージの機能を解析するためマウス腹腔から無刺激で採取した常在マクロファージを使用した。腹腔細胞は 1 晩培養し、接着細胞のみにすることで約 90%がマクロファージのマーカーである F4/80 陽性細胞になることを確認している。脱感作アッセイは Sun らの方法に従い、LPS で刺激し脱感作を誘導した後に洗浄・培地除去し、再度 LPS 刺激を行った際のサイトカイン産生で解析した<sup>12</sup>。脱感作に関しては一定時間の TLR 刺激によって誘導される、定常状態と比較して TLR 刺激に対する応答性が減弱した状態と定義される<sup>6</sup>。本研究のアッセイでは、既報に倣い、「無刺激」は定常状態のマクロファージを、「単回刺激」は TLR 刺激によって脱感作が誘導された状態のマクロファージを評価するために設定した。また、定常状態と脱感作状態の TLR 刺激に対するサイトカイン産生などの応答を比較するために「単回刺激」の培養上清、及び「脱感作誘導」の培養上清、さらにコントロールとして TLR 刺激のない「無刺激」の培養上清を用いて解析を行った。

歯周病病原因子の一つとされる *P.g* は *E.c* 等他のグラム陰性細菌の LPS と比較して脱感作誘導されるサイトカイン種が限定されることなど、脱感作誘導効果に差があることが報告されていたことから<sup>5, 19, 20</sup>、歯周病の病態との関連解析を目的とする本研究では *P.g* LPS を解析に用いた。使用した *P.g* LPS の濃度は Sun らの方法を参考に設定した。また、 $H_2O_2$  の濃度は Nakao らの方法を参考に 24 時間処置した際にも腹腔マクロファージに対

して細胞傷害を認めない濃度を設定したものである<sup>21</sup>。

酸化ストレスは歯周病の重大なリスク因子の一つであり、両者の関連については多くの報告がある。具体的には歯周炎患者の唾液や GCF では健常者と比較して有意に酸化ストレスが亢進していることや<sup>22, 23</sup>、歯周炎患者末梢血由来の好中球は健常者由来のものと比較して細菌刺激時の ROS の産生が亢進していること<sup>24</sup>などが報告されている。また酸化ストレスが歯周組織に与える影響としては、歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞などに対する炎症性サイトカイン産生誘導、線維芽細胞の増殖や遊走の抑制<sup>25</sup>、骨細胞、骨芽細胞のアポトーシス誘導や破骨細胞分化促進<sup>26, 27</sup>などが知られているが、歯周病における炎症慢性化抑制機序の一つと考えられるマクロファージの脱感作機能との関連に関してはこれまで報告がなかった。

今回の *in vitro* でのマクロファージ脱感作系では TLR シグナル抑制因子の *Myd88sh*, *Irakm*, *Twist2*, *Socs3* の発現亢進が関与していることが明らかとなった (図 3B)。さらにそれらの全てが H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により発現抑制されていたことから、酸化ストレスによる脱感作の抑制機序の一端は酸化ストレスによる TLR シグナル抑制因子の発現低下であることが示唆された。本研究では報告されている 4 つのマクロファージ脱感作抑制機序、

①TLR シグナル抑制因子の発現 ②TLR シグナル因子の変化 ③エピジェネティクスによる制御 ④miRNA 発現による TLR シグナル因子転写後制御、のうち、*P.g* LPS 特異的な脱感作誘導の機序である可能性がある TLR シグナル抑制因子の発現に着目して解析を行った。今回解析した TLR シグナル抑制因子発現制御と同様に、②～④の 3 つの脱感作誘導機序についても酸化ストレスによる影響を検討した報告はない。しかしながら、これら 3 つの機序も酸化ストレスによる影響を受ける可能性は考えられるため、酸化ストレスによる脱感作抑制機序全貌の解明に向けては、さらなる検討が必要であると考え。特に②TLR シグナル因子の変化に関しては歯周病患者由来の歯肉で TLR の発現が亢進しているとの報告もある<sup>4, 28, 29</sup>。従って、同上変化も歯周病の発症・進行に関与している可能性があり、TLR 自体の発現やその他 TLR シグナル因子の変化に対する酸化ストレスの影響にも関心がもたれる。

本研究で用いた SMP30KO マウスは生存に関わるため、生後 8 週間は飲水でのアスコルビン酸補充が必須であることが報告されていることから<sup>30</sup>、本研究もそれに倣った。本マウスは生後 8 週後以降にアスコルビン酸(AsA)を全く含まない水を投与すると酸化ストレスの亢進とともに壊血病を発症するが、8.52mM AsA を飲水投与すると酸化ストレスの亢進、壊血病発症もなく野生型マウスと同じ表現型を示すことが報告されている<sup>31</sup>。そのため、投与するアスコルビン酸の濃度を最適化することで壊血病は発症せず酸化ストレ



スの亢進のみを認めるマウス創出の可能性を考え、条件検討を行った。本研究ではアスコルビン酸補充には水溶性のアスコルビン酸誘導体であるアスコルビン酸リン酸マグネシウム(APM)を使用した。誘導体化されていないアスコルビン酸 Na は水中で不安定であり 8.52mM の高濃度溶液ではマウスへの投与を想定した室温 3 日間の静置の後に添加量の約 50%が残存していたものの 0.107mM 溶液では 24 時間で分解され、検出限界以下になった。一方で APM は 0.107mM 溶液を 7 日間室温静置した後でも分解されていなかったことから、本研究では APM を選択した。APM は生体内でホスファターゼによる加水分解でリン酸基が外れることでアスコルビン酸として作用することが明らかにされている<sup>32</sup>。実際に予備検討で SMP30KO マウスに 8.52mM アスコルビン酸 Na 溶液と同モル濃度の APM 溶液を 16 週間飲水投与すると血中 AsA 量などには差がなく、両化合物共に、吸収された後に AsA として生体内で作用することが示唆されている。

図 4C に示す通り、検討した 0.107mM または 0.213mM APM の 4 週、10 週、16 週投与のうち 0.107mM APM の 16 週間投与でのみ ctrl マウスに対して有意な血中酸化ストレスの亢進を認めた。これは、生後 8 週までに飲水投与したアスコルビン酸が 0.107mM の 4 週、10 週投与、及び 0.213mM APM の 4 週、10 週、16 週投与の条件では生体内に残っており、組織から徐放されることで酸化ストレス亢進の抑制に働いていたものと推測される。実際、予備検討で歯肉中のアスコルビン酸量を解析した結果、0.107mM APM 投与を行ったマウスでは 10 週と 16 週のアスコルビン酸量に差はなく、10 週投与の時点で歯肉組織に蓄積していたアスコルビン酸が放出されており、含有量が下がり切っていたと考えられる。一方で、0.213mM APM 投与のマウスでは、10 週投与から 16 週投与の間で歯肉アスコルビン酸量に約 3.3 倍の差があり、歯肉組織中に蓄積されていたアスコルビン酸が血中に補充された結果、酸化ストレスの亢進が抑制されていたことが示唆された。また、0.107mM APM の 16 週間投与を行ったマウスでは、酸化ストレスの亢進は認めるものの壊血病症状を呈さなかったことから、本条件は、コラーゲンやホルモン合成など壊血病症状に関わる生体反応維持には十分であるが、ROS 消去などの抗酸化効果を発揮するための余剰なアスコルビン酸の供給はできない濃度であると考えられた。

以上より酸化マウスの条件として 0.107mM 16 週間投与を設定したが、本マウスは壊血病発症には至らないものの、ctrl マウスと比較すると生体内のアスコルビン酸濃度は有意に低く、酸化マウスと ctrl マウスの比較ではその差の原因が酸化ストレスの亢進であるか、アスコルビン酸の低下であるかの判別がつかない。そのため、酸化マウスにアスコルビン酸ではない抗酸化剤の NAC を投与することで、体内アスコルビン酸濃度は低い酸化ストレスは ctrl 同等のマウスを作製し、比較対照とした。これにより、ctrl と比較して

酸化と NAC マウス両方で見られる表現型はアスコルビン酸の低下に、酸化マウスでのみ見られる表現型は酸化ストレスの亢進に起因することが明らかとなる。NAC の投与濃度は Barquissau らの方法に倣い<sup>33</sup>、15mg/ 日/ マウスとなるようにし、予備検討での 1 日当たりの飲水量から 2.7g/L に設定した。図 4E に示すように、NAC マウスの血中酸化ストレスは ctrl と同等であり酸化マウスは ctrl, NAC マウスに対して有意に酸化ストレスが亢進していた。また図 4F の通り、酸化ストレス応答のグローバルレギュレーターである *Ho1* 遺伝子の発現が酸化マウスの歯肉では亢進していたことから、酸化マウスにおいては血中だけでなく歯肉も酸化ストレスの亢進が起きていることが示唆された。

図 5A に記載の通り、酸化マウスの腹腔マクロファージは *P.g* LPS の単回刺激時の TNF- $\alpha$  産生に関しては ctrl, NAC マウスと有意な差を認めないが、脱感作誘導処置では有意に ctrl, NAC よりも TNF- $\alpha$  産生量が高く、一方で IL-10 の産生量は有意に低かった(図 5B)。すなわち酸化マウス由来の長期間生体内で酸化ストレスに暴露されていた常在マクロファージにおいても *in vitro* 同様 *P.g* LPS に対する脱感作が抑制されること、さらに図 5C の通り、酸化ストレス長期暴露においても *P.g* LPS 刺激時の *Myd88sh*, *Irakm*, *Twist2* の発現低下がおきたことから、TLR シグナル抑制因子の発現低下が脱感作抑制機序の一つであることが示唆された。本モデルでは血中の酸化ストレスが亢進していることから全身の酸化ストレスが亢進している、すなわち全身のマクロファージが酸化ストレスに暴露されていると考えられる。腹腔の常在マクロファージと他の臓器の常在マクロファージは両者ともに血中の液性因子の影響を受け類似の表現型を示す報告があることから<sup>34</sup>、本研究において腹腔の常在マクロファージが酸化ストレスによって呈した脱感作抑制は他の臓器の常在マクロファージにおいても起こると推察される。

以上のことより、体内のマクロファージで脱感作機能が低下していることが示唆された酸化マウスに対して上顎第 2 臼歯に絹糸結紮を行うことで歯周病を誘導した。マウスへの歯周病誘導モデルとしては本研究で用いた単純な絹糸結紮モデル<sup>35</sup>に加え、*P.g* などのヒト歯周病原菌懸濁液の口腔内投与<sup>36</sup>、同菌液や LPS 溶液を浸漬させた絹糸結紮<sup>37</sup>などのモデルが知られる。細菌や LPS などを投与するモデルでは投与した細菌や病原因子による影響を解析できるメリットがある一方、ヒトの歯周病原細菌である *P.g* などはマウスの口腔内には定着しないため複数回の投与が必要であり、誘導される症状にもばらつきが生じる可能性がある。一方、菌液や LPS 添加をしない絹糸結紮モデルでは、処置が結紮だけであることから歯周病症状を再現性良く誘導できると考えた<sup>35</sup>。絹糸結紮モデルでは、マウスの口腔常在細菌の結紮糸への蓄積等により炎症が惹起されるが、ヒトの歯周病と同様に、口腔細菌叢の破綻が起こることや<sup>35</sup>、ラットでの知見になるが、LPS の感受性がな

い個体では絹糸結紮による歯周病誘導時の歯周病症状が抑制されることなど<sup>38</sup>が報告されている。本研究では歯周病症状を再現性良く誘導するために単純な絹糸結紮モデルを選択したため、マウス口腔内に定着しない *P.g* LPS は本研究の *in vivo* 解析には関与していない。また、本研究において絹糸結紮前後での菌叢変化や口腔内 LPS 量の変化などは解析しておらず情報が無い。しかしながら、既報<sup>38</sup>で絹糸結紮モデルにおいて LPS が炎症惹起に関与していることから、本モデルにおいても、マウス常在口腔細菌のグラム陰性菌 LPS も病原因子の一端を担っていると考えられる。従って、歯肉における LPS への応答を見ている点では相違なく、本研究の歯周病モデルマウスの検討は *in vitro* での *P.g* LPS を用いた検討の結果と併せて考察できると考えている。

本研究ではマクロファージの *P.g* LPS のみに着目したが、歯周病においては *Tannerella forsythia* (以下 *T.f*)、*Fusobacterium nucleatum* (以下 *Fn*)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (以下 *A.a*) など他のグラム陰性細菌の関与も示唆されている。これら歯周病関連細菌の中で、*P.g* は歯周病発症進行の原因である口腔細菌叢の破綻の引き金となる keystone pathogen の一つであると考えられており<sup>39</sup>、歯周病関連細菌 LPS の中で *P.g* LPS は歯周病発症進行に重要な役割を果たしていると考えられる。一方で、*P.g* LPS は宿主の免疫を回避でき、炎症惹起効果は他の LPS と比較して低いことが報告されている<sup>40, 41</sup>。これまでに *T.f*, *Fn*, *A.a* などの *P.g* 以外の歯周病関連細菌 LPS に対するマクロファージの脱感作作用やその制御に関しては報告がないが、今後、歯周病の発症進行におけるマクロファージ脱感作の役割を明確化するためには *P.g* 以外の LPS に対する脱感作作用の詳細解明も必要であると考えられる。

本研究では脱感作変化の影響がどれほど速やかに歯周病症状の変化として顕在化するか情報が無いため、絹糸結紮モデルにおいて一般的に骨吸収誘導期間として設定される結紮 7 日と、結紮除去後 10 日間の回復期間の後の 2 点を設定した。その結果、図 6A に示すように、酸化マウスは結紮 7 日目、回復 10 日目共に ctrl マウス、NAC マウスより有意に骨量が低かったことから、歯周病症状の一つである歯槽骨吸収が増加していることが示された。一方で、絹糸結紮をしなかった群では ctrl、酸化、NAC の 3 群間で骨量に有意な差を認めなかったことから、結紮 7 日、回復 10 日で認めた酸化マウスでの骨量低下は、生理的なものではなく、結紮による炎症で誘導される骨吸収が悪化していることが示唆された。また第 2 臼歯歯槽骨頂周囲の破骨細胞数が回復 10 日の時点で酸化群において他の 2 群と比較して有意に多かったことから、酸化マウスでの骨吸収の長期化が回復 10 日時点での酸化マウスにおける骨量低下の原因の一つである可能性が示唆された(図 6C)。さらに、上顎歯肉の炎症を遺伝子発現で解析した結果酸化マウスでは他の 2 群と比較して

結紮 7 日及び回復 10 日で炎症性サイトカインの発現が増加しており、酸化マウス歯肉では結紮に伴う炎症が憎悪及び長期化していることが明らかとなった。この炎症の増悪と長期化も酸化マウスにおける骨吸収増大の一因となっているものと考えられた。一方で、酸化マウスでは他の 2 群と比較して抗炎症・組織修復を担う *Il10*, *Tgfb* の発現が低下しており (図 6D)、歯肉における脱感作抑制が生じている可能性が考えられた。そこで、酸化ストレスによる脱感作抑制機序の一端を担うことが示唆された TLR シグナル抑制因子の歯肉での発現を解析した。その結果、図 7 に示すように、ctrl マウスでは LPS 長期暴露を受けた状態である結紮 7 日の時点で TLR シグナル抑制因子の *Myd88sh*, *Irakm*, *Socs3* の発現が亢進しており、脱感作が誘導されていることが示唆された。さらに *Myd88sh*, *Irakm* に関しては回復 10 日まで発現が亢進しており、回復 10 日の時点でも脱感作が維持されている可能性が考えられた。*in vivo* での脱感作の持続期間に関しては知見が非常に乏しいが、ウマにおいて誘導後 1 週間以上脱感作が続くことが報告されており<sup>42</sup>、マウス歯肉においても 1 週間以上の長期間脱感作状態が持続している可能性が示唆された。一方で、酸化マウスの歯肉では、結紮 7 日、回復 10 日共に *Myd88sh*, *Irakm* の発現が ctrl マウスより有意に低く、脱感作の抑制が生じていることが示唆された。さらに *Myd88sh*, *Irakm* の発現は NAC マウスでは ctrl マウスと同等であったことから酸化マウスで見られた脱感作抑制は酸化ストレスに起因することが示唆された。酸化マウスでは歯周病誘導された歯肉において脱感作の抑制を示唆する TLR シグナル抑制因子の発現低下が起きていること、歯肉の炎症が悪化・長期化していること、歯槽骨吸収が増大していることから、本マウスにおいては酸化ストレスによる歯肉でのマクロファージ脱感作機能低下が歯肉炎症を悪化させ、その結果歯槽骨吸収を増大させている可能性が考えられる。

LPS に対する脱感作はマクロファージや好中球などの骨髄細胞特有の機能と報告されていたが<sup>3</sup>、その後の研究により歯肉の他の細胞においても類似の機構が存在することが示唆されている。例えばヒトの歯根膜から単離された hPDL 細胞では LPS 刺激により脱感作が誘導され、その後の LPS 刺激に対する応答性が減弱することが報告されている<sup>43</sup>。また、Kang らは歯肉結合組織由来の付着性細胞、すなわち線維芽細胞や免疫細胞などの混合物においても脱感作が誘導されること、さらに健常歯肉結合組織由来細胞と炎症歯肉結合組織由来細胞を比較すると炎症歯肉結合組織由来では脱感作誘導が抑制されていることを報告している<sup>44</sup>。さらに、脱感作誘導に働く TLR シグナル抑制因子の一つである IRAK-M は *P.g* LPS 刺激に伴い歯肉の上皮細胞で発現することや<sup>45</sup>、歯肉線維芽細胞においても IRAK-M が発現しており、細胞老化に伴い発現が低下することなど<sup>46</sup>、脱感作機構の存在の可能性を示唆する知見の報告もある。その一方で、同様にヒトから採取した

歯肉線維芽細胞での検討では、歯肉線維芽細胞においては脱感作が誘導されず、長期的な LPS 刺激に対して炎症反応が持続するとの報告もあり<sup>47)</sup>、未解明な点も多い。本研究での歯肉の炎症・TLR シグナル抑制因子発現は歯肉全体の遺伝子発現を解析したものであり、歯肉中の結合組織や上皮細胞といったマクロファージ以外の影響を受けている可能性は否定できない。今後マクロファージ以外の歯周組織構成細胞に関しても、脱感作機能の有無、及びその脱感作機能への酸化ストレスの影響が明確になることで、酸化ストレスによる脱感作制御が歯周病に与える影響の全貌が明らかになるものと期待される。

歯周病は最終的には歯の脱落を起こす QOL の低下に直結する疾患であるが、厚生労働省の平成 28 年度歯科疾患実態調査によると成人の約 70%が罹患しており、さらなる対応が必要とされている。歯周病は細菌感染に端を発し、炎症の慢性化により進行する疾患であることから、原因除去に加えて、慢性炎症への対応が求められている。炎症歯周組織における炎症性サイトカインの主要産生細胞の一つであるマクロファージに対する脱感作の制御は慢性炎症を制御する一つの有効な手段の可能性はある。本研究では、酸化ストレスによりマクロファージの脱感作機能が抑制されること、酸化ストレス亢進モデルマウスにおいて歯周病症状の悪化が起き、その一因が歯肉での脱感作抑制である可能性を見出した。すなわち、複数のメカニズムで歯周病の発症進行を促進することが報告されている酸化ストレスによる歯周病進行機序に、新たにマクロファージの脱感作機能抑制という機序がある可能性が示唆された。本研究から、全身・歯周組織での酸化ストレスの制御に加えて、将来的に加齢などに伴う酸化ストレスの亢進で低下したマクロファージの脱感作機能を、例えば IRAK-M のアナログなどにより正常化することで炎症の慢性化を抑制できれば、歯周病に対する新しい予防・治療技術につながる可能性が考えられる。

## 結論

本研究の結果より、以下の結論を得た。

1. 酸化ストレスは *in vitro* でマクロファージにおける LPS 刺激時の TLR シグナル抑制因子発現を低下させた
2. 酸化ストレスは *in vitro* でマクロファージの *P.g* LPS に対する脱感作を抑制した
3. 酸化ストレス亢進マウス由来の腹腔マクロファージにおいて LPS 刺激時の TLR シグナル抑制因子発現が低下した
4. 酸化ストレス亢進マウス由来の腹腔マクロファージにおいて *P.g* LPS に対する脱感作抑制を認めた
5. コントロールマウスと比較して、酸化ストレス亢進マウスは歯周病誘導時に炎症の悪化と長期化、歯槽骨量の低下を認めた
6. 酸化ストレス亢進マウスの歯肉では歯周病誘導時に TLR シグナル抑制因子の発現が低下した

以上のことから、酸化ストレスは TLR シグナル抑制因子の発現低下によりマクロファージの脱感作を抑制することが示唆された。さらに酸化ストレスの亢進は、歯肉においても TLR シグナル抑制因子の発現を低下させることで脱感作を抑制すること、そのことが歯周病の炎症・骨吸収を悪化させる可能性があることが示唆された。

すなわち、酸化ストレスによる歯周病の悪化機序の一つとして、酸化ストレスによるマクロファージの脱感作抑制がある可能性が示唆された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御助言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。

本研究の実施に多大なる御協力を頂きました東京都健康長寿医療センター研究所分子老化制御、石神昭人研究部長、佐藤綾美博士、滝野有花氏、早稲田大学人間科学学術院、近藤嘉高講師、順天堂大学医学部、石井智子特任助教に心より感謝申し上げます。

本研究に必須となる動物実験手技などをご教授いただいたNova Southeastern大学歯学部口腔基礎研究講座、河井敬久講座長に謝意を述べさせていただきます。

本研究の遂行に対して様々な御協力・御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究に携わる機会を与えて頂いたライオン株式会社岡野知道博士、村越倫明博士、片岡伸介副主席研究員と、様々なご協力を頂いたライオン株式会社口腔健康科学研究所の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文献

1. Sima C, Viniegra A, Glogauer M. Macrophage immunomodulation in chronic osteolytic diseases-the case of periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2019;105(3):473-487.
2. Clark D, Halpern B, Mielau T, Nakamura M, Kapila Y, Marcucio R. The Contribution of Macrophages in Old Mice to Periodontal Disease. *J Dent Res.* 2021;100(12):1397-1404.
3. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* 2002;4(9):903-914.
4. Sun Y, Guo QM, Liu DL, Zhang MZ, Shu R. In vivo expression of Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, CSF2 and LY64 in Chinese chronic periodontitis patients. *Oral Dis.* 2010;16(4):343-350.
5. Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM. Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol.* 2001;167(9):5278-5285.
6. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 2009;30(10):475-487.
7. Ghiboub M, Zhao J, Li Yim AYW, et al. HDAC3 Mediates the Inflammatory Response and LPS Tolerance in Human Monocytes and Macrophages. *Front Immunol.* 2020;11:550769.
8. Domon H, Honda T, Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. Early and preferential induction of IL-1 receptor-associated kinase-M in THP-1 cells by LPS derived from *Porphyromonas gingivalis*. *J Leukoc Biol.* 2008;83(3):672-679.
9. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018;13:757-772.
10. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2013;62(1):59-94.
11. Szczepanik FSC, Grossi ML, Casati M, et al. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontol 2000.* 2020;84(1):45-68.
12. Sun Y, Li H, Yang MF, Shu W, Sun MJ, Xu Y. Effects of aging on endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2012;7(6):e39224.
13. Chakraborty D, Felzen V, Hiebel C, et al. Enhanced autophagic-lysosomal activity and increased BAG3-mediated selective macroautophagy as adaptive response of neuronal cells to chronic oxidative stress. *Redox Biol.* 2019;24:101181.
14. Kondo Y, Inai Y, Sato Y, et al. Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(15):5723-5728.



15. Ishigami A, Kondo Y, Nanba R, et al. SMP30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(3):575-580.
16. Furusawa H, Sato Y, Tanaka Y, et al. Vitamin C is not essential for carnitine biosynthesis in vivo: verification in vitamin C-depleted senescence marker protein-30/gluconolactonase knockout mice. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(9):1673-1679.
17. Xu R, Teich W, Frenzel F, et al. Optical Characterization of Sodium Fluorescein In Vitro and Ex Vivo. *Front Oncol*. 2021;11:654300.
18. Hoover DL, Nacy CA. Macrophage activation to kill *Leishmania tropica*: defective intracellular killing of amastigotes by macrophages elicited with sterile inflammatory agents. *J Immunol*. 1984;132(3):1487-1493.
19. Al-Shaghдали K, Durante B, Hayward C, Beal J, Foey A. Macrophage subsets exhibit distinct *E. coli*-LPS tolerisable cytokines associated with the negative regulators, IRAK-M and Tollip. *PLoS One*. 2019;14(5):e0214681.
20. Foey AD, Habil N, Al-Shaghдали K, Crean S. *Porphyromonas gingivalis*-stimulated macrophage subsets exhibit differential induction and responsiveness to interleukin-10. *Arch Oral Biol*. 2017;73:282-288.
21. Nakao N, Kurokawa T, Nonami T, Tumurkhuu G, Koide N, Yokochi T. Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress-activated protein kinase. *Innate Immun*. 2008;14(3):190-196.
22. Wolfram RM, Budinsky AC, Eder A, et al. Salivary isoprostanes indicate increased oxidation injury in periodontitis with additional tobacco abuse. *Biofactors*. 2006;28(1):21-31.
23. Tripathi V, Singh ST, Sharma V, Verma A, Singh CD, Gill JS. Assessment of Lipid Peroxidation Levels and Total Antioxidant Status in Chronic and Aggressive Periodontitis Patients: An in vivo Study. *J Contemp Dent Pract*. 2018;19(3):287-291.
24. Ling MR, Chapple IL, Matthews JB. Neutrophil superoxide release and plasma C-reactive protein levels pre- and post-periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2016;43(8):652-658.
25. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007;43:160-232.
26. Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2017;14(2):209-216.

27. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev.* 2015;24(10):1150-1163.
28. Ren L, Leung WK, Darveau RP, Jin L. The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2005;76(11):1950-1959.
29. D'souza RS, Bhat KG, Sailaja D, Joshi V. Indirect immunofluorescence technique to study expression of toll-like receptor 4 in chronic periodontitis. *Indian J Dent Res.* 2016;27(3):283-287.
30. Takisawa S, Funakoshi T, Yatsu T, et al. Vitamin C deficiency causes muscle atrophy and a deterioration in physical performance. *Sci Rep.* 2019;9(1):4702.
31. Koike K, Kondo Y, Sekiya M, et al. Complete lack of vitamin C intake generates pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;298(6):L784-792.
32. Okajima LS, Martinez EF, Pinheiro IF, Fonseca Silva AS, Demasi APD. Effect of sodium ascorbyl phosphate on osteoblast viability and differentiation. *J Periodontal Res.* 2020;55(5):660-666.
33. Barquissau V, Capel F, Dardevet D, et al. Reactive oxygen species enhance mitochondrial function, insulin sensitivity and glucose uptake in skeletal muscle of senescence accelerated prone mice SAMP8. *Free Radic Biol Med.* 2017;113:267-279.
34. Lenzo JC, Turner AL, Cook AD, et al. Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(4):429-440.
35. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods.* 2013;394(1-2):49-54.
36. Cai Y, Chen Z, Liu H, Xuan Y, Wang X, Luan Q. Green tea epigallocatechin-3-gallate alleviates Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(2):839-845.
37. Suh JS, Kim S, Bostrom KI, Wang CY, Kim RH, Park NH. Periodontitis-induced systemic inflammation exacerbates atherosclerosis partly via endothelial-mesenchymal transition in mice. *Int J Oral Sci.* 2019;11(3):21.
38. Nowotny A, Sanavi F. Induction of nonspecific tolerance to endotoxins reduces the alveolar bone resorption in ligature-treated rats. *Infect Immun.* 1983;39(2):873-878.
39. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 2014;35(1):3-11.
40. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30-44.

41. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *J Dent Res*. 2006;85(3):235-239.
42. Holcombe SJ, Jacobs CC, Cook VL, Gandy JC, Hauptman JG, Sordillo LM. Duration of in vivo endotoxin tolerance in horses. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016;173:10-16.
43. Wu X, Zhang G, Wang X, Zhang P, Tan Y. Endotoxin tolerance induction in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with different bacterial lipopolysaccharides. *Arch Oral Biol*. 2015;60(3):463-470.
44. Kang W, Hu Z, Ge S. Healthy and Inflamed Gingival Fibroblasts Differ in Their Inflammatory Response to Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide. *Inflammation*. 2016;39(5):1842-1852.
45. Takahashi N, Honda T, Domon H, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K. Interleukin-1 receptor-associated kinase-M in gingival epithelial cells attenuates the inflammatory response elicited by Porphyromonas gingivalis. *J Periodontal Res*. 2010;45(4):512-519.
46. Domon H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Age-related alterations in gene expression of gingival fibroblasts stimulated with Porphyromonas gingivalis. *J Periodontal Res*. 2014;49(4):536-543.
47. Ara T, Kurata K, Hirai K, et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2009;44(1):21-27.