



| | |
|--------------|---|
| Title | 歯周病の病態形成過程におけるAnnexin A1-FPR2シグナルの炎症制御機能 |
| Author(s) | 村田, 真里 |
| Citation | 大阪大学, 2023, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/91862 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (村田 真里)

論文題名

歯周病の病態形成過程におけるAnnexin A1-FPR2シグナルの炎症制御機能

論文内容の要旨

【研究目的】

歯周病は細菌バイオフィームが原因となり歯周組織に炎症が生じ、その炎症反応が遷延化することにより、歯周組織の破壊が進行する慢性炎症性疾患である。我々の研究室では、歯周病の病態形成過程において歯根膜が炎症反応制御に果たす役割を解明することを目的として、絹糸結紮マウス歯周病モデルを用いて、歯根膜における分子の発現変化を網羅的に解析した。その結果、非結紮側に比べ、結紮側において発現が上昇する分子の一つとして炎症調節因子として知られるAnnexin A1 (ANXA1) を同定した。ANXA1はGタンパク共役型受容体であるN-Formyl peptide receptor 2 (FPR2) に結合することで、炎症の収束や創傷の治癒を促進する役割を担うことが、様々な炎症性疾患に関する研究から報告されている。しかしながら、ANXA1-FPR2シグナルが歯周病の病態形成に及ぼす影響については全く報告がない。そこで本研究では歯周病の病態形成過程におけるANXA1-FPR2シグナルの役割を明らかにすることを目的に*in vivo*と*in vitro*の両面で解析を行った。

【材料と方法】

ANXA1-FPR2シグナルが歯周病の病態形成に及ぼす影響について明らかにするため、絹糸結紮マウス歯周病モデルを用いた*in vivo*解析を行った。すなわち、8週齢C57BL/6J雄性マウスの上顎第二後臼歯に5-0絹糸を結紮し、結紮7日後の歯周組織におけるANXA1およびFPR2のmRNA発現についてRNA scope®を用いた*in situ hybridization*により、各分子の発現について特異抗体を用いた免疫組織学的染色により組織学的に検討した。また、内因性のANXA1によるFPR2シグナルの機能を明らかにするため、絹糸結紮マウス歯周病モデルに対し、FPR2選択的阻害薬であるWRW4を連日皮下投与し、結紮3日後、5日後、7日後における歯槽骨吸収量を μ CTにて定量的に解析した。なお、対照群にはPBSを投与した。さらに組織学的解析として、HE染色およびTRAP染色を行い、上顎第二後臼歯の近遠心歯槽骨上の破骨細胞数、歯根膜中の血管数ならびに1血管当たりの面積について対照側と比較し、定量解析した。続いて、ANXA1-FPR2シグナルを増強させることが歯槽骨吸収に与える影響について検討するため、絹糸結紮マウス歯周病モデルに対し、ANXA1 N末端模倣ペプチドであるAc2-26を連日皮下投与し、結紮7日後の歯槽骨吸収量を μ CTにて定量的に解析した。なお、対照群にはPBSを投与した。さらに、ANXA1-FPR2シグナルが歯根膜の炎症反応に対して果たす役割について明らかにするため、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) を用いて*in vitro*解析を行った。まず、ANXA1の発現に影響を与える炎症性サイトカインについて検討するため、ヒトリコンビナントTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 存在下にてHPDLを培養し、培養上清中の細胞外ANXA1の濃度をELISAで検討した。また、WRW4存在・非存在下でHDPLをIL-1 β 存在下で培養し、培養上清中に含まれる炎症メディエーターについてサイトカインアレイを用いて網羅的に解析した。さらに、その結果を元に、培養上清中のタンパク濃度をELISAで検討した。また、HPDLにおけるFPR2シグナルの機能について検討するため、siRNA導入によりFPR2の発現を抑制したHPDL (si *FPR2*) を作製し、発現の抑制効果をRT-PCR法およびWestern blot法にて確認した。si *FPR2*あるいはコントロールsiRNA導入HPDL (si NC) をIL-1 β を用いて刺激し、誘導されるIL-8の遺伝子発現をRT-PCR法、培養上清中のIL-8のタンパク濃度をELISAにて解析した。さらにHPDLにおけるANXA1の機能について検討するため、siRNA導入によりANXA1の発現を抑制したHPDL (si *ANXA1*) を作製し、発現の抑制効果をRT-PCR法およびWestern blot法にて確認した。続いて、si *ANXA1*あるいはsi NCをIL-1 β 存在下で培養し、IL-8およびGM-CSFの遺伝子発現をRT-PCR法、培養上清中のIL-8およびGM-CSFタンパク濃度をELISAにて解析した。さらに、si *ANXA1*をAc2-26で前処理したのち、IL-1 β 存在下で培養し、培養上清中に誘導されるIL-8の濃度についてELISAで検討した。

【結果】

絹糸結紮マウス歯周病モデルの組織学的解析から、結紮7日後の結紮側において上皮下結合組織、歯冠側ならびに根尖周囲の歯根膜に炎症細胞浸潤を認めるとともに、歯槽骨表面に多数の多核巨細胞が観察された。歯周組織における

ANXA1およびFPR2の発現を検討した結果、結紮側、非結紮側のいずれにおいても、歯肉上皮にANXA1およびFPR2両分子の発現が認められた。また、非結紮側に比べ、結紮側の歯根膜を含む結合組織において、両分子の高発現が遺伝子レベル、タンパクレベルで観察されるとともに、多核巨細胞を含む炎症細胞での両分子の発現が認められた。結紮3日後および7日後にはWRW4投与による歯槽骨吸収への明らかな影響を認めなかったものの、結紮5日後には有意な歯槽骨吸収の亢進が認められた。なお、非結紮側の歯槽骨に対するWRW4投与の影響は認められなかった。続いてTRAP染色およびHE染色による組織学的解析を行った結果、結紮5日後において、結紮側の歯槽骨表層に存在するTRAP陽性多核巨細胞の数がWRW4投与により有意に増加し、歯根膜中の1血管当たりの面積が有意に増加した。さらに、Ac2-26を連日皮下投与した結果、対照群と比較し、歯槽骨吸収量は有意に低下した。続いて*in vitro*解析により、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 存在下で培養したHPDLの培養上清中のANXA1の濃度は、いずれの炎症性サイトカインにおいても有意に上昇し、とりわけIL-1 β 刺激により顕著なANXA1産生上昇を認めた。また、WRW4存在・非存在下でHPDLをIL-1 β にて刺激し、培養上清中に発現が誘導される炎症メディエーターについてサイトカインアレイを用いて網羅的に解析した結果、WRW4存在下でIL-1 β 誘導性のsICAM-1、GM-CSF、IL-6、IL-8の発現が亢進した。これら4つの分子についてELISAにて定量的に解析した結果、WRW4存在下で、HPDLの培養上清中に発現するIL-1 β 誘導性のIL-8およびGM-CSF濃度の有意な上昇が確認された。さらに、HPDLにおけるFPR2の機能について検討するため、si FPR2あるいはsi NCをIL-1 β 存在下で培養し、誘導されるIL-8の発現をRT-PCR法、ELISAにて解析した結果、遺伝子レベルおよび培養上清中のタンパクレベルで発現が有意に上昇した。また、ANXA1の機能について検討するため、si ANXA1あるいはsi NCをIL-1 β 存在下で培養し、誘導されるIL-8とGM-CSFの発現をRT-PCR法およびELISAにて解析した結果、si NCと比較し、si ANXA1において遺伝子レベルおよび培養上清中のタンパクレベルでIL-1 β 誘導性のIL-8、GM-CSFの産生が有意に上昇した。さらに、si ANXA1で認められたIL-1 β 誘導性IL-8の産生亢進は、Ac2-26存在下で有意に抑制された。

【結論および考察】

本研究結果から、歯周病の病態形成において歯周組織におけるANXA1およびその受容体であるFPR2の発現が上昇し、ANXA1によるFPR2シグナルの活性化が炎症性サイトカインの産生制御等を介して、歯周病の進行に対するネガティブフィードバック機構の一つとして機能する可能性が見出された。

本研究結果から、絹糸結紮マウス歯周病モデルにおいて非結紮側、結紮側ともに歯肉上皮でANXA1およびFPR2の発現を認めること、非結紮側と比較し、結紮側において歯根膜を含む結合組織にてANXA1およびFPR2の発現が上昇すること、が明らかとなった。歯肉上皮に発現を認めたANXA1、FPR2はそのシグナル活性化により、炎症の初期段階で細菌感染に対する生体防御としての役割を担うことを示唆している。また*in vitro*解析において炎症性サイトカインによる刺激により、HPDLのANXA1産生亢進を認めたことは、炎症歯周組織においてANXA1が、炎症浸潤細胞のみならず、歯周組織構成細胞からも産生されることを示唆している。絹糸結紮マウス歯周病モデルに対し、WRW4投与することで、対照群と比較し、破骨細胞数の増加、歯根膜における血管の拡張を認め、歯槽骨の吸収が有意に亢進することが明らかとなった。結紮5日後に歯槽骨吸収は有意に亢進したが、結紮3日後、7日後には歯槽骨の吸収に差を認めなかったのは、結紮3日後ではANXA1、FPR2両分子の発現が顕著でなく、内因性FPR2シグナル阻害の効果が十分に観察されなかったことによるものと考えられ、また結紮7日後には対照群でも根尖付近に至る歯槽骨吸収が生じており、さらなる歯槽骨吸収を誘導することが困難であったためと考えられる。また、結紮側の歯根膜における1血管あたりの面積の増加を認めたことは、*in vitro*解析で得られた、FPR2シグナル抑制により歯根膜でのIL-8産生が亢進するという結果を鑑みると、好中球等の走化性の活性化が血管を拡張した可能性が示唆される。また同モデルに対するANXA1 N末端ペプチドであるAc2-26投与により、結紮7日後の歯槽骨吸収を有意に抑制したが、ANXA1-FPR2シグナルの活性化が破骨細胞の分化を抑制するとともに、局所での炎症性サイトカイン産生を抑制した結果ではないかと考えられる。HPDLを用いた*in vitro*解析で、FPR2シグナル抑制により、IL-1 β 誘導性のIL-8、GM-CSFの産生が亢進することが明らかとなった。IL-8は免疫担当細胞の遊走に関与し、GM-CSFはM1マクロファージの分化誘導に寄与することからANXA1-FPR2シグナルが歯根膜における炎症応答を抑制することが示唆される。

本研究の成果は、ANXA1-FPR2シグナルを介した宿主応答制御を作用機序とする歯周病治療薬の開発につながるものと期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 (村 田 真 里) | | | |
|---|-----|-----|--------|
| | (職) | 氏 名 | |
| 論文審査担当者 | 主 査 | 教授 | 村上 伸也 |
| | 副 査 | 教授 | 豊澤 悟 |
| | 副 査 | 准教授 | 久保庭 雅恵 |
| | 副 査 | 講師 | 佐々木 淳一 |
| <p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、Annexin A1 (以下 ANXA1 と略す) がその受容体である N-Formyl Peptide Receptor 2 (以下 FPR2 と略す) の活性化を介して、歯周病の病態形成過程に及ぼす影響について検討したものである。</p> <p>絹糸結紮マウス歯周病モデルを用いた解析結果から、歯周病の進行に伴い歯周組織における ANXA1 および FPR2 の発現が上昇し、ANXA1-FPR2 シグナルの阻害は歯槽骨吸収を促進し、同シグナルの活性化は歯槽骨吸収を抑制することが明らかとなった。さらに、ヒト歯根膜細胞を用いた <i>in vitro</i> の解析結果から、ANXA1-FPR2 シグナルは歯根膜細胞の IL-1β誘導性 IL-8 および GM-CSF の産生を制御していることが明らかとなった。</p> <p>以上の研究成果は、ANXA1-FPR2 シグナルが歯周組織における内因性の炎症制御機構として機能している可能性を明らかにし、歯周病の病態生理の理解に新たな知見を与えるものであり、博士 (歯学) の学位を授与するに値するものと認める。</p> | | | |