



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	<a href="https://doi.org/10.18910/91862">https://doi.org/10.18910/91862</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

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

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻  
口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学

村田 真里

(指導教員：村上 伸也 教授)



## 緒言

歯周病は歯面に形成された細菌バイオフィームが原因となり、歯槽骨吸収を含む歯周組織の進行性破壊が生じる慢性炎症疾患である<sup>1</sup>。歯周病の発症進行には、歯周病原性細菌に由来する因子に加え、喫煙やストレスなどの環境因子と免疫応答や炎症反応の制御等に関わる宿主因子が深く関与している<sup>2</sup>。

歯周組織の一つである歯根膜は歯を歯槽窩に保持し、線維性結合組織としての特徴を維持しつつ、咬合力等のメカニカルストレスを緩衝するとともに、歯周組織の恒常性維持や歯周組織再生に関与する未分化間葉系幹細胞（歯周組織幹細胞）の供給源として重要な役割を演じている<sup>3</sup>。その一方で、咬合性外傷や矯正力による過度なメカニカルストレスや細菌由来因子の暴露ならびに炎症性サイトカインが存在する状況下において、歯根膜細胞は各種炎症メディエーターを産生するとともに、**Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand** や **Osteoprotegerin** などの破骨細胞分化調節因子の産生を介して歯槽骨の破壊にも積極的に関与することが示唆されている<sup>4</sup>。しかしながら、歯周病の病態形成過程における歯根膜の炎症反応制御機構や、同制御が歯周病の進行に及ぼす影響に関する詳細は十分に明らかになっていない。

そこで我々の研究室では、歯根膜の炎症制御機構の解明を目的とし、絹糸結紮マウス歯周病モデル<sup>5</sup>から **Laser microdissection** 法により採取した歯根膜を対象にプロテオーム解析を実施し、歯周病の有無が歯根膜に発現する分子群に与える影響を網羅的に解析した。その結果、非結紮側と比較し、結紮側において有意に発現上昇する分子を 7 つ同定し、そのなかの一つに炎症調整因子として近年注目が集まる **Annexin A1**（以下 **ANXA1** と略す）を見出した。

**ANXA1** は、12 種類の **Annexin**（以下 **ANX** と略す）からなる **ANX** スーパーファミリーに属し、346 個のアミノ酸から構成される 37 kDa のタンパク質である。その構造は、他の **ANX** と同様に 4 つのカルシウム結合モチーフの繰り返し配列により構成されるコアドメインと、サブタイプごとに異なる、すなわち **ANXA1** に特有の構造を示す N 末端領域から構成される<sup>6,7</sup>。細胞質内に存在する **ANXA1** はカルシウム存在下で立体構造を変化させ、コアドメインが細胞膜を構成するリン脂質に結合することにより、細胞膜の修復や維持さらには膜小胞輸送に重要な役割を果たす<sup>6,8-10</sup>。一方、炎症反応などにより細胞が活性化されると、**ANXA1** は細胞外に放出され<sup>11,12</sup>、N 末端領域が細胞膜上に発現する G タンパク共役型受容体である **Formyl peptide receptor 2**（以下 **FPR2** と略す）に結合することでオートクラインあるいはパラクライン作用を発揮する<sup>6,11,13</sup>。

**FPR2** はパターン認識受容体の一つで、病原体関連分子パターンなかでも **N-formylated peptides** を認識し、細菌感染に際し好中球の遊走や貪食能の活性化

を介して細菌の排除に重要な役割を果たす<sup>14,15</sup>。一方で、FPR2はANXA1のみならずLipoxin A4やResolvin D1といった脂質メディエーター等の内因性リガンドによって活性化されることにより、各種炎症反応の抑制や収束に寄与することが報告されている<sup>16,17</sup>。すなわち、FPR2の活性化はIL-6などの炎症性サイトカイン産生や好中球の走化性を制御する<sup>18</sup>一方で、抗炎症性サイトカインであるIL-10の血漿中での産生を亢進する<sup>19</sup>。また、多形核白血球のアポトーシスとそれに続くマクロファージによるエフェロサイトーシスを活性化することで炎症性疾患の収束に積極的に関与することが報告されている<sup>20</sup>。このようなFPR2シグナルによる炎症収束機構は、慢性閉塞性肺疾患、アテローム性動脈硬化症、虚血再灌流、神経炎症などの慢性炎症疾患に対するFPR2アゴニストの新規治療薬としての開発につながる重要な基盤情報となっている<sup>21</sup>。

さらにANXA1-FPR2シグナルが、頭蓋骨の骨融解モデルにおいて破骨細胞の分化を抑制することで骨融解を改善する<sup>22</sup>ことに加え、関節炎モデルにおける炎症性骨・軟骨破壊に対して生体防御的な役割を果たすこと<sup>23,24</sup>が明らかになっており、炎症性硬組織破壊過程における同シグナルの抵抗性が報告されている。これらの報告と、我々が見出した炎症菌根膜におけるANXA1発現の上昇は、ANXA1-FPR2シグナルが歯周病の病態形成において内因性の抗炎症、あるいは炎症収束メカニズムに寄与することを強く示唆しているものの、歯周病局所における同上シグナルの役割については全く報告がない。

そこで本研究では、ANXA1-FPR2シグナルが歯周病の病態形成過程で担う役割について明らかにすることを目的として絹糸結紮マウス歯周病モデルにおけるANXA1および同受容体であるFPR2の発現を解析するとともに、同シグナルの抑制または活性化が歯周病の進行に及ぼす影響について解析を行った。さらに、ヒト歯根膜細胞（以下、HPDLと略す）を用いた*in vitro*の実験にて、ANXA1-FPR2シグナルがHPDLの炎症反応制御に及ぼす影響について検討を加えた。

## 材料および方法

### 1. 絹糸結紮によるマウス実験的歯周病モデル

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（受付番号：動歯-30-016-2、動歯-R-03-005-1）。絹糸結紮によるマウス実験的歯周病モデルはAbeらの方法<sup>5</sup>に準じて行った。すなわち、8週齢 C57BL/6J 雄性マウス（日本クレア、東京、日本）に、三種混合麻酔（1 mg/ml ドミトール、5 mg/ml ミダゾラム、5 mg/ml ベトルファール）を投与した後、上顎左側第二後臼歯に対し、1%リドカインにて局所麻酔を行い 5-0 絹糸（Johnson & Johnson Services Inc.、New Brunswick、NJ、USA）を結紮した。結紮 7 日後に 5-0 絹糸を除去し、CO<sub>2</sub> 下で安楽死させた。また、一部の実験では同モデルに対し、FPR2 選択的阻害薬 WRW4（1.8 mg/kg ; Tocris Bioscience、Bristol、UK、Cat.2262）<sup>25</sup> を 3、5、7 日間、ANXA1 N 末端模倣ペプチド Ac2-26（1 mg/kg ; Tocris Bioscience、Cat.1845）<sup>22</sup> を 7 日間、連日皮下投与した。

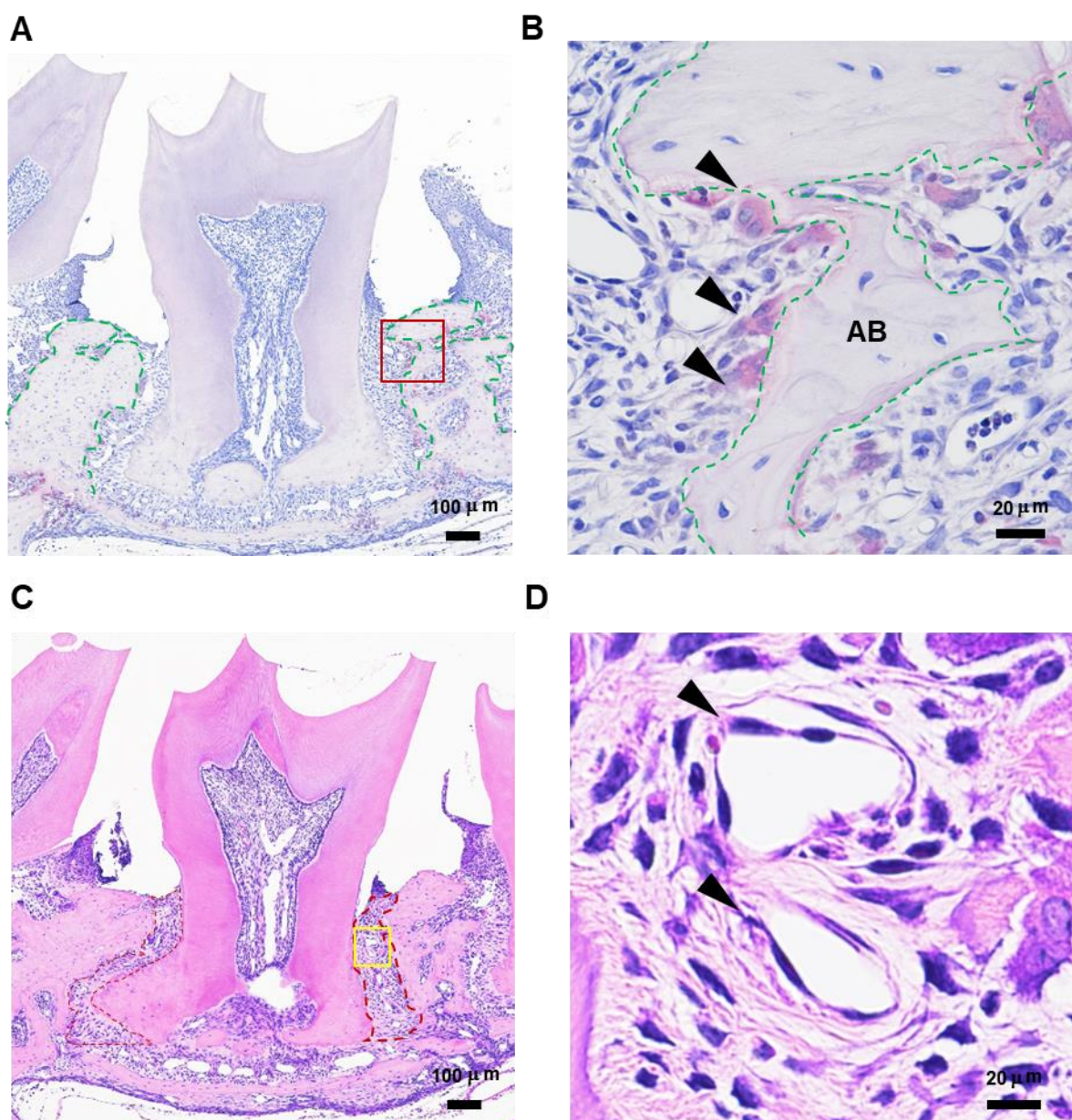
### 2. 歯槽骨吸収量の定量解析

実験的歯周炎を誘導したマウスに対し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（富士フィルム和光純薬、大阪、日本、以下 PFA と略す）を用いて還流固定した後、上顎骨を採取した。実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R\_mCT2（リガク、東京、日本、以下マイクロ CT と略す）により断層撮影を行い、得られた DICOM データを用いて、3次元画像解析ソフトウェア Drishti v2.7 (Australian National University Vizlab、Canberra、Australia) によりデータの 3次元構築を行った。3次元構築した画像における第 2 臼歯近心根および遠心根の頰側の歯根のセメント-エナメル境を指定し、同部位から歯根軸に平行に下ろした垂線上の歯槽骨頂までの距離について三次元的に距離を計測し、その合計を歯槽骨吸収量として算出した<sup>5</sup>。

### 3. 組織学的解析

マウス上顎骨を 4%PFA にて 4℃、24 時間浸漬固定後、0.5 mol/l ethylenediaminetetraacetic acid (pH7.5)（富士フィルム和光純薬、以下、EDTA と略す）を用いて 4℃、7 日間の脱灰処理を行い、続いて 70%エタノール（富士フィルム和光純薬）に 4℃、24 時間以上浸漬し、パラフィンで包埋した。その後、LEICARM2245（Leica Microsystems GmbH、Wetzlar、Germany）を用いて厚さ 4 μm の薄切切片を作製した。薄切切片は、マイヤー・ヘマトキシリン（武藤化学、東京、日本）および 1%エオシン Y 液（富士フィルム和光純薬）を用いたヘマトキシリン・エオシン（HE）染色、あるいは Naphthol AS-BI 溶液

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および Pararosaniline 溶液 (Sigma-Aldrich) を用いた酒石酸抵抗性酸性フوسفターゼ (TRAP) 染色を行った後、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。破骨細胞数の定量化は、第二後臼歯近遠心歯槽骨の表面に存在する TRAP 染色陽性の多核巨細胞を計数し、歯槽骨表面長さ 1 mm 当たりの細胞数として算出した (図 1)。一方で、歯根膜に存在する血管数および一血管あたりの面積は HE 染色像から算出した。すなわち、第二後臼歯近遠心の歯根膜に存在する血管内皮細胞で裏層された管腔を血管として計数するとともに、一血管あたりの平均面積を算出した。なお、歯槽骨表面長さおよび血管の面積は WinROOF® (三谷商事, 福井, 日本) を用いて計測した。



#### 図 1. 組織学的解析の方法

- A. 絹糸結紮 5 日後の上顎第二後臼歯周囲組織の TRAP 染色像を示す。破骨細胞数の計測は、第二後臼歯根尖より歯冠側に存在する歯槽骨（破線）を対象とし算出した。
- B. A の口部の強拡大像を示す。歯槽骨表面に存在する TRAP 染色陽性の多核巨細胞（矢頭）を破骨細胞として計数した。AB：歯槽骨
- C. 絹糸結紮 5 日後の上顎第二後臼歯周囲組織の HE 染色像を示す。血管の解析は、第二後臼歯根尖より歯冠側に存在する歯根膜（破線）を対象とし算出した。
- D. C の口部の強拡大像を示す。血管内皮細胞に裏層された管腔（矢頭）を血管として、数と面積を算出した。

#### 4. 免疫組織学的解析

パラフィン薄切切片を脱パラフィンした後、ANXA1 の染色に対しては Tris EDTA buffer pH9 (Genostaff、東京、日本)、FPR2 の染色に対しては Citrate buffer pH6 (Genostaff) を用いて 80°C で 40 分間の抗原賦活化処理を行った。次に、G-Block (Genostaff) を用いて 25°C、10 分間処理した後、Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector laboratories、Newark、CA、USA) を用いて 25°C、15 分間処理することでブロッキングを行った。一次抗体にはウサギ抗マウス ANXA1 モノクローナル抗体 (0.2 µg/ml、Abcam、Cambridge、UK、Cat.EPR19342) あるいはウサギ抗ヒト FPR2 ポリクローナル抗体 (0.4 µg/ml、NOVUS BIOLOGICALS、Centennial、CO、USA、Cat.NLS1878) を用いて 4°C にて 18 時間反応させた。0.5% Tween® 20 含有トリス緩衝生理食塩水 (以下、TBST と略す) およびトリス緩衝生理食塩水 (以下、TBS と略す) で洗浄後、二次抗体としてヤギ抗ウサギ IgG ビオチン化抗体 (3.75 µg/ml、Vector laboratories Inc.) を 25°C、30 分間反応させ、TBST および TBS を用いて洗浄後、100 µg/ml ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ、東京、日本) を 25°C、5 分間反応させた。TBST および TBS にて洗浄後、3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (Genostaff) を用いて発色し、マイヤー・ヘマトキシリンにて対比染色を行った。なお、一次抗体および二次抗体は、いずれも TBS に G-Block を 1% 添加した溶液を用いて希釈した。マリノール (武藤化学、東京、日本) を用いて封入した後、光学顕微鏡 ECLIPSE Ci を用いて観察および写真撮影を行った。

#### 5. RNA scope® *in situ* hybridization

マウス上顎骨を 4%PFA にて 4°C、24 時間浸漬固定後、0.5 mol/l EDTA (pH7.5) にて 4°C、7 日間の脱灰処理を行った。その後、20%ショ糖 (富士フィルム和光純薬) 含有リン酸緩衝液 (富士フィルム和光純薬、以下 PBS と略す) に浸漬し、

95%エタノール(富士フイルム和光純薬)に浸漬したドライアイス上でO.C.Tコンパウンド(サクラファインテックジャパン、東京、日本)を用いて、凍結包埋した。包埋後、凍結切片支持用粘着フィルム(Cryofilm type 2 C (9)、Section-Lab Co.Ltd、神奈川、日本)を用いた川本らの方法<sup>26</sup>に準じて、LEICA CM3050 S (Leica Microsystems GmbH)を用いて厚さ14 μmの脱灰凍結薄切切片を作製した。薄切切片は、RNAscope® マルチプレックス蛍光アッセイキット(Advance Cell Diagnostics、Newark、CA、USA)、RNAscope® Probe- Mm-Anxa1 (Advance Cell Diagnostics)ならびにRNAscope® Probe- Mm-Fpr2 (Advance Cell Diagnostics)を用いてそれぞれ*Anxa1*および*Fpr2*のmRNA発現を検出し、RNAscope® Multiplex FL v2 DAPI (Advance Cell Diagnostics)を用いて、核染色を行った。その後、Prolong™ Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA)を用いて封入し、共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8 (Leica Biosystems GmbH)を用いて観察および写真撮影を行った。

## 6. 細胞培養

HPDLはLonza (Basel、Switzerland)より入手したものをを用いた。細胞は10%ウシ胎仔血清(Biowest、Nuaille、France、以下FBSと略す)と60 μg/mlカナマイシン(以下KMと略す：富士フイルム和光純薬)を加えたα-Modification of Eagle's Medium(以下α-MEMと略す：富士フイルム和光純薬)を培地として用い、5%CO<sub>2</sub>、37°C、湿度95%の条件下で培養した。継代培養の際には0.05%トリプシン0.02%EDTA(Life technologies、Carlsbad、CA、USA)添加PBSで処理、回収した後、100 mm培養ディッシュ(Corning、Corning、NY、USA)に播種した。HPDLは継代8代から12代目までの細胞を実験に供した。

## 7. HPDL培養上清中のANXA1濃度の解析

HPDLを12穴細胞培養プレートに $2.0 \times 10^5$ 個播種し、10%FBSおよび60 μg/ml KM含有α-MEMにて培養し、サブコンフルエントになった時点で、培地交換を行い、40 ng/ml ヒトリコンビナント tumor necrosis facotr-α (R&D Systems、Minneapolis、MN、USA、以下TNF-αと略す)、20 ng/ml ヒトリコンビナント interferon-γ (R&D Systems、以下IFN-γと略す)、20 ng/ml ヒトリコンビナント interleukin-1β protein (R&D Systems、以下IL-1βと略す)存在下で24時間培養し、培養上清を回収した。培養上清に含まれるANXA1濃度をHuman ANXA1 ELISA Kit (Abcam)を用いて定量的に解析した。

## 8. HPDL 培養上清中の炎症メディエーターの解析

HPDL を 6 穴細胞培養プレート (Corning) に  $5.0 \times 10^5$  個播種、あるいは 12 穴細胞培養プレート (Corning) に  $2.0 \times 10^5$  個播種し、10%FBS および 60  $\mu\text{g/ml}$  KM 含有 $\alpha$ -MEM にて培養し、サブコンフルエントになった時点で、培地交換を行い、24 時間後に 100 ng/ml WRW4 の存在あるいは非存在下で 1 時間培養後、10 ng/ml IL-1 $\beta$  の存在あるいは非存在下で培養し、24 時間後の培養上清を回収した。HPDL 培養上清中に含まれる炎症メディエーターは Human Inflammation Antibody Array C3<sup>®</sup> (RayBiotech, Norcross, GA, USA) を用いて解析した。メンブレン上のドットは、Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) にて検出し、画像解析ソフトウェア Image Quant TL (GE Healthcare) を用いて各ドットの濃さを無刺激の HPDL の培養上清を 1 として半定量的に解析した。

次に培養上清中に含まれる soluble intercellular adhesion molecule-1 (以下 sICAM-1 と略す) 濃度を Human ICAM-1/CD54 Allele-specific Quantikine ELISA kit (R&D Systems)、interleukin-6 (以下 IL-6 と略す) 濃度を Human IL-6 Quantikine ELISA kit (R&D Systems)、interleukin-8 (以下 IL-8 と略す) 濃度を Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA kit (R&D Systems)、growth granulocyte-macrophage colony stimulating factor (以下 GM-CSF と略す) 濃度を Human GM-CSF Quantikine ELISA kit (R&D Systems) を用いて、それぞれ定量的に解析した。

## 9. 全 RNA の抽出および相補鎖 DNA (以下、cDNA と略す) の作製

培養細胞からの全 RNA 抽出には、Maxwell<sup>®</sup> RSC simply RNA Cells Kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いた。抽出・精製した全 RNA を鋳型として、High-Capacity RNA-to-cDNA<sup>™</sup> Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

## 10. Real-time polymerase chain reaction (RT-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 に示す各遺伝子特異的な Real-time PCR 用プライマー (タカラバイオ、滋賀、日本、および FASMAC、神奈川、日本) を用いて行った。PCR 反応は Fast SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、Step One Plus Real-time PCR System<sup>®</sup> (Applied Biosystems) にて行った。なお、各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子の一つである *hypoxanthine phosphoribosyltransferase* (以下 *HPRT* と略す) を内在性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 本研究で使用した Real-time PCR 用プライマーの一覧

Gene		Primer sequence
<i>ANXA1</i>	F	5'-ATGTTGCTGCCTTGCACAAA-3'
	R	5'-CCAAGGGCTTTCCATTCTCCT-3'
<i>FPR2</i>	F	5'-TGGCTTTAGCTTGCCGATGTC-3'
	R	5'-AGCCACCACAGCAGTGAGGA-3'
<i>IL-8</i>	F	5'-ACACTGCGCCAACACAGAAATTA-3'
	R	5'-TTTGCTTGAAGTTTCACTGGCATC-3'
<i>GM-CSF</i>	F	5'-CACTGCTGCTGAGATGAATGAAA-3'
	R	5'-GTCTGTAGGCAGGTCGGCTC-3'
<i>HPRT</i>	F	5'-GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA-3'
	R	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC-3'

### 11. *FPR2* および *ANXA1* siRNA の導入

KM を含まない 10%FBS 含有 $\alpha$ -MEM を用い、HPDL を 6 穴細胞培養プレートに播種し、2.5 nM Silencer<sup>®</sup> Select Negative Control siRNA (Life technologies)、2.5 nM *FPR2* siRNA (5'-CCACAAAAGGGCAUGAUUtt) (Life technologies)、2.5nM *ANXA1* siRNA (5'-GACGUAAACGUGUCAAUAtt) (Life technologies) をそれぞれ Lipofectamine<sup>®</sup>3000 (Life technologies) 存在下にて reverse transfection 法にて導入した。播種 6 時間後に 60  $\mu$ g/ml KM 添加 10%FBS 含有 $\alpha$ -MEM に培地交換し、細胞をサブコンフルエントまで培養し、実験に供した。

### 12. 全細胞画分タンパク質の回収

HPDL を PBS にて 2 回洗浄した後に、プロテアーゼインヒビターカクテル錠 (Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA)、10 mM フッ化ナトリウム (富士フイルム和光純薬)、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich)、10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸 (富士フイルム和光純薬) を添加した RIPA Lysis Buffer (Merck Millipore、Darmstadt、Germany) を用いて、4 $^{\circ}$ C で 20 分間処理した後に、遠心分離 (12000 rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分) し、上清を全細胞画分として回収した。得られたサンプルは、Pierce<sup>™</sup> 660nm Protein Assay 法にてタンパク量を算出した後、濃度を同値に調整した。

### 13. Western blot 法による解析

全細胞画分を 2-メルカプトエタノール (富士フイルム和光純薬) 含有 Laemmli の 4x サンプルバッファー (BioRad Laboratories、Hercules、CA、USA) を用

いて 95°C、5 分間熱処理することにより還元し、至適濃度のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて電気泳動 (150V) を行い、タンパク質溶解画分を展開した。その後、PVDF トランスファーメンブレン (BioRad Laboratories) にブロッティング装置 (トランスブロット Turbo システム ; BioRad Laboratories) を用いて転写した (25V、3 分)。Bullet Blocking One for Western Blotting (ナカライテスク、京都、日本) を用いて 25°C、5 分間ブロッキングを行った後、一次抗体として 0.2 µg/ml ウサギ抗マウス ANXA1 モノクローナル抗体、1.1 µg/ml ウサギ抗ヒト FPR2 ポリクローナル抗体あるいは 0.2 µg/ml マウス抗ヒトβ-actin モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) を 4°C、18 時間反応させた。二次抗体として HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:5000 ; GE Healthcare) あるいは HRP 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体 (1:10000 ; GE Healthcare) を 25°C、90 分反応させた後、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いて発光した後、ChemiDoc Touch MP (BioRad Laboratories) にてバンドを検出した。得られたバンドを画像解析ソフトウェア Image Lab (BioRad Laboratories) にて数値化した後、ANXA1 および FPR2 の各発現をβ-actin で標準化した後、コントロールを 1 として半定量的に解析した。

#### 14. 免疫蛍光細胞染色法による解析

*FPR2* siRNA を導入した HPDL をガラスボトムディッシュ (松波硝子、大阪、日本) 上に播種し、6 時間後に培地交換を行い、10%FBS および 60 µg/ml KM 含有のα-MEM でサブコンフルエントまで培養した。PBS で洗浄した後、25°C、15 分間 4%PFA を用いて固定した。PBS で洗浄した後、0.25%TritonX-100 (MP バイオジャパン、東京、日本) 含有 PBS にて 10 分間室温で処理した。5%ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) 含有 PBS (以下、ブロッキング溶液と略す) で 1 時間、室温にてブロッキングを行った。一次抗体として 0.2 µg/ml ウサギ抗ヒト FPR2 ポリクローナル抗体を 4°C で 16~18 時間反応させた。PBS で洗浄した後に、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (4.0 µg/ml ; Thermo Fisher Scientific) を 25°C、30 分間反応させ、DAPI (Sigma-Aldrich) にて 25°C、5 分間処理し、核染色を行った。なお、一次抗体および二次抗体は、それぞれブロッキング溶液で希釈した。PBS にて洗浄した後、蛍光顕微鏡 Nikon ECLIPSE Ti-U (Nikon、東京、日本) を用いて観察した。

#### 15. 統計処理

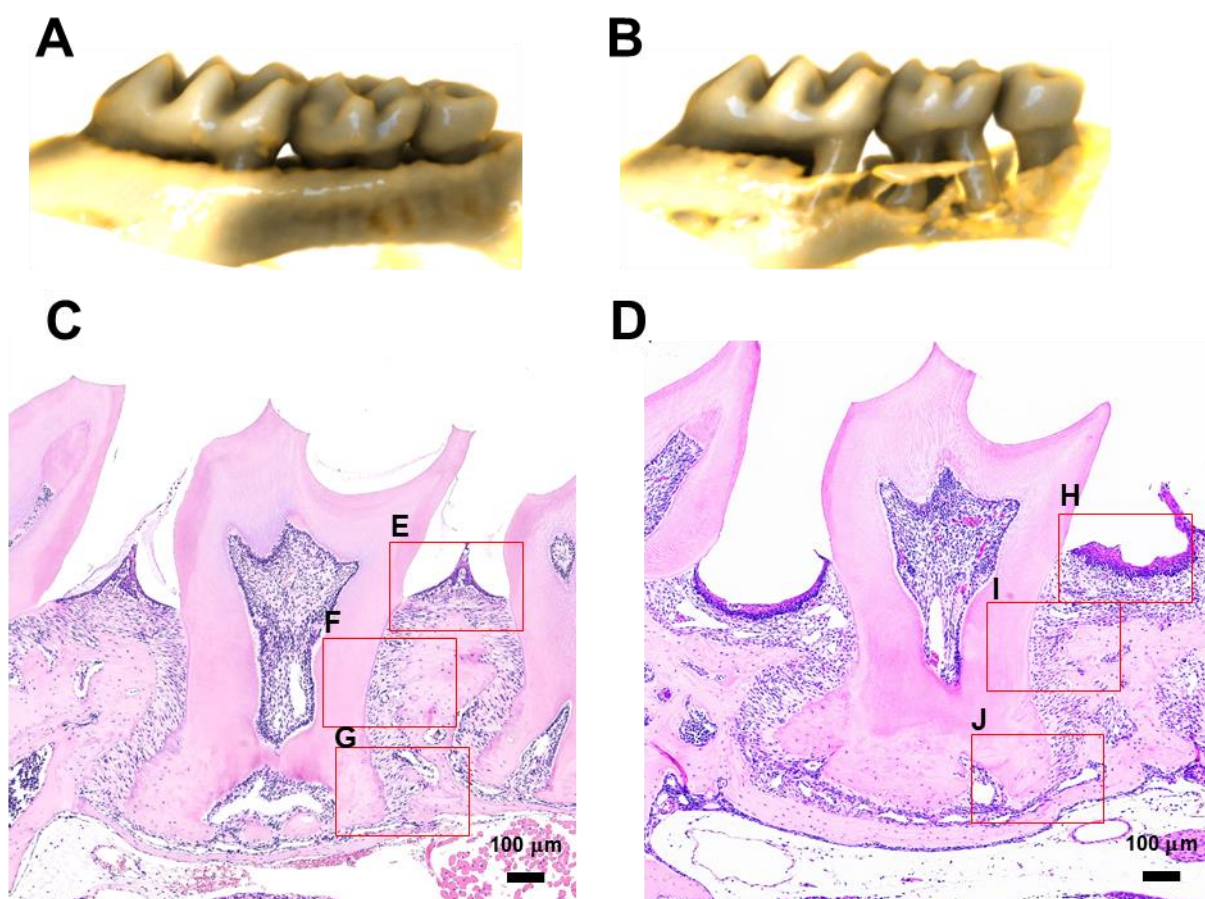
実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析 (ANOVA) を行った後に post-hoc と

して Tukey 検定あるいは Wilcoxon 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差があるものとした。

## 結果

### 1. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおける ANXA1 および FPR2 の発現

歯周病局所における ANXA1 および FPR2 の発現について検討するために、絹糸結紮マウス歯周病モデルを用いて上記両分子の mRNA およびタンパク発現を組織学的に検討した。まず、絹糸結紮が歯周組織に及ぼす影響について検証した。マウスの上顎左側第二後臼歯に絹糸を結紮し 7 日後の上顎骨を、マイクロ CT を用いて解析した結果、第一後臼歯遠心から第二後臼歯周囲、第三後臼歯近心にかけて根尖付近に至る歯槽骨吸収が確認された (図 2A、B)。さらに、HE 染色による組織学的な解析から、結紮側では、非結紮側と比較し歯槽骨頂が低位にあり、骨表面に不整が認められ、歯槽骨の吸収が組織学的に確認された (図 2C、D)。また、結紮側の歯肉および歯根膜に炎症浸潤細胞が観察されるとともに、歯槽骨周囲には多核巨細胞が多く認められた (図 2E-J)。



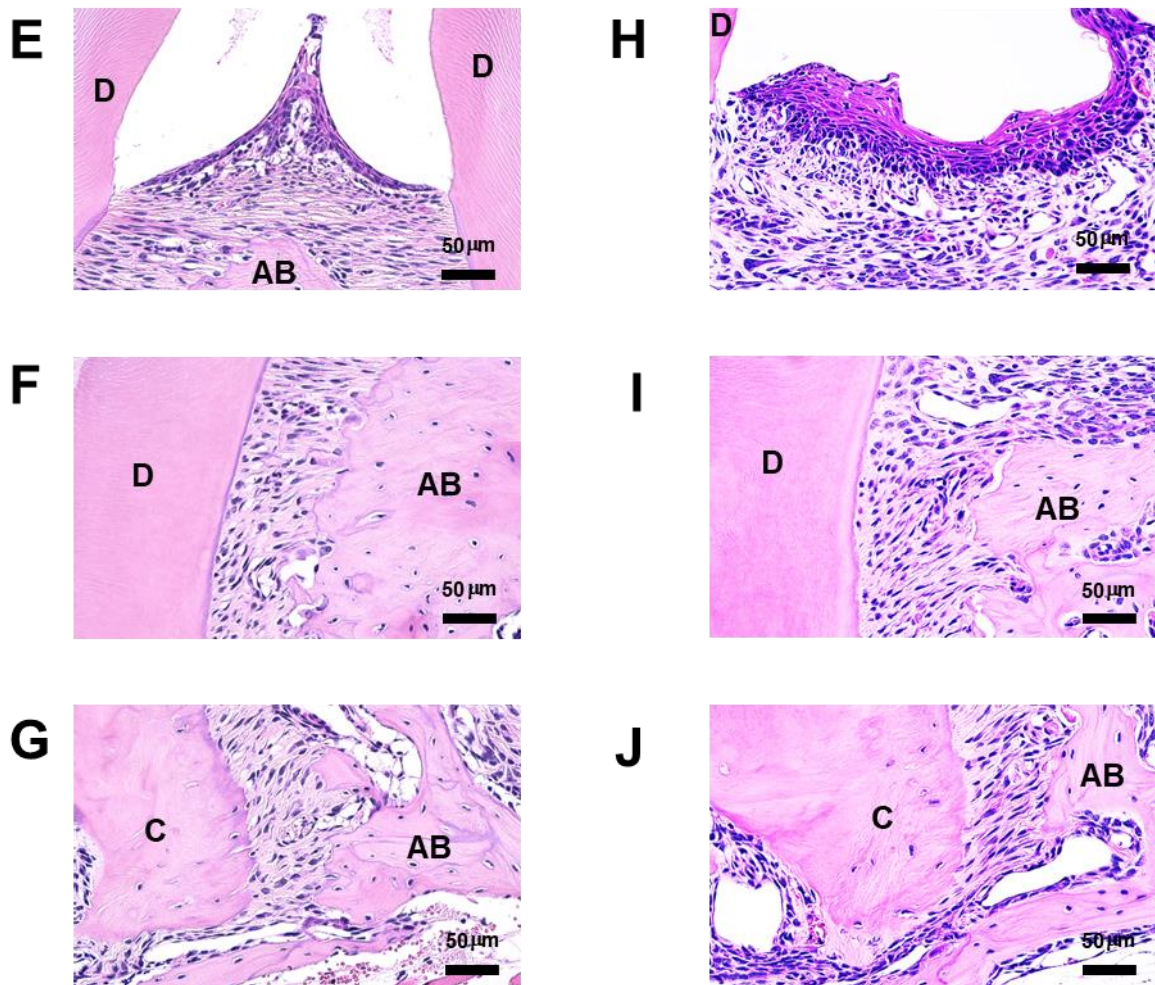


図 2. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおけるマイクロ CT 解析による三次元構築像と HE 染色像

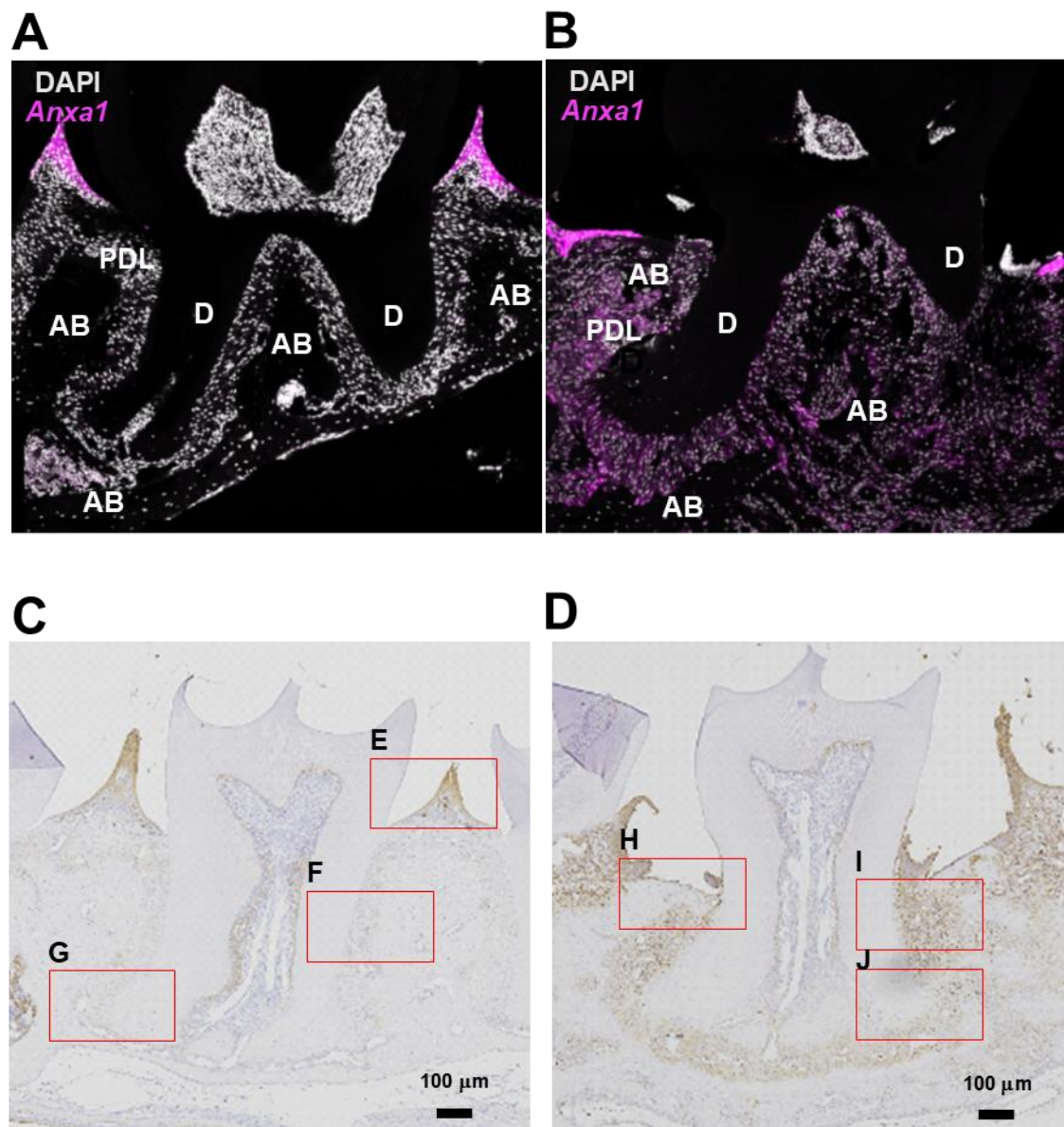
8 週齢 C57BL6/J 雄性マウスの上顎左側第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、7 日後に安楽死させたのち還流固定を行い、上顎骨を採取した。実験の対照群は非結紮の右側上顎骨とし、非結紮側 (A、C、E-G) および結紮側 (B、D、H-J) のマイクロ CT 解析 (A、B)、および HE 染色像 (C-J) を示す。C および D に示された赤枠内の上皮および上皮下結合組織 (E、H)、歯冠側歯根膜 (F、I)、および根尖側歯根膜 (G、J) の拡大像を示す。

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。

AB：歯槽骨、D：象牙質、C：セメント質

次に、同モデルを用いて歯周組織における ANXA1 の mRNA、タンパク発現をそれぞれ *in situ* hybridization 法および免疫組織染色法にて検討した。その結果、非結紮側および結紮側の歯肉上皮に ANXA1 mRNA およびタンパクの強い発現が認められた (図 3A-E、H)。また、非結紮側の歯肉および歯根膜で観察された軽微な ANXA1 mRNA およびタンパク発現は、結紮側において顕

著に亢進することが明らかとなった（図3）。さらに歯周組織に浸潤した炎症細胞には、より強いANXA1発現が観察された（図3H-J）。



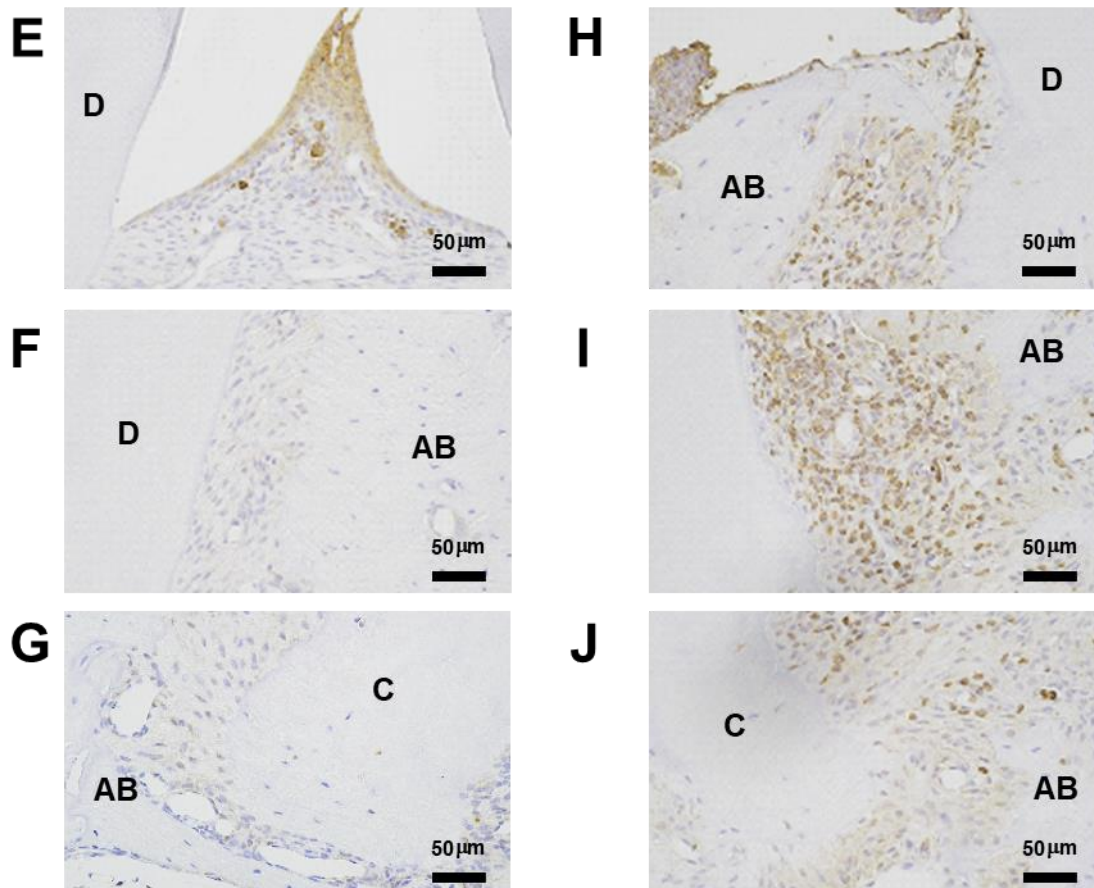


図 3. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおける ANXA1 発現

8 週齢 C57BL6/J 雄性マウスの上顎左側第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、7 日後に上顎骨を採取し薄切切片を作製した。実験の対照群は非結紮の右側上顎骨とし、非結紮側 (A、C、E-G) および結紮側 (B、D、H-J) の *Anxa1* mRNA 発現 (A、B)、および ANXA1 発現 (C-J) を示す。C および D に示された赤枠内の上皮および上皮結合組織 (E、H)、歯冠側歯根膜 (F、I) および根尖側歯根膜 (G、J) の拡大像を示す。

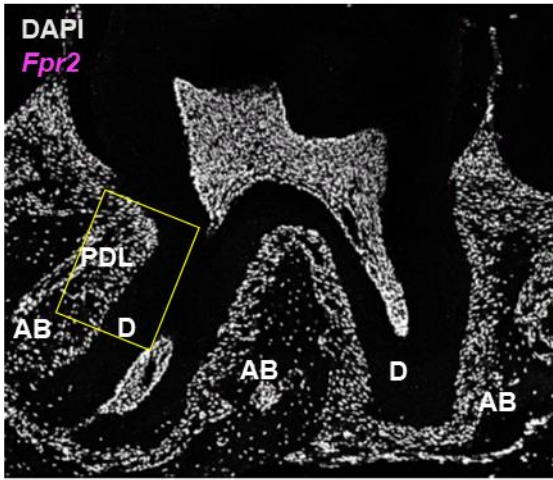
PDL: 歯根膜、AB: 歯槽骨、D: 象牙質、C: セメント質

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。

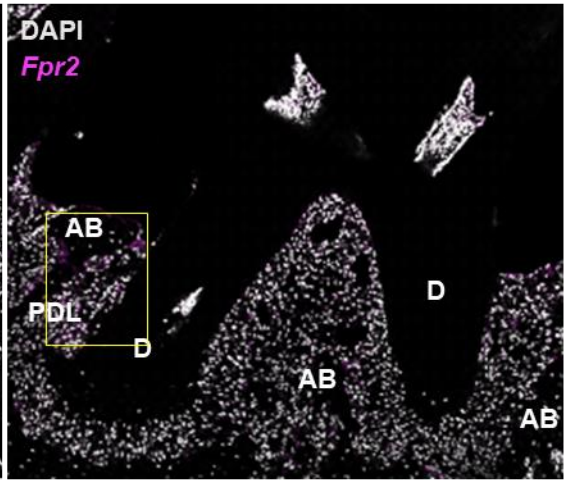
続いて ANXA1 と同様に FPR2 の発現についても検討を加えた。その結果、非結紮側および結紮側の歯肉上皮に FPR2 mRNA およびタンパク発現が認められた (図 4A、B、E-G、J)。また非結紮側の歯肉および歯根膜で観察された微小な FPR2 の mRNA およびタンパク発現は、結紮側において顕著に亢進することが明らかとなった (図 4)。また、歯周組織に浸潤した炎症細胞、特に歯槽骨周囲の多核巨細胞に、より強い FPR2 発現が観察された (図 4F、J-L)。

以上の結果から、ANXA1-FPR2 シグナルが歯周病の病態形成過程で重要な役割を担う可能性が明らかとなった。

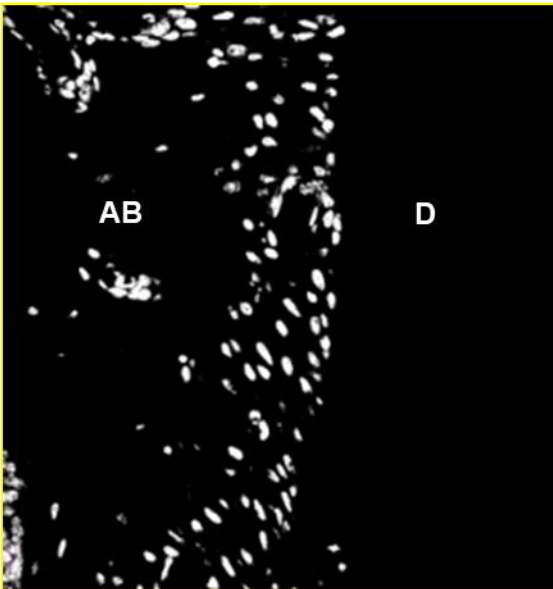
**A**



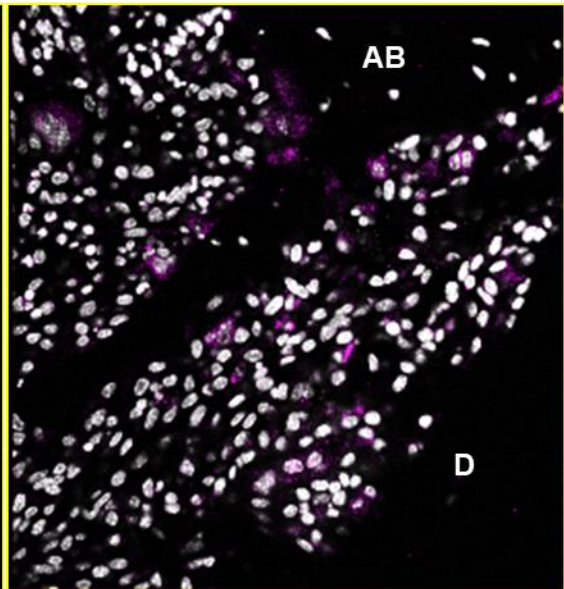
**B**



**C**



**D**



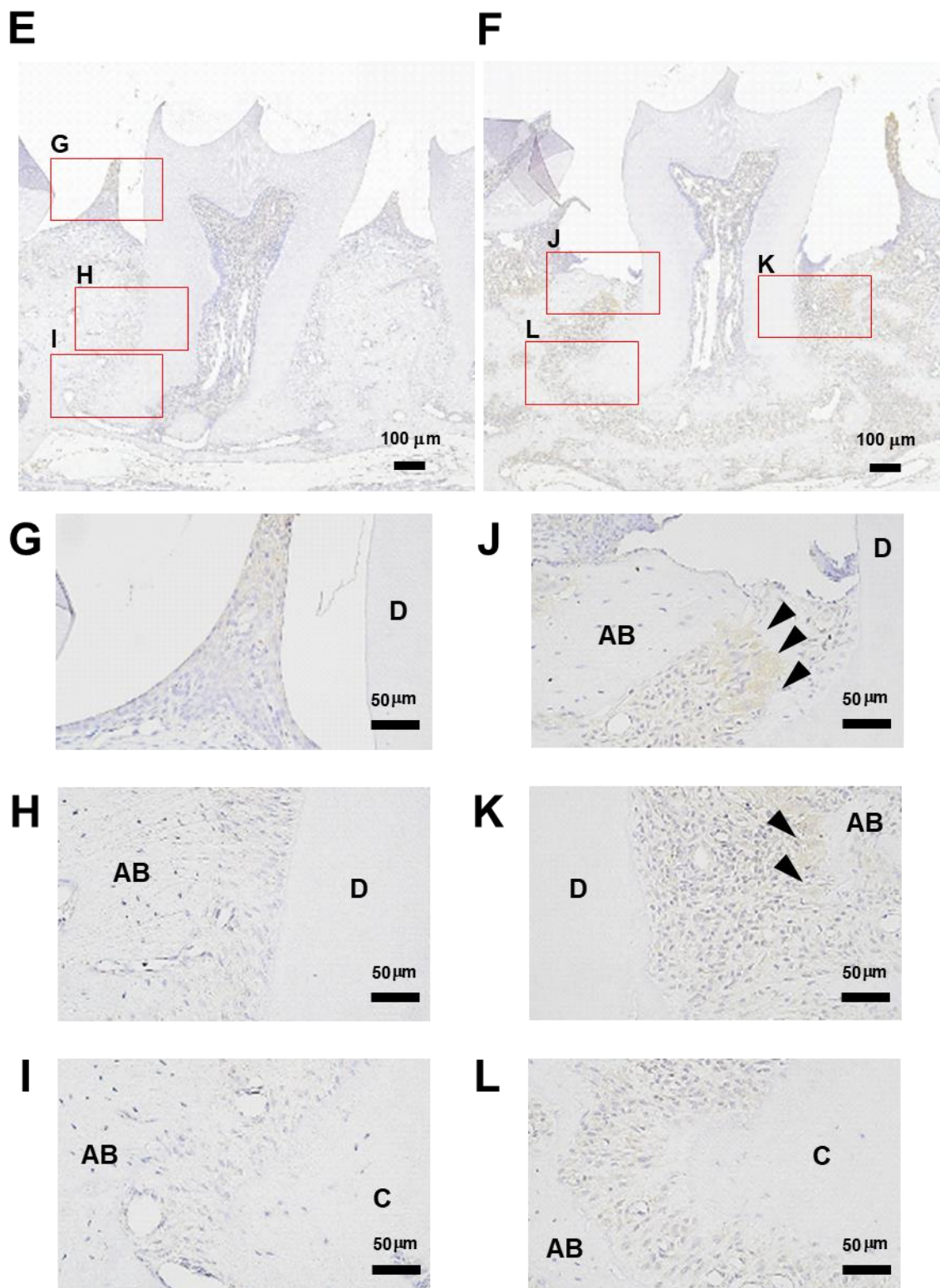


図 4. 絹糸結紮マウス歯周炎モデルにおける FPR2 発現

8 週齢 C57BL6/J 雄性マウスの上顎左側第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、7 日後に上顎骨を採取し薄切片を作製した。実験の対照群は非結紮の右側上顎骨とし、非結紮側 (A、C、E、G-I)

および結紮側 (B、D、F、J-L) の *Fpr2*mRNA 発現 (A-D) および FPR2 発現 (E-L) を示す。

A および B に示された黄枠内の拡大像を示す (C、D)。

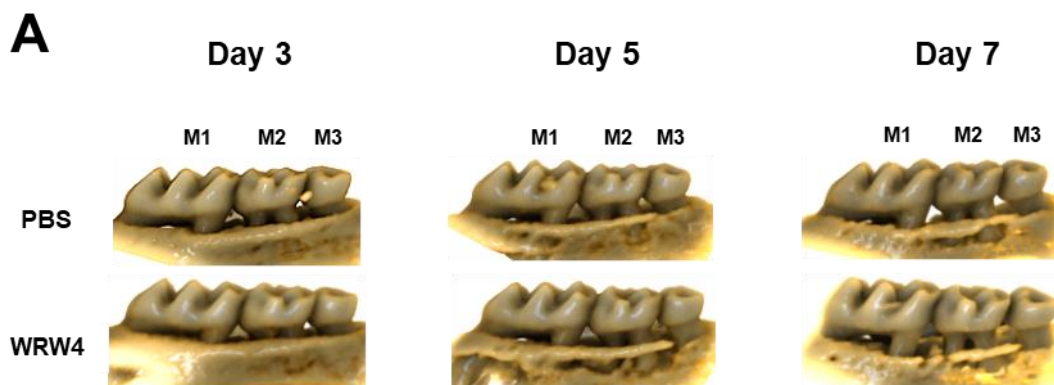
E および F に示された赤枠内の上皮および上皮結合組織 (G、J)、歯冠側歯根膜 (H、K)、および根尖側歯根膜 (I、L) の拡大像を示す。

矢頭：多核巨細胞、PDL：歯根膜、AB：歯槽骨、D：象牙質、C：セメント質

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。

## 2. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおける FPR2 の機能解析

次に ANXA1 による FPR2 シグナル活性化が、歯周病の病態形成過程に担う役割について検討するため、絹糸結紮マウス歯周病モデルにおける FPR2 の機能解析を行った。すなわち、同モデルに対し、FPR2 選択的阻害薬である WRW4 を連日皮下投与し、歯周組織に対するマイクロ CT 解析および組織学的解析を行った。なお、対照群には PBS を投与した。マイクロ CT 解析の結果、結紮 3 日後には、非結紮側と比較し、結紮側において有意な歯槽骨吸収が認められたが、WRW4 投与による影響は認められなかった。結紮 5 日後には対照群において顕著な歯槽骨吸収が観察され、その歯槽骨吸収は WRW4 投与群において有意に亢進した。結紮 7 日後には、対照群、WRW4 投与群のいずれにおいても根尖付近に至る歯槽骨吸収を認め、WRW4 投与による影響は認めなかった (図 5)。



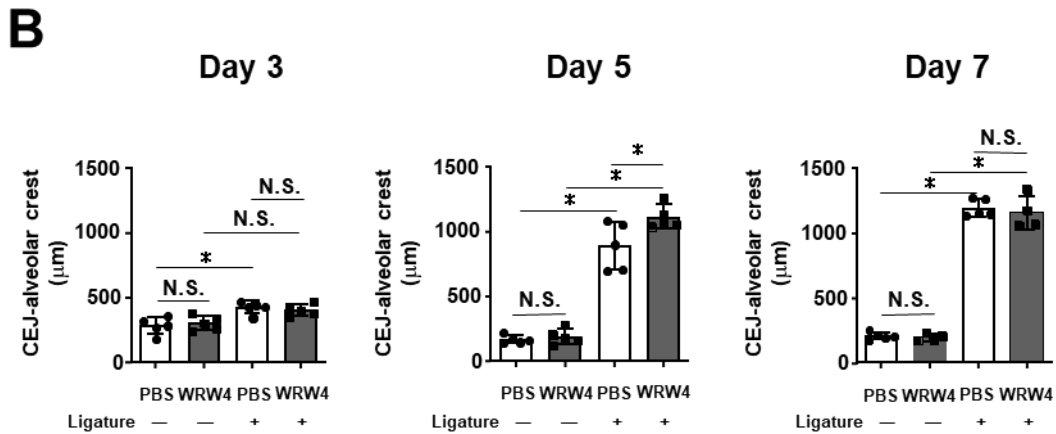


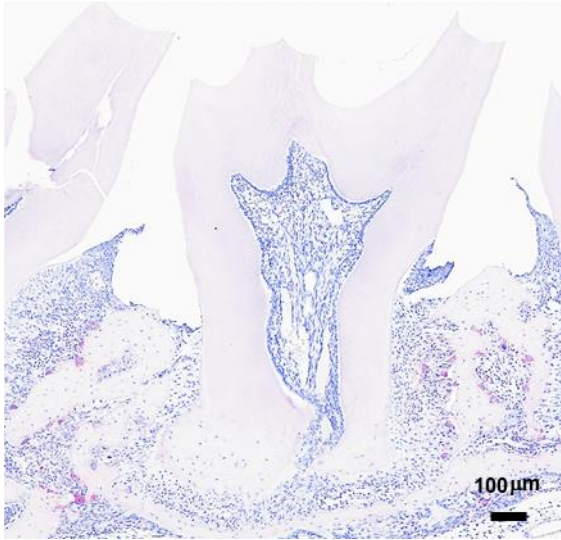
図 5. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおいて WRW4 投与が歯槽骨吸収に及ぼす影響

8 週齢 C57BL6/J 雄性マウスの上顎左側第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮後、FPR2 選択的阻害剤 WRW4 を連日皮下投与し、3 日後、5 日後、7 日後に上顎骨を採取した。マイクロ CT による代表的な三次元構築像 (A)、およびセメント-エナメル境から歯槽骨頂までの距離を定量解析した結果 (B) を示す。なお、実験の対照群には PBS を投与した。

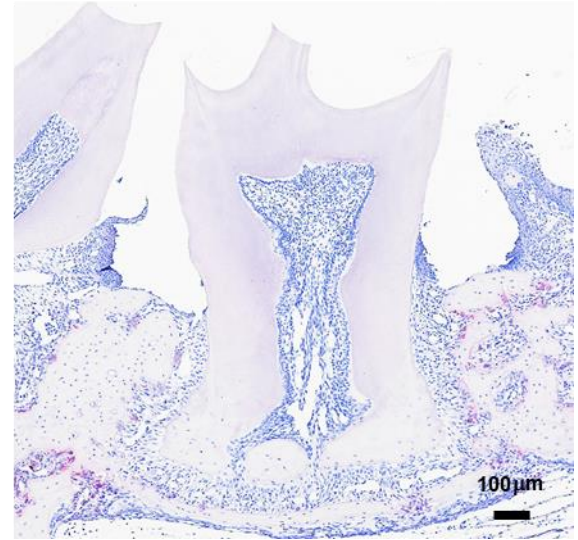
\*  $p < 0.05$ 、N.S. : not significant、 $n = 4-5$ 。

次に、WRW4 投与により歯槽骨吸収に差を認めた結紮 5 日後の薄切切片を製作し、TRAP 染色および HE 染色による組織学的な解析を行った。TRAP 染色の結果、WRW4 投与群の歯槽骨表面には対照群と比較して有意に多い破骨細胞が観察された (図 6A、B、E)。さらに、上顎第二後臼歯近遠心の歯根膜に存在する血管数と一血管あたりの面積について HE 染色像をもとに解析を行った。その結果、WRW4 投与により歯根膜に存在する血管数に影響を及ぼさなかった (図 6F) が、1 血管あたりの面積が有意に増加することが明らかとなった (図 6G)。

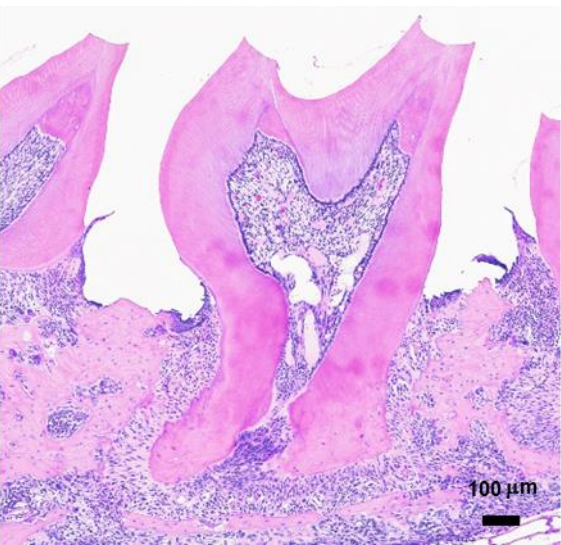
**A**



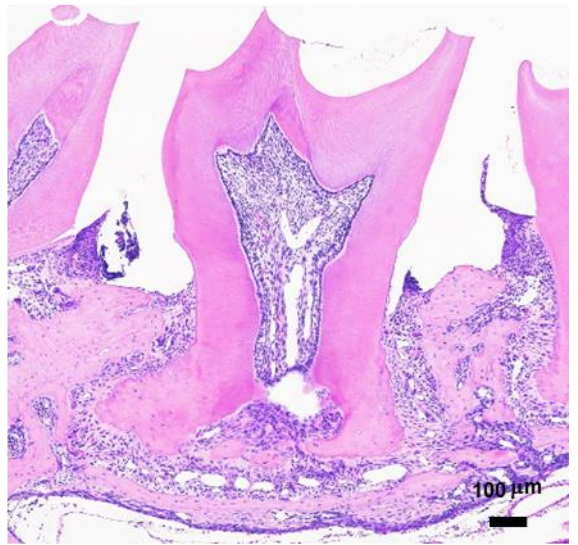
**B**



**C**



**D**



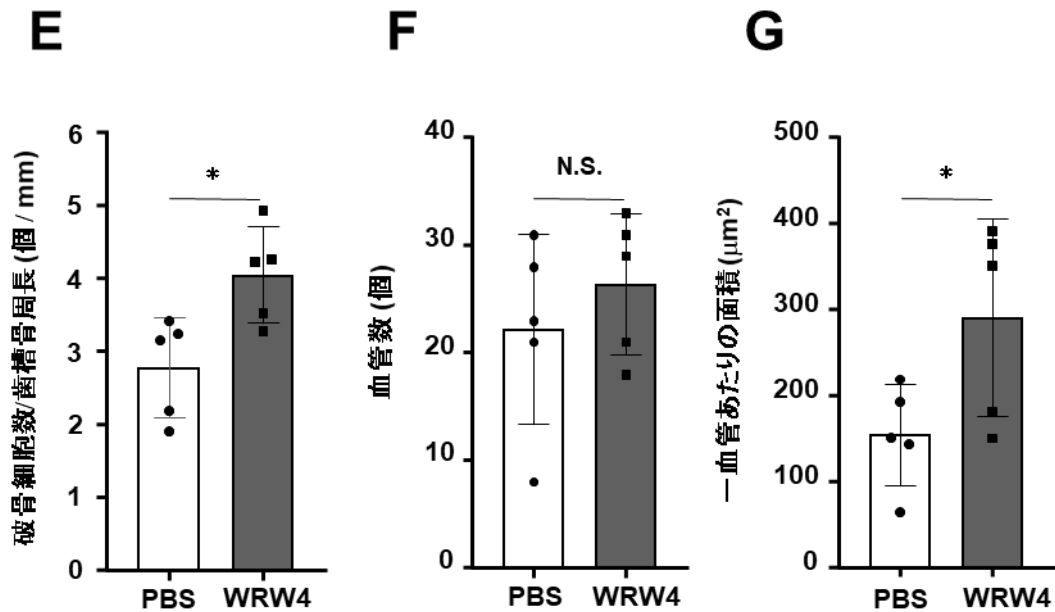


図 6. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおいて WRW4 投与が歯槽骨表面の破骨細胞数および歯根膜の血管数、血管面積に及ぼす影響

8 週齢 C57BL6/J 雄性マウスの上顎左側第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮後、FPR2 選択的阻害剤 WRW4 を連日皮下投与し、5 日後に上顎骨を採取した。対照群 (A、C) および WRW4 投与群 (B、D) の上顎左側第二後臼歯周囲の TRAP 染色像 (A、B)、および HE 染色像 (C、D) を示す。また、材料および方法に記載した方法により算出した歯槽骨表面の破骨細胞数 (E) および歯根膜の血管数 (F) と一血管あたりの面積 (G) を示す。

\*  $p < 0.05$ 、N.S. : not significant、 $n=5$ 。

次に FPR2 シグナルを増強させることが、歯周病の病態形成にいかなる影響を及ぼすか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、マイクロ CT 解析により歯槽骨吸収量に及ぼす影響を解析した。なお、対照群には PBS を投与した。その結果、PBS 投与群と比較し、Ac2-26 投与群では歯槽骨吸収が有意に抑制されることが明らかとなった (図 7)。

以上の結果から、FPR2 シグナルが歯周病の進行の抑制に関与することが示唆された。

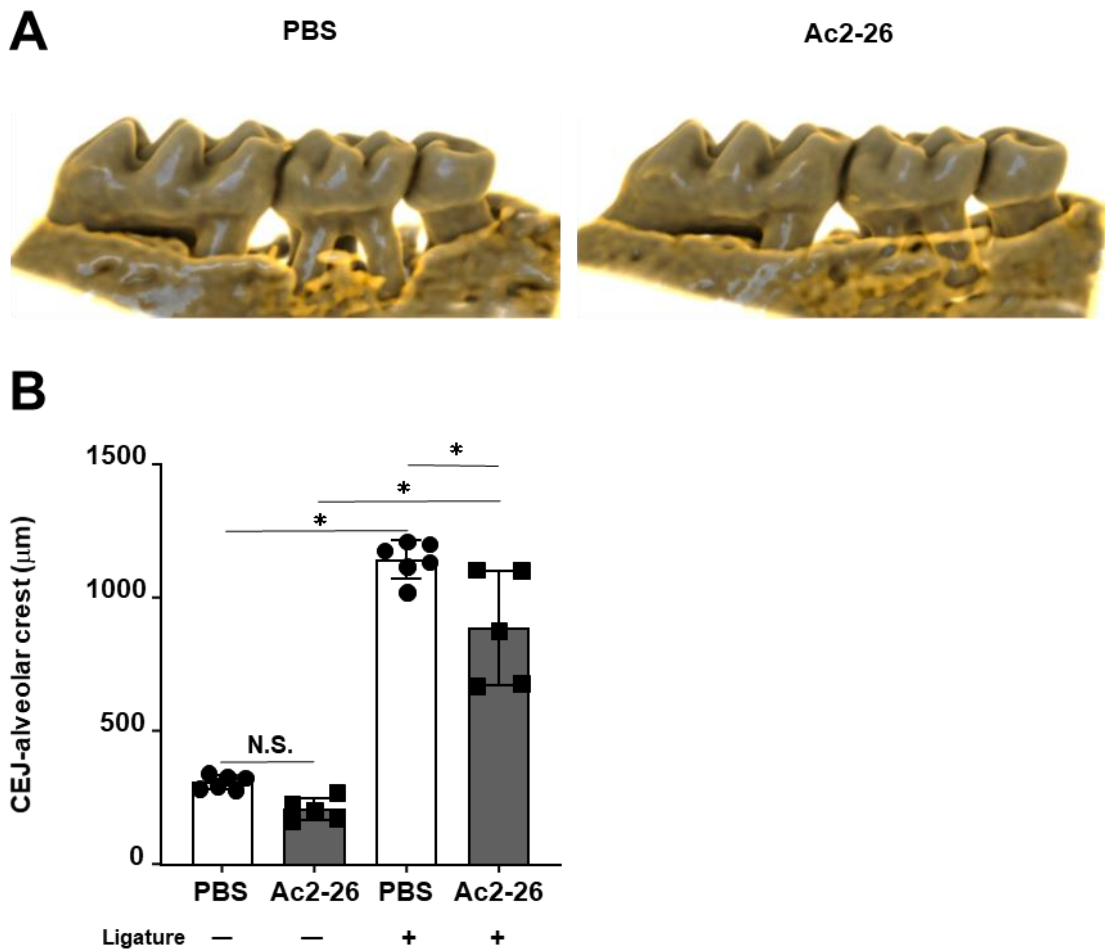


図 7. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおいて Ac2-26 投与が歯槽骨吸収に及ぼす影響

8 週齢 C57BL6/J 雄性マウスの上顎左側第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮後、ANXA1 N 末端模倣ペプチド Ac2-26 を連日皮下投与し、7 日後に上顎骨を採取した。マイクロ CT による代表的な三次元構築像 (A)、およびセメント-エナメル境から歯槽骨頂までの距離を定量解析した結果 (B) を示す。なお、実験の対照群には PBS を投与した。\*  $p < 0.05$ 、 $n = 5-6$ 。

### 3. 炎症性サイトカインが HPDL からの ANXA1 産生に及ぼす影響

炎症性サイトカイン刺激が HPDL からの ANXA1 産生に及ぼす影響について検討するため、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  存在下で HPDL を 24 時間培養し、培養上清に含まれる ANXA1 濃度を ELISA 法で解析した。その結果、無刺激と比較し、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  のいずれの刺激においても HPDL の培養上清中の ANXA1 濃度は有意に上昇した。なかでも IL-1 $\beta$  刺激により ANXA1 の顕著な上昇を認めた (図 8)。なお、上記炎症性サイトカイン存在下で 24 時間培養した際に、細胞死などの細胞毒性を疑うような細胞形態の変化は認めなかった (結果には示さず)。このことから、炎症性サイトカイン刺激により、HPDL からの

ANXA1 産生が亢進することが明らかとなった。

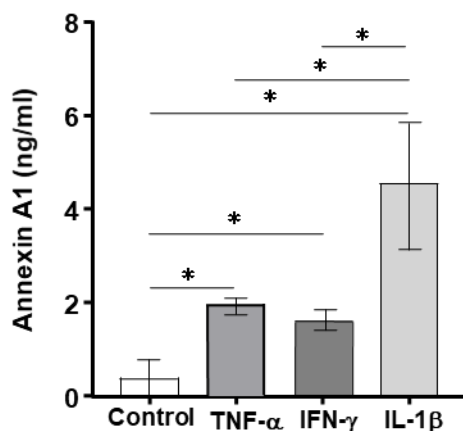
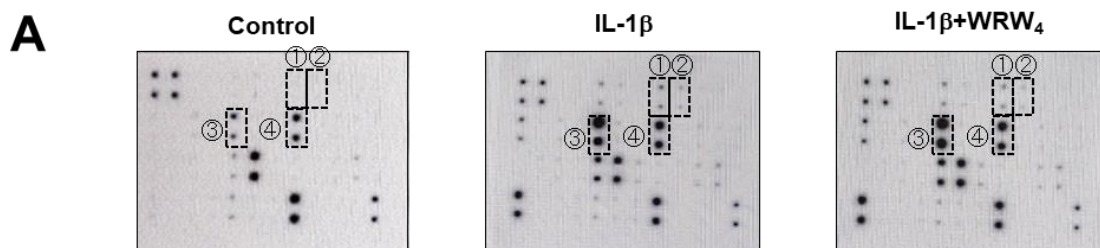


図 8. 炎症性サイトカイン刺激が HPDL からの ANXA1 産生に及ぼす影響

HPDL を、無刺激あるいは 40 ng/ml TNF- $\alpha$ 、20 ng/ml IFN- $\gamma$ 、20 ng/ml IL-1 $\beta$ 存在下で 24 時間培養した際の培養上清中の ANXA1 濃度を示す。各群、triplicate でサンプル採取し、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。結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。\* $p$ <0.05。

#### 4. 内因性 FPR2 シグナルが制御する HPDL 由来炎症メディエーターの同定

内因性 FPR2 シグナルが HPDL から産生される如何なる炎症メディエーターを制御するのかについて検討するため、HPDL を WRW4 で前処理後、IL-1 $\beta$ 存在下で培養し、培養上清に含まれる炎症メディエーターについて抗体アレイを用いてスクリーニングを行った。その結果、IL-1 $\beta$ 存在下で培養上清中の濃度が上昇し、WRW4 の前処理によりさらに濃度上昇する炎症メディエーターとして、sICAM-1、GM-CSF、IL-6、IL-8 が示唆された (図 9A、B)。この結果を定量的に検証するため、培養上清に含まれるこれら 4 種類の炎症メディエーターの濃度を ELISA 法にて解析した。その結果、WRW4 の前処理により IL-1 $\beta$ 存在下で培養上清中の濃度が有意に上昇するのは GM-CSF および IL-8 であることが明らかとなった (図 9C)。



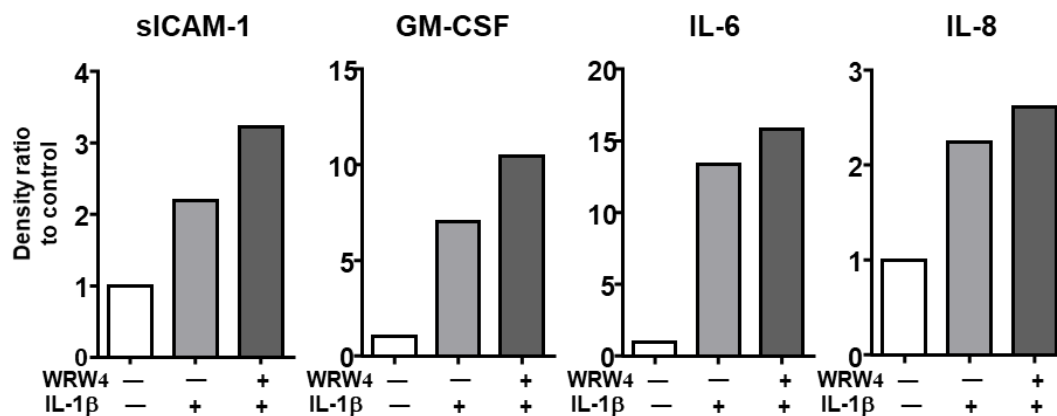
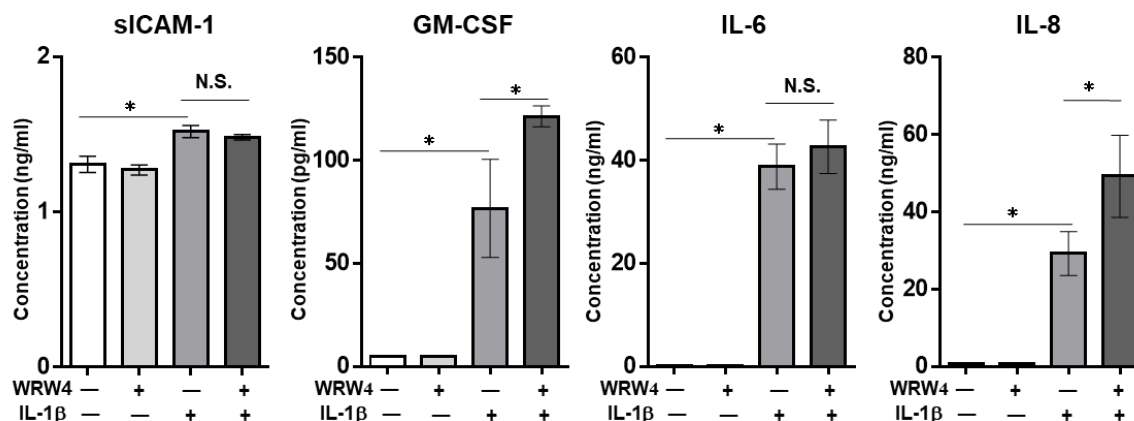
**B****C**

図9. WRW4 前処理により HPDL にて発現上昇する IL-1β誘導性炎症メディエーターの同定

100 ng/ml WRW4 で 1 時間の前処理あるいは未処理の HPDL を、10 ng/ml IL-1β存在あるいは非存在下で 24 時間刺激した際の培養上清を回収し、抗体アレイで解析を行ったメンブレンの写真 (A) を示す。①は sICAM-1、②は GM-CSF、③は IL-6、④は IL-8 を示す。抗体アレイで得られたドットのうち sICAM-1、GM-CSF、IL-6、IL-8 のドットの画像解析結果 (B) および同 4 因子の ELISA による定量解析結果 (C) を示す。

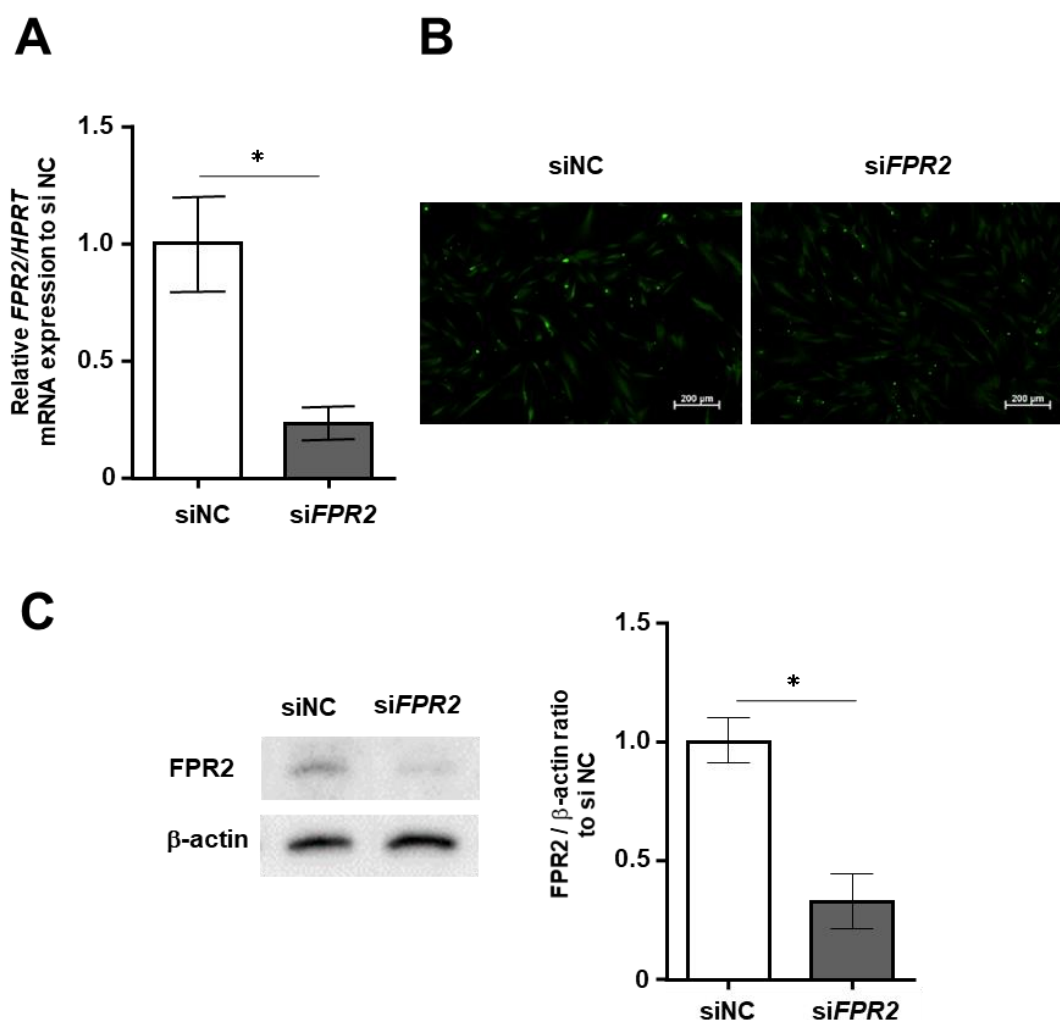
ELISA の結果は、各群、triplicate でサンプル採取し、3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示し、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

\* $p < 0.05$ , N.S. : not significant.

## 5. 内因性 FPR2 シグナルが HPDL からの IL-1β誘導性 IL-8 産生に及ぼす影響

前項 4 にて得られた結果を検証するために、siRNA 導入により FPR2 発現を抑制した HPDL (siFPR2) を作製した。なお、コントロールは negative control

siRNA を導入した HPDL (siNC) とした。siRNA 導入による FPR2 の発現抑制効果を検討した結果、RT-PCR 法により *siFPR2* における *FPR2* mRNA の発現は siNC と比較し有意に抑制されていることが明らかとなり (図 10A)、免疫蛍光細胞染色法および Western blot 法による解析から、タンパクレベルにおいてもその抑制が確認された (図 10B、C)。そこで、*siFPR2* および siNC の両細胞を IL-1 $\beta$  存在下で培養し、IL-8 産生について検討した。RT-PCR 法の結果より、IL-1 $\beta$  誘導性 *IL-8* の発現は、siNC と比較し *siFPR2* で有意に上昇した (図 10D)。また ELISA 法の結果より、培養上清中の IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 濃度は siNC と比較し *siFPR2* で有意に上昇した (図 10E)。以上の結果から、HPDL における内因性の FPR2 シグナルが IL-8 の産生を抑制することが示唆された。



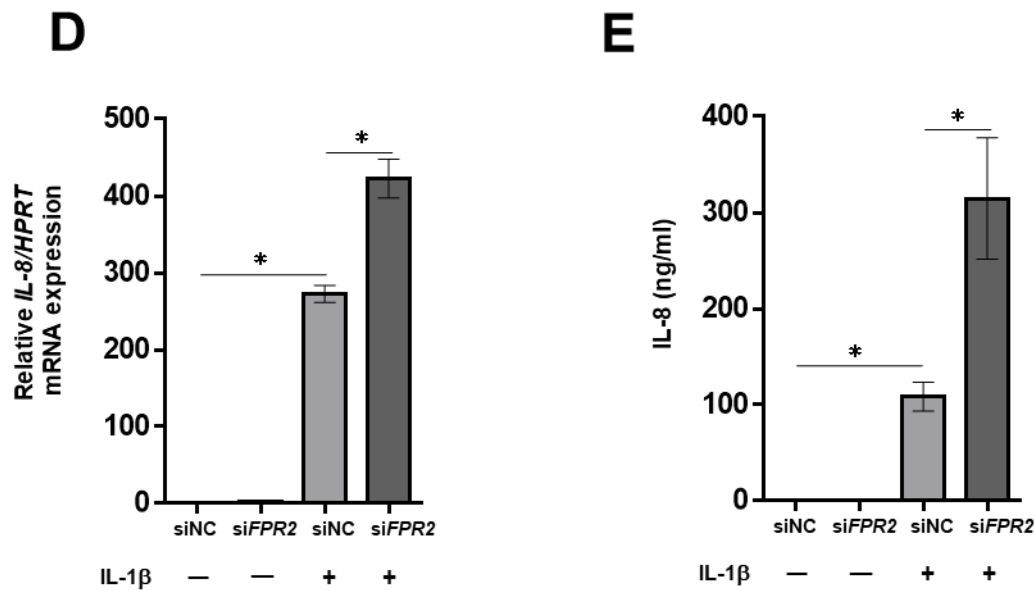


図 10. FPR2 発現抑制 HPDL における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 産生

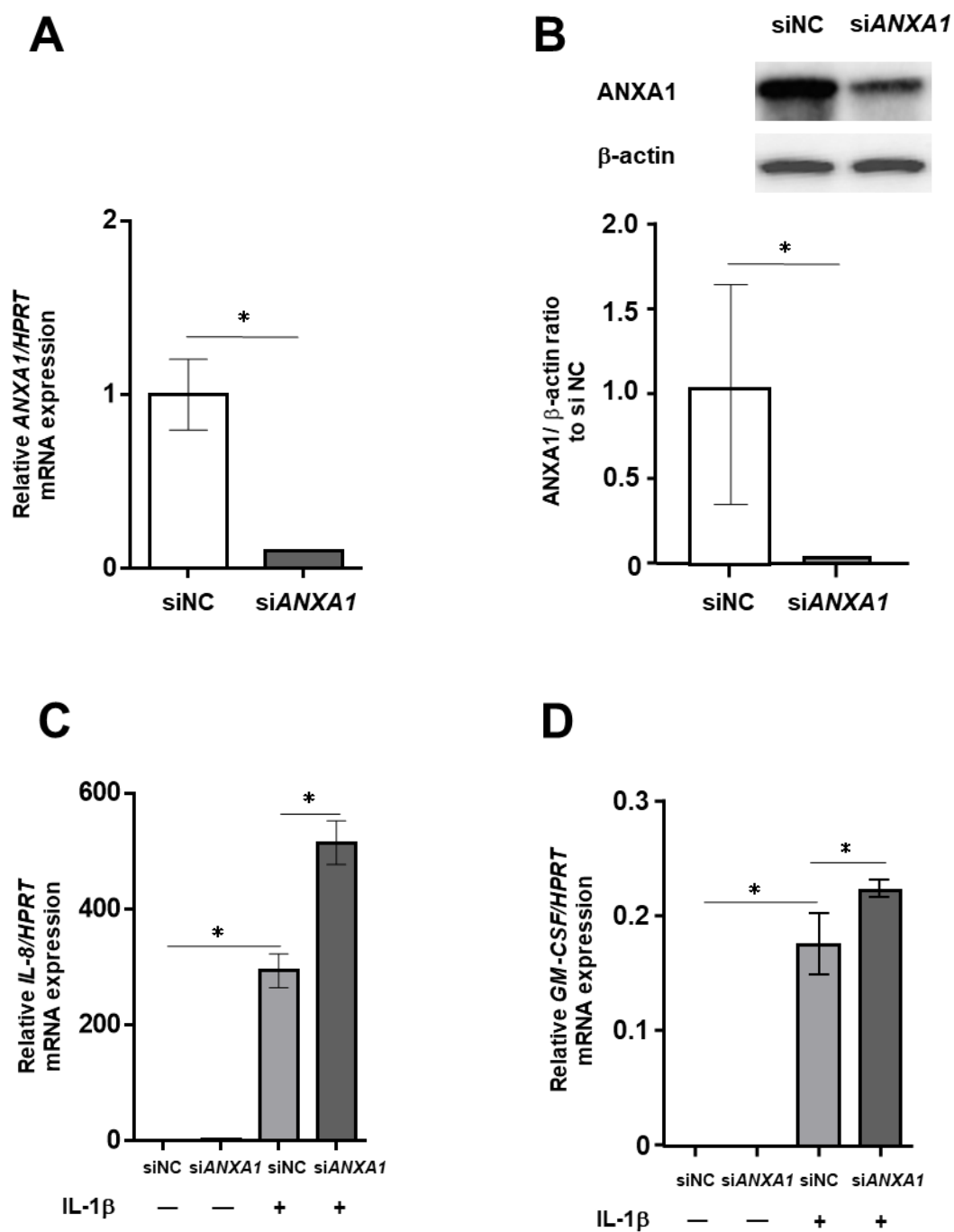
HPDL に *FPR2* siRNA あるいは negative control siRNA をそれぞれ導入し FPR2 抑制 HPDL (si*FPR2*) およびコントロール細胞 (siNC) を作製した。si*FPR2* および siNC における *FPR2* mRNA 発現 (A) を siNC における遺伝子発現量を 1 としたときの相対量として示す。また si*FPR2* および siNC における FPR2 タンパク発現を細胞免疫染色法 (B) あるいは Western blot 法 (C) で解析した結果を示す。C の定量解析結果は siNC における発現を 1 としたときの相対量として示す。さらに、si*FPR2* および siNC を 10 ng/ml IL-1 $\beta$  存在あるいは非存在下で 6 時間培養した際の *IL-8* mRNA 発現 (D) および 12 時間培養した際の培養上清中の IL-8 濃度 (E) を示す。各群、triplicate でサンプル採取し、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。\* $p < 0.05$ 。

## 6. ANXA1 が HPDL からの IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8、GM-CSF 産生に及ぼす影響

続いて siRNA 導入により ANXA1 発現を抑制した HPDL (si*ANXA1*) を作製した。なお、コントロールは前項 5 と同様に siNC とした。siRNA 導入による ANXA1 発現の抑制効果を検討した結果、si*ANXA1* における *ANXA1* mRNA 発現は、siNC に比べて有意に抑制されており (図 11A)、Western blot 法による解析からタンパクレベルにおいても、その抑制が確認された (図 11B)。

次に、si*ANXA1* および siNC の両細胞を IL-1 $\beta$  存在下で培養し、IL-8、GM-CSF 産生について検討した。RT-PCR 法の結果より、IL-1 $\beta$  誘導性の *IL-8* mRNA および *GM-CSF* mRNA の発現は siNC と比較し si*ANXA1* で有意に上昇した (図 11C、D)。また ELISA 法の結果より、培養上清中の IL-8 および GM-CSF 濃度も siNC と比較し si*ANXA1* において有意に上昇した (図 11E、F)。

さらに、siANXA1で認められたIL-1 $\beta$ 誘導性のIL-8の産生亢進は、ANXA1 N末端模倣ペプチドAc2-26で前処理することにより有意に抑制された(図11G)。以上の結果から、HPDLにおいてANXA1はIL-1 $\beta$ 誘導性のIL-8およびGM-CSFの産生を負に制御する役割を担うことが示唆された。



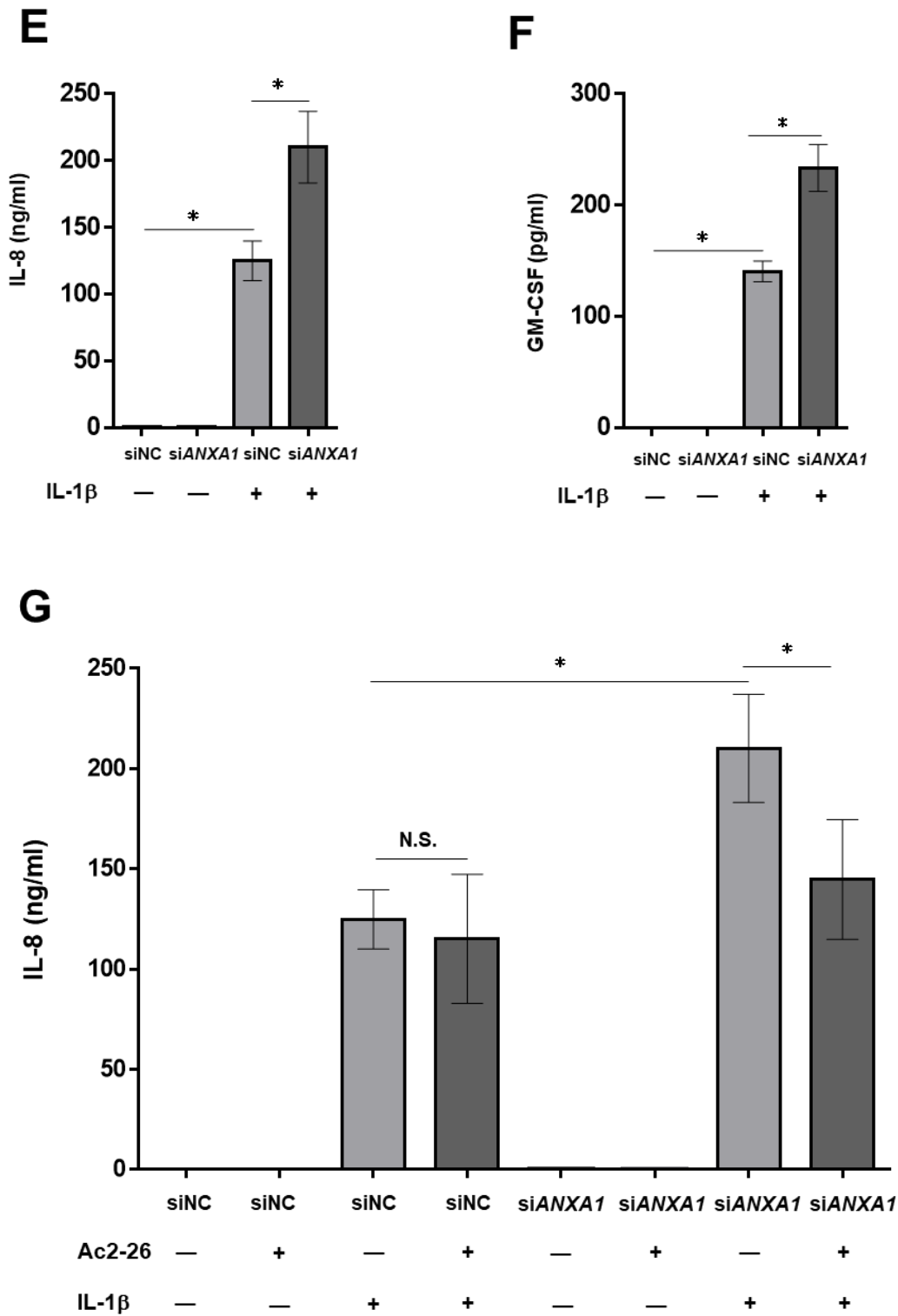


図 11. ANXA1 発現抑制 HPDL における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8、GM-CSF 産生  
 HPDL に *ANXA1* siRNA あるいは negative control siRNA をそれぞれ導入し ANXA1 抑制 HPDL (*siANXA1*) およびコントロール細胞 (*siNC*) を作製した。*siANXA1* および *siNC* にお

ける *ANXA1* mRNA 発現 (A) を siNC における遺伝子発現量を 1 としたときの相対量として示す。また、si*ANXA1* および siNC における *ANXA1* タンパク発現を Western blot 法で解析した結果 (B) を示す。B の定量解析結果は siNC における発現を 1 としたときの相対量として示す。si*ANXA1* および siNC を 10 ng/ml IL-1 $\beta$  存在あるいは非存在下で 6 時間培養した際の *IL-8* mRNA (C)、*GM-CSF* mRNA (D) および 24 時間培養した際の培養上清中の IL-8 濃度 (E)、GM-CSF 濃度 (F) を示す。さらに、si*ANXA1* および siNC を 1  $\mu$ g/ml Ac2-26 にて 15 分間前処理あるいは未処理後、10 ng/ml IL-1 $\beta$  存在あるいは非存在下で 24 時間培養した際の培養上清中の IL-8 濃度 (G) を示す。各群、triplicate でサンプル採取し、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。\* $p < 0.05$ 。

## 考察

歯周病は、歯周病原性細菌に対する炎症反応の遷延化によって病態が進行する慢性炎症疾患であり、数多くの宿主因子が疾患の感受性や活動性に深く関与することが知られている<sup>27,28</sup>。本研究は、歯周組織の恒常性維持の中心的役割を担っている歯根膜に焦点をあて、その炎症反応制御機構の一端を解明しようとするものである。炎症歯根膜組織を対象としたオミックス解析の結果を足掛かりに、同上組織における ANXA1 とその受容体である FPR2 の発現と機能について *in vivo*、*in vitro* の両面で解析を行い、ANXA1-FPR2 シグナルが歯周組織における炎症反応の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を見出した。

絹糸結紮マウス歯周病モデルにおける ANXA1 および FPR2 の発現について組織学的に解析した結果から、両分子が絹糸結紮の有無に関わらず歯肉上皮に高発現していることが明らかとなった (図 3、4)。Balta ら<sup>29</sup>は、ヒトの健全な歯肉上皮組織に FPR2 が発現していることに加え、FPR2 の活性化がヒト歯肉上皮細胞から抗菌ペプチドの産生を促すと報告している。また、FPR は、細菌由来ペプチドを認識し自然免疫を誘導する役割を担うこと<sup>30</sup>から生体防御の最前線で細菌と対峙する上皮組織に高発現することは、細菌感染に対する防御の観点から重要であると考えられる。さらに、その内因性リガンドである ANXA1 が恒常的に発現していることは、歯肉上皮における ANXA1-FPR2 シグナルが歯周病発症の初期段階に生体防御の役割を担っていることを示唆している。しかしながら、本研究では、歯周炎初期段階と考えられる絹糸結紮 3 日目の歯槽骨吸収量に関し、WRW4 投与の影響は認められなかった (図 5)。絹糸結紮歯周病モデルを無菌動物に実施した場合、上皮組織の破壊が生じるものの上皮下結合組織における炎症や歯槽骨の破壊は限定的となる<sup>31</sup>ことから、同モデルでは口腔内の常在菌が絹糸結紮による創傷によって結合組織内に侵入し炎症を誘導することにより歯周炎が生じるものと考えられる。このことから、歯周病発症における上皮組織の機能について検討するには、本絹糸結紮モデルは不適である可能性が示唆されている。今後、歯肉上皮における ANXA1-FPR2 シグナルの機能を明らかにするためには、歯周病原性細菌感染による歯周病モデル<sup>32</sup>等を用いた解析が必要になるものと考えられる。

絹糸結紮マウス歯周病モデルの組織学的解析の結果、上皮下結合組織には多量の炎症細胞の浸潤が観察され (図 2)、ANXA1 の免疫染色像から、これらの炎症浸潤細胞の細胞内に ANXA1 の高い発現が認められた (図 3)。絹糸結紮後に歯周組織に浸潤する細胞の多くは好中球、単球、マクロファージであり<sup>33-35</sup>、これら自然免疫に寄与する細胞群には ANXA1 が発現し<sup>13,36</sup>、細胞内 ANXA1 は

コアドメインの細胞膜への結合を介して経内皮移動に重要な役割を果たす<sup>37</sup>ことが報告されている一方で、LPS等の刺激により活性化されることでANXA1は細胞外に放出されることが報告されている<sup>12</sup>。絹糸結紮によって上皮結合組織および歯根膜においてANXA1の転写レベルからの発現亢進が観察され(図3)、*in vitro*の解析において炎症性サイトカインによる刺激がHPDLによるANXA1産生を活性化させたこと(図8)から、炎症歯周組織におけるANXA1は、炎症浸潤細胞のみならず、歯根膜細胞を含む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。すなわち、歯周病の進行に伴い歯周組織に遊走を果たしたマクロファージ等の免疫担当細胞から分泌された炎症性サイトカインに反応して歯根膜細胞からのANXA1の産生が誘導されるものと考えられる。本研究では、HPDLからのANXA1産生を活性化する炎症性サイトカインとしてTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ を明らかにしたが、他の細胞種を用いた研究ではIL-6やLPSがANXA1の産生を誘導する一方でTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ の刺激では効果がないことが報告されている<sup>12</sup>。予備実験にてHPDLに対し、IL-6およびLPS刺激下でのANXA1産生を検討したが、その効果は認められなかったことから、細胞種ごとにANXA1産生に及ぼす因子が異なるものと考えられる。本研究では、主にHPDLを用いた解析にとどまったが、今後、歯肉線維芽細胞やセメント芽細胞など他の歯周組織構成細胞を用いた解析を推進することにより、歯周組織におけるANXA1産生についてさらに検討する必要があるものと考えている。

本研究では、FPR2の歯周組織における発現も、ANXA1と同様に、絹糸結紮後の炎症歯周組織において上昇することが明らかとなった(図4)。本研究では、如何なるシグナルが歯周組織におけるFPR2の発現上昇に関与するかについて検討するには至らなかったが、滑膜細胞を用いた実験ではTNF- $\alpha$ 刺激がFPR2の発現を誘導することが報告される<sup>38</sup>一方で、上皮細胞を用いた研究ではIL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ がFPR2の転写を活性化するという報告もある<sup>39</sup>。このような細胞種によって異なるFPR2発現制御機構にはエピジェネティックな調整が関与するとの報告もある<sup>40</sup>ことから、研究対象とする組織や細胞種ごとにFPR2の発現について詳細を検討する必要があると考えられている。FPR2が抗炎症作用を有することから、その発現低下が病態の進行につながる可能性があるという疾患が存在する<sup>41,42</sup>一方で、動脈硬化病変<sup>43</sup>や炎症性滑膜組織<sup>37</sup>では健常組織に比べFPR2の発現が増加するため、FPR2の人為的な活性化が病態の改善につながると期待されている疾患もある。本研究にて明らかとなった歯周病の進行過程におけるFPR2の発現上昇という結果から歯周病は後者にあたり、Ac2-26の投与による歯槽骨吸収の抑制効果(図7)もこれを裏付けるものと考えられる。

絹糸結紮マウス歯周病モデルに対してFPR2阻害薬であるWRW4を投与す

ることにより、結紮 3 日後、7 日後には歯槽骨の吸収に差を認めず、5 日後に歯槽骨吸収の有意な亢進を認めた (図 5)。ANXA1 および FPR2 の発現を経時的に解析した結果 (結果には示さず) から、歯肉や歯根膜における両分子の経時的な発現上昇が認められたものの、結紮 5、7 日後に認められたような顕著な発現は結紮 3 日後には観察されなかった。このことが WRW4 投与による内因性 FPR2 シグナル阻害の効果が結紮 5 日後まで観察されなかった理由なのではないかと推察される。一方で、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、このモデルにより評価できる歯槽骨吸収量の限界を示していたことから、WRW4 投与がさらなる歯槽骨吸収を誘導するか否かについて評価できなかったものと考えられる。なお、本研究では WRW4 を皮下投与していることから、同試薬の効果は全身のすべての FPR2 に作用しているものと考えられ、歯周組織に特異的な ANXA1-FPR2 シグナルの役割について、さらに検討するためには、ANXA1 あるいは FPR2 コンディショナル KO マウスを作製して検証することが必要と考えている。

歯槽骨吸収量に差を認めた結紮 5 日後の組織学的な解析から、WRW4 投与群における歯槽骨周囲の破骨細胞数の増加が確認されたこと (図 6E) は、マイクロ CT 解析で得られた歯槽骨吸収量の亢進を裏付ける結果であった。また、ANXA1 の N 末端ペプチドである Ac2-26 の投与は、結紮 7 日後の歯槽骨吸収を有意に抑制した (図 7)。これらの結果は、ANXA1-FPR2 シグナルが炎症性の歯槽骨吸収に対し抑制的に作用することを強く示唆している。Alhasan ら<sup>22</sup>は、人工関節周囲の骨溶解を対象とした研究から、ANXA1 が NF- $\kappa$ B シグナルの抑制と PPAR- $\gamma$ 経路の活性化により *in vitro* における破骨細胞分化を抑制することに加え、*in vivo* において Ac2-26 の投与が局所の炎症細胞浸潤および炎症性骨破壊を抑制することを報告しており、本研究で得られた結果の方向性と合致するものである。すなわち、ANXA1 は破骨細胞の分化を直接的に抑制する因子として機能するとともに、局所の炎症反応を抑制することで、歯周組織破壊を抑制したのではないかと考えられる。興味深いことに、絹糸結紮によって誘導された歯槽骨表面の多核巨細胞 (破骨細胞と考えられる) に、他の細胞よりも高い FPR2 の発現が観察された (図 4)。前述の Alhasan らのほか、FPR2 活性化が破骨細胞分化を抑制するという報告は複数ある<sup>23,44,45</sup>ものの、破骨細胞における FPR2 発現について詳細を解析した報告はなく、今後のさらなる研究が ANXA1-FPR2 シグナルを介した炎症性骨破壊制御の解明につながるものと期待される。

ANXA1-FPR2 シグナルが局所の炎症反応を制御するという点に関して、本研究では、*in vitro* における HPDL を用いた解析にて、ANXA1-FPR2 シグナルを抑制することにより IL-1 $\beta$ 誘導性の IL-8、GM-CSF の産生が亢進することを明

らかにした (図 9-11)。FPR2 シグナルの抑制により、歯根膜での IL-8 産生が亢進することは、好中球等の走化性の活性化につながり、WRW4 の投与が絹糸結紮後の歯根膜における一血管あたりの面積を増加させた (図 6) という結果を一部説明するものと考えられる。また、GM-CSF の産生を同シグナルが抑制する可能性が明らかとなったが、GM-CSF は M1 マクロファージの分化誘導に寄与する重要なサイトカインの一つである<sup>46</sup> ことに加え、ANXA1-FPR2 シグナルは AMPK の活性化を介して M2 型マクロファージを誘導することが報告されている<sup>47</sup> ことから、直接的あるいは間接的にマクロファージの形質を炎症型から修復型へ転換することで、局所の炎症を抑制しているのではないかと考察できる。

絹糸結紮マウス歯周病モデルでは、絹糸結紮により歯周組織の破壊が生じるが、その後絹糸を除去することにより、歯槽骨を含め歯周組織は結紮前の状態に治癒する。ANXA1-FPR2 シグナルは、マクロファージの形質転換等の機序を介して炎症収束作用あるいは創傷治癒促進作用を発揮すると報告されている<sup>47</sup> ことから、結紮した絹糸を除去した後の歯周組織の治癒過程に同シグナルが如何なる役割を担うかについて検討するための予備実験を行っている。すなわち、本研究と同様に 7 日間の絹糸結紮後に絹糸を除去し、同日より WRW4 を連日投与し、歯槽骨の回復をマイクロ CT にて解析した。その結果、WRW4 の投与が歯槽骨の回復に及ぼす影響は認められず、対照群と同様に WRW4 投与群でも歯槽骨の回復が観察された (結果には示さず)。絹糸結紮 7 日目のマウス歯周組織に浸潤が認められる細胞群は、自然免疫を担当するものが多くを占め、ヒトで見られるリンパ球を中心とした慢性炎症にまでは至っていない。また絹糸除去により上皮組織が治癒すれば起炎要因となる口腔常在菌の侵入経路は速やかに取り除かれることになる。歯周組織における ANXA1 および FPR2 の発現は歯肉上皮を除き、絹糸結紮による炎症を惹起することで誘導されたことを考慮すると、結紮除去後の治癒過程に WRW4 の効果が見られなかった一因として、同過程における ANXA1 および FPR2 の発現低下が考えられ、現在、組織学的な解析を継続している。一方で、糖尿病性腎症<sup>48</sup> やアテローム性動脈硬化症<sup>49</sup> などの慢性炎症疾患モデルを用いた解析から ANXA1-FPR2 シグナルの活性化による病態改善が報告されていることから、ヒトと同様な慢性歯周炎モデルを用いた解析が可能になれば、より臨床に近い知見が得られるものと期待される。

近年、ANXA1 の一塩基多型 (以下 SNP と略す) と慢性閉塞性肺疾患<sup>50</sup> や全身性エリテマトーデス<sup>51</sup> などの慢性炎症との関連性が指摘されている。我々の研究室では、侵襲性歯周炎患者の末梢血から DNA を採取し、侵襲性歯周炎ゲノムデータベースを構築している。今後、同データベースを用いて ANXA1 や FPR2 の SNP を検索し、侵襲性歯周炎との関連について検討したいと考えてい

る。一方で、炎症収束機能を期待し、**FPR2** の活性化を薬理作用とする薬剤の開発が進み、心筋梗塞や動脈硬化など治験が進行している疾患もある<sup>15</sup>。今後、**ANXA1-FPR2** シグナルの歯周病進行抑制効果およびその分子機序の詳細を明らかにすることが出来れば、同シグナル制御を介した宿主応答制御を作用機序とする新たな歯周病の治療薬の開発につながる重要な情報になるものと考えている。

## 結論

本研究の結果より、以下の結論を得た。

1. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおいて、対照側、結紮側ともに歯肉上皮で ANXA1 および FPR2 の発現を認め、また、対照側と比較し、結紮側において ANXA1 および FPR2 の発現が上昇することが明らかとなった。
2. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおいて、FPR2 選択的阻害剤の投与により、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、歯槽骨吸収は有意に亢進することが明らかとなった。
3. 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおいて、ANXA1 模倣ペプチドの投与により、歯槽骨吸収は有意に抑制されることが明らかとなった。
4. TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 刺激により HPDL における ANXA1 の発現は有意に上昇することが明らかとなった。
5. FPR2 選択的阻害剤の投与あるいは FPR2 発現抑制 HPDL において、IL-1 $\beta$ 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。
6. ANXA1 発現抑制 HPDL において、IL-1 $\beta$ 誘導性の IL-8、GM-CSF の産生が亢進し、同亢進は ANXA1 模倣ペプチド存在下で有意に抑制されることが明らかとなった。

以上のことから、歯周病の病態形成において歯周組織構成細胞で ANXA1 および FPR2 の発現が上昇し、そのシグナルを介して IL-8、GM-CSF などの炎症性サイトカイン産生が制御されるとともに、歯槽骨吸収が抑制されることが明らかとなった。このことから、ANXA1-FPR2 シグナルは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が明らかとなった。

## 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。

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大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、竹立匡秀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ご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. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17038.
2. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):59-94.
3. Iwayama T, Sakashita H, Takedachi M, Murakami S. Periodontal tissue stem cells and mesenchymal stem cells in the periodontal ligament. *Jpn Dent Sci Rev*. 2022;58:172-178.
4. Zhou M, Graves DT. Impact of the host response and osteoblast lineage cells on periodontal disease. *Front Immunol*. 2022;13:998244.
5. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013;394(1-2):49-54.
6. Kelly L, McGrath S, Rodgers L, et al. Annexin-A1: The culprit or the solution? *Immunology*. 2022;166(1):2-16.
7. Sousa SO, Santos MRD, Teixeira SC, Ferro EAV, Oliani SM. ANNEXIN A1: Roles in Placenta, Cell Survival, and Nucleus. *Cells*. 2022;11(13):2057.
8. Berg Klenow M, Iversen C, Wendelboe Lund F, et al. Annexins A1 and A2 Accumulate and Are Immobilized at Cross-Linked Membrane-Membrane Interfaces. *Biochemistry*. 2021;60(16):1248-1259.
9. McNeil AK, Rescher U, Gerke V, McNeil PL. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J Biol Chem*. 2006;281(46):35202-35207.
10. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(6):449-461.
11. D'Acquisto F, Perretti M, Flower RJ. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol*. 2008;155(2):152-169.
12. Solito E, Christian HC, Festa M, et al. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. *FASEB J*. 2006;20(9):1498-1500.
13. Gavins FN, Hickey MJ. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. *Front Immunol*. 2012;3:354.
14. Zhang M, Gao JL, Chen K, et al. A Critical Role of Formyl Peptide

- Receptors in Host Defense against *Escherichia coli*. *J Immunol*. 2020;204(9):2464-2473.
15. Qin CX, Norling LV, Vecchio EA, et al. Formylpeptide receptor 2: Nomenclature, structure, signalling and translational perspectives: IUPHAR review 35. *Br J Pharmacol*. 2022;179(19):4617-4639.
  16. Perretti M, Godson C. Formyl peptide receptor type 2 agonists to kick-start resolution pharmacology. *Br J Pharmacol*. 2020;177(20):4595-4600.
  17. Perretti M, Chiang N, La M, et al. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat Med*. 2002;8(11):1296-1302.
  18. Ni C, Gao S, Zheng Y, et al. Annexin A1 Attenuates Neutrophil Migration and IL-6 Expression through Fpr2 in a Mouse Model of *Streptococcus suis*-Induced Meningitis. *Infect Immun*. 2021;89(3) :e00680-20.
  19. Guido BC, Zanatelli M, Tavares-de-Lima W, Oliani SM and Damazo AS. Annexin-A1 peptide down-regulates the leukocyte recruitment and up-regulates interleukin-10 release into lung after intestinal ischemia-reperfusion in mice. *J Inflamm*. 2013;10(1):10.
  20. Kang JW, Lee SM. Resolvin D1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury by enhancing M2 macrophage polarization and efferocytosis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1861(9 Pt A):1025-1035.
  21. Mastromarino M, Lacivita E, Colabufo NA, Leopoldo M. G-Protein Coupled Receptors Involved in the Resolution of Inflammation: Ligands and Therapeutic Perspectives. *Mini Rev Med Chem*. 2020;20(20):2090-2103.
  22. Alhasan H, Terkawi MA, Matsumae G, et al. Inhibitory role of Annexin A1 in pathological bone resorption and therapeutic implications in periprosthetic osteolysis. *Nat Commun*. 2022;13(1):3919.
  23. Kao W, Gu R, Jia Y, et al. A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis. *Br J Pharmacol*. 2014;171(17):4087-4096.
  24. Headland SE, Jones HR, Norling LV, et al. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med*. 2015;7(315):315ra190.

25. Senchenkova EY, Ansari J, Becker F, et al. Novel Role for the AnxA1-Fpr2/ALX Signaling Axis as a Key Regulator of Platelet Function to Promote Resolution of Inflammation. *Circulation*. 2019;140(4):319-335.
26. Kawamoto T and Kawamoto K. Preparation of Thin Frozen Sections from Nonfixed and Undecalcified Hard Tissues Using Kawamoto's Film Method (2020). *Methods Mol Biol*. 2021;2230:259-281.
27. Yucel-Lindberg T, Bage T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013;15:e7.
28. Van Dyke TE. Shifting the paradigm from inhibitors of inflammation to resolvers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*. 2020;91 Suppl 1(Suppl 1):S19-S25.
29. Balta MG, Schreurs O, Hansen TV, et al. Expression and function of resolvin RvD1(n-3 DPA) receptors in oral epithelial cells. *European Journal of Oral Sciences*. 2022;130(4):e12883.
30. Bufe B, Schumann T, Kappl R, et al. Recognition of bacterial signal peptides by mammalian formyl peptide receptors: a new mechanism for sensing pathogens. *J Biol Chem*. 2015;290(12):7369-7387.
31. Rovin S, Costich ER and Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res*. 1966;1(3):193-204.
32. Polak D, Wilensky A, Shapira L, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol*. 2009;36(5):406-410.
33. Hiyoshi T, Domon H, Maekawa T, et al. Neutrophil elastase aggravates periodontitis by disrupting gingival epithelial barrier via cleaving cell adhesion molecules. *Sci Rep*. 2022;12(1):8159.
34. Miyajima S, Naruse K, Kobayashi Y, et al. Periodontitis-activated monocytes/macrophages cause aortic inflammation. *Sci Rep*. 2014;4:5171.
35. Yu T, Zhao L, Huang X, et al. Enhanced Activity of the Macrophage M1/M2 Phenotypes and Phenotypic Switch to M1 in Periodontal Infection. *J Periodontol*. 2016;87(9):1092-1102.
36. Spurr L, Nadkarni S, D'Acquisto F. Comparative analysis of Annexin A1-formyl peptide receptor 2/ALX expression in human leukocyte subsets. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(1):55-66.

37. Williams SL, Milne IR, Bagley CJ, et al. A proinflammatory role for proteolytically cleaved annexin A1 in neutrophil transendothelial migration. *J Immunol.* 2010;185(5):3057-3063.
38. O'Hara R, Murphy EP, Bresnihan B. Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(6):1788-1799.
39. Gronert K, Gewirtz A, Serhan C.N, et al. Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release. *J Exp Med.* 1998 ; 187(8), 1285–1294.
40. Simiele F, Recchiuti A, Patrino S, et al. Epigenetic regulation of the formyl peptide receptor 2 gene. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1859(10):1252-1258.
41. Petri MH, Thul S, Andonova T, et al. Resolution of Inflammation Through the Lipoxin and ALX/FPR2 Receptor Pathway Protects Against Abdominal Aortic Aneurysms. *JACC Basic Transl Sci.* 2018;3(6):719-727.
42. Planaguma A, Kazani S, Marigowda G, et al. Airway lipoxin A4 generation and lipoxin A4 receptor expression are decreased in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(6):574-582.
43. Petri MH, Laguna-Fernandez A, Gonzalez-Diez M, Paulsson-Berne G, Hansson GK, Back M. The role of the FPR2/ALX receptor in atherosclerosis development and plaque stability. *Cardiovasc Res.* 2015;105(1):65-74.
44. Hu J, Li X, Chen Y, et al. The protective effect of WKYMVm peptide on inflammatory osteolysis through regulating NF-kappaB and CD9/gp130/STAT3 signalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2020;24(2):1893-1905.
45. Liu C, Guan H, Li F, et al. Xiao J. Lipoxin A4 suppresses osteoclastogenesis in RAW264.7 cells and prevents ovariectomy-induced bone loss. *Exp Cell Res.* 2017;352(2):293-303.
46. Schloer S, Hubel N, Masemann D, et al. The annexin A1/FPR2 signaling axis expands alveolar macrophages, limits viral replication, and attenuates pathogenesis in the murine influenza A virus infection model. *FASEB J.* 2019;33(11):12188-12199.

47. McArthur S, Juban G, Gobbetti T, et al. Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *J Clin Invest.* 2020;130(3):1156-1167.
48. Wu L, Liu C, Chang DY, et al. Annexin A1 alleviates kidney injury by promoting the resolution of inflammation in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2021;100(1):107-121.
49. Fredman G, Kamaly N, Spolitu S, et al. Targeted nanoparticles containing the proresolving peptide Ac2-26 protect against advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Sci Trans Med.* 2015;7(275):275ra20
50. Kamel AA, Hashem MK, AbdulKareem ES, et al. Significant Interrelations among Serum Annexin A1, Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) and rs2070600 in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Biology.* 2022;11(12):1707.
51. Dhaffouli F, Hachicha H, Abida O, et al. Annexin A1 and its receptor gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus in the Tunisian population. *Clin Rheumatol.* 2022;41(5):1359-1369.