

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11997

研究課題名(和文) ANGPTL2が歯周病病態形成に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of ANGPTL2 on periodontal disease

研究代表者

山本 弦太 (Yamamoto, Genta)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：30421241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規慢性炎症関連因子としてアンジオポエチン様タンパク質2 (ANGPTL2) が報告され、そのシグナル制御によるがんや生活習慣病の新しい治療戦略の可能性が示唆されている。しかしながら、歯周病におけるANGPTL2の関与についてはほとんど知られていない。申請者は歯周病の病態形成におけるANGPTL2の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、歯周病原細菌*P. gingivalis* LPS刺激により歯肉上皮細胞からのANGPTL2産生量が増加し、歯肉上皮細胞へのオートクライン作用ならびに歯肉線維芽細胞へのパラクライン作用により慢性炎症の遷延、歯周組織破壊に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病において、「慢性炎症」を基盤とした全身疾患の発症や進展に寄与しているANGPTL2による制御が明らかとなれば、歯周病と全身疾患との関連性のメカニズムを解明するうえで有意義であり、本研究成果により、歯周病治療、口腔衛生指導ががん、糖尿病などの全身疾患の予防につながるとなれば、超高齢社会における医療費削減に大きな役割をなすと思われる。

研究成果の概要(英文)：Angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) has been reported as a novel chronic inflammatory factor, suggesting the possibility of new therapeutic strategies for cancer and lifestyle-related diseases through its signal regulation. However, little is known about the involvement of ANGPTL2 in periodontal disease. The applicant conducted a study to clarify the role of ANGPTL2 in the pathogenesis of periodontal disease. The results suggest that stimulation of periodontopathogenic bacteria *P. gingivalis* LPS increases ANGPTL2 production from gingival epithelial cells, and that it is involved in prolonged chronic inflammation and periodontal tissue destruction through autocrine effects on gingival epithelial cells and paracrine effects on gingival fibroblasts.

研究分野：歯周病学

キーワード：ANGPTL2 オートクライン パラクライン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんや生活習慣病などに共通する基本病態として「慢性炎症」が注目されており、新規慢性炎症関連因子としてアンジオポエチン様タンパク質 2 (ANGPTL2) が報告され、ANGPTL2 シグナル制御によるがんや糖代謝異常の新しい治療戦略の可能性が示唆されている。アンジオポエチン様タンパク質 (ANGPTLs) は血管新生因子であるアンジオポエチンに構造上類似する分泌型タンパク質で、これまでに 8 種類が同定されている。そのファミリーメンバーのひとつである ANGPTL2 は、身体の恒常性維持に重要なタンパク質であるが、過剰に産生されることでメタボリックシンドローム、糖尿病、動脈硬化性疾患などの生活習慣病やがんの発症や進展に関わることが明らかにされている (Tian Z et al., Nat Commun. 2016)。この ANGPTL2 は脂肪細胞をはじめとした種々の細胞から産生されることが知られており、がん細胞周囲の微小環境の変化により分泌され、分泌された ANGPTL2 はパラクライン効果により血管内皮細胞に作用して血管新生を促進させると同時に、がん細胞自身にもオートクラインに作用し、がん細胞の運動能を促進させることで、がん細胞の転移を促進すると考えられている (Endo M et al., Inflamm Regen. 2012)。このような背景から、ANGPTL2 の産生量や作用を抑制することによって新たな生活習慣病やがんの新規治療薬開発に繋がるものと期待されている。

一方、歯周病は、歯周病原細菌による慢性炎症性疾患であり、歯周組織の破壊および病的な歯槽骨吸収が引き起こされることが特徴である。また歯周病原細菌の病原因子である内毒素や歯周局所で産生される炎症メディエーターにより心臓・血管系疾患、糖尿病やがんなどの全身疾患のリスクが上昇することが報告されており (Fernandez-Solari et al., Mediators Inflamm. 2015) 1990 年代より歯周病と全身疾患との関わりはペリオドンタルメディシンとして歯科医科連携の重要なカギと考えられている。近年、メタボリックシンドロームを形成する個々の病態である肥満や糖尿病が歯周病を重症化させるとの報告が散見される。歯周病とがんとの関係については、歯周病の存在により膵臓がん 54%、腎臓がん 49%、肺がん 36%、血液がん 30% の発症リスクが高くなることの報告 (Michaud DS et al., Lancet Oncol. 2008) されているが、疫学研究中心でかつ数少ないのが現状である。また ANGPTL2 の骨への影響としてケモカインレセプターである CXCR4 シグナリングを介し、乳がん細胞の骨転移を増加することが報告されている (Masuda T et al., Sci Rep. 2015)。よって歯周組織においてもこの ANGPTL2 が産生されているならば、歯周病における歯槽骨吸収等にも関連する可能性が高いことが予想される。

### 2. 研究の目的

歯周病は、歯周病原細菌による慢性炎症性疾患であり、歯周組織の破壊および病的な歯槽骨吸収が引き起こされることが特徴である。しかしながら、「慢性炎症」を主病態とする歯周病において ANGPTL2 の関与についての報告はなかった。これらの背景から申請者は、このがんおよび生活習慣病に關与する ANGPTL2 に着目し、歯肉溝滲出液において検出されること、また歯肉上皮細胞において歯周病原細菌由来 LPS 刺激により産生されることなどを確認している。さらに歯周局所の ANGPTL2 および全身性の ANGPTL2 が歯周組織に及ぼす影響について基礎的研究を行い、ペリオドンタルメディシンについてのメカニズムを解明することで、歯周病における ANGPTL2 をターゲットにした新規治療法や創薬が開発されることを期待している。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト歯肉上皮細胞における ANGPTL2 の影響について

ヒト歯肉上皮細胞株である Ca9-22 を用い各種検討を行った。

ANGPTL2 レセプターあるインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を中和抗体にてブロックし歯周病原細菌由来 *P.gingivalis* LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生への影響を ELISA 法にて解析した。

バリア機能の評価として細胞接着分子に対する影響について、rANGPTL2 刺激における遺伝子発現の変化を qPCR 法にて解析した。

ANGPTL2 の歯周組織破壊に及ぼす影響について評価するため歯肉細胞外マトリックス破壊に關与する Matrix metalloproteinase (MMPs) 遺伝子発現の変化を qPCR 法にて解析した。

#### (2) RNA 干渉による ANGPTL2 発現に及ぼす影響について

ANGPTL2 産生に關わる候補因子として Macrophage migration inhibitory factor (MIF) 遺伝子抑制を行い、qPCR 法にて ANGPTL2 遺伝子発現の変化について検討し、歯周病における ANGPTL2 産生経路への影響について評価した。

#### (3) ANGPTL2 のパラクライン作用について

歯肉上皮細胞より産生される局所の ANGPTL2 が周囲の歯周組織に及ぼす影響について、歯肉固有層を構成するヒト歯肉線維芽細胞株 HGF を用い、rANGPTL2 刺激による炎症性サイトカイン産生への影響を qPCR 法、ELISA 法にて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト歯肉上皮細胞株における ANGPTL2 の影響について

ANGPTL2 のレセプターのひとつであるインテグリン $\alpha 5\beta 1$  を中和抗体にてブロックすることにより歯周病原細菌由来 *P.gingivalis* LPS 刺激後 24 時間において炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  のタンパク産生量が有意に抑制されることが確認された。

rANGPTL2 刺激により炎症性疾患の病態に密接に関与している ICAM-1、上皮細胞における細胞間接着因子である E-cadherin、高い細胞接着活性を有する laminin-5 など細胞間接着分子の遺伝子発現に変化は認められなかった。

rANGPTL2 刺激によりゼラチナーゼ B である MMP-9、コラゲナーゼ 3 である MMP-13 の遺伝子発現増強が認められた。一方、ゼラチナーゼ A である MMP-2 の遺伝子発現は増強傾向に留まった。

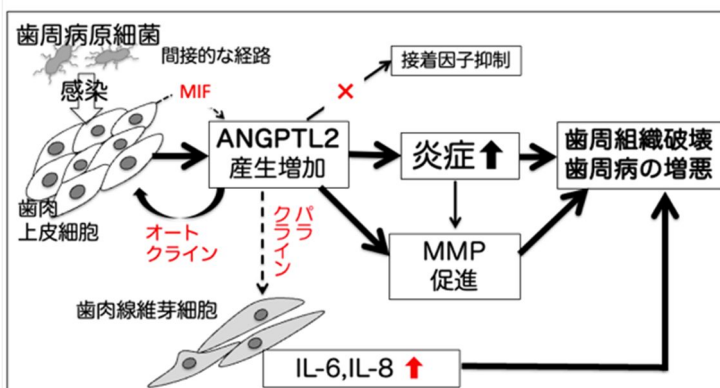
##### (2) RNA 干渉による ANGPTL2 遺伝子発現に及ぼす影響について

サイトカインアレイによって候補因子として挙げられた MIF を RNA 干渉によりノックダウンを行なったところ有意ではないものの ANGPTL2 遺伝子発現の抑制傾向が認められたが、タンパク産生量に差は認められなかった。

##### (3) ANGPTL2 のパラクライン作用について

rANGPTL2 を刺激因子として歯肉線維芽細胞株 HGF を刺激したところ、10 ng/ml までは濃度依存的に炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 遺伝子の発現増強が認められたが、高濃度の刺激下では非刺激と同程度まで遺伝子発現が低下した。一方、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現には変化が認められなかった。rANGPTL2 刺激による経時的変化を確認したところ、IL-6 遺伝子は 1 時間を、IL-8 遺伝子は 6 時間をピークに非刺激と比較し 10 倍以上の発現増強を認めた。またタンパク産生については IL-8 は培養上清中のタンパク産生量も有意な増加を認めたが、IL-6 は遺伝子発現増強に反して刺激後 1、3 時間でタンパク産生が抑制され 6 時間で回復する結果であった。

歯周病における ANGPTL2 の役割



上記に示すよう成果をまとめた。

歯周病の病態形成において、歯周病原細菌由来 *P.gingivalis* LPS 刺激によって歯肉上皮細胞から産生される ANGPTL2 は、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  産生増加ならびにタンパク分解酵素である MMP-9 や MMP-13 の活性化などにより歯周局所の炎症の増悪や組織破壊の進行に影響を及ぼすことが明らかとなった。また ANGPTL2 レセプターのひとつであるインテグリン $\alpha 5\beta 1$  をブロックすることで IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  産生が抑制されたことから、歯肉上皮細胞から産生される ANGPTL2 はさらにオートクライン作用により炎症を増悪し歯周組織の破壊に影響する可能性が示唆された。また MIF を RNA 干渉によりノックダウンすることにより ANGPTL2 遺伝子発現の抑制傾向が認められたことから、歯周病を想定したモデルにおいて ANGPTL2 産生経路として直接的な経路だけでなく上皮細胞から産生される MIF を介した間接的な経路が存在する可能性も示唆されたが、細胞間接着分子に対する効果は認められなかった。

一方、ANGPTL2 のパラクライン作用としては、隣接する歯肉固有層を構成する歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカイン IL-6 および IL-8 の遺伝子発現を著しく増強した。しかしながら ANGPTL2 刺激後、早期に IL-6 遺伝子が、その後少し遅れて CXC ケモカインである IL-8 遺伝子発現の増強を認めたものの、タンパク産生においては IL-8 のみ産生増加するという結果であったことからパラクライン作用として主に慢性炎症の遷延化に関与するのは IL-8 である可能性が示唆された。

歯周病の病態形成における ANGPTL2 の関与の解明については、今後さらに動物実験などの解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Ohno T, Yamamoto G, Hayashi JI, Nishida E, Goto H, Sasaki Y, Kikuchi T, Fukuda M, Hasegawa Y, Mogi M, Mitani A.                                      | 4. 巻<br>12(9)      |
| 2. 論文標題<br>Angiopoietin-like protein 2 regulates Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival epithelial cells. | 5. 発行年<br>2017年    |
| 3. 雑誌名<br>PLoS One   | 6. 最初と最後の頁<br>1-14 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.pone.0184825  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-          |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>菊池 毅, 岡部猪一郎, 岡田康佑, 大野 祐, 後藤久嗣, 藤村岳樹, 菱川敏光, 山本弦太, 福田光男, 三谷章雄 | 4. 巻<br>59(4)         |
| 2. 論文標題<br>歯周病における組織破壊に関する免疫学的考察                                      | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>日本歯周病学会雑誌   | 6. 最初と最後の頁<br>185-190 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）                                 | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大野祐, 山本弦太, 林潤一郎, 西田英作, 後藤久嗣, 佐々木康行, 菊池毅, 福田光男, 長谷川義明, 三谷章雄           |
| 2. 発表標題<br>歯肉上皮細胞においてアンジオポエチン様タンパク2はPorphyromonas gingivalis菌由来LPSによる炎症反応に関与する。 |
| 3. 学会等名<br>第13回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会                                 |
| 4. 発表年<br>2018年～2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大野祐, 山本弦太, 林潤一郎, 西田英作, 後藤久嗣, 佐々木康行, 菊池毅, 長谷川義明, 茂木眞希雄, 福田光男, 三谷章雄 |
| 2. 発表標題<br>アンジオポエチン様タンパク2は歯肉上皮細胞において炎症反応を遷延化させる。                             |
| 3. 学会等名<br>第60回秋季日本歯周病学会学術大会（京都）   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-----------|--|-----------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 茂木 眞希雄<br><br>(MOGI MAKIO)<br><br>(00174334) | 愛知学院大学・薬学部・准教授<br><br><br>(33902) |    |
| 研究<br>分担者 | 三谷 章雄<br><br>(MITANI AKIO)<br><br>(50329611) | 愛知学院大学・歯学部・教授<br><br><br>(33902)  |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|