

平成22年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592123
 研究課題名（和文） 歯周病原性細菌が引き起こす炎症性骨吸収における IL-32 の役割の解明
 研究課題名（英文） Roll of interleukin-32 in inflammatory bone resorption caused by periodontopathic bacterium
 研究代表者
 辻澤 利行（TSUJISAWA TOSHIYUKI）
 九州歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：60265006

研究成果の概要（和文）：歯周病原性細菌の一つである *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の菌体成分であるリポ多糖（LPS）がヒト単球系細胞においてインターロイキン 32 の発現を誘導するかどうかについて検討した。また、その発現機序について解析した。その結果、Toll 様受容体 4 の下流に存在する NF- κ B の阻害剤を用いると LPS による IL-32 の発現が阻害されたため、LPS による IL-32 の誘導には NF- κ B の活性化が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined whether lipopolysaccharide (LPS) derived from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, one of periodontopathic bacteria, induce expression of interleukin-32. We also analyzed the induction mechanism of IL-32 in human monocyte. Since an inhibitor of NF- κ B, one of downstream signaling of Toll-like receptor 4, inhibits the expression of IL-32, it was suggested that NF- κ B activation was involved in the induction of IL-32 by LPS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：炎症，サイトカイン，インターロイキン，インターロイキン，リポ多糖，自然免疫，歯周病原性細菌，

1. 研究開始当初の背景

骨の代謝異常によって引き起こされる疾病に、骨粗鬆症、関節リウマチ、歯周炎などがある。特に歯周炎は歯科領域の二大疾患であり、歯の喪失の大きな原因となっている。

また、歯周炎に罹患していると、歯面に付着している歯周病原細菌を始めとするバイオフィルムを形成している細菌やそれによって引き起こされる炎症反応の影響で誤嚥性肺炎、虚血性心疾患、動脈硬化、糖尿病、妊

婦の早産など全身の健康に害をもたらすことが知られている。しかし、バイオフィルムを構成する細菌がどのような機序で歯肉炎を発症し、それが歯周炎の発症にどのように関わるかは不明な点が多く、分子レベルでの基礎研究が求められている。

歯周炎の進行を抑制する炎症性骨吸収の抑制薬も 2000 年以前には存在していなかった。しかし、2000 年以降になってから生理的な状態での骨代謝や炎症性サイトカインによる炎症時の骨代謝の機序が明らかにされてきた。また、関節リウマチ患者の滑膜細胞から炎症性サイトカインの発現を制御する新規のサイトカインとしてインターロイキン (IL) -32 が発見され、炎症による骨破壊を亢進するサイトカインとして注目された。しかしながら、歯周炎における IL-32 の役割に対する研究は行われておらず、申請者らは歯周炎時の炎症性骨吸収の発症における IL-32 の役割に着目し、その発症機序の解明や炎症性骨吸収の抑制法の開発ができるかと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

歯周病原細菌は、歯肉縁下にバイオフィルムを形成し、歯周病の発症にかかると考えられている。歯周病原細菌の菌体成分が、炎症の発現にかかわるマクロファージ系の細胞に対して IL-32 を発現するかどうかを解析し、その誘導機序を明らかにすることである。また、IL-32 が骨代謝に影響を及ぼすかどうかを検討するために、骨芽細胞様細胞に IL-32 を作用させ細胞増殖や分化に影響を及ぼすか、また破骨細胞指示能があるかどうかを検討するために、RANKL 発現の誘導の有無を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) IL-32 の遺伝子発現の検出系の開発

まず、DNA・RNA 塩基配列データベースから IL-32 遺伝子の情報を取得し、複数の IL-32 遺伝子または transcript variant の遺伝子解析を行ない、PCR での検出を行なうためのプライマー配列の設計を行なった。また、フォルボールエステルで活性化したヒト単球様細胞 (THP-1 細胞) に、インターフェロン- γ を作用させ、RNA を抽出後、逆転写した遺伝子をグラジエント PCR を用いて増幅条件を検討した。

(2) 菌体成分による IL-32 発現の解析

ヒト単球様細胞 (THP-1 細胞) をフォルボールエステルで 48 時間作用させた後に、歯周病原性細菌の一つである *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の菌体成分であるリポ多糖 (LPS) を作用させ、経時的に total RNA を抽出した。Total RNA は、DNase 処理後にランダムプライマーを

用いて逆転写を行なった。この cDNA を鋳型として PCR を行い、電気泳動後に染色した。遺伝子発現量の解析は、画像解析ソフト (Image J 1.43u) を用いて解析した。

(3) IL-32 発現機序の解析

THP-1 細胞をフォルボールエステルで活性化した後に、NF- κ B の阻害剤 (BAY11-7082) を作用させた後に、LPS を作用させ、total RNA を抽出し、DNase 処理後逆転写を行い同様に IL-32 の発現を解析した。

(4) 骨芽細胞様細胞の細胞増殖とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性に及ぼす影響

マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) に異なる濃度の IL-32 α を作用させ、WST-8 assay を用いて経時的に細胞増殖に及ぼす影響を解析した。また、同様に経目的に ALP 染色を行なった。

(5) 骨芽細胞様細胞の RANKL 発現に及ぼす影響

MC3T3-E1 に異なる濃度の IL-32 α を作用させ、経時的に total RNA を抽出し、DNase 処理後、オリゴ dT プライマーを用いて逆転写を行い PCR にて RANKL 発現を解析した。

4. 研究成果

(1) IL-32 の遺伝子を DNA・RNA 塩基配列データベースで調べ、BLAST 検索を行なったところ IL-32 には α 、 β 、 γ 、 δ の 4 つのアイソフォームが存在していることが明らかとなった。また、それぞれのアイソフォームには複数の transcript variant の遺伝子が存在していることが明らかとなった。これら遺伝子のうち、4 つのアイソフォームを PCR にて共通の大きさとして検出できるプライマー配列 (OMB-237, 238) と増幅条件を開発した。また、IL-32 のうち、最も分子量の大きなアイソフォームのみを検出するプライマー配列 (OMB-239, 240) および増幅条件を開発した。

(2) 歯周病原細菌の菌体成分の一つである LPS が、ヒト単球様細胞に対して IL-32 の産生を誘導するかどうか検討するために、THP-1 細胞をフォルボールエステルで活性化した後に *A. actinomycetemcomitans* の菌体成分である LPS を 5 mg/ml の濃度で作用させ、経時的に IL-32 の発現を解析した。その結果、LPS 刺激後 3 時間から IL-32 の発現は見られ、9 時間でピークに達した (Fig. 1)。IL-32 の発現は、72 時間まで検出できた。

同様に、異なる濃度の LPS を作用させ、9 時間後に IL-32 の発現を解析したところ、*A. actinomycetemcomitans* の LPS は、濃度依存的に IL-32 の発現を誘導することが明らかとなった (Fig. 2)。

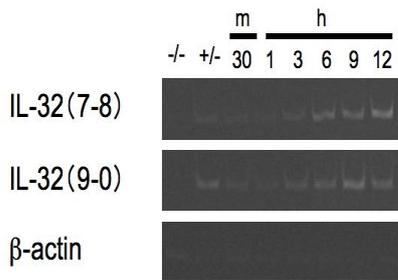


Fig. 1 LPS による IL-32 の発現の経時的変化

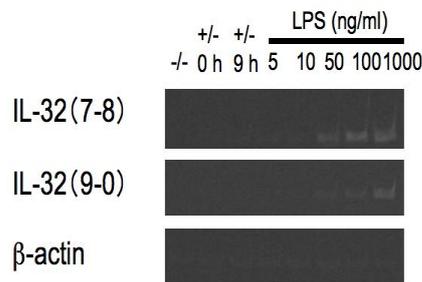


Fig. 2 異なる濃度の LPS による IL-32 の発現

(3) LPS は、マクロファージの膜上に存在する Toll 様受容体 4 (TLR4) を介してプロスタグランジン E₂ や IL-1 β 、腫瘍壊死因子などの炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られている。そこで、LPS による IL-32 産生に TLR4 が関与するかどうかを検討するために、TLR4 の下流に存在する核内転写因子の一つである NF- κ B の阻害剤 BAY11-7082 を作用させた後に LPS 刺激を行なった。その結果、フォルボールエステルで刺激した THP-1 細胞において BAY11-7082 は濃度依存的に LPS による IL-32 発現を阻害した (Fig. 3)。以上のことから、THP-1 細胞における LPS による IL-32 発現の誘導には NF- κ B の活性化が関与する可能性が示唆された。

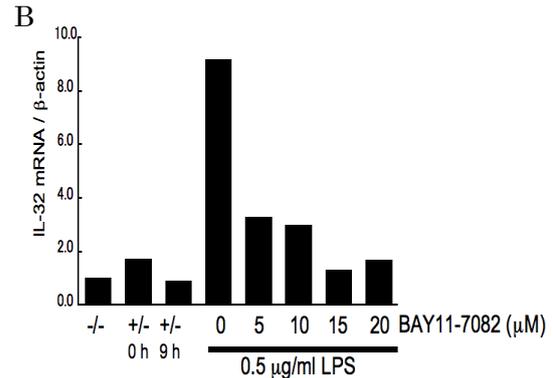
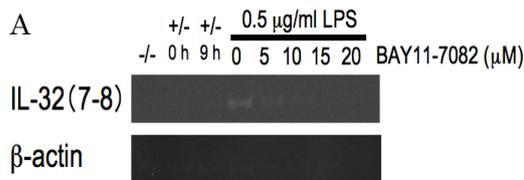


Fig. 3 NF- κ B 阻害剤による LPS が誘導する IL-32 発現の阻害効果

(4) 骨芽細胞様細胞の細胞増殖に対する影響を解析するために、96 穴プレートに細胞を播種し、異なる濃度の IL-32 α を添加して、培養した後、WST-8 assay を用いて解析した。IL-32 は、MC3T3-E1 細胞の増殖に対して影響を及ぼさなかった。また、ALP に対する影響を調べるために、48 穴プレートに細胞を播種し、異なる濃度の IL-32 α を添加して、培養した後、経日的に ALP 染色を行なったが、IL-32 は、MC3T3-E1 細胞の ALP 陽性細胞数に対しても影響を及ぼさなかった。

(5) 骨芽細胞様細胞の RANKL 発現に及ぼす影響を解析するため、細胞に IL-32 を添加して培養した後に PCR 法にて RANKL 発現を解析したところ、RANKL 発現を誘導したが、IL-32 の濃度依存的には誘導されず、IL-32 が RANKL 発現を誘導するか否かについては結論を得るには至らなかった。

(6) 成果のまとめ

歯周炎患者の歯周ポケットには、多種多様なグラム陰性嫌気性桿菌が検出され、混合感染という形で、これらの細菌が様々な病型の歯周炎にかかわっている。これらの細菌は、歯周組織を破壊する酵素や免疫応答を回避する酵素や毒素を産生することで歯周病原性を発揮すると考えられている。LPS は、グラム陰性桿菌の外膜成分の一つで、歯周病原細菌の全てが有している。LPS は、菌体が破壊された時に内毒素として作用し、自然免疫において Toll 様受容体 4 (TLR4) を介して情報が伝達され、腫瘍壊死因子 (TNF- α) や IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られている。

本研究で用いた歯周病原性細菌の一つである *A. actinomycetemcomitans* の LPS がフォルボールエステルで活性化した THP-1 細胞において刺激 3 時間で IL-32 の発現を誘導

することが明らかとなり、IL-32 は、LPS による炎症発現に関与する可能性が示唆された。

また、LPS は TLR4 と結合し、TLR4 シグナルを伝達し、NF- κ B を活性化することによって炎症性サイトカインの発現を誘導することが知られているが、本研究で、フォルボールエステルで刺激した THP-1 細胞において NF- κ B の阻害剤である BAY11-7082 が濃度依存的に LPS による IL-32 発現を阻害したことから、LPS による IL-32 の発現には TLR4 の下流に存在する NF- κ B の活性化が関与する可能性が示唆された。

以上のことから歯周病原性細菌の一つである *A. actinomycetemcomitans* の LPS が、ヒト単球様細胞に対して IL-32 の発現を誘導することが明らかとなった。LPS による IL-32 の発現機序のうち少なくとも一つは、TLR4 の下流に存在する NF- κ B の活性化が関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T., Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2007, 101(5): 1266-77, 査読有.
- ② Nomiya K, Kitamura C, Tsujisawa T, Nagayoshi M, Morotomi T, Terashita M, Nishihara T. Effects of lipopolysaccharide on newly established rat dental pulp-derived cell line with odontoblastic properties. *J Endod.* 2007, 33(10):1187-91, 査読有.
- ③ Okinaga T, Kasai H, Tsujisawa T, Nishihara T. Role of caspases in cleavage of lamin A/C and PARP during apoptosis in macrophages infected with a periodontopathic bacterium. *J Med Microbiol.* 2007, 56(10):1399-404, 査読有.
- ④ Kanzaki S, Takahashi T, Kanno T, Ariyoshi W, Shinmyozu K, Tsujisawa T, Nishihara T. Heparin inhibits BMP-2 osteogenic bioactivity by binding to both BMP-2 and BMP receptor, *J Cell Physiol.* 2008, 216(3):844-50, 査読有.

⑤ Toshinaga A, Hosokawa R., Okinaga T, Masaki C, Tsujisawa T, Nishihara T. Inflammatory response in epithelial cells induced by mechanical stress is suppressed by hyaluronic acid. *Inflammation and Regeneration.* 2010, 30(2): in press, 査読有.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Nomiya K., Kitamura C., Tsujisawa T., Morotomi T., Nagayoshi M., Terashita M., Nishihara T.: Establishment of rat dental pulp cell line showing odontoblastic phenotype. 85th General Session of the International Association for Dental Research, New Orleans, March 21-24, 2007.
- ② Kanzaki S., Kanno T., Ariyoshi W., Shinmyozu K., Tsujisawa T., Takahashi T., Nishihara T.: The effect of glycosaminoglycans on BMP Activity. 85th General Session of the International Association for Dental Research, New Orleans, March 21-24, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻澤 利行 (TOSHIYUKI TSUJISAWA)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 60265006

(2) 研究分担者

西原 達次 (TATSUJI NISHIHARA)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80192251

井上 博雅 (HIROMASA INOUE)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 20137326