

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593077

研究課題名(和文) EGFレセプターシグナルによって誘導されるケモカイン産生が歯周病態に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effect of EGF receptor pathway on cytokine production in gingival fibroblasts

研究代表者

小越 菜保子 (Kogoe, Nahoko)

姫路獨協大学・薬学部・助手

研究者番号：60509115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：EGF-Rシグナルが歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞のケモカインおよびサイトカインの産生性に及ぼす影響を評価した。EGF-Rシグナルを抑制すると、歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞においてBAFF、APRIL、TSLPといった体液性免疫応答に深くかかわるサイトカインの発現が増強された。また、歯肉線維芽細胞のTh2ケモカインCCL11、CCL17、CCL26の発現が増強していたが、Th1ケモカインCXCL9、CXCL10、CXCL11の発現に影響はなかった。したがって、EGFRシグナルはケモカイン産生性に影響を及ぼし、歯周病の病巣局所における免疫応答に関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the effects of EGF-R pathway on the productivity of chemokines and cytokines in gingival fibroblasts and gingival epithelial cells. We found that inhibition of EGF-R signaling leads to the expression of BAFF, APRIL, and TSLP that is cytokines help to shape the local accumulation and activation of Th2 responses and B cell immunoglobulin production. In addition, EGF-R signaling blockade produces the effect with increased Th2 chemokines, CCL11, CCL17, and CCL26 expression, although no effect with Th1 chemokines, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 expression in gingival fibroblasts. These results may imply additional mechanisms by which EGF-R pathway the immune responses in periodontal lesion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：EGFR 歯肉線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子レセプター (EGF-R) は、受容体型チロシンキナーゼの一つとして細胞の増殖、分化に重要なシグナルを誘導することから長年研究が進んでいる。EGF-R は血球系以外のほとんどの細胞に発現しており、そのリガンドは、EGF の他に TGF- $\alpha$  , heparin-binding EGF (HB-EGF) , amphiregulin, betacellulin , epiregulin など複数存在する。多くのリガンドは細胞膜に前駆体として存在し、特異的なメタロプロテアーゼによる ectodomain shedding に依存して、EGF-R を活性化する。EGF-R シグナルは、TLR を介した刺激や抗菌ペプチド LL37 など多様な刺激によって活性化される。

上皮細胞における EGF-R シグナルは、炎症性細胞のリクルート、抗菌ペプチドの産生、上皮の修復の他に、ケモカイン産生によって自然免疫応答から獲得免疫応答に至る過程においても重要な役割を果たしている。上皮細胞によるケモカイン産生は EGF-R シグナルによって影響を受ける。皮膚や肺の上皮細胞が EGF-R シグナルによるケモカイン産生を介してアトピー性皮膚炎や喘息といったアレルギー性の疾患にかかわることが知られている。また、上皮性の腫瘍細胞では EGF-R 発現が亢進しているが、EGF-R シグナルによるケモカイン産生への影響が腫瘍免疫にかかわるという報告もある。

歯周組織を構成する歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞も EGF-R を発現していることから、EGF-R シグナルがこれらの細胞のケモカイン産生に影響を及ぼし、歯周病の病巣局所の免疫応答における鍵を握る一要因となっていると考えられる。

歯周病患者は歯周病細菌に対する血清抗体価が高いという事実から、歯周病細菌に対する体液性免疫応答が歯周病の病態に関わっていることが推察される。抗原特異的な体液性免疫応答はヘルパーT細胞のサブセット Th2 細胞によって誘導される。歯周病の病巣局所では Th2 細胞浸潤が見られることから、我々はこれまでに歯周病の病巣局所における Th2 細胞の誘導に関わる因子として、歯周組織を構成する種々の細胞が産生する様々

な液性因子に着目して研究を進めてきた。その結果、歯肉線維芽細胞が HLA class II 分子を介した刺激によって産生する液性因子が Th2 細胞の分化誘導に関わることを明らかにした。しかしながら、歯周病病巣局所の Th2 細胞の誘導に関わる因子は他にもあると考えられる。近年上皮由来のケモカインが Th2 細胞の分化誘導に関わるしくみの解明が進んでおり、肺の上皮細胞の EGF-R のシグナルが TARC/CCL17 および TSLP などの Th2 細胞を誘導するケモカイン産生にかかわるといふ報告がある。一方、歯周病の病巣局所においても Th2 細胞の誘導に関わるケモカインとして TARC/CCL17、MDC/CCL22 が発現していることが分かっている。これらの事実から、EGF-R を介したシグナルがケモカイン産生性に影響を及ぼし、歯周病における免疫応答にかかわっているものと推察される。

## 2. 研究の目的

本研究は、上皮成長因子レセプター (EGF-R) を介したシグナルによって産生されるケモカインが歯周病の免疫応答に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。そのために、歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞のケモカイン産生性さらに T細胞分化誘導に及ぼす EGF-R シグナルの影響を評価し、その制御の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株

歯肉線維芽細胞は ScienCell research laboratories 社より、歯肉上皮細胞は CELLnTEC 社より初代培養株を購入し、説明書に従って培養し、以下の実験系に用いた。

### (2) EGFR およびそのリン酸化の評価

歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞における EGFR の発現および EGF 刺激によるリン酸化 EGFR、その下流のリン酸化 AKT およびリン酸化 ERK の発現を、ウエスタンブロット解析により評価した。

### (3) ケモカイン遺伝子発現の定量解析

歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞におけるケモカインの遺伝子発現の定量をリアルタイム RT-PCR 法にて行なった。すなわち、

細胞から全 mRNA を回収した後、オリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応を行うことによって cDNA を合成し、それらを鋳型としてターゲット分子に対して特異的な TaqMan プローブを用いて増幅を行ない、ABI 社製 Sequence Detection System 7500HT を用いて蛍光強度をリアルタイムに測定することによって行った。遺伝子発現プロファイルを EGF-R シグナル阻害剤である AG1478 の存在下および非存在下での各条件で比較し、EGF-R シグナルのケモカイン産生性への関与について考察した。

#### (4) EGF-R シグナルによるケモカイン産生性の網羅的解析

AG1478 存在下で EGFR のシグナルを抑制した時の歯肉線維芽細胞のケモカイン産生性をタンパクアレー (RayBiotech 社) を用いて網羅的に調べ、EGF-R シグナルがその産生性に深く関わるケモカインを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) EGFR 発現

歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞における EGFR 発現量をウエスタンブロッティングで評価した。EGFR 高発現の細胞株として知られるヒト扁平上皮細胞由来の癌細胞株 A431 と比較して歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞は無刺激の培養系で EGFR を同程度発現していた。EGF 刺激によるリン酸化 EGFR の発現および EGFR の下流の代表的なシグナル分子である AKT および MAPK のリン酸化も確認することができた。これらのリン酸化は EGFR 特異的阻害剤 AG1478 によって抑制された。さらに、我々が見出した EGF-R シグナルを ATP 非競合的に阻害するオリゴペプチド NYQQN の EGFR シグナル抑制効果を調べたところ、歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞においてペプチドは AG1478 と比較して弱いながらも EGFR のシグナルを抑制することがわかった (図 1)。

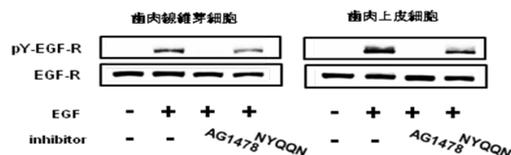


図 1 EGFR 発現とそのリン酸化阻害

#### (2) EGFR シグナルがケモカイン産生性及ばす影響

##### 歯肉線維芽細胞

A1478 で EGFR シグナルを阻害した時の歯肉線維芽細胞のケモカイン産生性をリアルタイム RT-PCR 法で定量解析した。その結果、調べたケモカインの発現に EGFR シグナルの影響はほとんど検出できなかったが、非免疫系細胞から産生され、体液性免疫応答に関わることが知られているサイトカインである BAFF, APRIL, TSLP の発現が AG1478 の濃度依存的に上昇することが明らかになった (図 2)。BAFF や APRIL は B 細胞に対してその生存、分化、抗体産生に重要な役割を果たす TNF ファミリーに属するサイトカインである。歯肉線維芽細胞における EGFR シグナルは、体液性免疫応答に深く関わるこれらのサイトカインの発現を抑制し、歯周病における免疫応答に影響を及ぼしている可能性が示された。

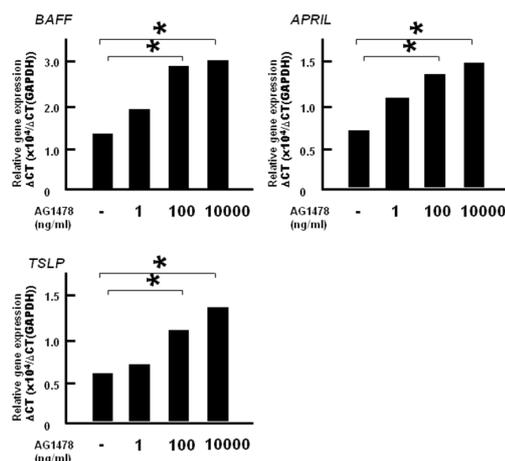


図 2 歯肉線維芽細胞において AG1478 存在下で EGFR シグナル阻害時の各サイトカイン mRNA 発現レベル

## 歯肉上皮細胞

歯肉上皮細胞において AG1478 で EGFR シグナルを阻害した場合、BAFF, TSLP の発現が上昇した (図 3)。さらに Th2 細胞の分化誘導に関わるケモカインである CCL17(TARC), CCL22(MDC) の発現を定量解析した結果、これらの発現も EGFR シグナルを阻害することによって上昇した。これらのことから、歯肉上皮細胞における EGFR シグナルは、これらのサイトカインやケモカインの発現を抑制し、歯周病における免疫応答に影響を及ぼしている可能性が示された。

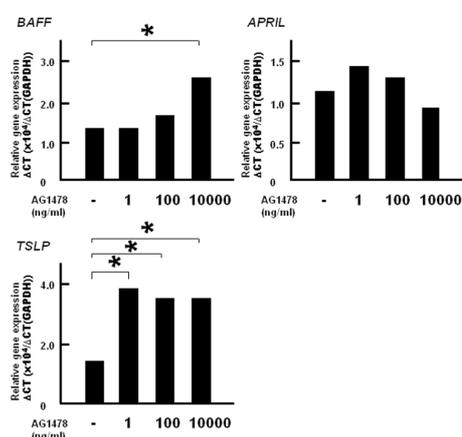


図 3 歯肉上皮細胞において AG1478 存在下で EGFR シグナル阻害時の各サイトカイン mRNA 発現レベル

### (3) EGFR シグナルによって産生されるケモカインの網羅的解析

AG1478 存在下で EGFR のシグナルを抑制した時の歯肉線維芽細胞のケモカイン産生性をタンパクアレーで網羅的に調べた。AG1478 存在下において、Th2 ケモカインのうち Eotaxin (CCL11), MDC (CCL17), Eotaxin-3 (CCL26) の発現レベルは阻害剤なしと比較してそれぞれ 9.3, 2.7, 2.4 倍高かった。Th1 ケモカインの CXCL9, CXCL10 (IP-10), CXCL11 の発現レベルにちがいはみられなかった。ケラチノサイトにおいて EGFR シグナルの抑制によって発現が増強することが報告されているケモカインである CTACK (CCL27), MCP-1 (CCL2) の発現はそれぞれ 6.3, 3.3 倍高かった。以上の結果より、歯肉線維芽細胞において EGFR シグナルは Th2 ケモ

カイン産生性に影響を及ぼし、歯周病の病巣局所における免疫応答に關与する可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Kuroda Y, Kato-Kogoe N, Tasaki E, Murata E, Ueda K, Abe M, Miyamoto K, Nakase I, Futaki S, Tohyama Y, Hirose M., Oligopeptides derived from autophosphorylation sites of EGF receptor suppress EGF-stimulated responses in human lung carcinoma A549 cells., *Eur J Pharmacol.* 査読あり 2013, 698:87-94. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.007.

Ohyama H, Kato-Kogoe N, Takeuchi-Hatanaka K, Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, Matsushita S, Terada N., T-cell Responses Involved in the Predisposition to Periodontal Disease: Lessons from Immunogenetic Studies of Leprosy., *J Clin Cell Immunol* 査読あり 2012, S1: 005, doi: 10.4172/2155-9899.S1-005

The promotional effect of IL-22 on mineralization activity of periodontal ligament cells., Kato-Kogoe N, Nishioka T, Kawabe M, Kataoka F, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamamoto T, Nakasho K, Urade M, Terada N, Ohyama H., *Cytokine.* 査読あり 2012, 59:41-8. doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.024.

[学会発表](計 4 件)

黒田 義弘, 小越 菜保子, 田崎 絵美, 中瀬 生彦, 二木 史朗, 通山 由美, 廣瀬 宗孝, IGF-1R の自己リン酸化部位由来ペプチドが MCF-7 ヒト乳がん細胞に及ぼす影響, 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜

黒田義弘, 村田恵理, 上田康陽, 田崎絵美, 小越菜保子, 阿部峰大, 宮本和英, 中瀬生彦, 二木史朗, 通山由美, 廣瀬宗孝, EGFR の自己リン酸化部位由来ペプチドの A549 ヒト肺腺がん細胞における効果, 第 84 回日

本生化学会大会 2011年9月23日 国立京都国際会館

川辺睦記, 大山秀樹, 安川陽子, 小越菜保子, 安孫子宜光, IL 22存在下においてヒト歯根膜由来細胞が発現する遺伝子の網羅的解析, 第54回日本歯周病学会春季学術大会 2011年5月28日 福岡国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小越 菜保子 (KOGOE, Nahoko)

姫路獨協大学・薬学部・助手

研究者番号: 60509115

### (2) 研究分担者

大山 秀樹 (OHYAMA, Hideki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 90280685

黒田 義弘 (KURODA, Yoshihiro)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号: 90093236

### (3) 連携研究者

該当なし