

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23083

研究課題名(和文)リポカリン2の歯周病における役割の解明

研究課題名(英文)Functions of Lipocalin2 in periodontal disease

研究代表者

木戸 理恵 (KIDO, Rie)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60876027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔上皮細胞が産生するリポカリン2(LCN2)が、歯周組織構成細胞に対して及ぼす影響について検討した。好中球様細胞ではLCN2受容体の発現が強く、歯肉線維芽細胞や歯根膜線維芽細胞では弱かった。リコンビナントLCN2(rLCN2)は好中球様細胞のケモカインCCL-1と抗炎症作用のあるアドレノメジュリンの発現を増加した。しかし、線維芽細胞ではIL-6やIL-34等の炎症や免疫に関するサイトカインの発現に変化は無かった。rLCN2はPorphyromonas gingivalisの口腔上皮細胞への付着を抑制効した。LCN2は、歯周組織細胞に対して多様な作用を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりリポカリン2(LCN2)が、歯周組織を構成する細胞において炎症や免疫調節に関連した影響を及ぼしていること、Porphyromonas gingivalisの口腔上皮細胞に対する付着を抑制することが明らかとなった。歯周組織を構成する細胞においてLCN2のレセプターの発現には違いがあることから、生体内でもLCN2が作用する細胞やその生理作用には違いがあると推測される。LCN2は多様な作用があり、歯周病の病態形成や生体反応に複雑な影響を及ぼしていると考えられる。今後さらにLCN2の作用機序を明らかにしていくことでLCN2を用いた歯周病の早期診断や予防に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the effect of lipocalin 2 (LCN2) derived from oral epithelial cells on cells in periodontal tissues. A receptor of LCN2, 24p3R, strongly expressed in neutrophil-like cells, differentiated HL-60, but its expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts were very weak. Recombinant LCN2 (rLCN2) increased the expression of CCL-1, a chemokine, and adrenomedullin, an anti-inflammatory factor, in neutrophil-like cells. However, rLCN2 did not influence the expression of inflammation-related cytokine, IL-6, and immunity-related cytokine, IL-34, in human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. When the effect of rLCN2 on an adhesion of Porphyromonas gingivalis to oral epithelial cells was investigated, rLCN2 significantly inhibited an adhesion of P. gingivalis to oral epithelial cells. LCN2 derived from oral epithelial cells play multiple roles in periodontal tissues.

研究分野：歯周病学

キーワード：Lipocalin2 口腔上皮細胞 歯根膜線維芽細胞 好中球 抗菌作用 マイクロアレイ分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

リポカリン 2 (Lipocalin 2: LCN2)は上皮細胞や好中球が産生する分泌性糖蛋白であり、炎症性疾患や糖尿病(DM)で、そのレベルが高くなることが知られている。LCN2 は生体内で炎症反応の調節、細胞遊走の制御、抗菌作用など多くの機能を示し、歯周病においては歯肉溝滲出液中の LCN2 濃度が有意に高いことが報告されている。私は、歯周病における LCN2 の発現動態についての研究を行い、口腔上皮細胞において DM 合併症の原因物質とされている最終糖化産物(AGEs)が LCN2 発現を増加させることを明らかとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、LCN2 が歯周組織の細胞に与える影響について分子細胞レベルで検討を行い、LCN2 の歯周炎病態における役割を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞の培養

ヒト口腔上皮細胞(TR146),ヒト歯肉線維芽細胞(CRL-2014),ヒト歯根膜線維芽細胞(HPdLF),ヒトマクロファージ様細胞(dTHP-1),ヒト好中球様細胞(dHL-60)をそれぞれ10%のFBSを含むHamF-12,DMEM および  $\alpha$ -MEM 培地や10~15%のFBSを含むRPMI 培地にて通法に従い、細胞培養を行った。LPSとしてLipopolysaccharide from *E.coli* O55(*E.coli* LPS)を使用した。

### (2)蛋白発現解析

各種細胞の細胞画分を抽出し、LCN2のレセプターである24p3Rの抗体(SIc22A17 Polyclonal Antibody,Biossusa, HRP Conjugated, Bioss Antibodies, bs-0444R-HRP)およびAldolase Cの抗体(Aldolase C antibody, Unconjugated, Gene Tex)それぞれの特異的抗体を用いて、Western blotting (WB)にて24p3RおよびAldolase Cの蛋白質発現を確認した。

### (3)遺伝子発現解析

Recombinant LCN2(rLCN2,0-100ng/mL)を歯根膜線維芽細胞や歯肉線維芽細胞に作用させ、培養後に通法に従いRNAを分離後、cDNAを合成し、IL-6, IL-34 およびPRAP-1のプライマーを用いて各遺伝子の発現を定量的PCRにより検討した。また、別の実験では上皮細胞生産LCN2の影響についてsiRNAを用いて検討した。すなわち、ヒト口腔上皮細胞のLCN2発現をLCN2-siRNAによりノックダウンさせ、歯根膜線維芽細胞と24時間共培養を行った。歯根膜線維芽細胞のRNAを抽出し、cDNAを合成後、IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, TGF- $\beta$ およびIL-34等の各種プライマーを用いて各遺伝子の発現を定量的PCRすることにより、上皮細胞由来のLCN2の歯根膜線維芽細胞への影響を検討した。

### (4)DNAマイクロアレイ解析

好中球様細胞(dHL-60)培養系にrLCN2(10 ng/mL)添加し、24時間培養後、RNAを抽出し、マイクロアレイ(Affymetrix Gene 2.0 Array)を行い、その結果をIngenuity Pathway Analysisを用いて解析することにより、網羅的に遺伝子発現への影響を調べた。また、別の実験では口腔上皮細胞のLCN2発現をsiRNAによりノックダウンさせ、好中球様細胞と24時間共培養を行った後、好中球様細胞からRNAを抽出し、マイクロアレイ分析を行った。

### (5) LCN2による *Porphyromonas gingivalis* の口腔上皮細胞への付着分析

培養した口腔上皮細胞をrLCN2 (10 ng/mL)で前処理し、蛍光色素(Cyto Tell UltraGreen)ラ

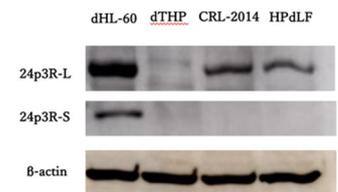
ベルした *P. gingivalis* (ATCC33277) と 2 時間共培養した。洗浄後、培養面の蛍光強度を蛍光測定し、LCN2 による *P. gingivalis* の口腔上皮細胞への付着に対する影響を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯周組織の細胞における 24p3R の発現 (図 1)

好中球様細胞に分化させた (dHL-60), マクロファージ様細胞 (dTHP-1), ヒト歯肉線維芽細胞 HGF (CRL-2014), ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPdLF) における LCN2 のレセプター, 24p3R の発現を WB にて確認した。分化好中球様細胞では 24p3R の Long と Short の両方レセプター蛋白が発現していた。一方, ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯根膜線維芽細胞では 24p3R の Long のみが発現しており, マクロファージ様細胞では 24p3R レセプターの発現は認められなかった。

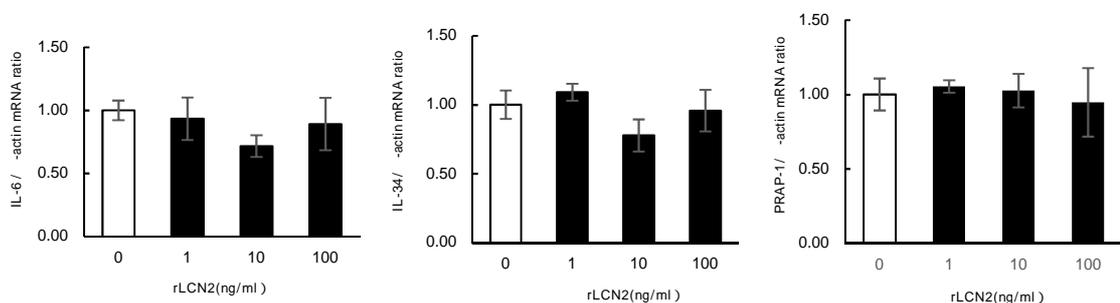
図 1 歯周組織の細胞における 24p3R 発現



##### (2) rLCN2 のヒト歯肉線維芽細胞の遺伝子発現に与える影響 (図 2)

rLCN2 (0-100 ng/mL) をヒト歯根膜線維芽細胞に 24 時間作用させた。qRT-PCR にて遺伝子発現の変化を調べたところ IL-6, IL-34 および PRAP-1 に関して変化は認められなかった。なお, 歯肉線維芽細胞についても調べた結果, 同様に遺伝子発現に変化は認められなかった。

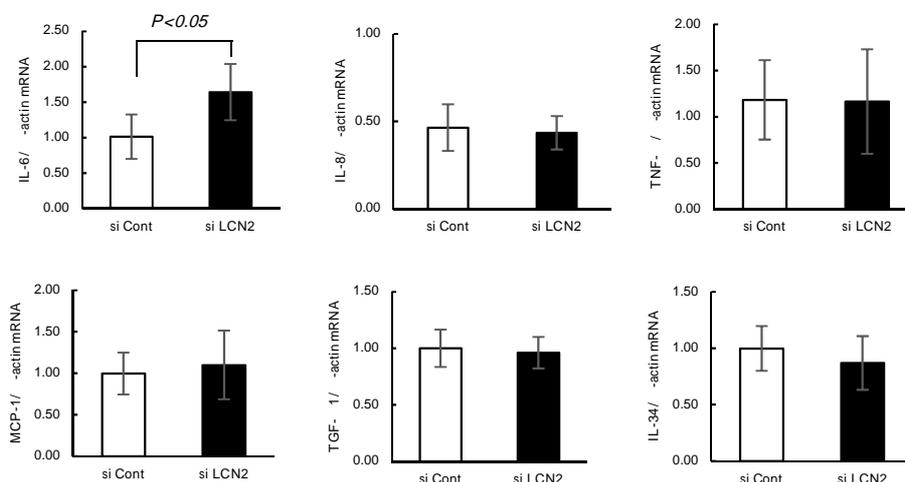
図 2 rLCN2 によるヒト歯根膜線維芽細胞における遺伝子発現の変化



##### (3) 口腔上皮細胞が分泌する LCN2 の歯根膜線維芽細胞の遺伝子発現に与える影響 (図 3)

口腔上皮細胞の LCN2 発現を siRNA にてノックダウン後, 歯根膜線維芽細胞と共培養を行った。上皮細胞生産 LCN2 による歯根膜線維芽細胞の遺伝子発現への影響を調べた結果, LCN2 の発現を抑制することで, 歯根膜線維芽細胞の IL-6 発現が上昇した。好中球様細胞においても上皮細胞の LCN2 の発現を抑制させることで, 共培養した好中球様細胞の IL-6 の発現が同様に上昇する結果を得ている。(R Kido, J Periodontal Res 2020) そのことから, LCN2 は歯根膜線維芽細胞や好中球様細胞に対して IL-6 発現を抑制する働きがあることが示唆された。一方で, IL-8, MCP-1, TGF- $\beta$ 1 および IL-34 の各遺伝子発現に影響は認められなかった。

図 3 歯根膜線維芽細胞における遺伝子発現の変化

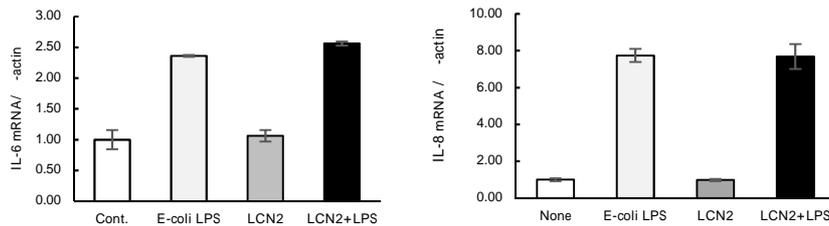


##### (4) *E. coli* LPS 及び rLCN2 によるヒト歯根膜線維芽細胞に対する遺伝子発現への影響 (図 4)

LCN2 および LPS による歯根膜線維芽細胞の炎症性サイトカインの遺伝子発現の変化について調

べた。500 ng/mL rLCN2 を細胞に作用させ、その1時間後に100 ng/mL の *E-coli* LPS を添加し、24 時間作用させた。結果、LPS 添加により IL-6 と IL-8 の遺伝子発現が増加するものの、rLCN2 による遺伝子発現への影響は認められず、LPS と rLCN2 の両方を作用させた場合も LPS 単独の増加と差はなかった。

図4 *E-coli* LPS および rLCN2 による歯根膜線維芽細胞における遺伝子発現の変化



### (5) LCN2 によるヒト好中球様細胞への遺伝子発現への影響(表1, 表2, 図5)

rLCN2(10 ng/ml)のヒト好中球様細胞の遺伝子発現への影響を検討した。その結果、rLCN2 添加により炎症関連因子である Aldolase C (ALDOC), Chemokine ligand 1 (CCL-1)および Adrenomedullin (ADM) の発現が約2.0倍に増加した一方、microRNA 4518 (MIR4518)と Nuclear Enriched Abundant Transcript 1(NEAT 1)などの発現は0.5倍以下に減少した(表1)。rLCN2 により好中球様細胞において炎症に関連した遺伝子の発現が増加した。また ADM に関しては抗炎症作用があることも着目すべき点と考えられる。また Aldolase C (ALDOC) に関しては WB により蛋白質の発現についても検討を行い、rLCN2 刺激により好中球様細胞の Aldolase C 蛋白質の発現も増加傾向にあることが確認された(図5)。

また、別の実験では siRNA により LCN2 発現をノックダウンさせた口腔上皮細胞と共培養した好中球様細胞での遺伝子発現をマイクロアレイ法にて解析した結果、LCN2 の減少により炎症関連因子である Fc fragment of IgG receptor IIb (FCGR2B), C-C chemokine receptor type3 (CCR3)などの発現が2倍以上増加した。一方、FBJ murine osteosarcoma oncogene B(FOSB)の減少が認められた。(表2)

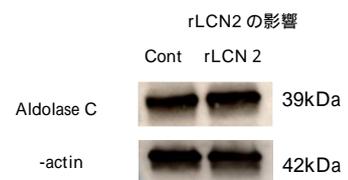
表1 マイクロアレイ(rLCN2の影響)

Molecules	Expr.Value
ALDOC	↑ 2.586
CCL1	↑ 2.177
BNIP3	↑ 1.975
ADM	↑ 1.882
MIR4518	↓ -2.798
NEAT1	↓ -2.420
mir-548	↓ -2.358
GUSBP3	↓ -2.355

表2 マイクロアレイ(LCN2-siRNAの影響)

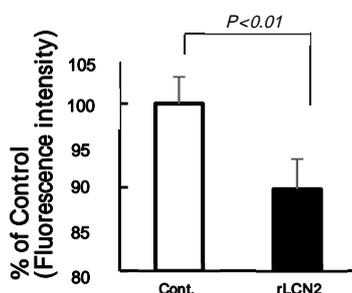
Molecules	Expr.Value
FCGR2B	↑ 2.467
HILPDA	↑ 2.254
NEAT1	↑ 2.169
CCR3	↑ 2.121
FOSB	↓ -2.782

図5 Aldolase C 発現に及ぼす



### (6) rLCN2 による *P. gingivalis* の口腔上皮細胞への付着抑制効果(図6)

図6 rLCN2 の口腔上皮細胞の細菌の付着への影響



rLCN2 による *P. gingivalis* の口腔上皮細胞への付着への影響について検討を行った。10 ng/ml の recombinant LCN2 で16時間前処理を行った後に、蛍光ラベルした *P. gingivalis*と2時間インキュベーションしたところ、rLCN2 により *P.gingivalis*の付着がControl と比較して約10%抑制された。(図6)LCN2 は、歯周病原細菌の口腔上皮細胞への付着抑制作用を有することが示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 坂本 英次郎, 廣島 佑香, 木戸 淳一, 西川 泰史, 成石 浩司, 木戸 理恵, 湯本 浩通	4. 巻 62
2. 論文標題 カルプロテクチンの歯周病病態における多様な役割と歯周病診断マーカーとしての可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯周病学会会誌	6. 最初と最後の頁 193-199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2329/period.62.193	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rie Kido, Yuka Hiroshima, Jun-ichi Kido, Takahisa Ikuta, Eijiro Sakamoto, Yuji Inagaki, Koji Naruishi and Hiromichi Yumoto	4. 巻 55
2. 論文標題 Advanced glycation end-products increase lipocalin 2 expression in human oral epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 539-550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12741	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木戸 淳一, 廣島 佑香, 木戸 理恵, 吉田 賀弥, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 人工合成した -Defensin 2によるPorphyromonas gingivalisの付着抑制およびリポソーム封入と 口腔上皮細胞への送達
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣島 佑香, 木戸 理恵, 木戸 淳一, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 人工合成したLopocalin 2はPorphyromonas gingivalisの口腔上皮細胞への付着を抑制する
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木戸 淳一, 廣島 佑香, 木戸 理恵, 吉田 賀弥, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 リボソームに封入したリポカリン2の口腔上皮細胞への送達
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木戸 理恵, 廣島 佑香, 生田 貴久, 稲垣 裕司, 板東 美香, 成石 浩司, 木戸 淳一, 湯本 浩通
2. 発表標題 最終糖化産物による口腔上皮細胞の Lipocalin2 発現誘導は好中球の遊走性とサイトカイン発現を調節する
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

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