

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21071

研究課題名（和文）免疫チェックポイント分子（CTLA-4）の作用から探る新規歯周治療の確立

研究課題名（英文）Establishment of a Novel Periodontal Therapy Based on the Action of Immune Checkpoint Molecule (CTLA-4)

研究代表者

小谷地 咲 (Koyachi, Saki)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：90962134

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）：本研究は、CTLA-4の詳細な破骨細胞分化調節メカニズムの検討を目的とした。破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞へのCTLA-4-Ig添加により、NF- κ Bリン酸化は抑制される傾向が認められた。PP2A siRNA群では、CTLA-4-Ig添加によるCathepsin K、Trapの発現抑制は確認されなかった。破骨細胞様細胞数は、Control siRNA群と比較し、PP2A siRNA群で増加する傾向が確認された。これより、NF- κ B経路とPP2A発現の調節は、CTLA-4-Igによる破骨細胞分化抑制メカニズムの一つであ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

我々はこれまでに、免疫チェックポイント分子の一つである細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA-4）が破骨細胞分化を抑制し、歯周炎マウスモデルにおける歯槽骨吸収量を減少させることを明らかにした。本研究はそのメカニズムを解明することを目的とし、成果としてNF- κ B経路とPP2A発現の調節が、CTLA-4-Igによる破骨細胞分化抑制メカニズムの一つであることが示唆された。本申請研究から得られた知見は、歯周炎における歯槽骨吸収メカニズム解明の一助となり、新たな歯周治療の開発基盤となり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the detailed mechanism of CTLA-4 regulation of osteoclast differentiation. RANKL and CTLA-4-Ig were added to RAW264.7 cells, which are osteoclast progenitor cells, and the effects of CTLA-4-Ig on NF- κ B activation were evaluated by Western blot analysis. The expression of osteoclast differentiation markers was measured by qRT-PCR, and the number of osteoclast-like cells was evaluated by TRAP staining. In the PP2A siRNA group, no suppression of Cathepsin K or Trap expression was observed upon addition of CTLA-4-Ig. The number of osteoclast-like cells tended to increase in the PP2A siRNA group compared to the control siRNA group.

This suggests that regulation of the NF- κ B pathway and PP2A expression is one of the mechanisms by which CTLA-4-Ig suppresses osteoclast differentiation.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 CTLA-4 歯槽骨吸収 破骨細胞 免疫チェックポイント

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 歯周病は多因子性疾患であることから、病態の理解や根治的な治療法の確立は困難を極めていた。我々は、歯周病の病態解明と新規治療法の開発のため、免疫チェックポイント機構と歯周病の関連について検討を行ってきた。CTLA-4は、T細胞表面に発現する免疫調節分子であり、T細胞と抗原提示細胞 (APC) 間の共刺激プロセスを負に調節する (Brunet JF et al., *Nature* 1987; Linsley PS et al., *J Exp Med* 1992; Bluestone JA et al., *Immunity* 2006)。通常、T細胞は、T細胞受容体を介した主刺激と、APC上の共刺激分子であるCD80/86とT細胞上のCD28との結合を介した共刺激によって活性化される。CTLA-4は、CD80/86に対する親和性がCD28よりも高いため、共刺激を阻害し、T細胞の活性化を抑制する (Krummel MF et al., *J Exp Med* 1995)。

また、CTLA-4がCD80/86を介してAPCに抑制シグナルを伝達し、アポトーシスを誘導することが報告されている (Grohmann U et al., *Nat Immunol* 2002)。CD80/86は破骨細胞の起源である単球・マクロファージ系統でも発現しており (Bluestone JA et al., *Immunity* 2006)、CTLA-4の細胞外ドメインとヒト免疫グロブリンG1の改変Fc部分からなる可溶性融合タンパクであるCTLA-4-Igは、ヒト単球の破骨細胞分化を抑制した (Oi K et al., *Clin Exp Immunol* 2019)。臨床研究では、CTLA-4-Ig投与が関節リウマチ (RA) 患者の大腿骨頸部の骨密度を増加させたことが示されている (Tada M et al., *Rheumatol Int* 2018)。

口腔内の領域においては、歯周炎における主要な病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* の外膜抗原による刺激下で、歯周炎患者のT細胞が健康な被験者のT細胞よりも高い増殖活性とCTLA-4発現細胞陽性率を示したことが報告されている (Aoyagi T et al., *Clin Exp Immunol* 2000)。これより、歯周炎とCTLA-4の関連性も示唆されているが、これまでの報告はT細胞に焦点を当てたものが多く、破骨細胞に注目した研究は少ない。CTLA-4が歯周組織に及ぼす影響やそのメカニズムには不明な点が残されている。

- (2) これまでの研究で我々は、絹糸結紮により歯周炎を誘発したマウスを用い、CTLA-4-Ig全身投与が歯周炎による歯槽骨吸収に及ぼす影響を形態学的、組織学的に検討した。さらに *in vitro* では、マウスマクロファージを用い、CTLA-4-Ig添加後の破骨細胞挙動を評価した (Nakane-Koyachi S et al., *J Periodontal Res* 2021)。その結果、CTLA-4投与が実験的歯周炎における歯槽骨吸収を制御することを初めて見出した。また、*in vitro* において、CTLA-4-Ig添加がProtein phosphatase 2A (PP2A) 発現の上昇とNF- κ B経路の活性化阻害を介して、破骨細胞分化を抑制することを明らかにした (図1)。しかし、PP2A発現増強によって破骨細胞分化が抑制されたか等、CTLA-4が歯槽骨吸収に及ぼす影響やそのメカニズムは未だ不明な点が多い。

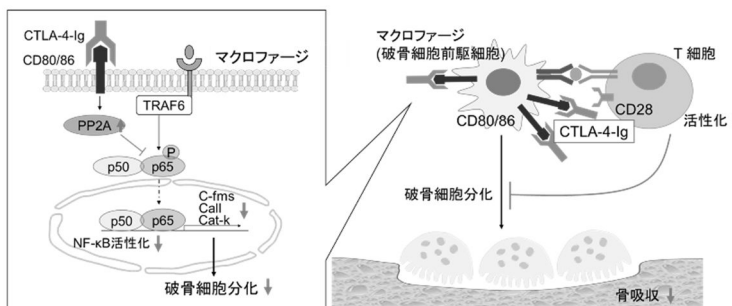


図1 CTLA-4-Igが歯周炎における骨吸収を阻害する想定メカニズム

2. 研究の目的

本研究の目的は、CTLA-4の詳細な破骨細胞分化調節メカニズムの検討を行い、安全かつ効果的な新規歯周治療法の開発の基盤とすることである。

本研究では、破骨細胞分化におけるシグナル伝達経路を制御し、Lipopolysaccharide誘発性骨吸収を調節することが報告されている脱リン酸化酵素、PP2Aに着目し、CTLA-4がどのような機構で破骨細胞分化の調整にかかわるのかを詳細に解析する。このように、CD80/86非依存的な経路も考慮に入れ、CTLA-4が歯槽骨吸収に及ぼす影響のメカニズムを探索することで、歯周病の免疫調節機構におけるCTLA-4の役割を解き明かす点が学術的独自性といえる。

本研究で得られる知見は、一つの免疫調節分子が歯周病の発症・進展に寄与する影響を明らかにするだけでなく、歯周病患者やRA患者に対する治療としてCTLA-4-Igを用いた際の効果、安全性や、その副作用に言及することも可能となる。また、CTLA-4-Igだけでなく、RA治療薬として現在使用されているIL-6やTNF- α 等をターゲットとした生物学的製剤の応用など、新たな歯周治療開発の足掛かりとなる点に創造性があると考えている。

3. 研究の方法

- (1) RAW264.7細胞にRANKLとCTLA-4-Igを添加し、CTLA-4-IgがNF- κ B活性化に及ぼす影響をウェスタンブロット分析にて評価する。
- (2) siRNAを用いてRAW 264.7細胞のPP2A発現を抑制する。siRNA導入後、WST-8 assayにて細胞生存率を確認する。siRNAによりPP2A発現が抑制されたRAW 264.7細胞にRANKLとCTLA-4-Igを添加する。添加後48時間、96時間で、qRT-PCRにて破骨細胞分化マーカー (Macrophage-colony stimulating factor, Carbonic anhydrase II, Cathepsin K, Tartrate-

resistant acid phosphatase) 発現を評価する。添加後 5 日目で TRAP 染色にて破骨細胞様細胞数を, 6 日目で Pit assay にて破骨細胞活性化の評価を行う。

4. 研究成果

- (1) CTLA-4-Ig 添加により, NF- κ B リン酸化は抑制される傾向が認められた。

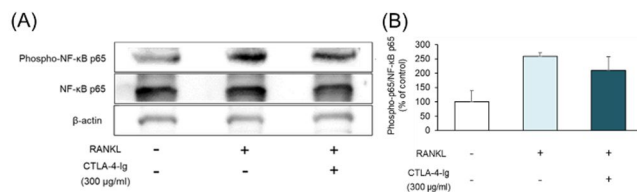


図 2 (A) Phospho-NF- κ B p65 と NF- κ B p65 のウェスタンブロット分析。(B) P-NF- κ B p65 の濃度を NF- κ B p65 に対して正規化し, 結果をコントロールに対するパーセンテージで表した。Data were presented as mean values \pm SD (n = 3).

- (2) CTLA-4-Ig 投与による PP2A 遺伝子発現の増加は, PP2A siRNA の導入によって抑制された。

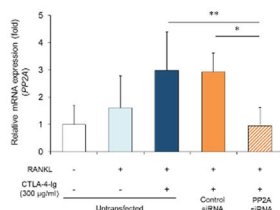


図 3 PP2A の mRNA レベルの qRT-PCR 解析。Means \pm SD (n = 5), * p < 0.05, ** p < 0.01 by Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

- (3) siRNA 導入は細胞生存率に有意な影響を与えなかった。

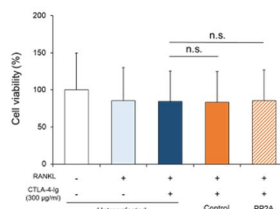


図 4 WST-8 アッセイによる細胞生存率の評価。Data are shown as means \pm SD (n = 5), by Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

- (4) PP2A siRNA 群では, CTLA-4-Ig 添加による Cathepsin K, Trap の発現抑制は確認されなかった。

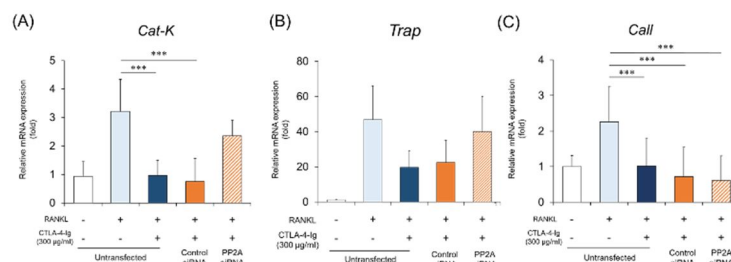


図 5 qRT-PCR による Cat-K (A) Trap (B) Call (C) の発現レベルの評価。Data are expressed as mean \pm SD (n = 5), *** p < 0.001 by Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

- (5) 破骨細胞様細胞数は, Control siRNA 群と比較し, PP2A siRNA 群で増加する傾向が確認された。

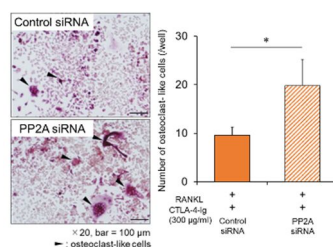


図 6 TRAP 染色による破骨細胞様細胞数の評価。Data are expressed as mean \pm SD (n = 5). * p < 0.05 by Mann-Whitney U test.

これまでに, 関節リウマチ患者において, CTLA-4 が B 細胞の CD80/86 に結合すると, NF- κ B p65 のリン酸化が誘導されないことが報告されている (Lorenzetti R et al., *J Autoimmun* 2019)。また別の報告では, PP2A 依存性の p65 脱リン酸化は, 上皮細胞および腎細胞における NF- κ B 活性化を阻害した (Park HJ et al., *Antioxidants* 2020)。

これより, PP2A の発現調節を介した NF- κ B 経路の制御が, CTLA-4-Ig による破骨細胞分化抑制メカニズムの一つであることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Saki Nakane-Koyachi, Kentaro Imamura, Tasuku Murakami, Rio Hisanaga, Kazuyuki Ishihara, Atsushi Saito
2 . 発表標題 The potential mechanism of CTLA-4-Ig-mediated osteoclast differentiation
3 . 学会等名 第108回アメリカ歯周病学会共催日本臨床歯周病学会・日本歯周病学会2022大会（国際学会）
4 . 発表年 2022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
---------	---------