

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592639

研究課題名 (和文) TOLL 様受容体 5 を介した歯槽骨代謝機構に関する分子生物学的探索

研究課題名 (英文) Molecular biological study on the mechanism of alveolar bone metabolism through the toll-like receptor 5

研究代表者

中村 公也 (NAKAMURA KIMIYA)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：00261313

研究成果の概要 (和文)：Toll 様受容体 5 リガンドであるフラジェリンを骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に作用させたところ、CC ケモカインである MCP-1 の発現が濃度依存的に誘導された。また、フラジェリンは破骨細胞形成抑制因子である OPG mRNA の発現を有意に抑制した。OPG mRNA の発現は、抗 MCP-1 抗体の添加によりさらに抑制された。以上より、骨芽細胞は骨代謝に関係するだけでなく、局所における生体防御機構に寄与しているものと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Flagellin, the ligand of Toll like receptor 5, markedly increased the expression of MCP-1 which is one of the CC chemokine, in a dose-dependent manner on osteoblastic MC3T3-E1 cells. In addition, flagellin was significantly suppressed the OPG mRNA expression. Furthermore, anti-MCP-1 antibody was further down-regulated the flagellin-suppressed OPG mRNA expression. These results indicate that osteoblasts are involved in host defense as well as bone metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：予防歯科学, 歯槽骨, Toll 様受容体 5, フラジェリン, MCP-1, OPG

1. 研究開始当初の背景

(1) 生活習慣病の一つである辺縁性歯周炎は慢性的に経過する疾患であり、現在成人の多くがこの疾患に罹患している。辺縁性歯周炎は進行すると歯槽骨の吸収を伴う疾患であり、一度破壊された骨を再生させることは難しく、それゆえ発生予防および進行抑制

が重要となる。

(2) 自然免疫系は細菌やウイルスなどの病原体の侵入を感知し、それを排除する生体防御システムであり、この微生物等の認識に関与している受容体として Toll 様受容体 (TLR) が知られている。進行した歯周疾患では歯槽骨の破壊・吸収がみられることから、自然免

疫とりわけ、TLR が歯槽骨の破壊・吸収に重要な働きをしていることが推測される。

(3) TLRと骨系細胞に関する研究は、以下に示すように骨を吸収・破壊する細胞である破骨細胞が中心であり、骨形成能を有する細胞である骨芽細胞に着目した研究は少ない。また、歯周病に関する研究においてもTLR2リガンドであるペプチドグリカンやTLR4リガンドであるリポポリサッカライドに関する研究が多く、それ以外のリガンドを用いた研究は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、これまであまり注目されなかったものの健康な歯肉においてもしばしば検出され、歯周病の進行とともに増加が認められる *Treponema* 属が有しているTLR5リガンドであるフラジェリンに着目する。そして、骨芽細胞に作用させた際の影響を明らかにし、フラジェリンが歯周病の進行に關与するかを確認し、歯周病の進行に対する新たな予防法を模索することを目的として設定した。

3. 研究の方法

(1) 試薬

- Flagellin isolated from *Salmonella typhimurium*
 - U0126
 - SB20190
 - SP600125
- } MAP kinase inhibitor

(2) 細胞培養

細胞は、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (E1) 細胞を用い、10%牛胎仔血清 (FBS) 含有 α -MEM 培地にて37°C、5% CO₂の気相下で通法に従い培養した。

(3) RT-PCR

E1 細胞がコンフルエンスになった後、TRIzol®を用いて全RNAを抽出し、cDNAを合成した。合成したcDNA および以下に示した TLR5 に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、TLR5 mRNA の発現について検討した。

TLR5:

5'-GAA AGT AAG AGG TAC AGA AAG CTG-3'
5'-TAT AGT TGT GGG GAA GAA AGA AGG-3'

(4) リアルタイム RT-PCR

E1 細胞がコンフルエンスになった後、フラジェリン (1ng/ml-100ng/ml) 処理し、TaqMan® Gene Expression Cells-to-Ct Kit を用いて、cDNA を合成した。リアルタイム PCR は、Taqman® gene expression assay および Taqman® gene expression master mix を使用し、ABI 7300 Real-time PCR system

にて行った。

使用した Taqman® gene expression assay は、次の通りである。

MCP-1: Mm00441242_m1

OPG: Mm01205928_m1

β -actin: 4352341E

(5) ELISA

E1 細胞をフラジェリンで処理した後、培養上清を回収し、MCP-1 タンパクの発現について ELISA 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞様 E1 細胞は、フラジェリンを認識する TLR5 mRNA を構成的に発現していた (図 1)。

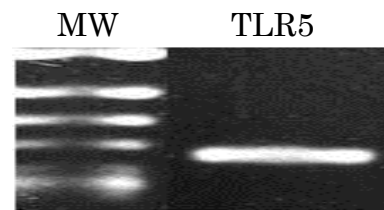


図 1

(2) フラジェリンは、E1 細胞における MCP-1 mRNA 発現を 0 から 100 ng/ml の範囲において濃度依存的に誘導した。また、MCP-1 mRNA の時間的推移について調べたところ、その発現レベルは処理後 1 時間で最大となった (図 2, 3)。

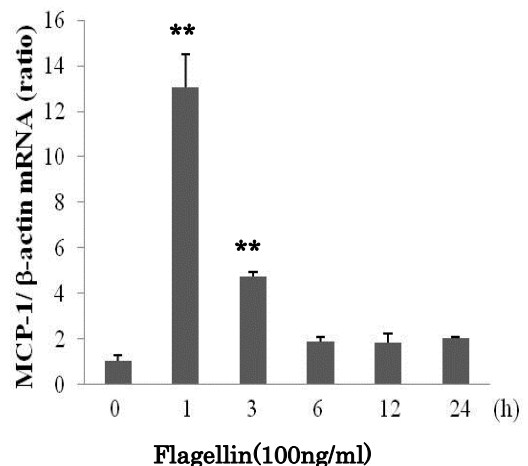


図 2

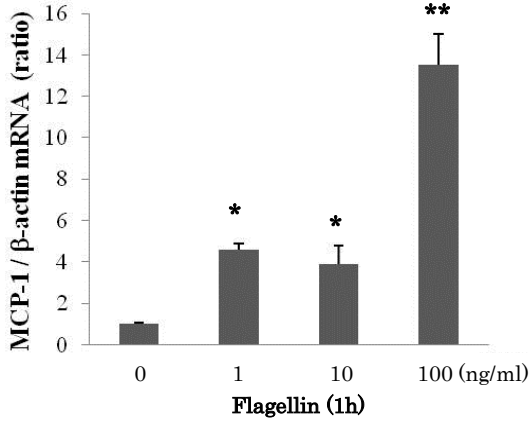


図 3

(3) E1 細胞を 100ng/ml のフラジェリンで刺激したところ、培養上清中の MCP-1 タンパク量は、3 時間以降有意に誘導され、処理後 24 時間まで時間依存的に誘導された (図 4)。

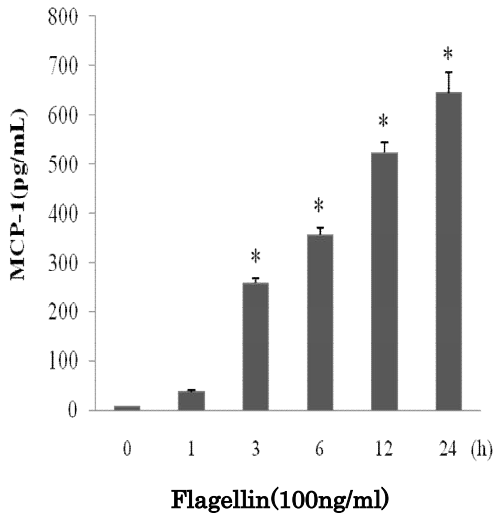
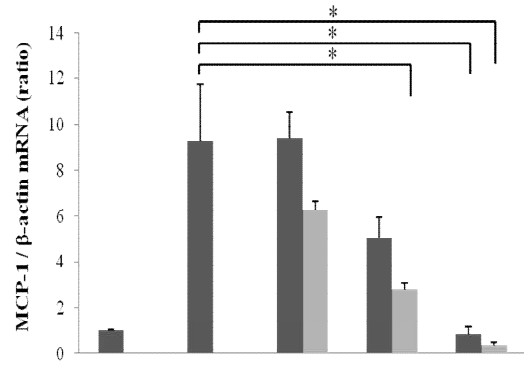


図 4

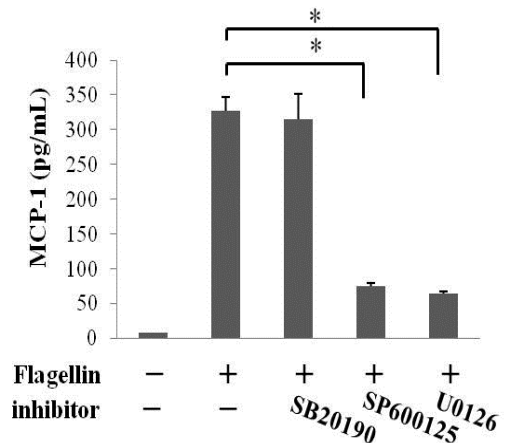
(4) 種々の MAP kinase 阻害薬を添加し、E1 細胞における MCP-1 mRNA の発現について検討した。その結果、SP600125 (JNK 阻害剤) および U0126 (MEK-ERK1/2 阻害剤) は、フラジェリンが誘導する MCP-1 mRNA の発現を濃度依存的に抑制した (図 5)。



Flagellin	-	+	+	+	+
Inhibitor	-	-	20 50	20 50	20 50

図 5

(5) (4) と同様に SP600125 および U0126 は、E1 細胞におけるフラジェリンが誘導する MCP-1 タンパクの発現を抑制した (図 6)。



Flagellin	-	+	+	+	+
inhibitor	-	-	SB20190	SP600125	U0126

図 6

(6) E1 細胞を 100ng/ml のフラジェリンで刺激したところ、処理後 3 時間までは破骨細胞形成抑制因子である OPG mRNA の発現レベルが上昇していたが、処理後 6 時間以降では、OPG mRNA の発現レベルが処理後 3 時間のレベルと比較し、有意に抑制された (図 7)。

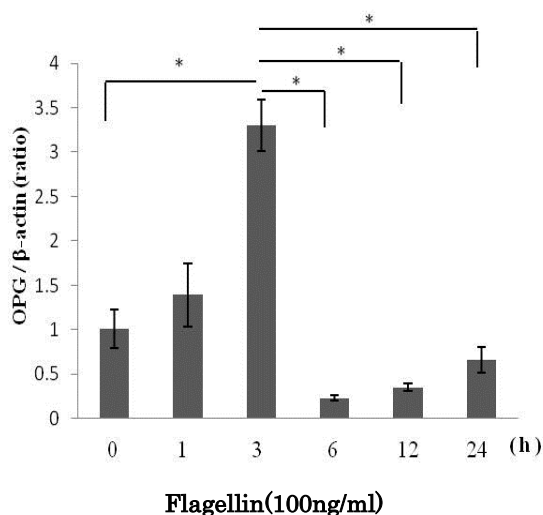


図 7

- (7) OPG mRNA の発現に対する MCP-1 の影響を明らかにするために、MCP-1 中和抗体を添加したところ、フラジェリンにより抑制された OPG mRNA がさらに down-regulation された (図 8)。

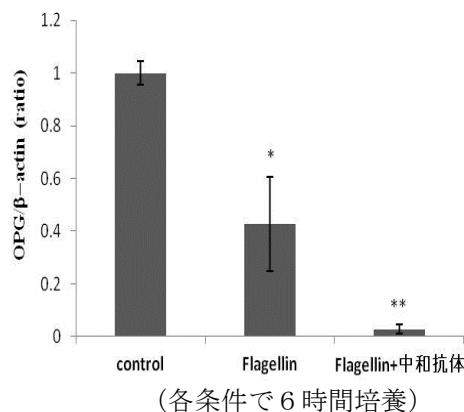


図 8

- (8) OPG mRNA の抑制に関するサイトカインを明らかにするために、IL-1β, IL-6, TNF-α および PGE2 に着目した。E1 細胞をフラジェリン処理すると処理後 1 時間で IL-6 および PGE2 mRNA の up-regulation が認められた。それゆえ、この 2 つのサイトカインが OPG mRNA の抑制に関与しているか否かを検討した。フラジェリン+IL-6 中和抗体の条件で培養しても E1 細胞におけるフラジェリンによる OPG mRNA の発現動態に変化は認めなかった。一方、COX2 阻害薬である NS398 を添加したところ、OPG mRNA の

down-regulation は抑制され、PGE2 がこの現象をもたらすサイトカインの 1 つであることが示唆された。

上述してきた結果より、

- ①骨芽細胞はフラジェリン刺激により、ケモカインの 1 つである MCP-1 を JNK および MEK-ERK1/2 を介して産生すること
 - ②フラジェリンは骨芽細胞における OPG の発現レベルを抑制し、破骨細胞の分化を促進すること
 - ③骨芽細胞は、フラジェリン存在下で MCP-1 を産生することで破骨細胞の産生を抑制し、骨代謝の維持に関与すること
- などが明らかになった。

骨芽細胞は、骨代謝調節機構以外の機能すなわち、局所における免疫系制御機構にも関与することや、鞭毛タンパクであるフラジェリンを有する *T. denticola* が歯周病の進行過程に関与することが推測されたので、今後は今回の実験で誘導された MCP-1 に着目し、動物実験等を行い、歯科臨床応用への可能性について検討を行う必要があると思われる。

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 1 件)

- ① Kimiya Nakamura, Yoshiaki Deyama, Yoshitaka Yoshimura, Kuniaki Suzuki and Manabu Morita: Toll like receptor 5 ligand induces monocyte chemoattractant protein-1 in mouse osteoblastic cells. Biomedical Research 33 : 39-44, 2012. (査読 : 有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 中村公也, 竹原順次, 三宅 亮, 兼平 孝: 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における TLR5 リガンドによる MCP-1 の発現誘導. 第 60 回日本口腔衛生学会・総会. 2011 年 10 月 9 日. 松戸市.
- ② 中村公也, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明: 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における TLR5 リガンドによる MCP-1 の発現誘導. 第 61 回日本薬理学会北部会. 2010 年 9 月 10 日. 札幌市.
- ③ Kimiya Nakamura, Yoshiaki Deyama, Yoshitaka Yoshimura, Kuniaki Suzuki: Flagellin induces MCP-1 in mouse osteoblastic cells. The 88th General Session & Exhibition of the IADR. 2010 年 7 月 16 日. Barcelona.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 公也 (NAKAMURA KIMIYA)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：00261313

(2) 研究分担者

出山 義昭 (DEYAMA YOSHIAKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：80271667

兼平 孝 (KANEHIRA TAKASHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：90194935

(3) 連携研究者

なし