

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293437

研究課題名(和文) ECM related Periodontal Medicine病態論の確立

研究課題名(英文) Establishment of ECM related Periodontal medicine

研究代表者

山田 聡 (Yamada, Satoru)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40359849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの歯周医学(Periodontal Medicine)は、歯周組織での歯周病菌の感染と慢性炎症が全身へ影響するという観点から研究が進められてきた。最近、内在性リガンドによる自然免疫の異常から組織恒常性が破綻することで、様々な病態が発症するという「自然炎症の破綻」が注目を集めている。そこで、本研究では、組織恒常性維持の中心的役割を担う細胞外基質(ECM)としてPLAP-1およびTGF- β に着目し、解析した。その結果、歯周組織および全身の標的臓器に共通に発現・機能しているPLAP-1、TGF- β の異常が自然炎症バランスを破綻させ、歯周病および全身疾患を引き起こす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated common molecules which are expressed and function in periodontal tissue and other organs/tissues to understand molecular pathogenesis of periodontal medicine. It was shown that PLAP-1 which is expressed in periodontal ligament and adipose tissue functions as positive regulator for adipogenesis. PLAP-1 KO mice shows the improvement of HFD-induced overweight and significantly high glucose tolerance and enhanced insulin sensitivity compared to WT mice. HFD-induced alveolar bone resorption in PLAP-1 KO mice were also less. In LDS model mouse, in which TGF- β signal is disordered alveolar bone loss by P.g inoculation was significantly increased, compared to WT. The LDS macrophages showed an up-regulated response to LPS compared to that of WT. These results suggest that PLAP-1 plays important roles in HFD-induced obesity and periodontitis and the abnormality of TGF- β signal may accelerate pathogenesis or progress of periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周医学 遺伝子改変マウス 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周病と全身疾患との関連性を説明づける病態メカニズムとして、炎症歯周組織の歯周病菌や菌体成分が血行性に標的臓器に到達して直接作用する経路、歯周組織での炎症・免疫反応により産生されるサイトカインや熱ショックタンパクに対する自己抗体が血行性に標的臓器に到達し作用する経路、歯周病局所で産生されるサイトカインが血行性に肝臓に到達し、急性期タンパク産生を介して標的臓器に影響を及ぼす経路などが示されている(北村ら医学の歩み 2010)。すなわち、これらは、歯周組織局所の慢性炎症に起因するサイトカイン、炎症代謝産物あるいは歯周病菌が、血行性に全身の標的臓器・組織に影響を及ぼすという病態論である。

一方、炎症局所に存在する細胞外基質(ECM)やECM関連分子が内因性リガンドとして、病原体センサー(インフラマソーム)と相互作用することで、免疫・炎症反応をコントロールしていることが明らかにされている(Anwar et al. Exp Mol Med. 2013)。興味深いことに、インフラマソームは、感染のない正常状態でもECMと絶えず相互作用することで平衡状態を保っており、このインフラマソームを介した微弱な炎症反応(自然炎症)が、組織の恒常性維持において重要な役割を担っていると考えられている。現在、この自然炎症の恒常性破綻により、様々な病態が惹起されるという新たな病態論が提唱されている(Fukui et al. Exp. Cell Res. 2012)。

申請者らは、歯根膜から単離・同定した新規ECM分子PLAP-1が、BMP-2やTGF- β のアンタゴニストとして歯根膜細胞の石灰化を抑制することで歯周組織の恒常性を制御していることを明らかとしてきた(Yamada et al. Gene 2001, J. Dent. Res. 2006, J. Biol. Chem. 2007, Tomoeda, Yamada et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008)。興味深いことに、申請者が研究代表者であるH23-25年度基盤研究B(No. 23390478)の結果から、PLAP-1は、TLR2/4と相互作用することにより炎症・免疫反応を制御することを見出している。このことは、PLAP-1が内因性リガンドとして、歯周組織における自然炎症の制御に関与している可能性を示唆している。さらに、マウスを用いてPLAP-1の全身における発現パターンを解析したところ、PLAP-1は歯根膜組織だけではなく、長管骨の骨膜組織、脂肪組織、心臓弁、腸管などにも発現していることが明らかとなり、歯周組織のみならず全身の各臓器においても、PLAP-1は組織恒常性の制御を担っているものと想定される。興味深いことに、我々が樹立したPLAP-1ノックアウトマウスは、実験的歯周炎に対する感受性異常を示すのみならず、高脂肪食による肥満病態モデルにおいて脂肪組織の障害が誘導される可能性が予備実験において示唆されている。すなわち、PLAP-1は、歯周病ばか

りでなく、メタボリックシンドローム等の全身疾患の原因遺伝子の一つとなる可能性が考えられる。加えて、申請者らは、結合組織におけるTGF- β 受容体遺伝子の異常によりECMの恒常性維持が破綻することで、大動脈瘤や解離等の心血管疾患を発症するロイス・ディーツ症候群(LDS)患者において侵襲性歯周炎の発症リスクが高くなることを見出している。H24-25年度挑戦的萌芽研究(No. 24659923)にて、TGF- β 受容体遺伝子変異をノックインしたLDSモデルマウスを樹立し、現在、ECMでの自然免疫を介したTGF- β シグナル異常が心血管系疾患と侵襲性歯周炎とに及ぼす影響を解析している。

以上のことから申請者は、歯周組織と全身の標的臓器に共通に発現し機能しているPLAP-1およびTGF- β などのECM関連分子の機能異常が、自然炎症のバランス(組織恒常性)を破綻させ、歯周病および全身疾患を引き起こすという全く新しい概念に基づくECM related Periodontal Medicine病態論を着想するに至った。

2. 研究の目的

これまでの歯周医学(Periodontal Medicine)は、歯周組織での歯周病菌の感染とそれにより惹起される慢性炎症が全身へ影響するという観点から研究が進められてきた。最近、内在性リガンドによる自然免疫の異常から組織恒常性が破綻することで、様々な病態が発症するという「自然炎症の破綻」が注目を集めている。そこで、本研究では、組織恒常性維持の中心的役割を担う細胞外基質(ECM)および関連分子に着目し、歯周組織および全身の標的臓器に共通に発現・機能しているECM分子群の異常が自然炎症バランスを破綻させ、歯周病および全身疾患を引き起こすという全く新しい概念のECM related Periodontal Medicine病態論を確立する。その詳細な分子メカニズムを解明し、同病態論に基づいた新しい歯周病診断法・治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 歯周炎モデルの解析

野生型マウス、ECM遺伝子改変マウスの上顎大臼歯に、Porphyromonas gingivalis(P.g.W83株)バイオフィルムを付着させた絹糸を結紮し、2週間留置することでバイオフィルムを形成させ、歯周組織に実験的歯周炎を惹起させた。経日的にマイクロCT撮影を行い、画像分析による歯槽骨吸収の定量性解析を行った。また、炎症歯周組織の病理組織切片を作製し、病理組織学的解析を行った。さらに、P.g.菌を1ヶ月間培養し、3日に1回、合計10回、マウスに経口投与するマウス歯周炎モデルを適応し、マイクロCT撮影を行い、画像分析による歯槽骨吸収の定量性解析を行った。また、炎症歯周組織の病理組織切片を作製し、病理組織学的解析を行った。

(2) 肥満モデルの解析

野生型マウスおよび各 ECM 遺伝子改変マウスに対して、60kcal%高脂肪食 (HFD) および対照群として、10kcal%コントロール飼料 (NCD) を 4 ヶ月間与えることで肥満病態を惹起させた。高脂肪食開始前、開始後 1 週間毎に体重の測定、1 ヶ月毎にブドウ糖負荷試験 (GTT)、インスリン負荷試験 (ITT) を行った。すなわち、GTT は、マウスに 16 時間絶食させた後、1.5 g/kg グルコースを腹腔内に投与し、0、15、30、60、120 分後における血糖値を測定した。ITT は、0.75 U/kg インスリンを腹腔内に投与し、0、15、30、60、120 分後における血糖値を測定した。血糖値測定はワンタッチウルトラを用いた。

NCD または HFD での飼育前および後の WT および遺伝子改変マウスの上顎を採取し、マイクロ CT により歯槽骨の吸収量を測定した。さらに、精巢上体脂肪を採取し、組織学的解析を行った。

(3) LDS モデルマウスの解析

180 日間の生存率について、カプランマイヤーの生存曲線で示すことにより比較した。また、24 週齢オスの LDS モデルマウスから胸部大動脈を回収し、組織切片を作製、エラスチカ・ワンギーゾン染色を行った。

(4) *in vitro* 細胞機能の解析

マウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞に PLAP-1 遺伝子に対する siRNA を導入した。同細胞株を脂肪分化誘導することで、PLAP-1 遺伝子の脂肪分化における機能を解析した。また、PLAP-1 発現アデノウイルスを用いて作製したリコンビナント PLAP-1 を培養時に添加することで、脂肪分化に対する影響を解析した。さらに、PLAP-1 ノックアウトマウスの皮下脂肪を採取した。同組織をコラゲナーゼ処理し、遠心分離により、間質血管細胞群を精製し、同細胞を脂肪組織前駆細胞として、脂肪分化培地にて培養した。

LDS モデルマウスからコラゲナーゼ処理など通法にしたがって細胞を精製し、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を樹立した。同細胞を TGF- β で刺激し、その際の TGF- β シグナルカスケードについて遺伝子レベル、タンパクレベルで解析した。さらに、LDS モデルマウスの腹腔内に 4%チオグリコネート培地を注射し、3 日後に腹腔内洗浄することで、腹腔内マクロファージを採取した。同細胞を *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) にて刺激し、炎症性サイトカインの発現を Real-time PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) LDS モデルマウスにおける実験的歯周炎による歯周組織の変化

上記の実験方法では、PLAP-1 ノックアウトにおいて、WT マウスと比較して歯槽骨吸

収量に差を認めることはなかった。現在、絹糸の留位期間や、絹糸と *P.g.* 菌の経口投与を同時に行うなど、研究方法の変更を比較検討している。

一方、LDS モデルマウスにおいては、*P.g.* 菌の経口投与による歯周炎モデルにて、WT と比較して、有意に歯槽骨吸収が起きていることが明らかとなった。歯周組織切片の組織学的解析より、*P.g.* 菌投与により、歯槽骨に近接した部位に多核細胞が観察された。TRAP 染色の結果、LDS モデルマウスでは、*P.g.* 菌投与により、WT マウスと比較して、有意に TRAP 陽性の破骨細胞が増加していることが示された。本結果から、TGF- β シグナル異常により歯周炎の発症・進行が促進される可能性が明らかとなった。

(2) PLAP-1 ノックアウトマウスにおける高脂肪食誘導性肥満病態および歯槽骨吸収の抑制

LDS モデルマウスにおいて高脂肪食誘導性の肥満モデルを作成したところ、WT マウスと比較して大きな表現型の違いは認めなかった。

一方、PLAP-1 ノックアウトマウスにおいては、高脂肪食誘導性の体重増加が WT マウスと比較して有意に抑制され、脂肪細胞の肥大化も少ないことが示された。GTT および ITT の結果から、インスリン感受性の低下が WT マウスと比較して、有意に改善していることが明らかとなった。さらに、高脂肪食誘導性の歯槽骨吸収量が、WT マウスと比較して、有意に少ないことが示された。

(3) LDS モデルマウスの大動脈病態解析

LDS モデルマウスの生存率についてカプランマイヤーの生存曲線にて 180 日間観察したところ、WT と比較して早逝であることが示された。大動脈のエラスチカ・ワンギーゾン染色の結果、LDS モデルマウスでは、弾性線維の断裂やねじれが認められた。

(4) *in vitro* 細胞機能の解析

脂肪分化における PLAP-1 の促進的機能 siRNA により PLAP-1 遺伝子をノックダウンした 3T3-L1 細胞株においてはコントロール siRNA 導入株と比較して脂肪滴形成が有意に低いことが明らかとなった。さらに、脂肪分化マーカー *Adipoq*、*Fabp4*、*Pparg*、*Cebpa* の遺伝子発現を解析した結果、PLAP-1 ノックダウン株では有意に発現が抑制されていることが明らかとなった。次に、リコンビナント PLAP-1 存在下で 3T3-L1 細胞の脂肪分化誘導を行ったところ、リコンビナント PLAP-1 添加により脂肪分化が促進されることが示された。さらに、PLAP-1 ノックアウトマウス由来脂肪前駆細胞は、脂肪分化能力が低下していることが明らかとなった。

TGF- β シグナル異常が LPS 反応に及ぼす

影響

LDS モデルマウス由来の腹腔マクロファージを LPS で刺激し、その際の炎症性サイトカイン発現を Real-time PCR 法にて解析した結果、WT 由来マクロファージと比較して、LDS モデルマウスマクロファージでは、LPS 刺激による炎症性サイトカインの発現が有意に亢進していることが明らかとなった。

以上のように、ECM である PLAP-1 は歯根膜および脂肪組織において、TGF- β シグナルは、歯根膜と大動脈においてそれぞれ機能しており、それらの異常が、歯周病と各全身疾患の発症・進行に関与してい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 4 件)

Yamada, S., Ozaki, N., Tsushima, K., Yamaba, S., Fujihara, C., Awata, T., Sakashita, H., Kajikawa, T., Kitagaki, J., Yamashita, M., Yanagita, M. and Murakami, S.*: Transcriptome reveals Cathepsin K in periodontal ligament differentiation. J Dent Res 95:1026-1033, 2016. 査読有り

Yamaba, S., Yamada, S.*, Kajikawa, T., Awata, T., Sakashita, H., Tsushima, K., Fujihara, C., Yanagita, M. and Murakami, S.: PLAP-1/aspirin regulates TLR2- and TLR4-induced inflammatory responses. J Dent Res 94: 1706-1714, 2015. 査読有り

Awata, T., Yamada, S.*, Tsushima, K., Sakashita, H., Yamaba, S., Kajikawa, T., Yamashita, M., Takedachi, M., Yanagita, M., Kitamura, M. and Murakami, S.: PLAP-1/asporin positively regulates FGF-2 activity. J Dent Res 94:1417-1424, 2015. 査読有り

Yamada, S., Tauchi, T., Awata, T., Maeda, K., Kajikawa, T., Yanagita, M. and Murakami, S.*: Characterization of a novel periodontal ligament-specific periostin isoform. J Dent Res 93:89-95, 2014. 査読有り

[学会発表](計 9 件)

Tsushima K, Yamada S, Awata T, Yamaba S, Sakashita H, Kinoshita M, Takedachi M, Kitagaki J, Yamashita M, Yanagita M, Nozaki T, Saito M, Murakami S. Analysis of pathomolecular condition of periodontitis with Loeys-Dietz Syndrome. International Association of Dental Research (IADR) 2017, 2017 年 3 月 22 日、San Francisco, USA

阪下裕美、山田 聡、津島賢一朗、木下昌毅、藤原千春、梶川哲宏、粟田敏仁、山羽聡子、村上伸也、脂肪分化による脂肪分化調節機構の解明、第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会、2016 年 10 月 7 日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

津島賢一朗、山田 聡、粟田敏仁、山羽聡子、阪下裕美、木下昌毅、竹立匡秀、北垣次郎太、山下元三、柳田 学、野崎剛徳、北村正博、村上伸也、Loeys-Dietz 症候群モデルマウスを用いた歯周病の分子病態解析、第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会、2016 年 10 月 7 日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

Tsushima K, Yamada S, Awata T, Yamaba S, Sakashita H, Takedachi M, Kitagaki J, Yamashita M, Yanagita M, Nozaki T, Kitamura M, Saito M, Murakami S, Pathomolecular relationship between Loeys-Dietz syndrome and aggressive periodontitis. 63rd Annual meeting of Japanese Association for Dental Research, 2015 年 10 月 30-31 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

阪下裕美、山田 聡、津島賢一朗、山羽聡子、粟田敏仁、梶川哲宏、竹立匡秀、村上伸也、脂肪分化過程における PLAP-1 の機能解析、第 58 回春季日本歯周病学会学術大会、2015 年 5 月 16-17 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

津島賢一朗、山田 聡、粟田敏仁、山羽聡子、阪下裕美、竹立匡秀、北垣次郎太、山下元三、柳田 学、野崎剛徳、北村正博、齋藤正寛、村上伸也、Loeys-Dietz 症候群モデルマウスの作製と解析、第 58 回春季日本歯周病学会学術大会、2015 年 5 月 16-17 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

Yamada S, Molecular basis of periodontal ligament homeostasis regulated by PLAP-1/asporin. International Association of Dental Research (IADR), 2014 年 6 月 27 日、Cape Town, South Africa

阪下裕美、山田 聡、梶川哲宏、粟田敏仁、山羽聡子、津島賢一朗、竹立匡秀、村上伸也、肥満病態における PLAP-1 の機能解析、第 57 回春季日本歯周病学会学術大会、2014 年 5 月 23 日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

山羽聡子、山田 聡、粟田敏仁、阪下裕美、津島賢一朗、梶川哲宏、竹立匡秀、柳田 学、村上伸也、TLR を介した PLAP-1 の炎症制御機構、2014 年 5 月 23 日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 聡 (YAMADA, Satoru)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：40359849

(2)研究分担者

村上 伸也 (MURAKAMI, Sinya)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70239490

竹立 匡秀 (TAKEDACHI, Masahide)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60452447

森崎 隆幸 (MORISAKI, Takayuki)
東京工科大学・医療保健学部・教授
研究者番号：30174410