

平成 31 年 4 月 20 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 0435

氏 名 吉本 哲也
(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：Kansas city, Indianapolis（国名：アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
TGF- β を介した歯周炎発症機序の解明
3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
Department of Oral and Craniofacial Sciences, School of Dentistry, University of Missouri-Kansas City, Kansas City, MO, USA, Yasuyoshi Ueki
Biomedical Sciences and Comprehensive Care, Biomedical and Applied Sciences, Indiana University, Indianapolis, IN, USA, Yasuyoshi Ueki

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10—別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

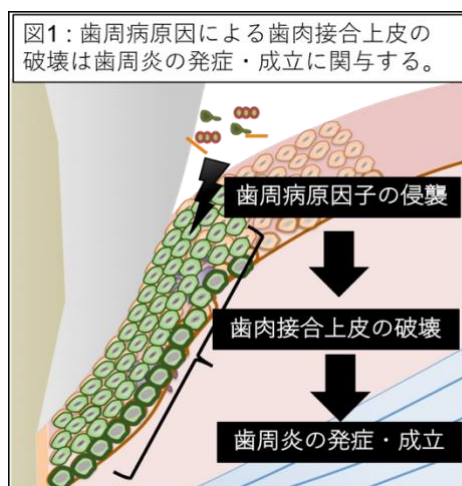
緒言

申請者は、ミズーリ大学カンザスシティ校歯学部にて 2017 年 4 月から 2018 年の 7 月まで、また受け入れ研究者の異動のため 2018 年 8 月から 2019 年 3 月までインディアナ大学歯学部にて、研究課題である「TGF- β を介した歯周炎発症機序の解明」に従事した。研究室の異動は当初の研究計画になく目的の遂行に大きく影響を与えたが、アメリカで異なる 2 つの研究機関で働けたことは私にとって大きな経験になった。海外特別研究員として二年間不自由なく働く事ができ、日本学術振興会には深謝の意を表する。以下に所期の目的の遂行状況および成果の詳細を述べる。

(1) 研究の背景・目的

生活習慣病である歯周炎は、慢性の細菌感染による過剰な免疫反応によって引き起こされ、その結果、歯槽骨の破壊、歯牙の喪失につながる疾患である。また歯周炎は口腔機能を著しく低下させる原因となるだけでなく糖尿病や関節リウマチ、心臓血管疾患、腸内細菌叢への影響など他の全身疾患へのリスクファクターとなる事が知られている。このことから歯周炎の発症予防、治療法の開発は重要な課題の一つと言える。そこで、申請者は歯肉接合上皮の破壊が歯周炎発症における重要な役割を果たす可能性(後述)を追求し、細菌除去しか根治治療のない歯周炎に対する SH3BP2-TGF- β 間のシグナルクロストークに注目した新たな治療法開発の礎とすることを研究の目的として掲げた。

歯肉接合上皮は外来抗原の侵襲に対して最前線に位置する重要な組織である。すなわち、歯肉接合上皮の破壊が歯周炎の発症・成立につながる(右図 1)。そこで申請者は、歯肉接合上皮の破壊の一因として、歯周病原菌が引き起こす歯肉接合上皮の過剰なアポトーシスに着目した。Tonetti らは、健常者に比較し有意に多くのアポトーシス陽性細胞が歯周炎患者の歯肉接合上皮中に認められることを報告している(Tonetti MS et al., Infect Immun. 1998)。また申請者は過去に、歯周病原因子の刺激による歯肉接合上皮細胞由来の TGF- β 1 の増加が、オートクライン/パラクライン的に作用することでアポトーシスを加速し、上皮の破壊、歯周炎発症に寄与していることを明らかにしてきた(Yoshimoto et al., 2016, Cellular microbiology)。



一方、受入研究室では、アダプター蛋白 SH3 domain-binding protein 2 (SH3BP2)が Toll-like レセプター抗原に対する免疫防御における新規の key regulator である事を見出し、細菌感染で起こる歯周炎の病態成立においても SH3BP2 が関与するのではないかと示唆してきた。さらに、絹糸結紮により歯周炎を誘導した SH3BP2 ノックアウトマウスの歯肉組織中の 5 日後での TGF- β 1 遺伝子発現が野生型マウスに比べて増加することを見出している。以上の事から、SH3BP2 の機能損失は TGF- β を介した上皮バリアの破壊を促進し、歯周炎の病態成立に関与している可能性が考えられる。この観点から SH3BP2-TGF- β 間のシグナルクロストークがどのように歯周炎の発症・成立機序に関与するのかを解

明することを派遣先での研究目的とした。

(2) 研究成果

1. Porphyromonas gingivalis (Pg)誘導性歯周炎マウスモデルの確立

① 序論

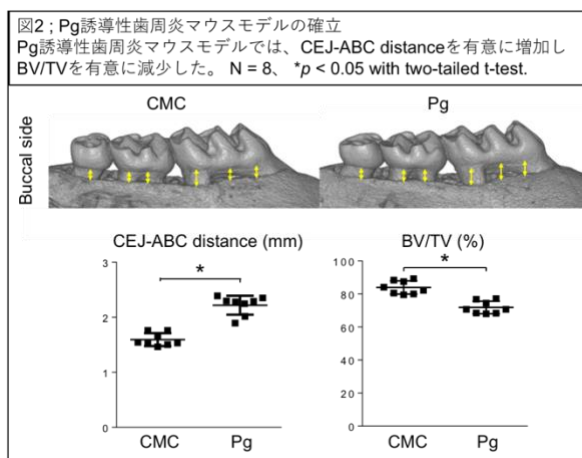
歯周炎を誘導するマウスモデルとして、現在主に2種類の方法が用いられている。一つ目は、ヒト歯周病の代表的な原因細菌の一つとして知られている *Porphyromonas gingivalis* (Pg)をマウス口腔内に持続的に感染させ、歯周炎を誘導するモデル(Pg 誘導性歯周炎マウスモデル)である。二つ目は、絹糸を上顎第二臼歯に結紮して歯周炎を誘導するモデル(絹糸結紮誘導性歯周炎モデル)である。しかし、絹糸結紮誘導性歯周炎モデルでは歯肉接合上皮を破壊してしまい本研究に適さないため、Pg 誘導性歯周炎モデルを採用した。

② 材料と方法

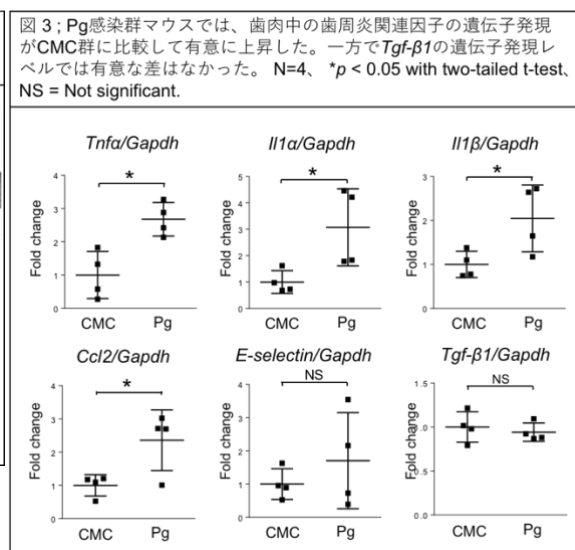
まず上記の歯周炎モデルを樹立するために生後10週目の野生型 C57BL/6 マウス (Male, Jackson laboratory より購入)の口腔内に歯周病原菌である Pg 33277 (ミシガン大学歯学部 佐々木元 博士より提供)を 10^9 CFU を2日ごとに5回感染させ、最後の感染から6週間後に屠殺した。Sham 群として2% carboxymethylcellulose (CMC)を用いた。上顎歯槽骨破壊を評価するために Micro CT による解析を行い、セメントエナメルジャンクションと歯槽骨頂との距離(CEJ-ABC distance, mm、上顎歯全ての咬頭直下(頬側、口蓋側)の12箇所の合計)また Bone volume / Tissue volume (BV/TV, %, 上顎第二臼歯の頬側根分岐部 21slice)を計測、定量した。さらに、Pg 感染6週間後の歯肉中における遺伝子発現を quantitative-PCR (qPCR)法により評価した。

③ 結果

図2に示すように、Pg 感染群では CMC 群に比較して、CEJ-ABC distance は有意に増加し、また BV/TV は有意に減少した。また図3に示すように、歯肉中における炎症性サイトカイン *Il1 α* 、*Il1 β* 、*Tnfa*、また歯周炎マーカーの一つである *Ccl2*、*E-selectin* の遺伝子発現を解析したところ CMC 群と



比較して有意に上昇していた。その一方で *Tgf- β 1* の遺伝子発現レベルは CMC 群と比較して有意な変化はなかった。



④ 考察

この結果は、本研究において Pg 誘導性歯周炎マウスモデルが確立されたことを示唆する。一方で、感染 6 週後における歯肉中の *Tgf-β1* 遺伝子レベルに CMC 群、Pg 群の両者間に有意な差は認められなかった。このことは、申請者らの *in vitro* での歯周病原因子刺激下において TGF-β1 遺伝子発現レベルは変化しないという過去の報告と一致する (Yoshimoto et al., 2016, Cellular microbiology)。

2. 上皮細胞特異的に TGF-β type II 受容体 (TGF-βRII) をノックアウトしたマウス (*Tgf-βRII^{epi-/-}*) マウスの

解析

① 序論

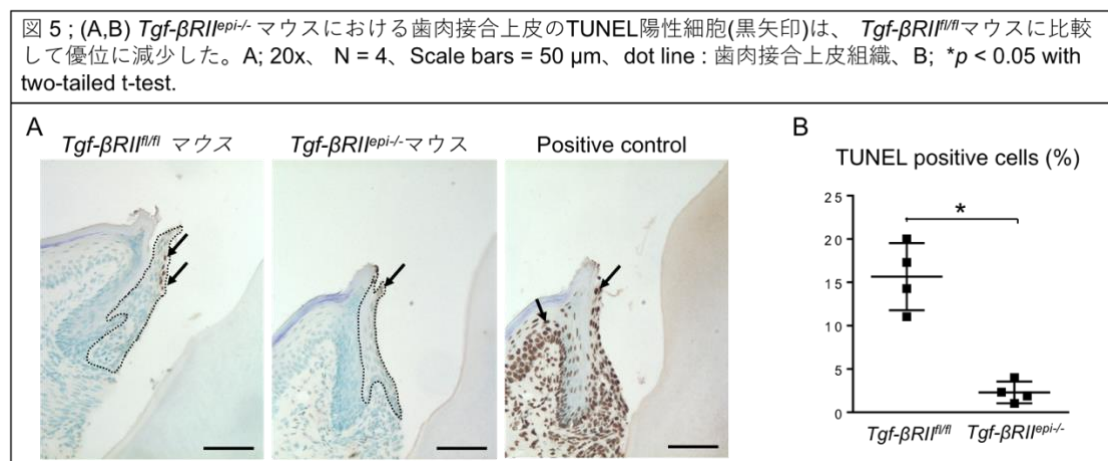
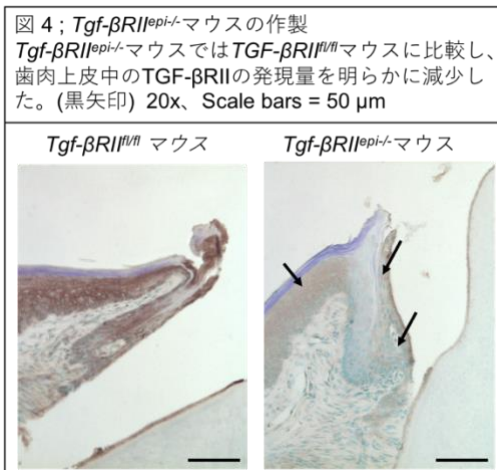
Ohgushi らは、TGF-β シグナルが腸管上皮の生理的なアポトーシスを制御し、その恒常性維持に重要であることを報告している (Ohgushi et al. 2005)。また申請者は過去に、歯周病原因子が歯肉上皮細胞の TGF-β シグナルを活性化することで、歯肉上皮細胞のアポトーシスを加速させ歯周炎の発症・成立に関連することを報告してきた (Yoshimoto et al., 2014, Journal of Dental Research, Yoshimoto et al., 2016, Cellular microbiology)。これらの知見から、歯肉上皮の TGF-β シグナルは歯周炎発症また成立に関連するのではないかと考えた。そこで、上皮細胞特異的に TGF-β type II 受容体 (TGF-βRII) をノックアウトしたマウス (*Tgf-βRII^{epi-/-}*) マウスを作製し、このマウスに Pg 誘導性歯周炎を惹起させ、検討する計画とした。

② 材料と方法

上記のマウスを作製するために、Keratin14 プロモーターにより表皮ケラチノサイトに Cre とエストロゲンレセプター融合タンパク質 (Cre-ERT) を発現するマウス (KR14-Cre-ERT, Jackson laboratory より購入) と TGF-βRII flox/flox (*TGF-βRII^{fl/fl}*, Jackson laboratory より購入) マウスとを交配させ、タモキシフェン投与により KR14-Cre- TGF-βRII fl/fl (*Tgf-βRII^{epi-/-}*) マウスの作成を行った。まず、Cre-ER-loxp システムが正常に作動しているか確認するため *Tgf-βRII^{epi-/-}* マウスまた *Tgf-βRII^{fl/fl}* マウスにおける歯肉上皮の TGF-βRII の発現を検討した (図 4)。具体的には、タモキシフェン (75 mg/kg) をそれぞれのマウスに 5 日間連続で腹腔内注射し、最後の注射の 2 週間後に屠殺、解析を行った。マウス屠殺後、マウスの上顎骨を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) にて固定、EDTA にて 2 週間脱灰を行い段階的に脱水後、パラフィン包埋を行った。包埋後、矢状面で 6μm の厚さに薄切した。組織学的解析として、TGF-βRII の免疫組織染色、またアポトーシス陽性細胞を検出するために、positive control として DNase を用い TUNEL 染色を行った。

③ 結果

右図4に示されるように、 $Tgf-\beta RII^{epi-/-}$ マウスでは $Tgf-\beta RII^{fl/fl}$ マウスに比較し、歯肉上皮(図は上顎第一臼歯近心側歯肉接合上皮付近)において TGF- βRII の発現量は明らかに減少した(黒矢印)。このことから、上皮特異的に効率的なリコンビネーションが起きていることを確認した。さらに歯肉上皮の TGF- β シグナルがアポトーシスに与える影響を検討するために、TUNEL 染色を行った。興味深いことに $Tgf-\beta RII^{epi-/-}$ マウスの歯肉接合上皮組織において、 $Tgf-\beta RII^{fl/fl}$ マウスに比較し TUNEL 陽性細胞数は優位に減少した(下図5A 矢印, B)。



④ 考察

図4に示されるように、この結果は本研究において $TGF-\beta RII^{epi-/-}$ マウスが樹立されたことを示唆する。また、興味深いことに $TGF-\beta RII^{epi-/-}$ マウスの歯肉接合上皮組織において、 $TGF-\beta RII^{fl/fl}$ マウスに比較し TUNEL 陽性細胞数が優位に減少した。この結果は *in vivo* においても歯肉上皮の TGF- β シグナルが歯肉上皮細胞のアポトーシスに関与することを示唆し、申請者が行ってきた *in vitro* の実験を支持する。しかし、タモキシフェン投与後2週間では、歯肉接合上皮における TGF- β シグナルの減少、またアポトーシス陽性細胞の減少が、歯周組織の炎症や恒常性の異常を引き起こすまでには至っていなかった。アポトーシス細胞の減少は、組織恒常性の異常につながる。したがってタモキシフェン投与後の観察期間を延長することで、歯周組織に何らかの影響がでる可能性が考えられ、更なる検討が必要である。

3. $TGF-\beta RII^{epi-/-}$ マウスにおける Pg 誘導性歯周炎モデルの応用

① 序論

歯肉上皮における TGF- β シグナルの欠失が Pg 誘導性の歯周炎成立にどのように影響を及ぼすか検討するために、*TGF- β RII^{epi-/-}* マウスに Pg 誘導性の歯周炎を惹起させ、解析、検討を行った。

② 材料と方法

生後 10 週目の *TGF- β RII^{fl/fl}* マウスまた *TGF- β RII^{epi-/-}* マウス (Male) の口腔内に Pg 33277 を 10^9 CFU を 2 日ごとに 5 回感染させ、最後の感染から 6 週間後に屠殺した。Sham 群として 2% CMC を用いた。上顎歯槽骨破壊を評価するために Micro CT による解析を行い、CEJ-ABC distance (mm、上顎歯全ての咬頭直下(頬側、口蓋側)の 12 箇所合計)また BV/TV (%、上顎第二臼歯の頬側根分岐部 21slice) を計測、定量した。組織学的な解析として HE staining、TRAP staining を行った。

③ 結果

図 6 に示すように、Pg 感染 *TGF- β RII^{fl/fl}* マウスでは CMC 群に比較して、CEJ-ABC distance は有意に増加し、BV/TV は有意に減少した。興味深いことに、Pg 感染 *TGF- β RII^{epi-/-}* マウスにおける CEJ-ABC distance また BV/TV は、Pg 感染 *TGF- β RII^{fl/fl}* マウスと比較して有意に改善した。さらに、Pg 感染 *TGF- β RII^{epi-/-}* マウスにおける Number of Osteoclasts/Bone Surface (N.Ocs/ B.S) また Osteoclasts surface / Bone surface (Ocs / B.S) は Pg 感染 *TGF- β RII^{fl/fl}* マウスと比較して有意に減少していた(図 7 A、B)。一方で、Pg 感染 *TGF- β RII^{fl/fl}* マウスまた Pg 感染 *TGF- β RII^{epi-/-}* マウスいずれにおいても炎症細胞の浸潤は認められなかった(図 8)。

図6 ; Pg感染*Tgf-βRII*^{epi-/-}マウスにおいて、Pg感染*Tgf-βRII*^{fl/fl}マウスと比較し歯槽骨破壊が有意に改善された。黄矢印 ; CEJ-ABC distance(mm)、Data are presented as mean ± SD. **p* < 0.05. ANOVA with Tukey-Kramer post-hoc test. NS = not significant.

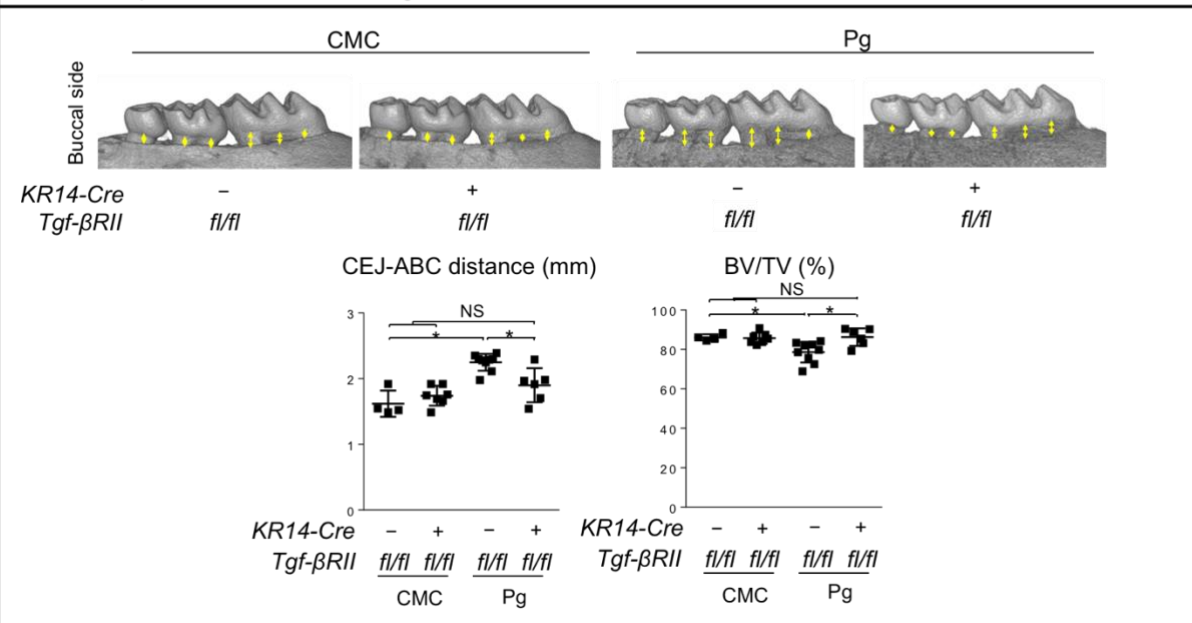


図7 ; PG感染*Tgf-βRII*^{epi-/-}マウスにおけるN. OCs/B.SまたはOCs.S/B.Sは、PG感染*Tgf-βRII*^{fl/fl}マウスに比較して優位に減少した。A ; 20x、Scale bars = 50 μm、B ; N=3、**p* < 0.05. ANOVA with Tukey-Kramer post-hoc test. NS = not significant.

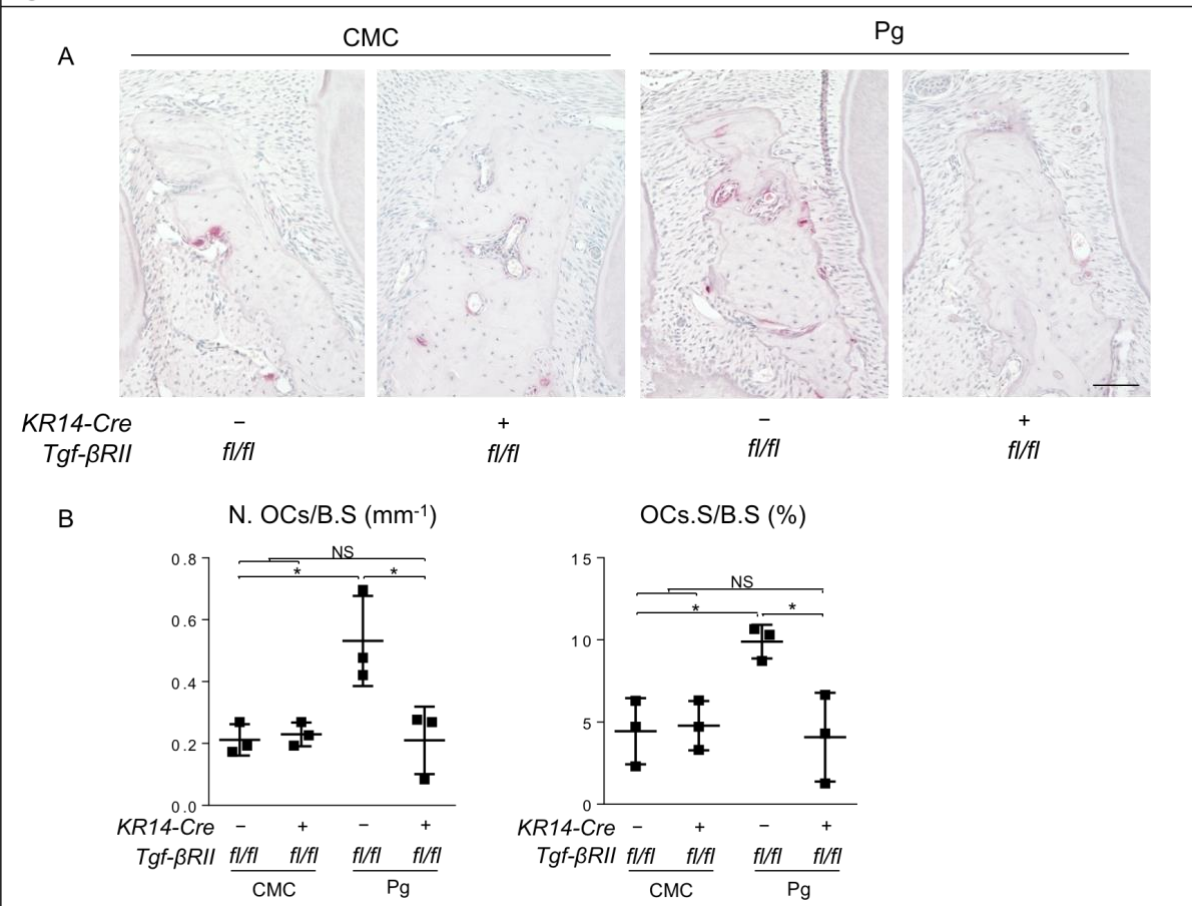
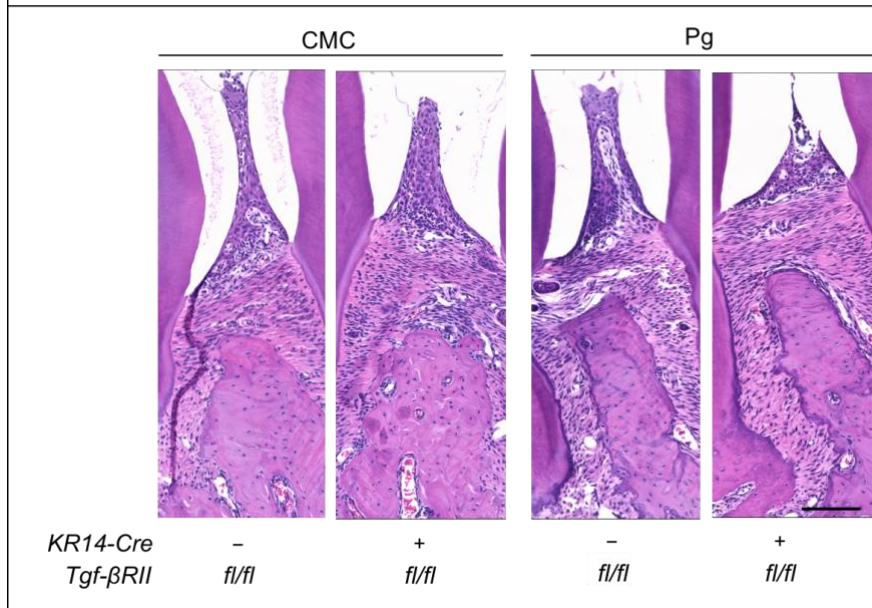


図8 ; Pg感染 *Tgf-βRII^{fl/fl}* マウスと Pg感染 *Tgf-βRII^{epi-/-}* マウスにおいて感染後6週では炎症性細胞の浸潤は認められなかった。 20x、 Scale bars = 50 μm



④ 考察

これらの結果は、歯肉上皮細胞における TGF-β シグナルは Pg 誘導性の歯槽骨破壊に関与していることを示唆する。一方で、歯肉組織中の炎症レベルに関して組織学的な点からでは、Pg 感染 *Tgf-βRII^{fl/fl}* マウスと Pg 感染 *Tgf-βRII^{epi-/-}* マウスのいずれにおいても CMC 群と明らかな差はなかった。このことに関しては遺伝子レベルでの解析など更なる検討が必要である。また、Pg 感染 6 週間では炎症のピークが既に過ぎている可能性が考えられるため、感染後早い時期での解析を行う予定である。

(3) 考察、今後の展望

今回の研究から、歯肉上皮細胞の TGF-β シグナルは Pg 誘導性の歯槽骨破壊に関与することが示唆された。上皮組織と骨組織が TGF-β シグナルを経由して関連しているという結果は非常に驚きである。歯肉上皮細胞の TGF-β シグナルが、結果としてどのように歯槽骨の破壊、特に破骨細胞前駆細胞に影響を与えているか詳細な分子メカニズムは未だ不明であるため更なる検討が必要である。しかし、本実験は、細菌除去しか根治治療のない歯周炎において、TGF-β シグナルが新規のターゲットになる可能性を見出した点は非常に意義があると考ええる。

本実験では、Pg 感染 *Tgf-βRII^{fl/fl}* マウスと Pg 感染 *Tgf-βRII^{epi-/-}* マウスの歯肉接合上皮における

TUNEL 陽性細胞数の検討を未だ行われていない。それぞれのマウスにおける TUNEL 陽性細胞数と破骨細胞形成分化との相関性を調べることで、より詳細な事実が明らかになると考える。過去の報告によると、アポトーシスを起こした上皮細胞はホスファチジルセリンを表出して樹状細胞の表面に存在する免疫受容体 CD300a と結合し制御性 T 細胞の数を制御する (Chigusa Nakahashi-Oda et al., *Nature Immunology*, 2016)。また、制御性 T 細胞は、TGF- β や IL-10, CTLA-4 を介した制御など分子機序については統一した見解が得られていないものの、総じて破骨細胞分化を抑制する (Okamoto, K., et al., *Arthritis Res Ther.* 13: 219, 2011)。これらの知見から、正常な歯肉上皮細胞のアポトーシスは歯周組織中の制御性 T 細胞数を制御し、その結果破骨細胞分化を調整、抑制することで恒常性を維持しているのかもしれない。一方で歯周病原菌が引き起こす歯肉上皮細胞の過剰なアポトーシスによって、そのバランスが破綻し、歯槽骨破壊に繋がっている可能性が考えられる。FACS などの解析により、この研究は更なる発展が期待される。

アダプター蛋白 SH3 domain-binding protein 2 (SH3BP2) と TGF- β とのクロストークについてマウスを使った研究を計画していたが、期間中に行うことができなかった。研究室の異動により時間が限られたこと、またマウスの作製に時間がかかったことが原因である。しかし、受け入れ研究室では、SH3BP2 の binding partner の一つである Spleen tyrosine kinase (Syk) が歯周炎治療における新規のターゲット分子であり、この分子に対する阻害薬が絹糸結紮誘導性歯周炎マウスモデルにおける歯槽骨破壊を回復することを明らかにした論文を投稿中である。予備的実験から SH3BP2 は TGF- β と関連することが明らかになっているため、上記した観点とは異なる角度から歯周炎病態の一端が解明されるかもしれない。

(4) 謝辞

本研究を進めるに当たり、受け入れ研究機関の指導教官の植木 靖好准教授、また同研究室のボスドクである橘高 瑞穂先生からは多大な助言を賜りました。厚く感謝を申し上げます。また会議などで Suggestion を与えて下さった University of Missouri-Kansas City の Sarah L.Dallas 教授また研究室の皆様方にも感謝の意を表します。