

原 著

ヒト歯根膜線維芽細胞およびヒト歯肉線維芽細胞の 細菌表層成分に対するサイトカイン応答

—— 特に CD14/Toll-like receptor 系の役割について ——

畠 山 純 子

東北大学大学院歯学研究科口腔機能再建・材料学講座
歯科保存学分野
(兼任主任: 越後成志教授)

Cytokine Production by Human Periodontal Ligamental Fibroblasts and Human Gingival Fibroblasts in Response to Stimulation with Bacterial Cell-Surface Components

—— With Special Reference to the Role of CD14/Toll-Like Receptor System ——

Junko Hatakeyama

*Division of Operative Dentistry, Department of Oral Rehabilitation and
Materials Science, Tohoku University Graduate School of Dentistry
(Director : Prof. Seishi Echigo)*

Abstract: The CD14/Toll-like receptor (TLR) system is responsible for the recognition and signaling of bacterial components by host cells such as macrophages. We compared human periodontal ligamental fibroblasts (HPLF) with human gingival fibroblasts (HGF) isolated from the same donor to examine interleukin-8 (IL-8) responses of the cells to endotoxic lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria and peptidoglycan (PGN), a main structural component of the cell-walls of gram-positive bacteria, and to study the involvement of the CD14/TLR system in these responses. The following results were obtained: 1) HGF expressed CD14 on their surface and strongly expressed CD14 mRNA, while HPLF expressed considerably lower levels in both respects. 2) Both cells expressed mRNA of TLR-related molecules, i.e., TLR2, TLR4, MD2, and MyD88, although HPLF expressed TLR2 more strongly than did HGF. 3) HGF exhibited a higher IL-8 response than HPLF to LPS, while HPLF exhibited a higher response than HGF to a water-soluble PGN, SEPS. 4) IL-8 responses of both cells to LPS and SEPS were completely inhibited by anti-human CD14 monoclonal antibody (MAb). 5) IL-8 responses of both cells to LPS were significantly inhibited by anti-human TLR4 MAb, while those to SEPS were not inhibited by the MAb.

Given previous reports, these findings suggest that HGF might respond to gram-negative bacteria by recognizing bacterial LPS via the CD14/TLR4 system, while HPLF might respond to gram-positive bacteria by recognizing bacterial PGN via the TLR2 system.

Key words: human periodontal ligamental cells, CD14, Toll-like receptor, bacterial cell-surface components, interleukin-8

緒言

マクロファージ等の細胞表層に存在する CD14 分子 (膜型 CD14, mCD14) はグラム陰性菌外膜の内毒素性リポ多糖 (LPS) をはじめとして, グラム陽性菌のリポタイコ酸 (LTA), 細菌種を問わず細胞壁の骨格をなすペプチドグリカン (PGN) などの様々な菌体表層成分を認識するレセプターとして機能することが知られている^{1,2)}。mCD14 は 55 kDa の糖タンパクで, グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) を介して細胞膜上に分布する GPI アンカータンパクである。従って, mCD14 自体にはシグナル伝達を担う細胞内構造は存在しないので, mCD14 とリンクしてシグナル伝達を担う未知の分子の解明が待たれていた。さらに, mCD14 を欠く内皮細胞や上皮細胞の場合, 血清中等に存在する遊離型 CD14 (sCD14) と結合した LPS に対して, おそらくはシグナル伝達を担う分子が認識して応答すると考えられている¹⁾。

1998 年に, Toll-like receptor (TLR) が LPS のシグナル伝達分子として機能しているとの最初の報告がなされた³⁾。Toll 分子はショウジョウバエの胚発生初期における背腹軸を決定するとともに, 成体では真菌に対する生体防御を担う分子として知られている^{4,5)}。ヒトおよびマウスにも数種類 (現在まで 6 種が報告され, 少なくとも 10 余種の存在が推測されている) の TLR が存在し⁶⁻⁸⁾, 種々の菌体成分のそれぞれがどの TLR によって認識されるかの解明が進むとともに, TLR の研究が自然免疫システム研究の新分野を展くとの期待が高まっている。LPS による細胞活性化は, 当初, TLR2 を介していると考えられた^{3,9)}。しかし, 遺伝的に LPS 応答性を欠く C3H/HeJ と C57BL/10ScCr マウスのそれぞれに TLR4 遺伝子の点突然変異と, 同遺伝子の全欠失が証明された¹⁰⁾。さらに TLR4 ノックアウトマウスが LPS に全く応答しないことが証明される¹¹⁾に及んで, LPS 応答における TLR4 の重要性が明らかになった。現在では, TLR4 に MD2 という別の蛋白が会合した複合体が LPS を認識している^{12,13)}とのモデルが有力視されている。一方, PGN の活性発現は TLR2 を介するされている^{11,12,14,15)}。LTA の活性に関しては TLR2 を介するとする説¹²⁾と TLR4 を介するとする説¹³⁾が併立している。なお, TLR 類の細胞内ドメインはインターロイキン-1レセプター (IL-1R) や IL-18R のそれと類似の構造で, IL-1R/TLR ファミリーと呼ばれている。最近, MyD88 分子がこれ

らのレセプターのアダプター分子としてシグナル伝達を担うことが明らかにされた^{16,17)}。実際 MyD88 遺伝子ノックアウトマウスは IL-1R, IL-18 の他, 調べられた限りの菌体成分に反応しないことが実証された¹⁸⁻²⁰⁾。現時点で証明されている CD14/TLR 系の菌体成分認識機構の概略を図 1 に示した。

歯周組織を構成する主要な細胞であるヒト歯肉線維芽細胞およびヒト歯根膜線維芽細胞は, 歯周組織の支持細胞として機能するばかりでなく, 種々の菌体成分刺激に反応して, 多様なサイトカインや増殖因子を産生し, 局所の炎症の発症や治癒に積極的に関与している可能性がある。一般に, 線維芽細胞には mCD14 は発現していないとされてきたが, Watanabe ら²¹⁾はヒト歯肉線維芽細胞に mCD14 発現を認めた。さらに Sugawara ら²²⁾はヒト歯肉線維芽細胞には, mCD14 高発現と低発現の細胞が存在し, 高発現細胞は mCD14 依存的に LPS に反応することを証明した。

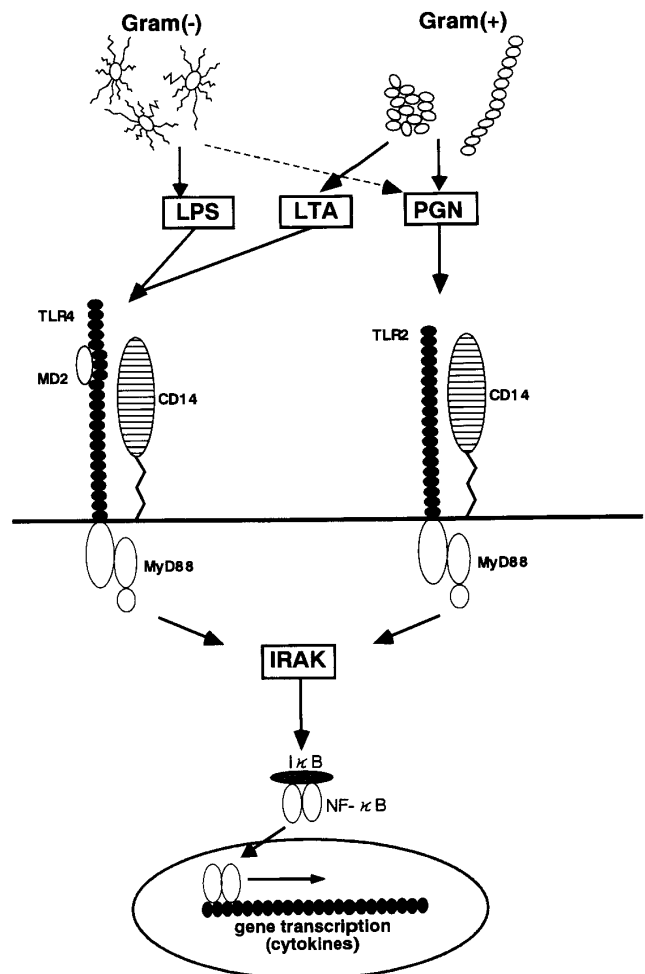


図1 mCD14/TLR系による細菌表層成分認識機構

そこで本研究では、まずヒト歯根膜線維芽細胞の mCD14 発現のレベルを調べ、各種菌体成分刺激に応じて炎症性サイトカインを産生するかどうかを、ヒトの歯肉および他組織の線維芽細胞と比較検討した。さらに、これら線維芽細胞の TLR 関連分子の mRNA 発現状況と菌体成分応答との関係を検討した。

材料と方法

1) 菌体成分

LPS は、*Escherichia coli* O55:B5 より熱フェノール・水抽出したものを Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) より購入した。PGN 関連標品として、*Staphylococcus epidermidis* の精製 PGN を SALE endopeptidase 処理してステムペプチド間の架橋を開裂して得た可溶性の PGN フラグメント SEPS^{22,23} [大日本製薬 (吹田) より分与を受けた] と、PGN の要構造に相当する合成化合物 *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine [ムラミルジペプチド, MDP; 第一製薬 (東京) より分与を受けた] を供試した。ちなみに SEPS は PGN サブユニットがグリカン鎖を介して重合した、いわばポリマー標品であり、MDP は PGN の要構造に相当するモノマー標品である (図 2)。

2) ヒト線維芽細胞の培養

ヒト歯根膜線維芽細胞は、12~18 歳の患者より、歯科矯正治療の為に便宜抜去した健全な第 1 小臼歯および智歯の根中央 1/3 より採取した。一方、ヒト歯肉線維芽細胞は、健全歯肉組織片より採取した。なお、術前に患者から組織の一部が実験に供されることに同意を得た。

組織片は 6 穴細胞培養プレート (Falcon; Becton

Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA) に 10% 牛胎仔血清 (FCS; Flow Laboratory) 加 α -MEM 培養液 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) に静置し、3 日ごとに培養液を交換し、10~15 日経過後、単層のサブコンフルエントになった時点でトリプシン-EDTA 処理して継代し、5~12 代のものをコンフルエント単層培養になった時点で供試した。

ヒト肺線維芽細胞 MRC-5 は国立衛生研究所より、ヒト皮膚線維芽細胞 FS-4 は小長谷昌功博士 (国立感染症研究所) より分与を受け、いずれの細胞も 10% FCS 加 α -MEM 培養液で培養し、サブコンフルエントの単層培養になった時点でトリプシン-EDTA 処理して継代し、コンフルエントの単層培養になった時点で実験に供試した。

3) ALP 活性の測定

ヒト歯根膜線維芽細胞はアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が高い²⁴ とされているので、確認のため分離したヒト歯根膜線維芽細胞とヒト歯肉線維芽細胞の ALP 活性を測定した。

細胞 ($2 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) は、96 皿平底プレート (Falcon) に 10% FCS 加 α -MEM に浮遊させて播種した。5% CO₂, 37°C の条件で 4 日間培養し、コンフルエント単層培養になった時点で、 α -MEM で 2 回洗浄し、0.25 M 2-amino 2-methyl 1-propanol, 2 mM MgCl₂ (pH 10.1) に基質として 6.6 mM p-nitrophenyl phosphate を加え、37°C で 30 分反応させた。その後、0.25 M NaOH で反応を停止させた後、405 nm の吸光度を測定した^{24,25}。測定には、Soft max data analysis program (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA) を用いた。それぞれのサンプルは 3 通り測定し、平均値と標準偏差 (SD) を求めた。

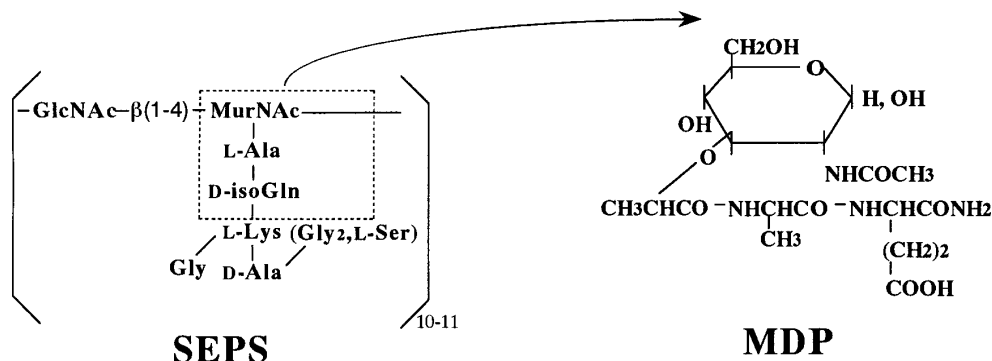


図 2 SEPS の推定化学構造と合成 MDP の化学構造

4) フローサイトメトリー

線維芽細胞上の mCD14 の発現をみるために、Flow cytometric analysis を実施した。被験者より分離したヒト歯根膜線維芽細胞、ならびにヒト歯肉線維芽細胞のコンフルエント培養と、対照としたヒト肺線維芽細胞、ヒト皮膚線維芽細胞はトリプシン処理して浮遊細胞とした後、PBS にて二度洗浄して供試した。ちなみに、トリプシン処理しても CD14 の検出に影響を及ぼさないことは既に判明している²⁾。細胞は、抗 CD14 抗体、MEM18 (mouse IgG1; Monosan, Uden, The Netherlands), ないしイソタイプの対照 mouse IgG2b (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) で 4°C, 30 分染色した。その後 2 次抗体として FITC ラベルの抗 mouse IgG (Bio Source International Inc., Camarillo, CA, USA) で 4°C, 30 分染色した。解析には fluorescence activated cell sorter (FACS) (FAC-Scan; Becton Dickinson) を用いた。

5) IL-8 の測定

細胞培養上清中の IL-8 量は、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) キット (Opt EIA TM; Pharmingen, San-Diego, CA, USA) を用い測定した。細胞 ($2 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) を 96 穴平底培養プレートに播種して、10% FCS 加 α -MEM にて、5% CO₂ 37°C 下で 4 日間培養し、コンフルエント単層培養になった時点で、 α -MEM で 3 回洗浄し刺激物質を加え 1% FCS 加 α -MEM 中でさらに 24 時間培養し、上清を回収した。

抑制実験では、刺激物質添加の前に、抗 CD14 モノクローナル抗体 MY4 (Coulter, Miami, FL, USA), または抗 TLR4 モノクローナル抗体 HTA125 (佐賀医大 三宅健介博士より供与) を加えて、30 分間前培養した後、上記と同様にテスト物質を加えて 24 時間培養し

た。

上清中のサイトカイン量の算定には、Soft max data analysis program を用いた。なお、それぞれの培養は 3 通り行い、平均値と標準偏差 (SD) を求め、Student *t*-test を行って、有意差を検定した。

6) 各種タンパク mRNA の発現

ヒト歯根膜線維芽細胞およびヒト歯肉線維芽細胞の全 RNA は、Isogen (日本ジーン社製) により抽出した。Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて、CD14, TLR2, TLR4, MyD88, MD2 と、対照として恒常的に発現する glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現を調べた。RT-PCR は、Takara PCR Thermal Cycler MP (宝酒造, 京都) を用いて行った。それぞれに特異的なプライマーは、表 1 の通りである。これらのプライマーはすべて、日本遺伝子研究所 (仙台) に合成および精製を依頼した。逆転写反応は、まずランダムヘキサマーの存在下で、70°C-10 分、4°C-3 分、25°C-5 分の処理を行った。合成された cDNA の増幅反応は、Ex Taq DNA polymerase とそれぞれのプライマーの存在下で、CD14 は 65°C-1 分、72°C-1 分、94°C-1 分の処理を 35 サイクルで行った。TLR2 は 60°C-30 秒、72°C-90 秒、94°C-30 秒の処理を 33 サイクルで行った。TLR4 は 54°C-40 秒、72°C-1 分、95°C-40 秒の処理を 28 サイクルで行った。MD2 は 56°C-30 秒、72°C-90 秒、94°C-30 秒の処理を 35 サイクルで行った。MyD88 は 64°C-30 秒、70°C-2 分、94°C-30 秒の処理を 35 サイクルで行った。GAPDH は 65°C-1 分、72°C-1 分、94°C-1 分の処理を 35 サイクルで行った。各増幅 cDNA サンプルは 2% 寒天ゲルに電気泳動し、臭化エチジウムで染色して、紫外線照射下で写真撮影して mRNA 発現レベルを評価した。なお、それぞれの遺伝子は、NIH イメージングアナライザーを用いて定量化

表 1 本研究で供試した PCR プライマー

標的遺伝子	センスプライマー	アンチセンスプライマー
CD14	5'-CTCAACCTAGAGCCGTTTCT-3'	5'-CAGGATTGTCAGACAGGTCT-3'
TLR2	5'-TCACCTACATTAGCAACAG-3'	5'-GATCTGAAGCATCAATCTC-3'
TLR4	5'-TGGATACGTTTCCTTATAAG-3'	5'-GAAATGGAGGCACCCCTTC-3'
MyD88	5'-TAAGAAGGACCAGCAGAGCG-3'	5'-CATGTAGTCCAGCAACAGCC-3'
MD2	5'-GCACATTTTCTACATTCC-3'	5'-CACAGTCTCTCCCTTCAG-3'
GAPDH	5'-CATCACCATCTTCCAGGAGC-3'	5'-CATGAGTCCTTCCACGATACC-3'

した。その際、GAPDH mRNA の発現をコントロールとして補正して、相対的発現量を算定した。

結 果

1) ヒト歯根膜線維芽細胞の特性

本実験で供試する代表的なヒト歯根膜線維芽細胞、ヒト歯肉線維芽細胞、ヒト皮膚線維芽細胞およびヒト肺線維芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性を測定したところ、ヒト歯根膜線維芽細胞では明確な活性が認められたが、ヒト歯肉線維芽細胞を始めとして他の線維芽細胞では同活性は検出限界以下であった (表2)。なお、培養時にヒト歯根膜線維芽細胞ではこれまでの報告²⁶⁾通り、Contact inhibition がかからないため、細胞同士が重なり合うような増殖を示した。これに対してヒト歯肉線維芽細胞では、Contact inhibition が認められた。これらの知見により、それぞれの細胞が歯根膜由来の線維芽細胞、歯肉由来の線維芽細胞で

あることが確認された。

2) 線維芽細胞の mCD14 の発現

フローサイトメトリーでこれまで得られた全てのヒト線維芽細胞の mCD14 の発現レベルを調べた。8人のドナーから分離したヒト歯根膜線維芽細胞の mCD14 発現レベルはいずれも 25% 以下であった。一方、対照としたヒト歯肉線維芽細胞では供試した 20 の細胞の発現レベルは様々で、50% 以上の高発現を示す細胞が 11 存在した一方で、10% 以下の細胞もあった。8人のドナーからはヒト歯根膜線維芽細胞と、ヒト歯肉線維芽細胞の両方を分離したが、いずれの組でも、ヒト歯根膜線維芽細胞の mCD14 発現レベルはヒト歯肉線維芽細胞のそれより低かった。図3は、以後の実験で主として供試したドナー (AK) 由来のヒト歯根膜線維芽細胞とヒト歯肉線維芽細胞の mCD14 発現のフローサイトメトリー分析の成績である。ヒト歯肉線維芽細胞では明確な mCD14 が認められるのに対して、ヒト歯根膜線維芽細胞では、わずかに mCD14 が認められるにすぎないことがみてとれる。なお、肺や皮膚の線維芽細胞では mCD14 発現はほとんど認められなかった (表3)。

表2 各種線維芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性

線維芽細胞	組 織	ALP (mU/ml)
AK-G	歯肉	N.D.
MH	歯肉	N.D.
AK-P	歯根膜	280±42
MRC-5	肺	N.D.
FS-4	皮膚	N.D.

N.D.: 検出されなかった

3) 菌体成分刺激に応じた線維芽細胞の IL-8 産生

各種ヒト線維芽細胞を、LPS, MDP および SEPS で刺激して IL-8 を産生するかどうかを検討した。ヒト歯根膜線維芽細胞とヒト歯肉線維芽細胞はともに、3 標品の刺激に应答して濃度依存的に IL-8 を産生し

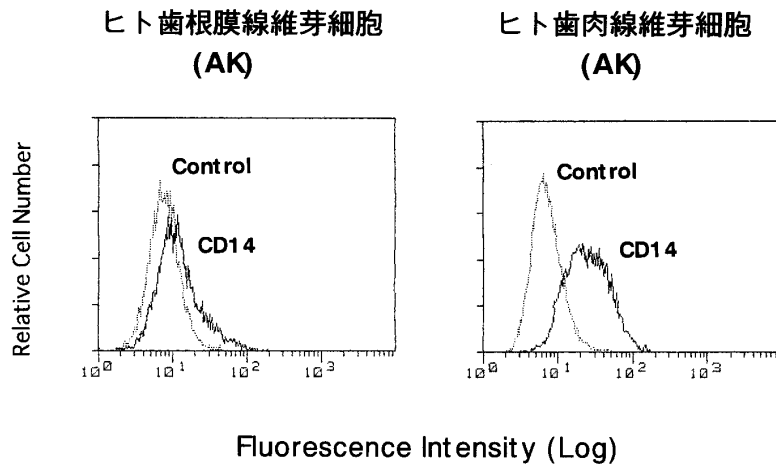


図3 フローサイトメトリーによる CD14 の発現
ヒト歯根膜線維芽細胞 (AK-P) およびヒト歯肉線維芽細胞 (AK-G) を抗ヒト CD14 抗体 (MEM18),
ないしアイソタイプ対照 mouse IgG1 で染色し FACS にて解析した。

表3 様々な組織由来のヒト線維芽細胞のmCD14発現

線維芽細胞	組織	陽性細胞の割合 CD14 (MEM18)
YS-G	歯肉	69.9
SM	歯肉	66.3
SH-G	歯肉	62.4
NIK	歯肉	61.3
NH-G	歯肉	61.3
AK-G	歯肉	58.6
MH	歯肉	56.1
HH-12	歯肉	56.1
TT-G	歯肉	53.2
MM	歯肉	52.9
MY	歯肉	51.9
KEK	歯肉	42.3
FM	歯肉	40.3
YT-G	歯肉	33.6
TY-G	歯肉	29.2
FE	歯肉	26.1
KT	歯肉	19.1
HN	歯肉	17.2
NK	歯肉	10.6
YN	歯肉	9.6
YT-P	歯根膜	22.9
YS-P	歯根膜	21.2
AK-P	歯根膜	17.9
NH-P	歯根膜	17.2
TT-P	歯根膜	15.1
TY-P	歯根膜	12.6
KS	歯根膜	10.9
SH	歯根膜	5.8
WI-38	肺	3.9
IMR-90	肺	1.1
MRC-5	肺	0.5
SF-MA	皮膚	1.9
FS-4	皮膚	0.7

ヒト歯肉線維芽細胞, ヒト歯根膜線維芽細胞, ヒト肺線維芽細胞, およびヒト皮膚線維芽細胞のコンフルエント培養をトリプシン処理後, PBSにて二度洗浄して供試した。細胞は, 抗ヒトCD14抗体MEM18あるいはアイソタイプ対照 mouse IgG1で4°C, 30分染色した。その後2次抗体としてFITCラベルのmouse IgGで4°C, 30分染色し, フローサイトメーターを用いて分析した。

た。ただし, ヒト歯根膜線維芽細胞のLPS応答はヒト歯肉線維芽細胞に比して著しく弱かった。一方SEPSに対してはヒト歯根膜線維芽細胞の方がヒト歯肉線維芽細胞よりも強く応答した。また, MDPに対しては, 両細胞とも明確な応答性を示した(図4)。なお, ヒト肺線維芽細胞はLPSには応答しなかったが, MDPには弱い応答性を示した(データは省略)。

4) 抗CD14ならびに抗TLR4抗体のIL-8抑制作用

次に, 抗ヒトCD14モノクローナル抗体(MY4)をヒト歯根膜線維芽細胞とヒト歯肉線維芽細胞培養系に加えて抑制効果を検討した。ヒト歯肉線維芽細胞(AK)では, 3標品に対する応答がいずれもほぼ完全に抑制された(図5)。別のヒト歯肉線維芽細胞(MH)でも, 同様の成績が得られた(データは省略)。一方, ヒト歯根膜線維芽細胞(AK)では, 明確な作用を示したSEPSの作用と, わずかに作用したLPSの作用が, MY4によってほぼ完全に抑制された。一方, MDPの作用はほとんど抑制されなかった。対照としたマウスIgG2b抗体は, いずれの実験でも抑制効果を示さなかった。

さらに, 抗ヒトTLR4抗体(HTA125)をヒト歯根膜線維芽細胞とヒト歯肉線維芽細胞培養系に加えて抑制効果を検討した。ヒト歯肉線維芽細胞(AK)では, HTA125によりIL-8のLPSに対する応答がほぼ完全に抑制された(図6)。ヒト歯根膜線維芽細胞(AK)でも, わずかなLPS作用が抑制された。一方, SEPSならびにMDPの作用はいずれの細胞でもほとんど抑制されなかった。ちなみに対照としたマウスIgG2a抗体は, いずれの実験でも抑制効果を示さなかった。

5) 各種線維芽細胞におけるCD14/TLR系諸分子のmRNA発現について

各種ヒト線維芽細胞のCD14, TLR2, TLR4, MD2およびMyD88 mRNAの発現をRT-PCR法によって検討した。この実験でも, 同一ドナー(AK)から得たヒト歯根膜線維芽細胞とヒト歯肉線維芽細胞を供試した。フローサイトメリーの成績から予想されたとおり, ヒト歯肉線維芽細胞のみが強くCD14 mRNAを発現しており, ヒト歯根膜線維芽細胞のCD14 mRNA発現は弱かった。一方, 両細胞とも無刺激状態で, TLR2, TLR4, MyD88およびMD2のmRNAを発現していた(図7)。両細胞の発現レベルの目立った相違

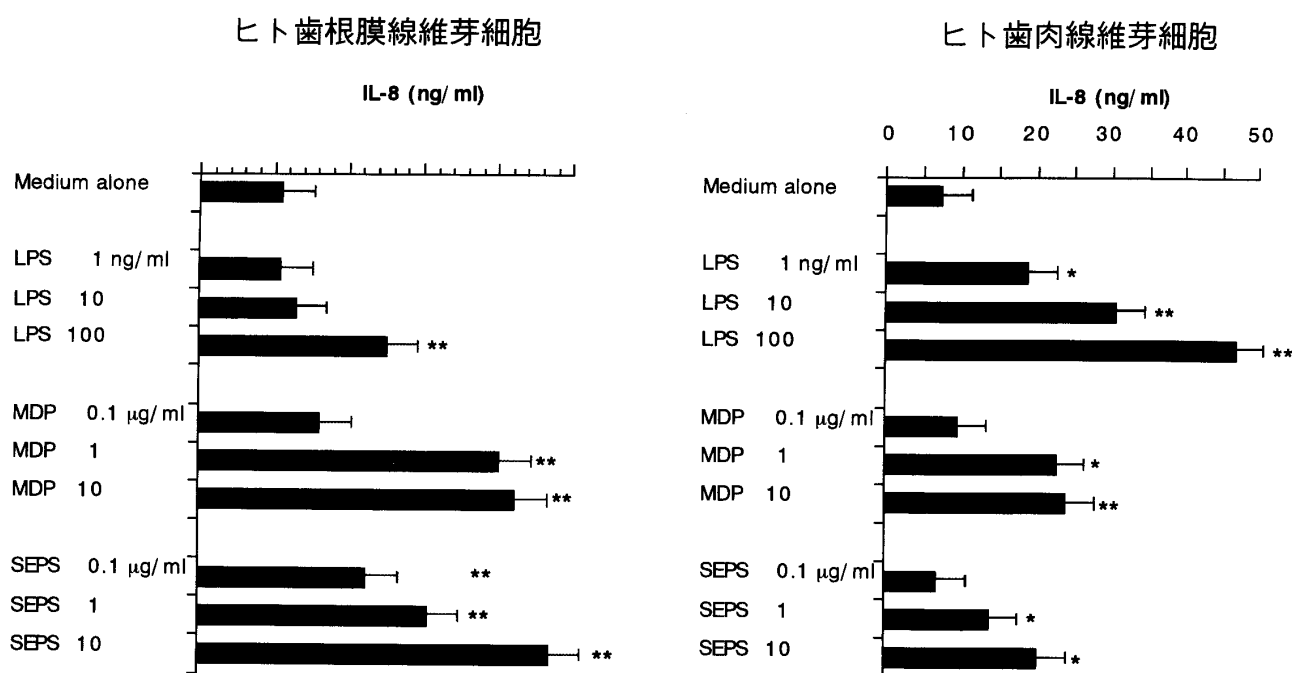


図4 菌体成分刺激に応じたヒト歯根膜および歯肉線維芽細胞のIL-8産生
ヒト歯根膜線維芽細胞 (AK-P) およびヒト歯肉線維芽細胞 (AK-G) を、各菌体成分で刺激後24時間目の上清を回収しELISA法にてサイトカイン量を測定した。それぞれ3通り実施して、その平均値と標準偏差を求めた。検定には Student *t*-test を行った。*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$, vs medium alone.

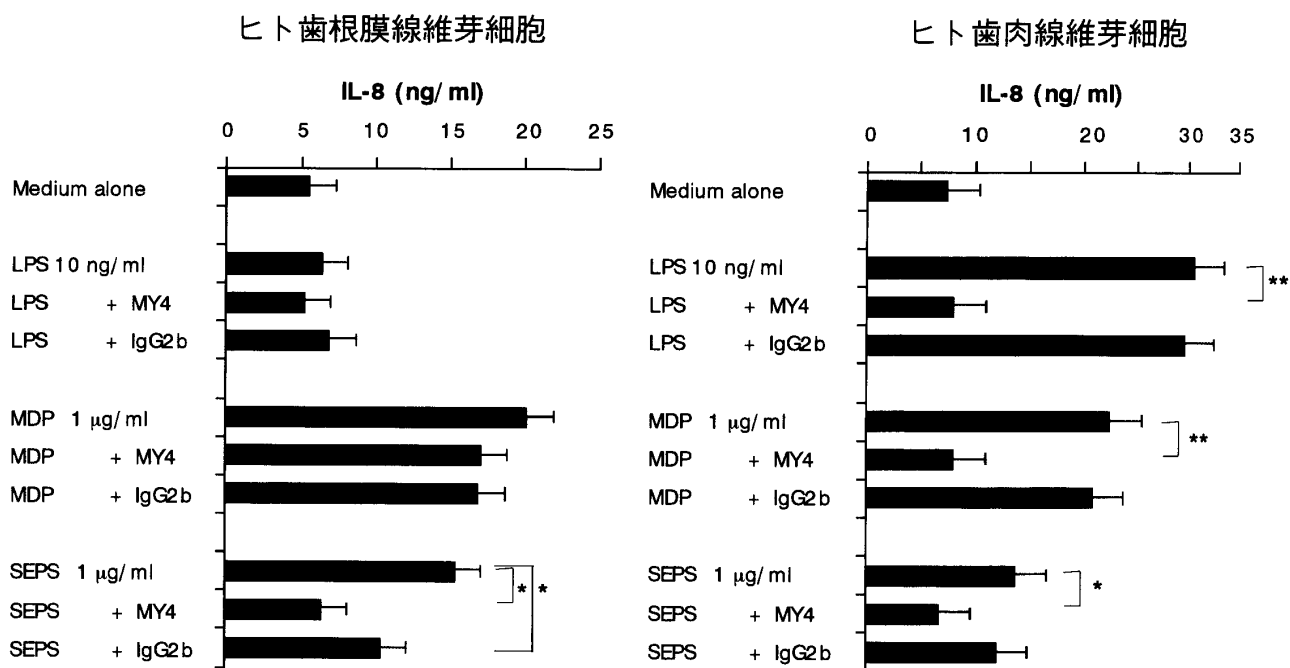


図5 抗ヒトCD14抗体による線維芽細胞のIL-8産生の抑制
ヒト歯根膜線維芽細胞 (AK-P) およびヒト歯肉線維芽細胞 (AK-G) は、抗ヒトCD14抗体MY-4で30分間前処理した後、各菌体成分で刺激し、24時間目の上清を回収しELISA法にてサイトカイン量を測定した。それぞれ3通り実施して、その平均値と標準偏差を求めた。検定には Student *t*-test を行った。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

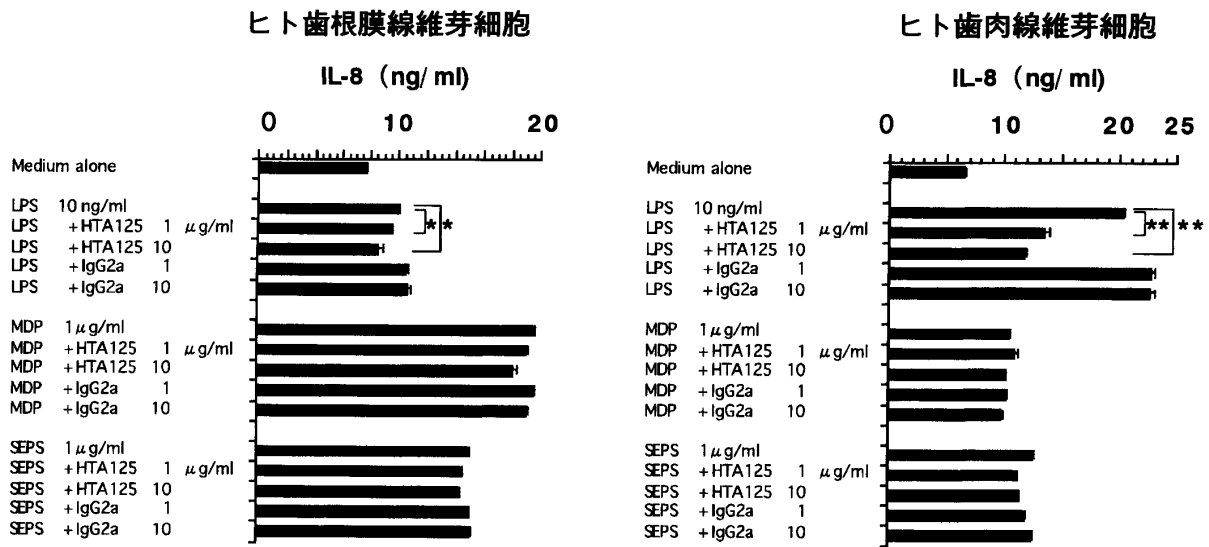


図6 抗ヒト TLR4 抗体による線維芽細胞の IL-8 産生の抑制
ヒト歯根膜線維芽細胞 (AK-P) およびヒト歯肉線維芽細胞 (AK-G) は、抗ヒト TLR4 抗体 HTA125 で 30 分間前処理した後、各菌体成分で刺激し、24 時間目の上清を回収し ELISA 法にてサイトカイン量を測定した。それぞれ 3 通り実施して、その平均値と標準偏差を求めた。検定には Student *t*-test を行った。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

点としては、ヒト歯根膜線維芽細胞の TLR2 mRNA 発現が歯肉細胞のそれに比べて著しく高いことが挙げられる。なお、皮膚と肺の線維芽細胞についても、無刺激時に CD14, TLR2, TLR4, MD2 および MyD88 の mRNA の発現が認められた。

さらに、LPS で刺激した後の遺伝子発現の変化も検討した。その結果、ヒト歯肉線維芽細胞では、MD2 を除いて他の分子の mRNA 発現が明確に増強された。特に、MyD88 mRNA 発現は著しく増強された。一方、ヒト歯根膜線維芽細胞では、LPS 刺激の影響は明確ではなかった (データは省略)。

考 察

歯周組織を構成する歯根膜ならびに歯肉の線維芽細胞は単に支持細胞として機能するばかりでなく、歯周病関連細菌の菌体表層成分を認識して様々な炎症性メディエーターを産生する事により積極的に炎症病巣の成立と治癒の両機能に参与している²⁷⁻²⁹⁾。

本研究では、グラム陰性菌表層の LPS とグラム陽性菌表層の主要構成成分である PGN に対する歯肉および歯根膜の線維芽細胞の応答性の相違点を明らかにして、その原因を CD14/TLR 系を構成する蛋白の動態と関連させて解明しようとした。その目的のため、実

験には、同一ドナー由来のヒト歯根膜線維芽細胞とヒト歯肉線維芽細胞を供試した。

これまでの研究で、ヒト歯肉線維芽細胞は mCD14 の発現に関して多様な細胞集団からなり、mCD14 高発現細胞は LPS に強く応答すること²⁾が知られている。他方、mCD14 低発現細胞は sCD14 を利用して LPS に応答するとの報告もある³⁰⁾。本研究でもヒト歯肉線維芽細胞には mCD14 発現に関する多様性が確認された。一方、ヒト歯根膜線維芽細胞はヒト歯肉線維芽細胞と異なり、おしなべて mCD14 発現は低レベルであることが明らかになった。ただし、肺や皮膚の線維芽細胞と比較すると、わずかに高い発現レベルを示していた (表 3)。LPS に高応答性を示したヒト歯肉線維芽細胞を分離したと同一ドナー由来のヒト歯根膜線維芽細胞では、mCD14 の低発現レベルを反映して、LPS 応答性はきわめて弱かった (図 4)。抗ヒト CD14 ならびに抗ヒト TLR4 抗体を供試した抑制実験の結果、両細胞の LPS 応答性には強弱の差はあるものの、いずれの細胞の LPS 応答も CD14 ならびに TLR4 依存的な応答であることが明らかになった (図 5 および 6)。ちなみに RT-PCR 分析の結果、両細胞の TLR4 mRNA 発現レベルは同程度であった (図 7)。

一方、PGN フラグメントである SEPS および MDP に対する両細胞の応答レベルの間には著しい差は認め

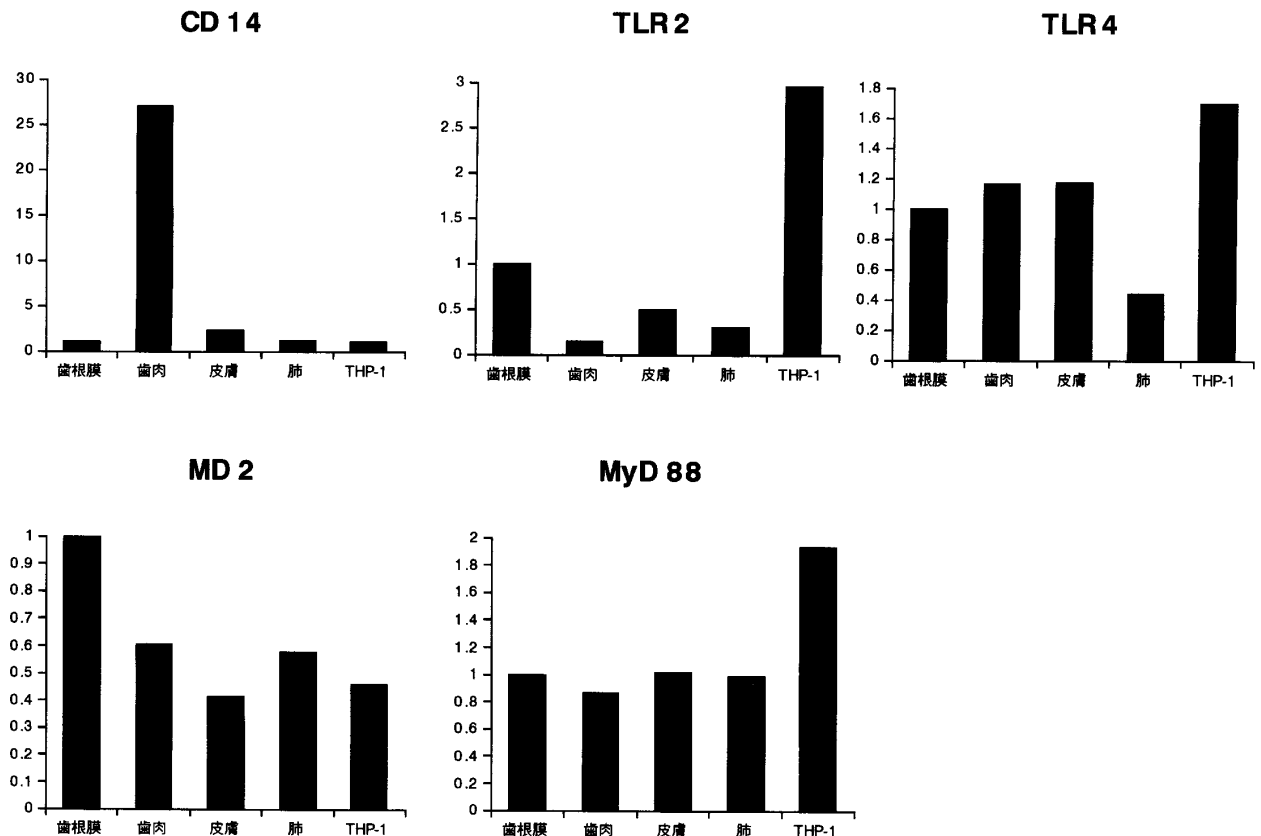


図7 各種細胞におけるCD14/TLR系分子の遺伝子発現

ヒト歯根膜線維芽細胞 (AK-P) およびヒト歯肉線維芽細胞 (AK-G), ならびにヒト皮膚線維芽細胞 (FS-4) およびヒト肺線維芽細胞 (MRC-5), さらに対照としたヒトマクロファージ系細胞 THP-1 を供試し CD14, TLR2, TLR4, MD2 および MyD88 の mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。グラフは得られた各 mRNA のバンドを NIH イメージングアナライザーで測定した後, GAPDH mRNA の発現量で補正して, 無刺激時のヒト歯根膜線維芽細胞の値を 1 とした比率で表示した。

られなかった(図4)。ただし, PGN のサブユニット構造のポリマーである SEPS は CD14 依存的に活性を発現するのに対して, モノマー構造にあたる MDP の活性は mCD14 高発現のヒト歯肉線維芽細胞に対しては CD14 依存的であったが mCD14 低発現のヒト歯根膜線維芽細胞に対しては CD14 非依存的に活性を発揮した(図6)。PGN が mCD14 依存的にマクロファージ系細胞を活性化することはよく知られている³¹⁾が, 線維芽細胞に関する報告は本報告が最初である。ヒト歯根膜線維芽細胞がヒト歯肉線維芽細胞に比較して, 著しく高レベルの TLR2 mRNA を発現していたことは, 低レベルの mCD14 を利用するか, あるいは sCD14 を利用しての PGN 応答を補償しているものとも考えられる。MDP と CD14 分子の相互作用の可能性については, Weidemann ら³²⁾が, LPS ないしリポド A と sCD14 の結合を MDP が阻害するとの報告をしてい

る。一方, Dziarski ら³³⁾は MDP を固相に固定して多価様構造をとらせたときに, 初めて CD14 分子と反応するとしている。本研究で見られた MDP 作用の一見矛盾する発現機序を合理的に解釈するには, さらに多くのファクターの解明を待たねばならないと考えられる。しかし, 本研究で得られた知見は, 少なくともポリマー構造を有する PGN とは異なる経路で MDP が作用を発現する可能性を示唆したといえよう。

ちなみに mCD14 を欠くとされるモルモット皮膚より分離した線維芽細胞に対して MDP が IL-1 様活性因子を誘導したとの Iribe ら³⁴⁾の古典的な報告や, ヒト歯肉線維芽細胞がウシ胎仔血清存在下で MDP に応答して IL-1 様活性因子を放出したとの Ohmori ら³⁵⁾の初期の研究も知られている。筆者らも mCD14 を殆ど発現しないヒト肺線維芽細胞が MDP には応答することを観察している(データは省略)。このように線維

芽細胞の MDP 応答能は古くから知られているが、その機序については現在に至るまで不明のままである。

本研究により、ヒト歯根膜線維芽細胞とヒト歯肉線維芽細胞が歯周組織でどのように LPS に反応するのかの一端が明らかになったと考えられる。特に、菌体成分に晒される機会の少ないヒト歯根膜線維芽細胞はヒト歯肉線維芽細胞に比較して、mCD14 の発現が低く、一般的には菌体成分に対する応答性は低いようである。CD14/TLR 系研究のエキスパートである Ulevich³⁶⁾ はこれまでの知見を概観して、グラム陰性菌は表層の LPS の存在のため、TLR4 によって認識されるのに対して、グラム陽性菌はおそらくは豊富な PGN の存在のために、TLR2 によって認識されると総括している。辺縁性歯周炎は一般的にグラム陰性菌によって惹起されるのに対して³⁷⁾、根尖性歯周炎にはグラム陽性菌の関与も指摘されている³⁸⁾。本研究で得られた知見を上記の視点から整理すると、ヒト歯肉線維芽細胞は、mCD14/TLR4 系による LPS 認識を介してグラム陰性の歯周病原菌に反応するのに対して、ヒト歯根膜線維芽細胞は TLR2 系による PGN 認識を介して根管内のグラム陽性菌に反応するように仕組まれているのかもしれない。

内容要旨： CD14/Toll-like receptor (TLR) 系は、マクロファージ等の菌体成分認識とシグナル伝達を担うと言われている。本研究では、同一ドナー由来のヒト歯根膜線維芽細胞とヒト歯肉線維芽細胞を供試して、グラム陰性菌の内毒素リポ多糖 (LPS) とグラム陽性菌細胞壁の主成分であるペプチドグリカン (PGN) に対するインターロイキン-8 (IL-8) 応答と、両細胞の CD14/TLR 系との関わりを比較検討した。その結果、① ヒト歯肉線維芽細胞は高レベルに膜 CD14 と CD14 mRNA を発現していたが、ヒト歯根膜線維芽細胞の発現レベルは低かった。② 両細胞とも、TLR 関連分子の TLR2, TLR4, MD2, と MyD88 の mRNA を発現していたが、ヒト歯根膜線維芽細胞の方が TLR2 mRNA を強く発現していた。③ LPS に対してはヒト歯肉線維芽細胞の方が、水溶性 PGN 標品 SEPS に対してはヒト歯根膜線維芽細胞の方が、高応答性を示した。④ 両細胞の LPS および SEPS 応答は抗ヒト CD14 抗体によって完全に抑制された。⑤ 両細胞の LPS 応答は抗ヒト TLR4 抗体によって明確に抑制されたが、SEPS 応答はほとんど抑制されなかった。

これまでの報告を考えあわせると、以上の知見は、ヒト歯肉線維芽細胞が mCD14/TLR4 系を介して高感度に LPS を認識してグラム陰性菌に反応するのに対して、ヒト歯根膜線維芽細胞は TLR2 を介して高感度に PGN を認識してグラム陽性菌に反応することを示唆している。

文 献

- 1) Ulevitch, R.J. and Tobias, P.S.: Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 437-457, 1995.
- 2) Sugawara, S., Sugiyama, A., Nemoto, E., Rikishi, H. and Takada, H.: Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts: characterization and CD14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **66**: 3043-

今後さらに、歯根膜および歯肉線維芽細胞等の歯周組織構成細胞における細胞内情報伝達経路が詳細に解析され、この伝達に必須のタンパクおよび遺伝子に特異的な阻害剤が開発されれば、分子生物学に裏付けされた歯周病の薬物治療の可能性が展げるものと期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に着手する機会を与えて下さいました本学旧歯科保存学第二講座 奥田禮一教授 (現本学名誉教授)、本研究の実施ならびに本論文の作成にあたり終始御懇篤なるご指導を賜りました本研究科口腔微生物学分野の高田春比古教授、直接ご指導、ご助言賜りました同分野の菅原俊二博士および杉山明子博士 (現鹿児島大学口腔生化学講座) に深甚なる感謝を捧げます。さらに、本論文作成にあたり御高閣下さいました本研究科の越後成志教授、加賀山学教授、坂本征三郎教授ならびに小松正志助教授に深謝します。最後に、様々な御助力を戴きました本研究科保存学分野ならびに口腔微生物学分野の教室員の方々に心から感謝いたします。

- 3049, 1998.
- 3) Yang, R.-B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L. and Godowski, P.J.: Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature* **395**: 284-288, 1998.
 - 4) Morisato, D. and Anderson, K.V.: The *spätzle* gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell* **76**: 677-688, 1994.
 - 5) Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M. and Hoffmann, J.A.: The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-983, 1996.
 - 6) Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastlein, R.A. and Bazan, J.F.: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 588-593, 1998.
 - 7) Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Takeda, K. and Akira, S.: TLR6: a novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene* **231**: 59-65, 1999.
 - 8) Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C.A., Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397, 1997.
 - 9) Kirschning, C.J., Wesche, H., Ayres, T.M. and Rothe, M.: Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **188**: 2091-2097, 1998.
 - 10) Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffer, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**: 2085-2088, 1998.
 - 11) Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S.: Toll like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.* **162**: 3749-3752, 1999.
 - 12) Schwander, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. and Kirschning, C.J.: Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**: 17406-17409, 1999.
 - 13) Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M. and Miyake, K.: Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **164**: 3471-3475, 2000.
 - 14) Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**: 443-451, 1999.
 - 15) Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R. and Golenbock, D.: Recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**: 1-5, 1999.
 - 16) Bonnert, T.P., Garka, K.E., Parnet, P., Sonoda, G., Testa, J.R. and Sims, J.E.: The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett.* **402**: 81-84, 1997.
 - 17) Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. and Janeway, C.A., Jr.: MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* **2**: 253-258, 1998.
 - 18) Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K. and Akira, S.: Targeted disruption of the *MyD88* gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9**: 143-150, 1998.
 - 19) Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S.: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**:

- 115-122, 1999.
- 20) Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T. and Akira, S.: Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int. Immunol.* **12**: 113-111, 2000.
- 21) Watanabe, A., Takeshita, A., Kitano, S. and Hanazawa, S.: CD14-mediated signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Infect. Immun.* **64**: 4488-4494, 1996.
- 22) Kawata, S., Takemura, T., Yokogawa, K. and Kotani, S.: Isolation of bacteriolytic endopeptidase from a strain of *Cytophaga* and its application to preparation of hydrosoluble polysaccharide peptide from *Staphylococcus epidermidis* peptidoglycan. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2253-2263, 1984.
- 23) Harada, K., Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Hirachi, Y., Kusumoto, S., Shiba, T., Kawara, S., Yokogawa, K., Nishimura, H., Kitaura, T. and Nakajima, T.: Liberation of serotonin from rabbit blood platelets by bacterial cell walls and related compounds. *Infect. Immun.* **37**: 1181-1190, 1982.
- 24) Kina, J.R., Yoshida, N., Goseki, M., Sasaki, S. and Ishikawa, I.: Properties of alkaline phosphatase in the gingival crevicular fluid. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* **42**: 57-63, 1995.
- 25) Shibata, Y., Yamashita, Y., Miyazaki, H., Ueno, S. and Takehara, T.: Effective method for discriminating between oral bacterial and human alkaline phosphatase activity. *Oral Microbiol. Immunol.* **9**: 35-39, 1994.
- 26) Quintero, J.C., Piesco, N.P., Langkamp, H.H., Bowen, L. and Agarwal, S.: LPS responsiveness in periodontal ligament cells is regulated by tumor necrosis factor- α . *J. Dent. Res.* **74**: 1802-1811, 1995.
- 27) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **59**: 295-301, 1991
- 28) Tamura, M., Tokuda, M., Nagaoka, S. and Takada, H.: Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect. Immun.* **60**: 4932-4937, 1992.
- 29) Yamaji, Y., Kubota, T., Sasaguri, K., Sato, S., Suzuki, Y., Kumada, H. and Umemoto, T.: Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **63**: 3576-3581, 1995.
- 30) Hayashi, J., Masaka, T., Saito, I. and Ishikawa, I.: Soluble CD14 mediates lipopolysaccharide-induced intercellular adhesion molecule 1 expression in cultured human gingival fibroblasts. *Infect. Immun.* **64**: 4946-4951, 1996.
- 31) Gupta, D., Kirkland, T.N., Viriyakosol, S. and Dziarski, R.: CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **271**: 23310-23316, 1996.
- 32) Weidemann, B., Schletter, J., Dziarski, R., Kusumoto, S., Stelter, F., Rietschel, E.T., Flad, H.D. and Ulmer, A.J.: Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect. Immun.* **65**: 858-864, 1997.
- 33) Dziarski, R., Tapping, R.I. and Tobias, P.S.: Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J. Biol. Chem.* **273**: 8680-8690, 1998.
- 34) Iribe, H., Koga, T., Kotani, S., Kusumoto, S. and Shiba, T.: Stimulating effect of MDP and its adjuvant-active analogues on guinea pig fibroblasts for the production of thymocyte-activating factor. *J. Exp. Med.* **157**: 2190-2195, 1983.
- 35) Ohmori, Y., Hanazawa, S., Amano, S., Miyoshi, T., Hirose, K. and Kitano, S.: Spontaneous production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts and its autorregulatory effect on their proliferation. *Infect. Immun.* **55**: 947-954, 1987.
- 36) Dahlén, G. and Möller, Å.J.R.: Microbiology of endodontic infections. Slots, J. and Taubman, M.A. (edit.): Contemporary oral microbiology and immunology. Mosby-Year Book, St. Louis, 1992, pp. 444-475.

- 37) Ulevitch, R.J.: Toll gates for pathogen selection. *Nature* **401**: 755-756, 1999.
- 38) Slots, J. and Rams, T.E.: Microbiology of periodontal disease. Slots, J. and Taubman, M.A. (edit.): Contemporary oral microbiology and immunology. Mosby-Year Book, St. Louis, 1992, pp. 425-443.