

論 文 内 容 要 旨

題 目

Advanced glycation end-products increase lipocalin 2 expression in human oral epithelial cells

(最終糖化産物は口腔上皮細胞におけるLipocalin2の発現を増加させる)

著 者

木戸 理恵

内容要旨

【背景と目的】

糖尿病は歯周病のリスク因子であり、歯周病の病態を悪化させる。歯周病は、*Porphyromonas gingivalis* (*P.g*)などの歯周病原細菌により発症する感染性疾患であるが、糖尿病の合併症でもある。糖尿病合併症の主要原因因子である最終糖化産物(Advanced Glycation End-products: AGEs)は歯周組織中にも蓄積し、歯周組織での炎症反応や組織破壊に関与している。しかしながら、口腔の上皮細胞に対する影響についての報告は少ない。一方、Lipocalin2(LCN2)は上皮細胞や免疫細胞などで発現する糖タンパク質であり、抗菌活性を示すとともに炎症反応を調整する働きを有している。LCN2は糖尿病患者の血清中やいくつかの炎症性疾患の組織中で増加している。LCN2は、歯肉結合組織の炎症性細胞で同定され、そのレベルは歯周病部位の歯肉溝滲出液中において健常部位と比較し有意に高いことが報告されているが、LCN2の糖尿病を伴った歯周炎への影響については、詳細は明らかではない。そこで本研究では、糖尿病関連歯周炎におけるLCN2の発現や影響を調べるために、口腔上皮細胞を用いてAGEsや*P.g*-LPSによるLCN2発現への影響およびその調節機構を調べた。また、発現誘導されたLCN2による歯周炎病態に対する作用についても検討を行った。

【材料と方法】

細胞はヒト口腔上皮細胞(TR146細胞)およびヒト歯肉上皮細胞(Ca9-22細胞)を用いた。AGEsは、Okazakiらの方法に従いウシ血清アルブミン(BSA)をDL-glyceraldehydeで糖化反応させて調製した。コントロールとして非糖化BSAを用いた。細胞をサブコンフルエントになるまで培養し、AGEs(500 µg/ml)またはBSAを添加し、24~72時間後に細胞毒性を測定した。AGEs(500 µg/ml)やBSAで刺激したTR146細胞の培養系からRNA、培養上清および細胞懸濁液を回収し、LCN2、IL-6およびAGE受容体(RAGE)などの発現をqRT-RNA法、ELISA法やwestern blot(WB)法を用いて調べた。TR146細胞にRAGE siRNAまたはRAGEの中和抗体を用いて、RAGEをノックダウン後、AGE刺激を行った細胞におけるLCN2発現への影響を検討した。AGEsによるMAPK(p38, ERK)やNF-κBのリン酸化への影響をWB法にて検討した。また、*P.gingivalis*由来LPS

(*P.g*-LPS)を細胞培養系に添加し、回収したサンプルを用いてTLR2とLCN2の発現への影響をWB法とELISA法により調べた。

AGE誘導性LCN2の作用を検討するため、TR146細胞と好中球様細胞に分化させたHL-60(ヒト前骨髄球性白血病細胞)の共培養実験を行った。HL-60細胞の分化はManda-Handzlikの方法に従い1.25%DMSOを含む培地で5日間培養し分化させた。TR146細胞と分化HL-60細胞におけるLCN2およびLCN2受容体(24p3R)の発現をWB法で検討した。LCN2 siRNAを用いてLCN2をノックダウンしたTR146細胞をAGEs(500 µg/ml)で前処理し、その後AGEsを除いた培地中にて分化HL-60細胞と共に共培養システムを用いて培養した。分化HL-60細胞からRNAを抽出し、qRT-RNA法にてIL-6遺伝子の発現への影響を検討した。また、遊走したHL-60細胞をクリスタルバイオレット染色し、遊走細胞数を位相差顕微鏡を用いて測定した。

【結果】

AGEs(500 µg/ml)は、培養24~72時間で口腔上皮細胞の細胞毒性に影響を及ぼさなかった。TR146細胞において、AGEsはLCN2およびIL-6の遺伝子と蛋白質の発現を増加し、LCN2の増加効果は培養48~72時間で、100~500 µg/mlのAGEs濃度で有意な増加が認められた。AGEsによるLCN2発現増加は、口腔歯肉上皮細胞(Ca9-22)においても認められた。また、AGEsによるシグナル伝達経路を検討したところ、TR146細胞ではRAGEは恒常的に発現し、AGE刺激による発現の変化は認められなかった。しかしsiRNAにてRAGE発現を抑制させると、AGEs誘導性LCN2の発現は有意に低下し、この抑制はRAGE中和抗体の前処理によっても見られた。また、AGEs刺激によりMAKPのp38とERK、および転写因子のNF-κBのリン酸化が亢進され、それぞれの阻害剤によりAGE誘導性LCN2発現の増加は有意に抑制された。また、TR146細胞ではTLR2の発現が認められるが、そのレベルは*P.g*-LPSやAGEsで変化は無く、また、LCN2発現も*P.g*-LPSによって影響を受けなかった。

TR146細胞は、LCN2を産生し、その受容体の24p3Rの発現は見られなかった。一方、分化HL-60細胞では24p3Rの発現は認められたが、LCN2は産生されていなかった。LCN2 siRNAの導入によりTR146細胞のLCN2産生は有意に抑制され、このLCN2抑制されたTR146細胞と共培養された分化HL-60細胞でのIL-6遺伝子の発現は、siControl群と比較して有意に高いレベルであった。一方、siControlを導入したTR146細胞と分化HL-60細胞を共培養した場合、AGEs刺激によりHL-60細胞の遊走が促進され、LCN2 siRNAによりTR146細胞のLCN2発現が抑制された場合は、コントロールと比較して分化HL-60細胞の遊走は有意に抑制された。

【結論】

AGEsはRAGE、MAPK(p38, ERK)およびNF-κB経路を介して口腔上皮細胞におけるLCN2発現を増加させることが明らかとなった。また、AGEsにより上皮細胞から発現されたLCN2は、好中球のIL-6の発現を抑制させる一方で、好中球の遊走を促進させることが分かった。以上の結果から、LCN2は糖尿病関連歯周炎の病態形成に対して複雑な影響を及ぼしていることが示唆された。