

## Apert 症候群由来歯肉上皮細胞の LPS 応答性

倉田 和之

松本歯科大学 歯科矯正学講座  
(指導教員：王 宝禮 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

The responsiveness of Apert syndrome gingival keratinocytes to LPS

KAZUYUKI KURATA

*Department of Orthodontics, School of Dentistry, Matsumoto Dental University  
(Academic Advisor : Professor Pao-Li Wang)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

### 要 旨

#### 【目的】

Apert 症候群は FGFR2 の変異 (Ser 252 Trp および Pro 253 Arg) により生じる頭蓋縫合早期癒合症の一つであり、頭蓋骨の早期癒合、頭蓋の変形と顔面中央部 1/3 の低形成、骨性皮膚性合指趾症などを特徴とする遺伝性疾患である。歯科的特徴としては反対咬合や開咬などが挙げられ、Mustafa ら (2001) は頭蓋縫合早期癒合症患者では歯肉炎の罹患率が高いと報告している。本研究はこの報告を前提として、Apert 症候群型の FGFR2 変異が歯周疾患のリスクファクターとなるか否かを検討した。

#### 【方法】

Apert 症候群患者 3 名および健常者 2 名の舌剝離細胞からゲノム DNA を採取し、PCR-RFLP 法にて FGFR2 遺伝子の変異様式を決定した。

埋伏歯抜去の予定があった Apert 症候群患者・健常者各 1 名から採取した遊離歯肉片より歯肉上皮細胞を分離・培養し、歯周疾患関連細菌由来の LPS (リポ多糖) 刺激による MMP および炎症性サイトカイン (IL-6 および IL-8) 産生量を比較した。MMP の検出はザイモグラフィにて、炎症性サイトカインの測定は ELISA にて行った。また、LPS 刺激に対する FGF シグナルの関与を検討するため、Apert 症候群患者の歯肉上皮細胞に細胞内シグナル伝達阻害作用をもつ PD 98059 を作用させ炎症性サイトカインの測定を行った。

#### 【結果および考察】

Apert 症候群患者は 3 名とも Ser 252 Trp の変異様式であることが確認された。健常者と Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞との間で LPS による MMP-2 の産生量およびその活性化の程度に明らかな差は認められなかった。一方、Apert

症候群患者由来の歯肉上皮細胞は炎症性サイトカイン産生に関して LPS に対する反応性が低下していた。その原因として FGFR 2 からのシグナルが LPS シグナル伝達系を抑制しているという仮説を立て検討したものの、有意な結果は得られず、そのメカニズムを明らかとすることはできなかった。

以上の結果から、FGFR 2 の変異が歯周疾患のリスクファクターとなる可能性は低いことが考えられ、また変異型 FGFR 2 では LPS に対する炎症反応が起こりにくい可能性があることから、TLR 4 以外のシグナル伝達経路 (TLR 2 など) によってサイトカイン産生が起こる可能性が考えられた。

## 緒 言

Apert 症候群は1906年に Apert によって報告された頭蓋縫合早期癒合症の一つであり、頭蓋骨の早期癒合、頭蓋の変形と顔面中央部 1/3 の低形成、対称性の合指症・合趾症を特徴とする疾患である<sup>1)</sup>。口腔領域の所見としては上顎後退、開咬、叢生、軟口蓋裂および口蓋垂裂などが見られる<sup>2-7)</sup>。また、歯の萌出遅延が見られ、その遅延は年齢の増加に伴って大きくなる<sup>8)</sup>。

ほとんどの症例は、父親の年齢と関連して新規の遺伝子変異によって生じるが<sup>9-11)</sup>、まれに常染色体優性遺伝形式を示す症例も存在する<sup>12)</sup>。北アメリカおよびヨーロッパにおける Apert 症候群の発症頻度は約 1/65,000 であり、頭蓋縫合早期癒合症の約 4.5% を占める<sup>13)</sup>。Apert 症候群は単一の遺伝子の点変異による疾患であり、増殖因子

の受容体の一つである FGFR 2 遺伝子 (遺伝子座 10q25-q26) の変異であることが解明されている<sup>14)</sup>。Apert 症候群の FGFR 2 遺伝子の変異様式は、コーディング領域 934 番目の C が G に置換することによる Ser 252 Trp、およびコーディング領域 937 番目の C が G に置換することによる Pro 253 Arg が大半を占め<sup>14)</sup>、頻度としては Ser 252 Trp の方が多い。また、まれなケースとして、FGFR 2 遺伝子に *de novo* に Alu 配列が挿入された症例も報告されている<sup>15)</sup>。FGFR 2 の変異型と表現型との関連性を検討した報告がなされており、合指症の重症度は Pro 253 Arg が高く<sup>14,16)</sup>、反対に口蓋裂の重症度は Ser 252 Trp が高いことが示されている<sup>16)</sup>。

FGFR 2 はチロシンキナーゼ型受容体の一つであり、その構造は図 1 に示すように、3 個のイムノグロブリン (Ig) ドメイン、膜貫通ドメイン (TM)、2 個のチロシンキナーゼドメイン (TK) からなる<sup>17)</sup>。また、FGFR 2 にはサブタイプが存在し、スプライシングの違いにより IIIa と IIIb が結合して第 3 Ig ドメインとなる FGFR 2 b (別名 keratinocyte growth factor receptor, KGFR) と、IIIa と IIIc が結合して第 3 Ig ドメインとなる FGFR 2 c (別名 bacterially expressed kinase, BEK) の 2 種類が存在する (図 1)。この 2 種類のサブタイプの発現様式は明瞭に分かれており、FGFR 2 b は主に上皮細胞、FGFR 2 c は間質 (線維芽細胞、血球細胞、骨芽細胞など) に発現している<sup>18,19)</sup>。Apert 症候群における FGFR 2 の変異は第 2 Ig ドメインと第 3 Ig ドメイン間の FGFR 2 b と FGFR 2 c に共通したリンカー部で起

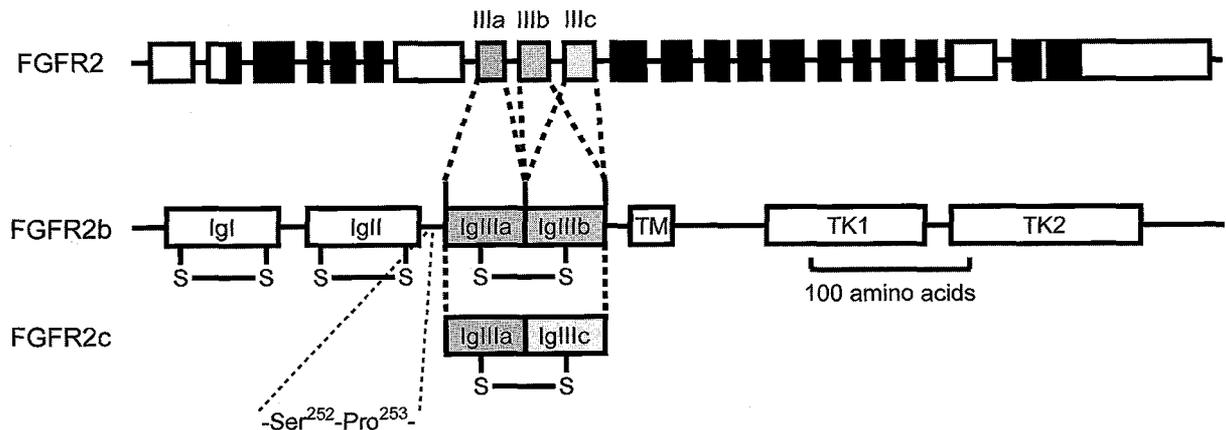


図 1 : FGFR 2 遺伝子の構造

Ig : イムノグロブリンドメイン, TM : 膜貫通ドメイン, TK : チロシンキナーゼドメイン

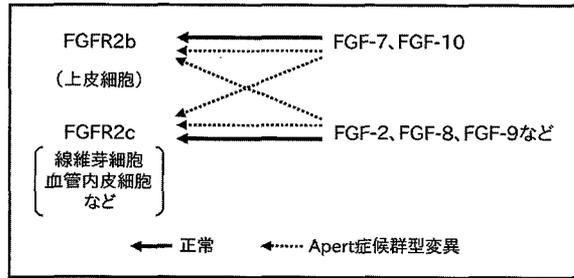


図2：FGFR2のリガンド特異性および遺伝子変異によるリガンド特異性の消失

る。本来 FGF と FGFR 2 の結合にはリガンド-受容体の特異性が存在し、図 2 の実線で示されるように、FGFR 2b には FGF-7 および FGF-10 が、FGFR 2c には FGF-2, FGF-8, FGF-9 が選択的に結合する<sup>20)</sup>。しかし、Apert 症候群型の変異によってその特異性が消失することにより、図 2 の点線に示されるように、本来のリガンドのみならず本来は結合しないはずの FGF も FGFR 2 に対する親和性が増して結合するようになる<sup>21)</sup>。その結果、FGF シグナルが増強されると考えられている<sup>22)</sup>。また、*in vitro* では、骨芽細胞についての研究が進んでおり、FGFR 2 の変異によりアポトーシスを誘導すること<sup>23,24)</sup>、また、骨芽細胞の分化が誘導されること<sup>25,26)</sup>が報告されている。詳細なメカニズムは不明ではあるが、これらの機能変化により縫合の早期癒合が生じると考えられている。

歯科領域における臨床的な所見として Mustafa らは、頭蓋縫合早期癒合症 (Apert 症候群を含むと思われる) の小児では健常者よりも歯肉炎の罹患率が高いことを報告しており、その原因は口腔清掃状態の不良であると考察している<sup>27)</sup>。しかし、遺伝性疾患である Down 症候群患者で歯周疾患の罹患率が高い<sup>28)</sup>のと同様に、Apert 症候群においても遺伝子変異が歯周疾患のリスクを高める可能性が考えられる。口腔内組織における FGFR 2 の発現部位を免疫組織学的染色法により検討した報告では、FGFR 2 は口腔粘膜上皮細胞に強く発現しており<sup>29,30)</sup>、また、上皮細胞由来である前立腺癌細胞株を FGF-7 で刺激するとコラゲナーゼ (MMP-1) およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) の産生量が増加することが示されている<sup>31)</sup>。したがって、これらの報告を総合すると図 3 に示されるように

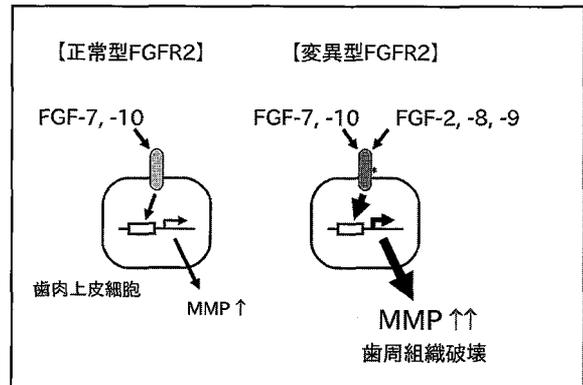


図3：本研究の仮説

Apert 症候群患者の歯肉上皮細胞においてもプロテアーゼの産生量が増加することによって歯周組織の破壊をもたらす可能性が考えられた。また、炎症反応による組織破壊は MMP のみならず炎症性サイトカインの産生によっても亢進することが一般的に知られている<sup>32,33)</sup>。

したがって本研究では、炎症および組織破壊に関連するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) および炎症性サイトカイン (IL-6 および IL-8) の産生量について、Apert 症候群患者および健常者由来の上皮細胞を使用して LPS に対する反応性を比較することにより、FGFR 2 の変異が歯周疾患のリスクファクターとなるか否かも検討した。

実験対象および方法

1. 対象者

歯科矯正治療のために松本歯科大学病院に来院中の Apert 症候群患者 3 名と、ボランティアの健常者 2 名を被験者とした。Apert 症候群患者はすべて女性で、初診時の年齢は 11 歳 5 か月、12 歳 6 か月、20 歳 7 か月であった。なお、本研究は本学倫理委員会の承認 (許可番号 第 0043 号) を受けている。

2. 試薬

歯周疾患関連細菌由来の LPS として花田信弘博士 (鶴見大学歯学部探索歯学講座) より供与された *Porphyromonas gingivalis* の LPS [PgLPS (0, 1, 10 μg/ml)] を使用した。

3. ゲノム DNA 抽出および遺伝子変異様式の判定

歯ブラシを用いて被験者の舌表面より剥離細胞

を採取し、ゲノム DNA を抽出した<sup>34,35)</sup>。最終的に 20  $\mu$ l の TE [1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 8.0)] に溶解し、使用時まで 4  $^{\circ}$ C で保管した。

Apert 症候群の遺伝子変異様式の判定は PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法により行った。まず変異部位を含む FGFR2 遺伝子領域を PCR 法にて増幅した。上流プライマーとして 5'-GGT CTC TCA TTC TCC CAT CCC-3'<sup>10)</sup>、下流プライマーとして 5'-GCT GGG CAT CAC TGT AAA C-3'<sup>14)</sup> を使用した。PCR は *Taq* ポリメラーゼ (Biotech International, 米国) を使用して 20  $\mu$ l の系で行った。PCR 法の条件として、最初の変性を 95  $^{\circ}$ C, 3 分で行い、次に 94  $^{\circ}$ C, 30 秒, アニール 60  $^{\circ}$ C, 30 秒, 伸長 72  $^{\circ}$ C, 30 秒を 40 サイクル行い、最後の伸長を 74  $^{\circ}$ C, 7 分行い、4  $^{\circ}$ C で保存した。器機は GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) を使用した。

反応終了後の溶液 (2  $\mu$ l) を 2.5% TAE アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い PCR 産物 (159 bp) の増幅を確認した。その後、PCR 反応溶液 (5  $\mu$ l) を制限酵素 *Sau3AI* (タカラバイオ, 滋賀) あるいは *BglI* (New England Biolabs, USA) で 37  $^{\circ}$ C, 1 時間反応させて PCR 産物を切断した。反応終了後の溶液 (10  $\mu$ l) を先程と同様に 2.5% TAE アガロースゲルで電気泳動し、DNA のバンドを確認した。

本研究で使用した遺伝子変異様式の判定法の原理を図 5 に示す。*Sau3AI* は 5'-GCATAG-3' の塩基配列を認識し、増幅した PCR 産物 (159 bp) を 103 bp と 56 bp の断片に切断する。一方、*BglI* は 5'-GCCNNNNGGC-3' (N は任意の塩基) を認識して 95 bp と 64 bp の断片に切断する。図 5 A に示すように正常な FGFR2 遺伝子は *Sau3AI* と *BglI* の両者の認識部位が存在しているためどちらの制限酵素を使用しても切断される。しかし、Ser 252 Trp 変異では *Sau3AI* の認識部位が消失するために、*Sau3AI* では切断されずに *BglI* でのみ切断される。一方、Pro 253 Arg 変異では *BglI* の認識部位が消失するために、*BglI* では切断されずに *Sau3AI* でのみ切断される。したがって、制限酵素切断後の DNA のパターン

により遺伝子の変異様式を判定することができる。

#### 4. 歯肉上皮細胞の分離および培養

Apert 症候群患者および健常者の埋伏歯抜去時の遊離歯肉片より歯肉上皮細胞を分離、培養した<sup>36)</sup>。得られた歯肉片を 50 mg/ml のペニシリンおよび 100 unit/ml のストレプトマイシンを含む PBS 中で 37  $^{\circ}$ C, 1 時間, CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した後、上皮細胞培養用培地 (Defined Keratinocyte-SFM, Invitrogen, USA) 中に移し、メスおよび眼科ハサミを用いて上皮下結合組織を除去した。その後、上皮組織を細切して少量ずつ 24 穴プレートに移し、組織片がプレートに接着するまで培養した。その後、培地を組織片が覆われる程度に少量添加した。翌日、培地をさらに 0.5 ml 添加した。4~5 日毎に培地交換を行い、上皮細胞が増殖したことを確認して継代培養した。細胞培養は CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>/95% air, 37  $^{\circ}$ C) にて行った。

#### 5. ザイモグラフィー

健常者および Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞から産生される MMP の種類および量を比較するため、各上皮細胞を 96 穴プレート (greiner bio-one, GER) に 1  $\times$  10<sup>4</sup> 個ずつ播き、指定された濃度の *Pg*LPS および FGF-7 (Peprotech, GB) を含む培地で 4 日間刺激した。培養上清中に産生された MMP をゼラチンあるいはカゼインを基質としたザイモグラフィーにより検出した。

ザイモグラフィーは以下の方法で行った。分離ゲルは 37.5 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 10% アクリルアミド (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=29:1), 0.1% ゼラチンあるいはカゼイン, 濃縮ゲルは 12.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 5% アクリルアミドの組成で作成した。ザイモグラフィーに使用するサンプル 2 容量に対して 3  $\times$  サンプルバッファー [150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6% SDS, 30% グリセリン] を 1 容量の割合で混合して泳動用のサンプルとした。分子量マーカーは Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad, USA) を使用した。

サンプルおよび分子量マーカーをゲルにアプライし、4  $^{\circ}$ C で電気泳動を行った。泳動バッファーは 25 mM Tris, 192 mM グリシン, 0.1% SDS の

組成で作成した。サンプルが濃縮ゲルに存在する間は80 V, 定電圧で約30分泳動し, サンプルが分離ゲルに達した後に150 V, 定電圧で泳動した。サンプル中のプロモフェノールブルー (BPB) が分離ゲルの底面から約1 cmの所まで来た時点で泳動を終了した。

電気泳動後のゲルを緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5% Triton X-100] 中で30分間, 2回振盪させてSDSを除去した。次に50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で10分間処理した後, 反応液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>] 中で37°C, 20時間反応させた。反応終了後のゲルを固定液 (50%メタノール, 10%酢酸) 中で10分間振盪して固定した後, クーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色液 (0.25% CBB-B 250, 50%メタノール, 10%酢酸) 中で1時間, 室温で振盪し, 染色を行った。その後, 脱色液 (50%メタノール, 10%酢酸) 中で振盪し, 程度を確認しながら脱色を行った。ザイモグラフィではゲル中の基質 (ゼラチン, カゼインなど) は青く染色され, MMPが存在する部位では基質が分解されるために白いバンドとして確認される。

#### 6. サイトカイン産生量の定量

図7の実験では, 各上皮細胞をPgLPSで刺激し, 炎症性サイトカインの産生量を検討した。図8の実験では, 健常者由来の歯肉上皮細胞に対してFGFR2bの本来のリガンドであるFGF-7を作用させることによりApert症候群由来上皮細胞を模倣することを試みた。各上皮細胞を96穴プレートに $1 \times 10^4$ 個ずつ播き, 指定された濃度のPgLPSおよびFGF-7を含む培地で24時間刺激した。また図9の実験では, Apert症候群患者由来の歯肉上皮細胞に対してMAPキナーゼカスケードを阻害した状態での炎症性サイトカイン産生量を検討した。FGF-7刺激によりMAPキナーゼカスケードの一つであるERKが活性化することが知られており<sup>37)</sup>, ERKはその上流に存在するMEKにより活性化される。したがって, Apert症候群患者由来の歯肉上皮細胞をMEK阻害剤20 $\mu$ MのPD 98059 (Sigma, USA) を添加し, 1時間前処理することによりERKの活性化を阻害した状態で, 指定された濃度のPgLPSおよびDMSOあるいは20 $\mu$ MのPD 98059を含む培

地で24時間刺激した。培養上清中に産生された炎症性サイトカイン量はHuman IL-6 ELISA Kit およびHuman IL-8 ELISA Kit (Biosource International, USA) を使用して測定した。PD 98059を添加しない対照群には同量のジメチルスルホキシド (DMSO) を添加した。

各実験において, 水溶性テトラゾリウム-1 (WST-1) による生細胞数測定の原理を用いたCell Counting Kit (同仁化学研究所, 熊本) を使用して刺激終了後の細胞数を測定した。反応終了後にマイクロプレートリーダー (Model 550, Bio-Rad, USA) を使用して測定波長450 nm, 参照波長655 nmで吸光度を測定した。ELISAにより測定されたサイトカイン量を無刺激群の細胞数を $1 \times 10^4$ 個としたときの細胞数で補正して, 細胞 $1 \times 10^4$ 個あたりの産生量としてグラフに表示した。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (S.D.) (n=3) で表した。

#### 7. 統計学的解析

多群間の平均値の比較は対比較を行った後にHolm法で有意水準を調整することにより行った。2要因間の交互作用は対応のない繰返しのある二元配置分散分析により解析した。統計学的解析はR (<http://www.r-project.org/>) を使用して行い,  $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。Holmの方法による多重比較および二元配置分散分析を行うためのRのプログラムは<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/R/index.html>に掲載されているものを使用した。

## 結 果

### 1. Apert症候群患者の所見

Apert症候群患者の初診時の顔貌, 手足, 口腔内の写真を示す。中顔面の陥凹 (図4AおよびB), 指趾合指症 (図4CおよびD), 骨格性反対咬合, 開咬 (図4EおよびF) などの所見がみられた。また, 他の2名のApert症候群患者も同様の所見を示した (データ非掲載)。これらの症状はこれまでに報告されている症状とほぼ一致した。

### 2. 遺伝子変異様式の判定

健常者およびApert症候群患者の遺伝子変異様式の判定を行った (図5BおよびC)。健常者では2名ともSau3AIとBglIで切断されたパ



ターンが確認されたため Apert 症候群型の変異は見られなかった。一方, Apert 症候群患者では 3 名とも *Bgl*I では切断されたパターンが確認されたが, *Sau*3AI では切断されなかった。そのため変異様式は Ser 252 Trp と判定した。健常者および Apert 症候群患者各 1 名 (図 5, レーン 1 および 3) から上皮細胞を分離培養し, 以後の実験に使用した。

3. 上皮細胞から産生される MMP 産生量の検討

健常者および Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞から産生される MMP の種類および量を比較した。ゼラチンを基質とした場合には両細胞ともに約 66 kDa と約 62 kDa の位置にバンドが検出された (図 6 A)。分子量からこれらのバンドはそれぞれ潜在型 MMP-2 (proMMP-2) と活性化型 MMP-2 (active MMP-2) と考えられた。両細胞間で MMP-2 のバンドに明らかな差は認められなかった。一方, 92 kDa の位置にはバンドは認められなかったため, MMP-9 を産生していないあるいは検出限界以下と考えられた

(データ非掲載)。また, カゼインを基質とした場合にはバンドは認められず, MMP-1 および MMP-3 も産生していないあるいは検出限界以下と考えられた (データ非掲載)。

次に各歯肉上皮細胞を *Pg*LPS で刺激した場合の潜在型および活性化型 MMP-2 の変化を検討した。各細胞を *Pg*LPS なし, あるいは 1 μg/ml および 10 μg/ml の *Pg*LPS で 4 日間刺激して, その培養上清をゼイモグラフィーで解析した (図 6 B)。1 μg/ml の *Pg*LPS で刺激した場合には両細胞とも無刺激時と比較して明らかな差は認められなかったが, 10 μg/ml の *Pg*LPS で刺激した場合には活性化型 MMP-2 のバンドが増強した。しかし, 両細胞間で活性化の程度に明らかな差は認められなかった。また, MMP-1, 3, 9 のバンドはいずれの条件においても検出されなかった (データ非掲載)。これらの結果から, 歯肉上皮細胞を *Pg*LPS で刺激すると MMP-2 が活性化するが, その程度は健常者および Apert 症候群患者由来の上皮細胞との間で明らかな差がないことが示された。

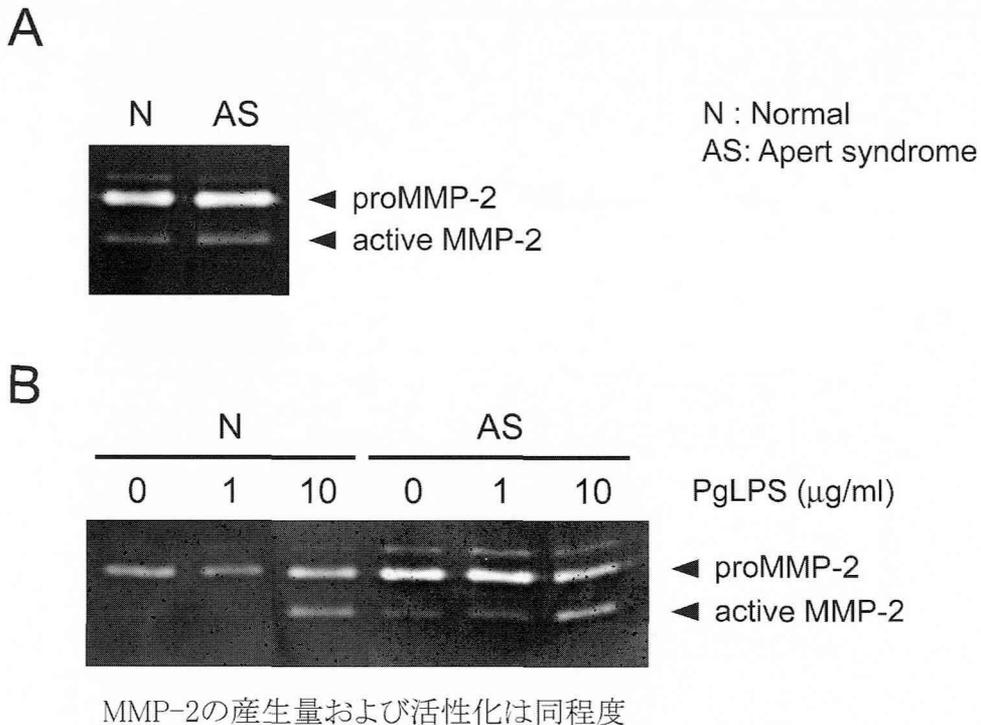


図 6 : ゼラチンゼイモグラフィーによる MMP 産生量の解析

- (A) 健常者および Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  個ずつ播き, 新しい培地に交換した後, 4 日間インキュベートした。培養上清中に含まれる MMP をゼラチンゼイモグラフィーで解析した。
- (B) 健常者および Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  個ずつ播き, 新しい培地に交換した後, 0, 1, 10 μg/ml の *Pg*LPS を含む培地で 4 日間インキュベートした。培養上清中に含まれる MMP をゼラチンゼイモグラフィーで解析した。N, 健常者; AS, Apert 症候群患者。

#### 4. 上皮細胞から産生される炎症性サイトカイン量の検討

各上皮細胞を *Pg*LPS で刺激し、炎症性サイトカインの産生量を検討した。健常者の上皮細胞は *Pg*LPS 刺激により IL-6 および IL-8 の産生量が明らかに増加したが、Apert 症候群患者由来の上皮細胞は *Pg*LPS で刺激してもサイトカイン産生量の増加の程度が健常者と比較して弱かった (図 7A)。実験間で無刺激時のサイトカイン産生量のばらつきが大きかったため、無刺激時の値を 1 として *Pg*LPS 刺激により何倍になるかを算出してグラフ化した (図 7B)。10  $\mu$ g/ml の *Pg*LPS で刺激したときに健常者由来の上皮細胞では約 20-40 倍にサイトカイン産生量が増加したが、Apert 症候群患者由来の上皮細胞では約 2-5 倍しか増加せず、LPS 刺激によるサイトカイン産生の程度に明らかな差があることが確認され

た。

健常者と Apert 症候群患者間で LPS 刺激に対する炎症性サイトカイン産生量の差の有意性を統計学的に確認するために図 7A のサイトカイン産生量の結果を *Pg*LPS (0, 1, 10  $\mu$ g/ml の 3 水準) と細胞種 (健常者および Apert 症候群の 2 水準) とを要因とした対応のない繰り返しのある二元配置分散分析で解析した。IL-6, IL-8 とも交互作用の P 値が 0.001 未満と有意であったため細胞種と *Pg*LPS との間に交互作用が認められた。すなわち、細胞の違いが *Pg*LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生量に影響を与えていることが確認された。

#### 5. FGF-7 刺激による Apert 症候群型変異の模倣

Apert 症候群型の FGFR 2 変異により本来は結合しない種類の FGF が結合する<sup>21)</sup>ことをふま

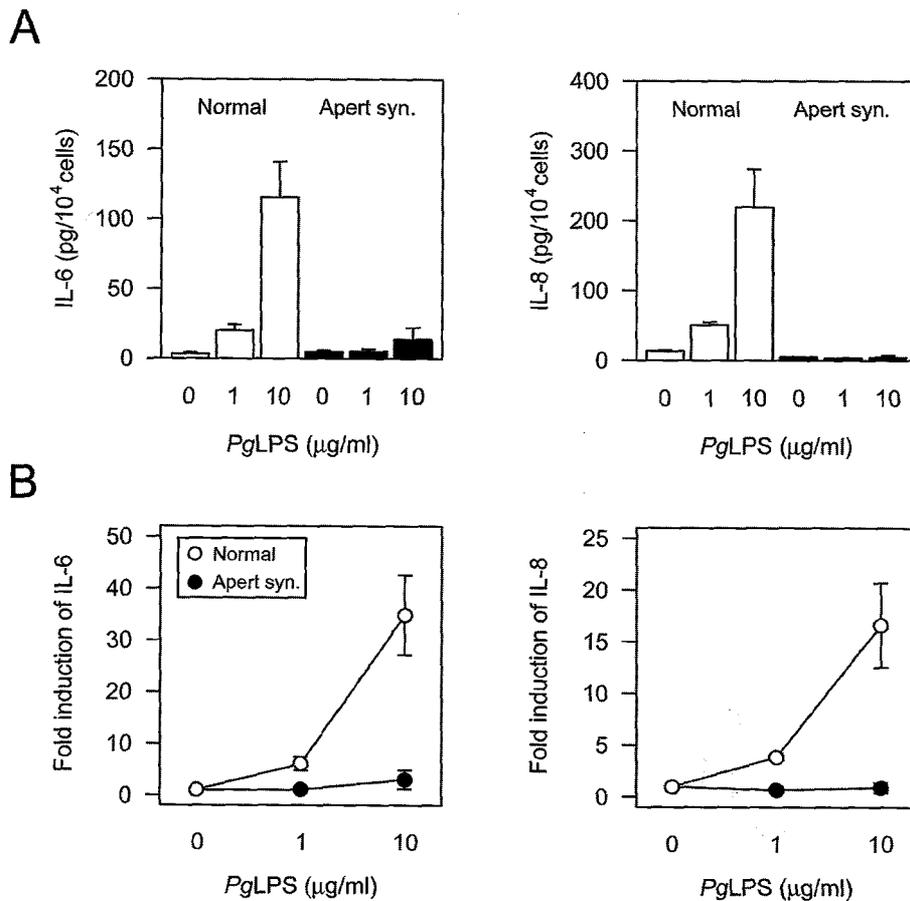


図 7：LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生

(A) 健常者および Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  個ずつ播き、0, 1, 10  $\mu$ g/ml の *Pg*LPS を含む培地で 24 時間刺激した。培養上清中に産生された IL-6 と IL-8 量を ELISA にて測定し、WST-1 により測定された細胞数で補正して細胞  $1 \times 10^4$  個当たりのサイトカイン産生量として表示した。

(B) (A) で得られた値を無刺激時の値を 1 として算出した。データは平均値  $\pm$  S.D. (n = 3) で表示した。

え、健常者由来の歯肉上皮細胞に対して Apert 症候群由来上皮細胞を模倣することを試みた結果、歯肉上皮細胞を FGF-7 単独で刺激した場合には IL-6 および IL-8 の産生量に明らかな差は見られなかった (図 8)。一方、10  $\mu$ g/ml の PgLPS で刺激した場合には IL-6, IL-8 とも産生量が有意に増加し、FGF-7 の濃度を上昇させることによりこれらのサイトカインの産生量が低下する傾向がみられた。しかし、PgLPS のみの値と PgLPS+FGF-7 の値を比較しても統計学的には有意差は認められなかった。

FGF-7 の存在によって LPS 刺激に対する炎症性サイトカイン産生の傾向が異なるか否かを統計学的に確認するために図 8 のサイトカイン産生量の結果を PgLPS (0, 10  $\mu$ g/ml の 2 水準) と FGF-7 (0, 10, 50 ng/ml の 3 水準) とを要因とした対応のない繰り返しのある二元配置分散分析で解析した。IL-6, IL-8 とも交互作用の P 値が 0.05 より大きく FGF-7 と PgLPS との間に交互作用が認められなかった (IL-6,  $P=0.135$ ; IL-8,  $P=0.419$ )。したがって、統計学的には FGF-7 が PgLPS 刺激による炎症性サイトカイン産生量に影響を及ぼしているとはいえなかった。

#### 6. Apert 症候群由来上皮細胞のサイトカイン産生に対する MAP キナーゼカスケードの関与の検討

Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞に対して MAP キナーゼカスケードを阻害した状態での炎症性サイトカイン産生量を検討した結果、図 9 に示すように、歯肉上皮細胞を PgLPS で刺激した場合には IL-6, IL-8 産生量に約 2-5 倍の増加が見られたが、各 PgLPS 濃度において DMSO 添加群と PD 98059 添加群のサイトカイン産生量はほぼ同程度で、統計学的にも有意差は認められなかった。先程と同様に PD 98059 の存在によって LPS 刺激に対する炎症性サイトカイン産生の傾向が異なるか否かを統計学的に確認するために図 9 のサイトカイン産生量の結果を PgLPS (0, 1, 10  $\mu$ g/ml の 3 水準) と PD 98059 の有無 (2 水準) とを要因とした対応のない繰り返しのある二元配置分散分析で解析した。IL-6, IL-8 とも交互作用の P 値が 0.05 より大きく PgLPS と PD 98059 との間に交互作用が認められなかった (IL-

-6,  $P=0.173$ ; IL-8,  $P=0.051$ )。したがって、統計学的には PD 98059 が PgLPS 刺激による炎症性サイトカイン産生量に影響を及ぼしているとはいえなかった。

## 考 察

本研究では、Apert 症候群の FGFR 2 変異が歯周疾患のリスクファクターとなるか否かを Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を用いて検討した。これまでに Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を使用した報告はなされていない。

健常者由来の歯肉上皮細胞と比較して Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞は PgLPS で刺激した際の MMP-2 の産生量およびその活性化に明らかな差は認められなかった (図 6)。一方、炎症性サイトカイン産生に関して Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞で PgLPS 刺激に対する反応性が明らかに低かった (図 7)。これらのことから、FGFR 2 の変異は、MMP に影響せず IL-6, IL-8 産生量を低下させている可能性が示唆された。

この原因に関して、試料数が少ないため個体差という可能性を無視することはできないものの、それ以外の原因として以下の仮説が考えられた。

- (1) Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞は細胞表面の TLR 4/MD-2 複合体の発現量が少ない。
- (2) Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞では FGFR 2 の活性化によりサイトカイン産生に関与する細胞内シグナル伝達系が阻害される。

そこで、MMP および炎症性サイトカインの産生量の変化をもとにして、上述の仮説を検討した。

#### 1. MMP の産生について

本研究において健常者および Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞から産生される潜在型 MMP-2 量およびその活性化の程度に明らかな差は認められなかった (図 6A)。また、各細胞を LPS で刺激した場合にも MMP-2 の産生量およびその活性化の程度は同程度であった (図 6B)。また、MMP-1 および MMP-3, MMP-9 は検出されなかった。これらの結果から、健常者および Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞と

の間で組織破壊能に差がないことが示唆された。

LPS はまず CD14 に結合する。CD14 は LPS を細胞表面に発現している TLR 4/MD-2 複合体に渡して活性化させ、エンドサイトーシスにより細胞内に情報が伝達され炎症性サイトカインの産生がおきる<sup>38)</sup>。また、潜在型 MMP-2 は細胞膜表面に結合している MT 1-MMP (membrane type 1-MMP) によって活性化される。MT 1-MMP は LPS 刺激によって発現量が増加し、MMP-2 を活性化することが末梢血由来単球で報告されている<sup>39)</sup>。歯肉上皮細胞を LPS 刺激した際の MT 1-MMP の発現量を検討した報告はなく、本研究においても同様の検討を行っていないが、両細胞で同程度に活性化型 MMP-2 が検出され、その活性化を引き起こす PgLPS 濃度も 10  $\mu\text{g/ml}$  と同じことから、MT 1-MMP も同程度に発現が誘導されたことが示唆された。さらに、PgLPS 刺激後の細胞の生存率に明らかな差は認められな

かった (WST-1 を用いた結果、データ非掲載)。したがって、本研究では細胞表面の TLR 4/MD-2 発現量を検討していないが、TLR 4/MD-2 発現量およびその後の細胞内シグナル伝達系に明らかな差はないことが示唆され、(1)の仮説は成立しないと考えられる。

## 2. 炎症性サイトカインの産生について

Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞が PgLPS 刺激による炎症性サイトカイン産生に関して低反応性を示す原因を FGFR 2 からのシグナル伝達を変化させることにより検討した。しかし、健常者由来の歯肉上皮細胞を FGF-7 で刺激してもサイトカイン産生量がわずかに減少する傾向を示したが、統計学的には有意差は見られなかった (図 8)。さらに Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を MEK 阻害剤 PD 98059 で処理した場合にも LPS 刺激によるサイトカイン産生量に明らかな差が見られなかった (図 9)。これら

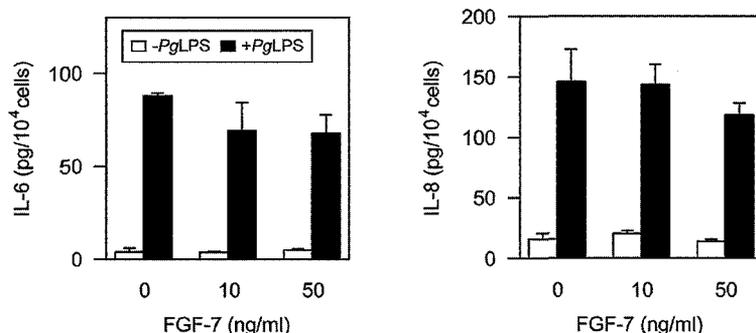


図 8：LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生に対する FGF-7 の影響

健常者由来の歯肉上皮細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  個ずつ播き、0, 1, 10  $\mu\text{g/ml}$  の PgLPS および 0, 10, 20  $\text{ng/ml}$  の FGF-7 を含む培地で 24 時間刺激した。培養上清中に産生された IL-6 と IL-8 量を ELISA にて測定し、WST-1 により測定された細胞数で補正して細胞  $1 \times 10^4$  個当たりのサイトカイン産生量として表示した。データは平均値  $\pm$  S.D. (n = 3) で表示した。

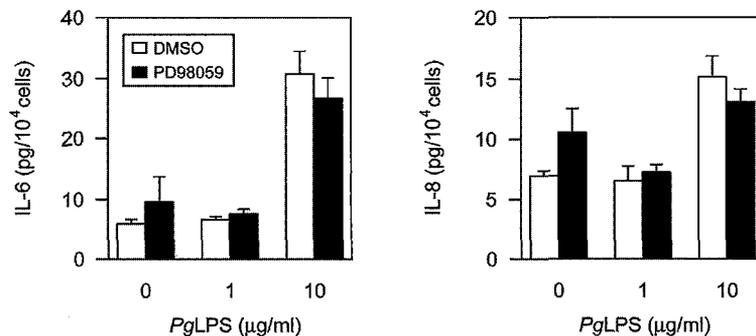


図 9：炎症性サイトカイン産生に対する MEK/ERK 系の影響

Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  個ずつ播き、DMSO あるいは 20  $\mu\text{M}$  PD 98059 で 1 時間前処理した後、0, 1, 10  $\mu\text{g/ml}$  の PgLPS と DMSO あるいは 20  $\mu\text{M}$  PD 98059 を含む培地で 24 時間刺激した。培養上清中に産生された IL-6 と IL-8 量を ELISA にて測定し、WST-1 により測定された細胞数で補正して細胞  $1 \times 10^4$  個当たりのサイトカイン産生量として表示した。データは平均値  $\pm$  S.D. (n = 3) で表示した。

の結果から、Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞のサイトカイン産生様式に対する MEK/ERK 系のシグナル伝達の関与は少ないことが示唆され、(2)の仮説も成立しないと考えられる。したがって、本研究では、Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を PgLPS 刺激した際に炎症性サイトカイン産生に関して低反応性を示したメカニズムを明らかにすることはできなかった。

Mustafa らは、頭蓋縫合早期癒合症 (Apert 症候群を含むと思われる) の小児では健常者よりも歯肉炎の罹患率が高いと報告している<sup>27)</sup>。一方、今回の結果では、Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞は LPS 刺激時の炎症性サイトカイン産生に関して低反応性を示している。したがって、FGFR 2 の変異と歯肉炎の罹患率が高いことは直接関連するものではなく、他の要因が存在する可能性が非常に高いと考えられる。その一つとして、Apert 症候群の歯肉上皮細胞は TLR 4 以外 (例えばペプチドグリカンの受容体である TLR 2) のシグナル伝達を介して炎症性サイトカインを産生していることが推測される。

一方、健常者由来の歯肉上皮細胞を FGF-7 で刺激して際にサイトカイン産生量がわずかに減少する傾向を示したことから、さらに高濃度の FGF-7 存在下では PgLPS 刺激による IL-6 および IL-8 産生量が有意に低下する可能性が考えられる。また、FGFR からのシグナル伝達系は主に MEK/ERK 系を介するが、それ以外のシグナル伝達系 (PI 3 K 系など) も活性化することが知られている。したがって、今回は PD 98059 しか使用していないが、PI 3 K 阻害剤である Wortmannin などを使用した場合には何らかの差が現れた可能性が考えられる。

### 3. 今後の検討課題および展望

本研究では PgLPS 刺激による TLR 4 を介した炎症性サイトカイン産生量しか検討していない。Apert 症候群患者で歯肉炎が多いということは縁上プラークが主な原因である可能性が考えられる。縁上プラークの主体であるグラム陽性菌は LPS を持たないことから、細胞壁の主成分であるペプチドグリカンあるいは縁上プラーク抽出物を使用した方が歯肉炎ということを検討するとより適切であるかもしれない。また、ペプチドグリカンあるいは縁上プラーク抽出物で歯肉上皮細胞

を刺激した場合には TLR 2 を介した炎症性サイトカイン産生量を検討することが可能であるため、今後の検討課題としたい。

本研究で、Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞は PgLPS 刺激した際の炎症性サイトカイン産生量が少ないことから、免疫能に何らかの影響がある可能性がある。しかしこれまでに Apert 症候群患者で免疫能の低下がみられるという報告はない。免疫系の変化を検討する一つとして、Apert 症候群患者の血清中の全タンパク質量および IgG 量を測定することは非常に興味深いと考えられる。

また、FGFR 2 の変異様式の違いにより表現型に違いがあることが知られているが<sup>10)</sup>、全身的な表現型のみ言及があり、口腔内の所見に差があるか否かは明らかでない。したがって、本研究で 3 名の Apert 症候群患者で遺伝子変異様式が異なっていた場合には、症例数が少ないもののその違いによる表現型の差を検討することも可能であった。しかし、遺伝子変異様式を判定した結果から 3 名とも Ser 252 Trp の変異様式であり (図 5)、本研究においては表現型を比較することができなかった。今後、さらに Apert 症候群患者の来院数が増加すれば Pro 253 Arg の変異を持つ患者もいることが予想される。その場合に遺伝子変異様式と表現型との間に関連性があるかどうかを検討することは非常に興味深い。

最後に、Crouzon 症候群などの Apert 症候群以外の頭蓋縫合早期癒合症においても同様の結果が得られる可能性がある。その理由として、Crouzon 症候群も FGFR 2 の変異 (His 254 Tyr, Gln 289 Pro, Trp 290 Arg, Cys 342 Tyr, Cys 342 Arg, Cys 342 Trp, Ser 354 Phe など) により生じ<sup>40)</sup>、FGFR 2 の活性化を引き起こす<sup>41,42)</sup>ことが挙げられる。したがって、Apert 症候群型の遺伝子変異により LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生が抑制されることを考えると、Crouzon 症候群型の変異においても同様の結果が得られる可能性が十分に考えられる。

## 結 語

Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を用いて、FGFR 2 変異が宿主要因として歯周疾患へ及ぼす影響について検討したところ以下の結論が得

られた。

1. 健常者と Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞を比較すると、PgLPS 刺激による MMP-2 の産生量およびその活性化は同程度であった。
2. PgLPS 刺激をした際に産生される炎症性サイトカインは Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞の方が低かった。
3. 頭蓋縫合早期癒合症患者で歯肉炎の罹患率が高いことを考慮すると、Apert 症候群患者由来の歯肉上皮細胞では TLR 4 以外のシグナル伝達経路 (TLR 2 など) によってサイトカイン産生が起こる可能性が考えられた。
4. 以上の結果から、Apert 症候群患者における FGFR 2 変異は LPS を介した歯周疾患発症への関与は少なく、宿主要因とはなり得ないことが示唆された。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり本学大学院遺伝子工学・分子創薬学教授 王 宝禮先生、同講座 荒敏昭先生、本学総合歯科医学研究所教授 栗原三郎先生、本学大学院臨床病態評価学教授 山田一尋先生にご指導、ご助言を賜りましたことを深く感謝致します。また歯肉上皮細胞の培養にあたり、本学大学院臨床病態評価学 上松隆司先生に多大なご協力を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Apert E (1906) De l'acrocephalosyndactylie. Bull Soc Med Hop **23** : 1310-30.
- 2) Costaras-Volarich M and Pruzansky S (1984) Is the mandible intrinsically different in Apert and Crouzon syndromes? Am J Orthod **85** : 475-87.
- 3) Richtsmeier J (1987) Comparative study of normal, Crouzon, and Apert craniofacial morphology using finite element scaling analysis. Am J Phys Anthropol **74** : 473-93.
- 4) Kreiborg S and Cohen MJ (1998) The oral manifestations of Apert syndrome. J Craniofac Genet Dev Biol **12** : 41-8.
- 5) Kreiborg S and Cohen MJ (1998) Is craniofacial morphology in Apert and Crouzon syndromes the same? Acta Odontol Scand **56** : 339-41.
- 6) Cohen MJ and Kreiborg S (1996) A clinical study of the craniofacial features in Apert syndrome. Int J Oral Maxillofac Surg **25** : 45-53.
- 7) Kreiborg S, Aduss H and Cohen MJ (1999) Cephalometric study of the Apert syndrome in adolescence and adulthood. J Craniofac Genet Dev Biol **19** : 1-11.
- 8) Kaloust S, Ishii K and Vargervik K (1997) Dental development in Apert syndrome. Cleft Palate Craniofac J **34** : 117-21.
- 9) Blank C (1960) Apert's syndrome (a type of acrocephalo-syndactyly)-observations on a British series of thirty-nine cases. Ann Hum Genet **24** : 151-64.
- 10) Erickson J and Cohen MJ (1974) A study of parental age effects on the occurrence of fresh mutations for the Apert syndrome. Ann Hum Genet **38** : 89-96.
- 11) Risch N, Reich E, Wishnick M and McCarthy J (1987) Spontaneous mutation and parental age in humans. Am J Hum Genet **41** : 218-48.
- 12) Rollnick B (1998) Male transmission of Apert syndrome. Clin Genet **33** : 87-90.
- 13) Cohen MJ, Kreiborg S, Lammer E, Cordero J, Mastroiacovo P, Erickson J, Roeper P and Martinez Frias M (1992) Birth prevalence study of the Apert syndrome. Am J Med Genet **42** : 655-59.
- 14) Wilkie A, Slaney S, Oldridge M, Poole M, Ashworth G, Hockley A, Hayward R, David D, Pulleyn L, Rutland P, Malcolm S, Winter R and Reardon W (1995) Apert syndrome results from localized mutations of FGFR 2 and is allelic with Crouzon syndrome. Nat Genet **9** : 165-72.
- 15) Oldridge M, Zackai E, McDonald McGinn D, Iseki S, Morriss Kay G, Twigg S, Johnson D, Wall S, Jiang W, Theda C, Jabs E and Wilkie A (1999) De novo Alu-element insertions in FGFR 2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. Am J Hum Genet **64** : 446-61.
- 16) Slaney S, Oldridge M, Hurst J, Morriss-Kay G, Hall C, Poole M and Wilkie A (1996) Differential effects of FGFR 2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. Am J Hum Genet **58** : 923-32.
- 17) Wilkie A, Patey S, Kan S, van den Ouweland A and Hamel B (2002) FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. Am J Med Genet **112** :

- 266-78.
- 18) Orr-Urtreger A, Givol D, Yayon A, Yarden Y and Lonai P (1991) Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development* **113** : 1419-34.
  - 19) Shi D, Launay C, Fromentoux V, Feige J and Boucaut J (1994) Expression of fibroblast growth factor receptor-2 splice variants is developmentally and tissue-specifically regulated in the amphibian embryo. *Dev Biol* **164** : 173-82.
  - 20) Ornitz D, Xu J, Colvin J, McEwen D, MacArthur C, Coulier F, Gao G and Goldfarb M (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* **271** : 15292-7.
  - 21) Yu K, Herr A, Waksman G and Ornitz D (2000) Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 14536-41.
  - 22) Ibrahim O, Eliseenkova A, Plotnikov A, Yu K, Ornitz D and Mohammadi M (2001) Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** : 7182-7.
  - 23) Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M and Basilico C (2000) Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* **149** : 1297-308.
  - 24) Lemonnier J, Hay E, Delannoy P, Fromiguet O, Lomri A, Modrowski D and Marie P (2001) Increased osteoblast apoptosis in Apert craniosynostosis: role of protein kinase C and interleukin-1. *Am J Pathol* **158** : 1833-42.
  - 25) Tanimoto Y, Yokozeki M, Hiura K, Matsumoto K, Nakanishi H, Matsumoto T, Marie P and Moriyama K (2004) A soluble form of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) with S 252 W mutation acts as an efficient inhibitor for the enhanced osteoblastic differentiation caused by FGFR2 activation in Apert syndrome. *J Biol Chem* **279** : 45926-34.
  - 26) Baroni T, Carinci P, Lilli C, Bellucci C, Aisa M, Scapoli L, Volinia S, Carinci F, Pezzetti F, Calvitti M, Farina A, Conte C and Bodo M (2005) P 253 R fibroblast growth factor receptor-2 mutation induces RUNX2 transcript variants and calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* **202** : 524-35.
  - 27) Mustafa D, Lucas V, Junod P, Evans R, Mason C and Roberts G (2001) The dental health and caries-related microflora in children with craniosynostosis. *Cleft Palate Craniofac J* **38** : 629-35.
  - 28) Reuland B and van Dijk LJ (1986) Periodontal disease in Down's syndrome. *J Clin Periodontol* **13** : 64-73.
  - 29) So F, Daley T, Jackson L and Wysocki G (2001) Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2, and receptors FGFR2 and FGFR3 in the epithelium of human odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med* **30** : 428-33.
  - 30) Wakulich C, Jackson-Boeters L, Daley T and Wysocki G (2002) Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **93** : 573-9.
  - 31) Ropiquet F, Huguenin S, Villette J, Ronfle V, Le Brun G, Maitland N, Cussenot O, Fiet J and Berthon P (1999) FGF7/KGF triggers cell transformation and invasion on immortalised human prostatic epithelial PNT1A cells. *Int J Cancer* **82** : 237-43.
  - 32) Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T, Kishimoto T and Suda T (1993) Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** : 11924-8.
  - 33) Okada H and Murakami S (1998) Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* **9** : 248-66.
  - 34) 今村泰弘, 王 宝禮, 久野知子, 音琴淳一, 藤井健男, 太田紀雄 (2006) 歯ブラシによる舌粘膜細胞からのDNA抽出簡便法. *歯科薬物療法* **25** : 17-21.
  - 35) Imamura Y, Usui S, Oomori Y, Fujigaki Y, Ota N and Wang PL (2007) Recovery of genomic DNA from lingual mucosal cells in sufficient quantity and quality. *Am J Dent* **20** (4) : 241-4.
  - 36) Wang PL, Shinohara M, Murakawa N, Endo M, Sakata S, Okamura M and Ohura K (1999) Effect of cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* on adhesion molecules in gingival epithelial cells. *Jpn J Pharmacol* **80** : 75-9.
  - 37) Portnoy J, Curran-Everett D and Mason R

- (2004) Keratinocyte growth factor stimulates alveolar type II cell proliferation through the extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-OH kinase pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30** : 901-7.
- 38) Wang PL and Ohura K (2002) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med* **13** : 132-42.
- 39) Shankavaram U, Lai W, Netzel-Arnett S, Mangan P, Ardans J, Caterina N, Stetler-Stevenson W, Birkedal-Hansen H and Wahl L (2001) Monocyte membrane type 1-matrix metalloproteinase. Prostaglandin-dependent regulation and role in metallo-proteinase-2 activation. *J Biol Chem* **276** : 19027-32.
- 40) Chun K, Teebi A, Azimi C, Steele L and Ray P (2003) Screening of patients with craniosynostosis : molecular strategy. *Am J Med Genet* **120 A** : 470-3.
- 41) Neilson K and Friesel R (1995) Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-2 by a point mutation associated with Crouzon syndrome. *J Biol Chem* **270** : 26037-40.
- 42) Galvin B, Hart K, Meyer A, Webster M and Donoghue D (1996) Constitutive receptor activation by Crouzon syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2 and FGFR2/Neu chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 7894-9.