

Title	Porphyromonas gingivalis LPSによるC3H/HeJ マウス脾B細胞の活性化
Author(s)	吉田, 穰次
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/39814
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	よし だ しょう じ 吉 田 穰 次
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 1 2 4 3 4 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	<i>Porphyromonas gingivalis</i> LPS による C3H/HeJ マウス脾 B 細胞 の活性化
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 宏 (副査) 教授 浜田 茂幸 助教授 大嶋 隆 助教授 森崎 市治郎

論 文 内 容 の 要 旨

グラム陰性菌の外膜に含まれる内毒素性リポ多糖 (LPS; lipopolysaccharide) は、宿主に対して種々の免疫生物学的活性を發揮するが、その標的細胞として単球/マクロファージのみならず、B細胞を活性化して増殖や抗体産生細胞への分化を誘導する。成人性歯周炎の主たる病原菌の一つと目されている *Porphyromonas gingivalis* の LPS は、低毒素でかつ種々の免疫薬理学的作用を有するとともに、腸内細菌由来 LPS には低応答性である C3H/HeJ マウス脾細胞に対しても、明確なマイトジェン活性を發揮することが知られている。しかしながら、*P. gingivalis* LPS による C3H/HeJ B細胞の活性化ならびにその機構については不明な点が多い。

本研究は、C3H/HeN ならびに C3H/HeJ マウス脾細胞より純化した B細胞画分を用いて、*P. gingivalis* LPS による B細胞活性化機構を *Escherichia coli* LPS のそれと比較検討したものである。

本研究には、*P. gingivalis* 381 株凍結乾燥菌体から温フェノール/水法により抽出、精製した LPS を供試した。また、対照として *E. coli* O55 : B55 LPS (List 社) を用いた。実験動物として C3H/HeN ならびに C3H/HeJ マウス (雄性, 8 週齢) を用い、同脾細胞から比重遠心法によって単核球細胞画分を得、磁気細胞分離システム (MACS) を用いて B細胞画分 (CD45R/B220 陽性細胞 98% 以上) を調製した。

P. gingivalis LPS のマイトジェン活性は、B細胞を所定濃度の LPS とともに 48 時間培養後、³H-チミジンの取り込みを測定することにより検討した。また同培養にポリミキシン B を添加することによりその抑制効果を検討した。IL-6 産生誘導能は、B細胞を LPS とともに 48 時間培養後、培養上清中に産生された IL-6 量を ELISA 法により測定した。また、種々のプロテインキナーゼ阻害剤を用いて B細胞を前処理することにより、IL-6 産生に及ぼす効果を併せて検討した。LPS 刺激による B細胞のリン酸化蛋白質の検出は、ウエスタンブロット法により行った。B細胞の LPS 結合蛋白質は、ヨード標識した LPS を用いた photocrosslinking 法により解析した。

P. gingivalis LPS は、C3H/HeN B細胞のみならず C3H/HeJ B細胞に対して、マイトジェン活性を示したが、同活性はポリミキシン B により抑制されなかった。一方、*E. coli* LPS は C3H/HeN B細胞のみマイトジェン活性を示し、同活性はポリミキシン B (100 ユニット/ウェル) によりほぼ完全に抑制された。

また、*P. gingivalis* LPS は C3H/HeN ならびに C3H/HeJ B細胞に明確な IL-6 産生を誘導したが、*E. coli* LPS 刺激による IL-6 産生誘導は C3H/HeN B細胞のみに認められた。さらに、同 IL-6 産生誘導活性は、いずれの LPS で刺激した場合にも、チロシンキナーゼ阻害剤である herbimycin A、プロテインキナーゼ C 阻害剤である

H-7 ならびに環状ヌクレオチド依存性プロテインキナーゼ阻害剤である H-8 の前処理によって濃度依存的に抑制された。

LPS 刺激による B 細胞の蛋白質リン酸化を検討した結果, *P. gingivalis* LPS 刺激後の C3H/HeN および C3H/HeJ B 細胞において, 特異的なチロシン, セリンおよびトレオニンのリン酸化蛋白質が認められた。また, *E. coli* LPS でも同様のリン酸化蛋白質の誘導が C3H/HeN B 細胞のみにみられた。

B 細胞の LPS 結合蛋白質について, [125 I]-ASD-LPS を用いた Photocrosslinking 法により分析した結果, *P. gingivalis* LPS および *E. coli* LPS は, C3H/HeN ならびに C3H/HeJ B 細胞の 73-kDa 蛋白質と結合した。さらに, これらの LPS と 73-kDa 蛋白質の結合は homologous ならびに heterogeneous な非標識 LPS により阻害された。

以上, 本研究より, *P. gingivalis* LPS による C3H/HeJ B 細胞の活性化には, *E. coli* LPS による C3H/HeN B 細胞の活性化と同様に, チロシン, セリン/トレオニンキナーゼの活性化が関与していることが示唆された。また, 同細胞には, *P. gingivalis* ならびに *E. coli* LPS と結合する 73kDa 蛋白質がみられることから, *P. gingivalis* LPS の C3H/HeJ B 細胞の活性化には, *E. coli* LPS とは異なる LPS 構造が深く関わっているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は, *Porphyromonas gingivalis* 381 株より精製したリポ多糖 (LPS) による LPS 低応答性 C3H/HeJ マウス脾 B 細胞活性化機構を, *Escherichia coli* LPS のそれと比較検討したものである。

その結果, 両 LPS は C3H/HeJ B 細胞の 73kDa 蛋白質と結合するが *E. coli* LPS は同細胞を活性化しないこと, さらに両 LPS による C3H/HeN B 細胞の活性化はチロシンキナーゼ, セリンキナーゼ, トレオニンキナーゼ経路を介する同じ伝達経路で生じることを明らかにした。これらの結果から C3H/HeJ B 細胞では 73kDa 蛋白質に結合後のシグナル伝達の過程において, 両 LPS の活性化機構に違いがある可能性が示唆された。

以上の業績は, 主要な歯周病原性細菌である *P. gingivalis* 由来 LPS による免疫生物学的活性の発現機構の特性を理解する上で新たな知見を提示するものであり, 博士 (歯学) の学位請求に値するものとする。