



Title	Porphyromonas gingivalis LPSによるC3H/HeJ マウス脾B細胞の活性化
Author(s)	吉田, 穂次
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39814
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	吉田 穣次
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第12434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発揮するが、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、明確なマイトジエン活性を発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のマイトジエン活性は、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、マイトジエン活性を示したが、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細胞のみマイトジエン活性を示し、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 結合蛋白について、 $[^{125}\text{I}]$ -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考える。