



Title	Porphyromonas gingivalis線毛蛋白によるヒト末梢血単球のサイトカイン産生誘導機構の解析
Author(s)	内田, 浩
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41272
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	内田 浩
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 14792 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	「 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 線毛蛋白によるヒト末梢血単球のサイトカイン産生誘導機構の解析」
論文審査委員	(主査) 教授 作田 正義
	(副査) 教授 浜田 茂幸 讲師 岩本 容泰 讲師 島内 英俊

論文内容の要旨

[研究目的]

黒色色素産生性のグラム陰性嫌気性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* は、歯周病、なかでも成人性歯周炎の発症や進行に深くかかわっていることが報告されている。同菌体周囲には線維状構造体である線毛が分布し、その生化学的性状ならびに免疫生物学的活性について検討されている。*P. gingivalis* 線毛は、歯周組織中の種々の細胞に付着し、これら細胞を活性化し、炎症を惹起する重要な病原因子の一つと考えられる。同線毛を含む菌体表層成分は、歯周局所への単球を含む炎症細胞を誘導し、炎症や組織破壊をもたらすことが示唆されている。しかしながら、歯周病の発症や進行において、*P. gingivalis* 線毛と宿主細胞との相互作用に関する分子レベルでの研究は緒についたばかりである。本研究は、組織マクロファージの前駆細胞と考えられるヒト末梢血単球に対する *P. gingivalis* 線毛によるサイトカイン産生およびその産生誘導にかかる作用機構について検討し、また、*P. gingivalis* 線毛に対する単球の細胞表面の結合部位について明らかにしようとしたものである。

[材料と方法]

本研究に用いた材料および方法は以下の通りである。すなわち、1. 線毛の調整は、*P. gingivalis* 381 株を嫌気的条件下で培養後、菌体から機械的に剥離し透析後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。2. 合成ペプチドは、Dickinson ら (1988) により明らかにされた *P. gingivalis* 381 株線毛のサブユニット蛋白であるフィンブリリンの推定アミノ酸配列にもとづき自動ペプチド合成装置により作出し、逆相高速液体クロマトグラフィーにて精製した。3. 単球の細胞表面抗原に対する特異抗体は市販のものを用いた。抗リボ多糖体結合蛋白 (LBP) 抗体は、九州大学歯学部の相田宣利博士より恵与された。4. ヒト末梢血単球は、ヒト静脈血を採取し比重遠心法により単核球画分を得、つづいて磁気細胞分離システムを用いて分離した。5. サイトカインの産生誘導は、所定量の *P. gingivalis* 線毛あるいは部分合成ペプチドと単球を、単球の表面抗原に対する種々のマウスモノクローナル抗体の添加あるいは無添加の条件下で24時間培養後、その上清を採取した。培養上清中のサイトカイン濃度は、酵素結合抗体免疫アッセイキットを用いて測定した。6. サイトカイン mRNA は、細胞から single-step 法により全 RNA を分離し、RT-PCR 法により検出した。7. チロシンリン酸化蛋白は、Weinstein らの方法に従い。界面活性剤により細胞膜を破壊し、得られた蛋白をマウス抗ホスホチロシンモノクローナル抗体を用いて、ウェスタンプロット法により検出した。8. 転写因子の活性化は、Dignam らの方法に準じ、核蛋白を抽出し、 $[\gamma - ^{32}P]$ -ATP で標識したオリゴ

ヌクレオチドプローブを用いて、ゲルシフト法により検討した。

[結果および考察]

P. gingivalis 線毛およびそのフィンブリリンのアミノ酸配列を模して合成した活性ペプチドの一つである Ala-Leu-Thr-Thr-Glu (ALTTE) は、ヒト末梢血単球より炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン 6 (IL-6) の産生および同 mRNA の発現を誘導した。また、単球の細胞内蛋白のチロシンリン酸化の誘導がみられた。さらに IL-6 の産生誘導にかかわる転写因子である AP-1, CREB, NF-IL-6, NF- κ B を活性化した。これら単球の活性化には、チロシンキナーゼおよびプロテインキナーゼ C の関与が示唆された。単球からの IL-6 産生誘導には、線毛およびその部分ペプチドが、少なくとも同細胞表面上の CD14 および／あるいは CD11a へ結合することが考えられ、また、これらの結合には LBP が関与しているとの所見を得た。

P. gingivalis が成人性歯周炎患者の歯周ポケット内から高頻度に検出され、また、歯周炎組織中に単球／マクロファージが浸潤していることが知られている。本研究により、*P. gingivalis* 線毛蛋白およびその部分ペプチドが、ヒト末梢血単球より炎症性サイトカインの一つである IL-6 産生を誘導することを明らかにした。また、その産生機構としては、*P. gingivalis* 線毛が、単球膜表面抗原である CD14 および／あるいは CD11a 分子に結合するとともに LBP が関与することが考えられる。その結果、細胞内へ刺激が伝達され、蛋白リン酸化により IL-6 産生にかかわる転写因子が誘導されることが示唆される。以上の結果から、歯周病の病巣局所では、*P. gingivalis* 線毛やその断片化した部分ペプチドが、単球を含む炎症細胞を活性化し、炎症を惹起していることが推測される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、*Porphyromonas gingivalis* 線毛およびその活性部分ペプチドによるヒト末梢血単球のサイトカイン産生ならびにその産生誘導にかかわる作用機構について検討し、また、*P. gingivalis* 線毛の単球細胞表面の結合部位について明らかにしようとした。

その結果、*P. gingivalis* 線毛およびその活性部分ペプチドにより、ヒト単球細胞内の蛋白リン酸化を介して転写因子が活性化され、炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン 6 の産生を誘導することを示した。また、*P. gingivalis* 線毛は、単球膜表面抗原である CD14 および／あるいは CD11a 分子と結合することが示唆された。

これらの結果は、歯周病巣局所における宿主と寄生体の相互作用の一端を明らかにしたものであり、本研究は、博士（歯学）の学位請求に十分値するものと認める。