



Title	Porphyromonas gingivalis菌体成分の刺激によるヒト 歯肉上皮細胞のサイトカイン産生
Author(s)	斎藤, 桂子
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41524">https://hdl.handle.net/11094/41524</a>
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、<a href="https://www.library.osaka- u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文につい て</a>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	さい とう けい こ 齋 藤 桂 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 4 2 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> 菌体成分の刺激によるヒト歯肉上皮細胞のサイトカイン産生」
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡 田 宏  (副査) 教 授 栗 栖 浩 二 郎      助 教 授 川 端 重 忠      講 師 天 野 敦 雄

#### 論 文 内 容 の 要 旨

歯周組織において、歯肉溝上皮はデンタルプラークに対峙して存在し、慢性的にその刺激にさらされている。近年、種々の上皮層が単に生体最前線の物理的バリアとして機能するのみならず、それぞれの組織で発症する炎症反応にも深く関わっていることが明らかにされている。従って歯周炎の発症、進行においても、歯肉上皮層がこの様な役割を担っているものと推察される。そこで本研究では、この実態を明らかにするために、ヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) を歯周組織より単離し、これを不死化することを試み、*in vitro*における実験系を創出して、歯周病原性細菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) の刺激を受けた HGEC の反応動態をそのサイトカイン産生を中心に検討し、歯周炎の病態形成への係わりを推測する縁とした。

HGEC は、本研究の主旨を理解し実験に参加することを同意した歯周炎患者より歯周外科時に歯肉組織片を得て、0.4% Dispase II 処理により上皮層を剥離した。上皮層を細切後、0.05% Trypsin-EDTA 処理にて HGEC を単離し、表皮角化細胞増殖用培地 (HuMedia-K G<sup>®</sup>) を用いて培養、増殖してきた細胞を HGEC とした。また、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) は、上皮層を剥離した後の歯肉組織片を10%ウシ胎児血清加  $\alpha$ -Modification of Eagle's Medium ( $\alpha$ -MEN) にて培養し、組織片より増殖してきた細胞を HGF として実験に供試した。ヒト成人乳房表皮角化組織 (HEDC) は、倉敷紡績株式会社より購入し HuMedia-KG<sup>®</sup> を用いて培養した。HGEC は培養を行うと、立方形、敷石状に増殖し、継代数3, 4代をこえると増殖が停止し長期継代培養が困難であった。そのため HGEC を2代継代培養の後、SV40T 抗原遺伝子を含むプラスミド (pMT10D) をリン酸カルシウム法を用いて同細胞に導入し、得られた細胞を HuMedia-KG<sup>®</sup> にて培養を続け、SV40T 抗原遺伝子を導入していない親細胞の増殖の停止した継代数をはるかに越えて継代培養可能となった細胞を、長期継代培養可能な HGEC (OBA-9) とした。OBA-9 も HGEC 同様の増殖像を呈し、25代まで継代培養が可能であることが確認された。HGEC および OBA-9 を Chamber Slide<sup>®</sup> 上で培養し、メタノール固定後、抗ヒトケラチン抗体および抗ヒトインボルクリン抗体を用いた免疫染色を行ったところ、HGEC および OBA-9 両細胞内にはケラチンの産生が認められ、高カルシウムイオン濃度で培養した際には、扁平上皮分化マーカーであるインボルクリン産生が検出されたことから、OBA-9 は上皮細胞の形質を保持していることが確認された。次に、*P.g.* 超音波破砕画分 (*P.g.*SE) を、*P.g.*381株培養菌体を超音波にて破砕し、遠心により不溶物を除いた後フィルターにて濾過することにより得た。また、*P.g.* 線毛 (*P.g.*fim.) は吉村らの方法により、*P.g.* リポ多糖 (*P.g.*LPS) は Westphal らの方法により抽出した。これら *P.g.* 菌体由来物以外に、ヒトリコンビナント

Interleukin (hrIL)  $-1\beta$ , ヒトリコンビナント腫瘍壊死因子 (hr TNF  $\alpha$ ) あるいは Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), *Escherichia coli* (*E.coli*) LPS を刺激物質として以下の実験に用いた。予備実験により決定された至適濃度の刺激物質共存下で, OBA-9 および HGEC を 5%  $\text{CO}_2$  湿潤状態で 8 時間培養した。培養終了後これら細胞より mRNA を抽出・精製し, ランダムヘキサマーおよび各種サイトカイン (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6, IL-8 ならびに monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 特異的なプライマーを用いて Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を行った。さらに, ジゴキシゲニン標識された各 PCR 産物に相補的な DNA プローブを用いてサザンブロット解析を行い, 各バンドの相対黒化度を画像解析により算定した。その結果 *P.g.*SE 存在下で OBA-9 を培養することにより, IL-8, MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 ならびに TNF  $\alpha$  サイトカイン mRNA の発現量が著明に増加した。これに対して, IL-1 $\alpha$  mRNA 発現は同上刺激後ほとんど変動が認められなかった。*P.g.*SE 刺激でのこれらサイトカインの著明な発現増加に比べ, *P.g.fim.* および *P.g.*LPS 刺激では, その発現増加はわずかであった。また, IL-1 $\beta$  ならびに TNF  $\alpha$  にて OBA-9 を刺激すると, 上記サイトカイン mRNA の発現増加は認められるものの, *P.g.*SE 刺激に比べてその程度は小さかった。HGEC を *P.g.*SE にて刺激した場合も, IL-8, MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 ならびに TNF  $\alpha$  mRNA の発現誘導が認められ, OBA-9 と同様の傾向が認められた。次に *P.g.*SE 刺激後 OBA-9 内に mRNA 発現を検出した各サイトカインについて, それらが蛋白として分泌されているか否かを検討するため, 上記刺激物質共存下で 24 時間培養した上清中に含まれる同サイトカイン産生量を, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した。*P.g.*SE 刺激により OBA-9 の培養上清中には, IL-8 および MCP-1 の著明な産生増加が認められた。これに対して, IL-6, IL-1 $\beta$  ならびに TNF  $\alpha$  は, 同培養上清中には検出されなかった。HGEC を *P.g.*SE にて刺激した際にも, 同培養上清中には OBA-9 と同様, IL-8 および MCP-1 産生増加が認められた。次に, 他の組織由来の上皮細胞でも OBA-9, HGEC で認められた IL-8 および MCP-1 産生増加の現象が認められるのか否かを検討するために, 本研究では HEDC を用い, 刺激物質として *P.g.*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*), *E.coli* の SE を添加した。その結果 OBA-9 の培養上清中には, *E.coli* SE, *P.g.*SE ならびに *A.a.*SE 刺激による IL-8 産生増加が認められた。一方, HEDC による培養上清中への IL-8 産生に関しては, hrTNF- $\alpha$ , PMA, *E.coli* SE の刺激によって産生増加が認められ, *P.g.*SE, *A.a.*SE 刺激による増加は認められなかった。このことから, 上皮細胞はその由来する組織の違いにより, 異なる細胞特性を有するものと推察される。次に, OBA-9 により産生される IL-8 および MCP-1 が実際に生物学的活性を有しているかを, ヒト好中球および単球に対する遊走の誘導を指標に検討した。*P.g.*SE 共存下で OBA-9 を 4 時間培養後, 新たな培地に交換し, さらに *P.g.*SE 非存在下で 24 時間培養後, その上清を回収した。同培養上清中の好中球および単球に対する遊走活性を, 96 穴走化チャンバーを用いて遊走細胞数を算出することにより求めた。また, 同実験系に抗ヒト IL-8 抗体および抗ヒト MCP-1 抗体を添加し, その抑制効果を検討した。その結果 *P.g.*SE にて刺激された OBA-9 の培養上清は, 好中球および単球に対する遊走活性を有し, さらに抗 IL-8 抗体および抗 MCP-1 抗体により, それぞれの細胞に対する遊走活性が特異的に阻害された。よって *P.g.*SE にて刺激された OBA-9 培養上清中に認められる遊走活性は, それぞれ主に IL-8, MCP-1 によるものであることが示唆された。さらに歯周組織における IL-8 および MCP-1 の発現を, 歯周外科処置時に得られた歯肉病組織切片を用いた免疫組織染色により検討したところ, 両ケモカインの発現が上皮層に存在するのが確認された。

以上の結果より, 本研究で HGEC の単離が可能となり, さらに, 同細胞に SV40T 抗原の遺伝子を導入することにより, HGEC の形質を保持した長期継代培養可能な細胞株 (OBA-9) を樹立することに成功した。これら細胞を *P.g.*SE で刺激することにより, 同細胞から IL-8, MCP-1 という 2 種類のケモカインが, 選択的に産生されることが明らかとなった。これらのことから歯肉上皮層は, 単に物理的なバリアとしてだけではなく, 歯周病原性細菌の刺激に応答してケモカインを産生し, 炎症細胞の遊走・活性化の誘導を介して, 歯周病組織の恒常性維持を担うのみならず, 歯周炎の発症・進行に関与するものと推察され, 歯周炎の病態形成において HGEC が重要な役割を演じていることが強く示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は歯周炎におけるヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) の役割を明らかにする目的で、まず HGEC を単離し、さらに同細胞に SV40T 抗原遺伝子を含むベクターを導入することにより、HGEC の形質を保持した長期継代培養可能な細胞株 (OBA-9) を樹立、これらの細胞が歯周病原性細菌の 1 つである *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) の刺激により惹起されるサイトカイン産生について検討したものである。その結果、*P.g.* 超音波破砕画分刺激により、OBA-9 および HGEC は IL-8, MCP-1 という 2 種類のケモカインを選択的に産生することが明らかとなった。さらに他の組織由来の上皮細胞と比較検討したところ、刺激に用いる細菌種により、上皮細胞の反応性が異なることから、上皮細胞における組織特異性の存在が示唆された。これらの知見は歯肉上皮層が単に物理的バリアとして歯周組織の恒常性維持に寄与するのみならず、炎症の発症・進行の過程に積極的に関与している可能性を示唆するものであり、今後、歯周炎の病理発生機構を明らかにする上で極めて有益な情報を提供するものと期待される。よって本研究は博士の学位請求に値するものと認める。