



Title	Porphyromonas gingivalis LPSによる歯肉線維芽細胞活性化機構の検討
Author(s)	奥田, 耕三
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41886
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	おく だ こう 三 奥 田 耕 三
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 3 3 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年3月24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による歯肉線維芽細胞活性化機構の 検討
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 岡田 宏 (副査) 教授 米田 俊之 助教授 川端 重忠 助教授 埴岡 隆

論 文 内 容 の 要 旨

成人性歯周炎の有力な病原菌と考えられている *Porphyromonas gingivalis* 由来のリポ多糖 (Lipopolysaccharide ; LPS) は、単球/マクロファージなどの宿主細胞を活性化することにより、炎症性あるいは抗炎症性サイトカイン産生を誘導することが知られている。LPSによる宿主細胞活性化の第一歩はLPSレセプターとの結合であるが、単球/マクロファージや好中球においては細胞膜上の膜型CD14 (mCD14) がLPSとLPS結合蛋白との複合体を高感度に認識するレセプターとして機能し、一方、mCD14を持たない細胞においては血中の分泌型CD14 (sCD14) が関与するLPS認識機構が存在することが明らかにされている。一方、歯肉線維芽細胞 (HGF) はmCD14発現において多様であり、mCD14あるいはsCD14のいずれを介しても同LPSを認識し活性化される可能性が示唆されている。しかし、LPSがmCD14あるいはsCD14を介して結合することにより、どのような細胞内シグナル伝達の相違が生じるのかということについては明らかではない。本研究はこの点を明らかにするために、HGFに遺伝子導入を行いmCD14分子を細胞膜上に発現させることによりmCD14を持たないHGFと *P. gingivalis* LPSによるHGF活性化の細胞内シグナル伝達機構の差異について比較検討した。

本実験に供試したLPSは、*P. gingivalis*381菌体より温フェノール/水法を用いて抽出し、超遠心操作ならびに酵素処理を行って精製し、Haziotらの方法に従ってビオチン標識化した。また対照として *Escherichia coli*055 : B 5株由来のLPS (List社) を用いた。また、HGFは健康人歯肉より分離し継代培養したものを供試した。CD14遺伝子導入HGF株 (HGF-CD14) はヒトCD14分子をコードするcDNAを組込んだネオマイシン耐性の発現ベクター-pCl-neo/CD14を電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行い、ネオマイシン存在下で選択培養することにより得た。なお、対照として発現ベクターのみを遺伝子導入したHGF (HGF-pCl-neo)、293TならびにTHP-1細胞を用いた。LPS刺激によるHGFからのIL-6ならびにIL-8産生は、HGFを *P. gingivalis* LPSとともに種々の条件で所定時間培養後、上清中に産生されたIL-6およびIL-8量をELISA法により測定した。HGFにおけるTLR2およびTLR4 mRNA発現をRT-PCR法を用いて検討するとともに、同分子の細胞外ドメインの一部を模して合成したペプチドを家兎に免疫して得た抗血清を用いたフローサイトメトリー法により細胞上への発現を調べた。また、種々のプロテインキナーゼインヒビターを用いた前処理を行うことにより同LPS刺激による細胞内情報伝達機構をIL-8のELISA法を用いて検討した。

pCl-neo/CD14をHGFに遺伝子導入を行うことにより、mCD14を発現した細胞株HGF-CD14が樹立された。

HGF-CD14をヒト血清存在下で *P. gingivalis* LPS 刺激を行うと、HGF-pCl-neo に比べて IL-6 および IL-8 産生性が有意に増加するが、いずれの細胞においても LPS 刺激時に、血清中の sCD14を除去することにより IL-6 および IL-8 産生性が低下した。また293Tに CD14を発現させた293T-CD14への LPS の結合も sCD14除去により低下することから、HGF の mCD14を介した LPS 結合機構においても sCD14 が関与していることが示唆された。LPS の細胞内シグナル伝達レセプターと考えられている TLR 2ならびに TLR 4 の発現を検討した結果、HGF では THP-1 に比べ弱いものの共に mRNA 発現を認めたが、HGF 細胞表面上には TLR 2 のみの発現が確認された。HGF 細胞内における LPS 刺激伝達系について IL-8 産生誘導を指標として検討した結果、sCD14および mCD14を介した経路の場合にはプロテインチロシンキナーゼ (PTK)、プロテインキナーゼ C (PKC)、cyclic AMP/cyclic GMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA/PKG) およびカルモジュリンキナーゼ (CaMK) が活性化されるのに対し、sCD14のみを介した場合には主として PTK および PKC の活性化が関与していることが示唆された。

本研究の結果、HGF は mCD14を発現することにより *P. gingivalis* LPS 刺激によるサイトカイン産生性は上昇するが、同 LPS の mCD14への結合にも sCD14が必要と考えられた。またシグナル伝達レセプターと考えられている TLR は単球系細胞とはその発現パターンが異なることが明らかとなった。さらに、HGF においては、mCD14を介して *P. gingivalis* LPS を認識する場合には PTK、PKC、PKA/PKG、CaMK が同細胞の活性化に関与するのに対して、sCD14のみに依存した場合の PTK、PKCのみが関与することが明らかとなり、LPS の結合機構により HGF 細胞内シグナル伝達機構に差異のあることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、*Porphyromonas gingivalis* LPS 刺激によるヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) の細胞活性化機構について、遺伝子導入により膜型 CD14 (mCD14) を HGF の細胞膜上に強制発現させた細胞株を作製して検討したものである。その結果、HGF は mCD14を発現することにより *P. gingivalis* LPS 刺激によるサイトカイン産生性は上昇するが、同 LPS の mCD14への結合にも可溶性 CD14 (sCD14) が関与することを明らかにした。また Toll-Like receptor の発現は HGF では単球系細胞と異なることが示唆された。さらに、HGF においては、mCD14を介して *P. gingivalis* LPS を認識する場合と sCD14のみに依存した場合は活性化されるプロテインキナーゼが異なり、LPS の結合機構により HGF 細胞内シグナル伝達機構に差異のあることを明らかにした。これらの知見は、歯周病原性細菌由来 LPS による宿主細胞活性化機構を明らかにする上で貴重な情報を提供するものであり、本研究は博士の学位請求に値するものと認める。