

|              |                                                                                   |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Porphyromonas gingivalis感染によるマウス ストローマ細胞ST2の炎症応答                                  |
| Author(s)    | 大野, 貴志                                                                            |
| Citation     |                                                                                   |
| Issue Date   |                                                                                   |
| Text Version | none                                                                              |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/11094/47621">http://hdl.handle.net/11094/47621</a> |
| DOI          |                                                                                   |
| rights       |                                                                                   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

|            |                                                                |
|------------|----------------------------------------------------------------|
| 氏名         | おの の たか し<br>大 野 貴 志                                           |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (歯 学)                                                      |
| 学位記番号      | 第 21087 号                                                      |
| 学位授与年月日    | 平成 19 年 3 月 23 日                                               |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>歯学研究科分子病態口腔科学専攻                            |
| 学位論文名      | <i>Porphyromonas gingivalis</i> 感染によるマウス ストローマ細胞 ST2 の炎症<br>応答 |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教 授 森崎市治郎<br><br>(副査)<br>教 授 天野 敦雄 助教授 永田 英樹 講 師 北村 正博 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 目的

歯周病は歯周組織における持続的な炎症とそれに伴う歯槽骨の吸収を特徴とする疾患であり、日常的な口腔清掃が困難であることが多い障害者においては、健常者と比較して歯周病の罹患率が高いことが知られている。これまでの研究により、いくつかの歯周病細菌のうち *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が最も強い歯周病原性を発揮すると考えられている。*P. gingivalis* の感染が上皮細胞などの様々な細胞の炎症応答を引き起こすことが多数報告されているが、歯周組織を構成する細胞のひとつである骨芽細胞の応答については、ほとんど知られていない。

本研究では、*P. gingivalis* を感染させた骨芽細胞およびストローマ細胞の遺伝子の発現変化を総括的に調べることを目的とした。*P. gingivalis* の主要な病原因子には、線毛、リポ多糖 (LPS)、プロテアーゼ活性をもつジンジパインなどが知られているが、ここでは特にジンジパインに着目して感染細胞の遺伝子応答の変化を解析した。

### 方法

#### (1) *P. gingivalis* 菌株と細胞

歯周病細菌 *P. gingivalis* として ATCC33277 (親株)、KDP136 (ジンジパイン欠損株) および KDP150 (線毛欠損株) を用いた。*P. gingivalis* を感染させる細胞は C57BL/6 マウス初代培養骨芽細胞およびマウスストローマ細胞 ST2 を用いた。

#### (2) *P. gingivalis* 感染細胞における遺伝子発現変化の網羅的な解析

*P. gingivalis* ATCC33277、KDP136 および KDP150 を感染させたストローマ細胞 ST2 から RNA を抽出し、マイクロアレイ法で約 2 万個の遺伝子の発現変化を解析した。

#### (3) *P. gingivalis* 感染細胞の炎症応答関連遺伝子の解析

方法(2)と同様に *P. gingivalis* 3 菌株を感染させた C57BL/6 マウス初代培養骨芽細胞およびストローマ細胞 ST2 から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法で遺伝子発現変化を測定した。ここでは、炎症応答に関連するケモカインとして CCL2、CCL5 および CXCL10 を、細胞外マトリックスを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) として MMP9 および MMP13 の遺伝子発現変化を解析した。

#### (4) *P. gingivalis* 感染により活性化されるシグナル伝達経路の解析

方法(2)と同様に *P. gingivalis* 3 菌株を感染させた細胞のタンパク質を抽出し、NF- $\kappa$ B の活性化、c-Jun のリン酸化などをウェスタンブロット法で解析した。

#### 結果

*P. gingivalis* ATCC33277 株をストローマ細胞 ST2 に感染させた際の遺伝子の発現変化をマイクロアレイ法で解析したところ、約 2 万個の遺伝子のうち、約 370 個の遺伝子発現が上昇していた。このうち、機能既知の遺伝子は約 180 個で、炎症応答関連遺伝子は約 30 個であった。これらの遺伝子の中で、CXCL10 や MMP13 は親株とジンジパイン欠損株の間で発現に相違がみられた。

さらに、炎症応答関連遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR 法で解析したところ、CXCL10 と MMP13 は、ジンジパイン欠損株の感染では明白に発現が低下していた。また、LPS 刺激による CXCL10 や MMP13 の遺伝子発現の誘導は弱かった。これとは対照的に、CCL5 や MMP9 は ATCC33277 株とジンジパイン欠損株感染のいずれも発現が促進され、LPS による発現促進も強く認められた。

これらの炎症応答のシグナル伝達経路を調べるためにウェスタンブロットを行ったところ、NF- $\kappa$ B の活性化と c-Jun のリン酸化が認められた。

#### 考察

以前は、骨芽細胞は免疫応答に無関係であると考えられていたが、最近の報告では、骨芽細胞がケモカイン産生などを通じて局所的な炎症応答に関与することが示唆されている。本研究の結果から、骨芽細胞およびストローマ細胞が *P. gingivalis* 感染に対して様々なケモカインや MMP などの炎症応答関連遺伝子の発現上昇を示すことが明らかになった。これらの遺伝子の発現変化を更に検討したところ、*P. gingivalis* 感染により発現の上昇する遺伝子のうち、CCL2、CCL5 や MMP9 には主に LPS が関与し、CXCL10 や MMP13 には LPS のみではなくジンジパインが関与していることが示唆された。また、本菌感染の際には NF- $\kappa$ B や c-Jun など複数のシグナル伝達経路が活性化され、炎症応答に関与していることが示された。

#### 結論

*P. gingivalis* をマウス骨芽細胞およびストローマ細胞に感染させると、ケモカインや MMP などの炎症応答関連遺伝子の発現が上昇した。これらの炎症応答には、本菌の LPS やジンジパインが関与しており、NF- $\kappa$ B や c-Jun など複数のシグナル伝達系路の活性化が誘導されていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* を感染させたマウスストローマ細胞の遺伝子発現の変化について、マイクロアレイ法を用いて網羅的に調べ、サイトカインやケモカインなど多彩な炎症応答関連の遺伝子発現が増強していることを明らかにしたものである。さらに、これらの遺伝子発現に影響を与える因子を調べたところ、リポ多糖の他にも本菌に特徴的なプロテアーゼであるジンジパインが関与することが明らかになった。以上のことから、本研究は歯周病の病態解明に重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の授与に値するものと認める。