

Title	Exit of intracellular Porphyromonas gingivalis from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway
Author(s)	竹内, 洋輝
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58423
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	たけうちひろき 竹内洋輝
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 24507 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	Exit of intracellular <i>Porphyromonas gingivalis</i> from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway (<i>Porphyromonas gingivalis</i> の歯肉上皮細胞からの脱出へのリサイクリング経路の関与)
論文審査委員	(主査) 教授 森崎市治郎 (副査) 教授 天野 敦雄 准教授 和田孝一郎 講師 仲野 和彦

論文内容の要旨

歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* は宿主細胞のエンドサイトーシス経路を利用し歯周細胞に侵入する。この細胞内侵入に伴う細胞障害は歯周病の慢性化に関与すると考えられているが、宿主細胞内に侵入した *P. gingivalis* の細胞内動態はよく知られていない。そこで申請者は歯肉上皮細胞に侵入後の *P. gingivalis* の動態について検討を加えた。

感染 1 時間後、歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* の約 70% が初期エンドソームのマーカーである FYVE と共局在を示し、その局在は経時的に減少した。感染 4 時間後には細胞内の *P. gingivalis* の約半数が LAMP1 (ライソソームマーカー) と共局在を示した。また、同じく感染 1 時間後、細胞内の *P. gingivalis* の約 70% はトランスフェリンレセプター (TfR) と共局在を示し、その局在は経時的に減少し、感染 6 時間後には約 35% と変化した。このことから、歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* はまず初期エンドソームに存在し、ライソソームで分解を受ける菌がいる一方、エンドサイトーシス経路へとソーティングされる菌がいる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* が歯肉上皮細胞に侵入した後、どのような細胞内動態を示すかを検討したものである。

その結果、1) 歯肉上皮細胞に侵入した細菌の一部は Rab11 と RalA が制御するリサイクリング経路を利用し細胞外へ脱出すること、2) 細菌の宿主細胞外への脱出にはアクチン・チューブリンの重合・脱重合、リビッドラフトが関与していること、3) 細菌を内含する輸送小胞と細胞膜との融合にはエキソシスト複合体の関与していることが明らかとなった。

この論文は、*P. gingivalis* の感染による歯周病の発症機序を理解する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位に十分値するものである。

次に、*P. gingivalis* を感染させた歯肉上皮細胞の培地に抗生剤を加え細胞外の *P. gingivalis* を殺菌した後、抗生剤を含まない培地に交換し、新たに培養液中に細胞内から脱出した生菌数を測定した結果、*P. gingivalis* の細胞外への脱出が確認された。加えて、ラトランキュリン A（アクチン骨格重合阻害剤）、ノコダゾール（微小管重合阻害剤）、メチル- β -サイクロデキストリン（コレステロール除去剤）で歯肉上皮細胞を処理すると、細胞培養液中の生菌数の減少が認められ、ラトランキュリン A では細胞内の生菌数の増加がみられた。

また、エンドソームから細胞膜へのリサイクリングを制御する Rab ファミリー GTPase である Rab11、およびアクチン細胞骨格系の再構成を制御する GTPase である RalA と *P. gingivalis* との共局在が観察された。Rab11 と RalA のドミナントネガティブ型（Rab11^{25N}, RalA^{27N}）と *P. gingivalis* との共局在を検討したところ、野生型と比較し、その共局率は減少した。さらに、Rab11 と RalA 遺伝子の RNAi ノックダウンにより、細菌の細胞培養液中への脱出の減少と細胞内の生菌数の増加がみられた。

さらに、リサイクリング小胞の細胞膜への繫留因子であるエキソシスト複合体の 1 つである Sec5, Sec6 および Exo84 遺伝子の RNAi ノックダウンを行ったところ、細胞培養液中の生菌数の減少、並びに細胞内の生菌数の増加がみられた。

これらの結果より、歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の一部は Rab11 と RalA が制御するリサイクリング経路を利用して細胞外へ脱出することが示された。この脱出にはアクチン・チューブリンの重合・脱重合、リビッドラフトが関与していることが示され、*P. gingivalis* を内含する輸送小胞と細胞膜との融合にはエキソシスト複合体が関与していることが示された。

本研究の結果、歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* は細胞内で分解を受けつつも一部は細胞外に脱出し、さらに近接細胞へ再侵入し、歯周組織の感染拡大を果たしていることが示唆された。