



Title	Porphyromonas gingivalis による免疫抑制の新たなメカニズムの解明
Author(s)	阿部, 翔太郎
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/91858">https://hdl.handle.net/11094/91858</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 阿 部 翔 大 郎 )	
論文題名	<i>Porphyromonas gingivalis</i> による免疫抑制の新たなメカニズムの解明
論文内容の要旨	
<p><b>【研究目的】</b></p> <p>インターフェロニンシグナルは、宿主細胞にとって細胞内に侵入してきた病原体を排除するのに極めて重要な感染防御機構である。特にマクロファージでは、インターフェロニンガンマ (IFN-<math>\gamma</math>) の作用によって約 2,000 にも及ぶ遺伝子の発現が誘導され、活性化することにより細胞内殺菌作用が増強される。一方、主要な歯周病原性細菌である <i>Porphyromonas gingivalis</i> は、細胞内に侵入することで宿主の免疫系を回避し、病態を進行・遷延化させている可能性が示唆されているものの、その細胞内生存戦略については不明な点が多い。そこで本研究では、根尖性および辺縁性歯周炎に対する新規の創薬・治療戦略の創成を念頭に、宿主のインターフェロニンシグナル応答と <i>P. gingivalis</i> 感染の相互作用について検討を加えた。</p> <p><b>【材料・方法】</b></p> <p>1. <i>P. gingivalis</i> 感染におけるマクロファージの遺伝子発現挙動の解析</p> <p><i>P. gingivalis</i> 感染がマクロファージに引き起こす遺伝子発現を包括的に把握するため、RNA-seq 解析を行った。宿主細胞としてヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を 100 nM PMA (Phorbol-12-myristate 13-acetate) で 2 日間処理し分化させたヒトマクロファージ様細胞を用いた。このマクロファージ様細胞を 20 ng/mL の IFN-<math>\gamma</math> で 24 時間作用させて活性化したサンプル、さらにその後 <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 株を感染させたサンプル、未処理サンプルから抽出したトータル RNA を RNA-seq 解析に供試し、遺伝子発現を比較した。</p> <p>2. 定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) による確認</p> <p>1. と同様の条件で IFN-<math>\gamma</math> 刺激および <i>P. gingivalis</i> 感染させたマクロファージ様細胞について、複数の IFN 誘導性遺伝子を標的とした RT-qPCR により確認実験を行った。また、他の細胞 (ヒト白血病細胞株 K562、歯肉上皮細胞株 TIGK、ヒト口腔由来上皮細胞株 Ca9-22、ヒト繊維肉腫細胞株 HT-1080)、および他の <i>P. gingivalis</i> 菌株 (W83、W50) を用いて同様の検証を行い、細胞種・菌株特異性の有無について検討を加えた。</p> <p>3. インターフェロニンシグナルの抑制に関わる細菌コンパートメントの同定</p> <p>Transwell (0.4 <math>\mu</math>m 孔) を利用した非接触共培養法を用いて、シグナル抑制が細菌-宿主細胞間の直接接触を必要とするのか、あるいは細菌由来の分泌性分子によるものなのかを確認した。さらに、PFA (Paraformaldehyde) 処理あるいは加熱処理 (70°C、30 分) した <i>P. gingivalis</i> について同様に感染実験を行い、菌体膜上タンパクの重要性についても検証を加えた。</p> <p>4. インターフェロニンシグナルの抑制に関わる細菌側病原因子の探索</p> <p><i>P. gingivalis</i> のシグナル抑制に重要な病原因子を探索するために、以下の実験を行った。</p> <p>1) <i>P. gingivalis</i> の遺伝子変異株の作製</p> <p>標的とする遺伝子の upstream と downstream に相同な配列でエリスロマイシン耐性遺伝子を挟み込んだ DNA 断片を、電気穿孔法により <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 株に導入し、相同組換えを用いた遺伝子欠損株を作製した。各遺伝子の欠損は RT-qPCR により確認した。</p>	

## 2) 免疫蛍光染色

*P. gingivalis* 感染させたTHP-1を4% PFA含有PBSを用いて10分間固定し、0.1%TritonX-100含有PBSにて5分間透過処理を行った。その後、1次抗体を37°Cで1時間作用させ、さらに2次抗体を同様に作用させた。スライドガラスにマウントし蛍光顕微鏡 (オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X800) を用いて観察した。*P. gingivalis* の染色には、あらかじめFITCにてラベルしたものを使用した。

## 3) CFU Assay

感染させた後のTHP-1をPBSで洗浄し、1mL RPMIに300 µg/mL ゲンタマイシン + 200 µg/mL メトロニダゾールを加えて37°C 5% CO<sub>2</sub> で1時間インキュベートした。次に再度PBSで洗浄し滅菌蒸留水を1mL加えて30分同様にインキュベートした。その後、血液寒天培地に播種して嫌気条件下で培養し、コロニーを計測することにより細胞内侵入細菌数を測定した。

### 【結果】

1. RNA-seq解析の結果、IFN- $\gamma$ により誘導される炎症関連遺伝子の多くが *P. gingivalis* 感染によって発現抑制されていた。
2. RT-qPCRにより、複数のIFN- $\gamma$ 誘導性遺伝子の発現が抑制されていることが確認され、シグナルのマスター転写因子であるSTAT1の発現も有意に阻害されていた。また、血球系細胞株や歯肉上皮細胞株においても同様の抑制効果が認められ、*P. gingivalis* の菌株による特異性も認められなかった。
3. Transwell および菌体変性処理を用いた検討の結果、*P. gingivalis* によるシグナルの抑制には宿主細胞との直接接触が必要であり、特に菌体膜上に存在する分子が重要であることが示唆された。
4. *P. gingivalis* の遺伝子変異株を用いた感染実験により、T9SSシステムおよびジンジパインが本菌による免疫抑制作用に重要な働きを示すことが明らかとなった。また、Kgp・RgpA・RgpBのすべてのジンジパインを欠損させた株でのみSTAT1の抑制効果が消失しており、この結果は活性化したSTAT1の核移行を標識した蛍光免疫染色でも確認された。さらに、ジンジパイン欠損株は細胞内への侵入能が低下していることが蛍光免疫染色およびCFUアッセイにより示された。

### 【考察・結論】

*P. gingivalis* はインターフェロンシグナルを抑制し、マクロファージの活性化を阻害することが明らかとなった。また、免疫細胞だけでなく歯肉上皮細胞においても *P. gingivalis* はインターフェロンシグナルを抑制しており、これにより宿主が持つ細胞内侵入病原体に対する排除機構を回避していることが示唆された。*P. gingivalis* によるインターフェロンシグナル抑制効果には、Kgp・RgpA・RgpBの全てのジンジパインが必要であることが明らかになった。これは、KgpとRgpの機能が相補的であること、そしてインターフェロンシグナル抑制にはジンジパインのプロテアーゼ活性が重要であることを意味している。また、ジンジパイン欠損株は細胞への侵入率が低下したため、ジンジパインのプロテアーゼが細胞侵入のための必須因子であることが示された。

以上より、*P. gingivalis* によるインターフェロンシグナルの抑制は、細胞内に侵入している *P. gingivalis* が引き起こしている可能性が高いことが示された。また、細胞への侵入にはジンジパインのプロテアーゼが必須因子であることが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 阿 部 翔 大 郎 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 林 美加子
	副 査	教授 天野 敦雄
	副 査	准教授 北村 正博
	副 査	講師 村上 旬平
<b>論文審査の結果の要旨</b>		
<p>本研究では、根尖性および辺縁性歯周炎に対する新規の創薬・治療戦略の創成を念頭に、宿主のインターフェロニングナル応答と <i>Porphyromonas gingivalis</i> (以下 <i>P. gingivalis</i>) 感染の相互作用について検討を加えた。その結果、<i>P. gingivalis</i> の宿主免疫抑制機構には、ジンジパインのプロテアーゼ活性および細胞内への侵入が必要不可欠であることが解明された。</p> <p>以上の研究成果は、<i>P. gingivalis</i> による宿主免疫抑制機構の解明において重要な知見を提供するものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。</p>		