

氏名	しも やま ゆう 下 山 佑
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第229号
学位授与の日付	平成19年3月13日
学位論文題目	<i>Porphyromonas gingivalis</i> LPSによるマウスB細胞の増殖反応にかかわる25 kDa チロシンリン酸化タンパク質の解析

論文内容の要旨

I. 研究目的

ヒトの歯周炎は *Porphyromonas gingivalis* をはじめとするグラム陰性の歯周病原性細菌により惹起されることが明らかにされている。しかし、歯周病原性細菌の直接的な作用というよりは、歯周病原性細菌のピルレンス因子と宿主側の防御機構/細胞との相互作用の結果、歯周炎が発症、進行するものと考えられている。ヒトの歯周炎の病巣歯肉組織の病理組織学的観察結果によれば、歯周病原性細菌の組織への直接的な侵入はまれで、B細胞優勢の炎症性細胞浸潤像が観察されることから、歯周炎の発症、進行にはグラム陰性菌の外膜に存在するLPS (lipopolysaccharide) がピルレンス因子として宿主防御機構を担う免疫担当細胞、特にB細胞の活性化反応に深く関与することが強く示唆される。

LPSは、B細胞およびマクロファージに対して、in vitro で増殖、分化を誘導し、それともなう炎症性サイトカインの産生を誘導するなど、多彩な免疫生物学活性を示すことが知られている。しかし、その活性化機構については、マクロファージについての解明は進んでいるが、LPSによるB細胞の活性化機構の詳細は依然不明な点が数多く残されている。

そこで本研究では、歯周炎の病理発症機序にかかわる *P. gingivalis* LPS のB細胞活性化機構の解明を目的として、*P. gingivalis* LPS 刺激により惹起される細胞増殖にともなう細胞内基質タンパク質のチロシンリン酸化反応、ならびにチロシンリン酸化細胞内基質タンパク質についての解析を行った。

II. 研究方法

P. gingivalis LPSは *P. gingivalis* 381株より精製した。B細胞はC3H/HeNマウスおよび腸内細菌由来LPSに低応答性のC3H/HeJマウスの脾臓より調製した。B細胞を *P. gingivalis* LPSで48時間刺激し、培養終了後の細胞数から細胞増殖活性を検討した。細胞内基質タンパク質のチロシンリン酸化反応の検討は、細胞溶解液で調整後、SDS-PAGEおよび二次元電気泳動後、抗チロシンリン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法により行った。*P. gingivalis* LPS刺激により特異的にチロシンリン酸化反応を示した基質タンパク質の同定は、飛行時間型質量分析、Peptide mass fingerprinting解析を用いて行った。同定されたタンパク質について、特異抗体を用いたウェスタンブロット法ならびにPDQuestを用いて検討を行った。

III. 研究成果

1. *P. gingivalis* LPS刺激によるB細胞の増殖反応において細胞内チロシンリン酸化反応が必須であることが明らかとなった。
2. *P. gingivalis* LPSは腸内細菌LPSに低応答性のC3H/HeJマウスB細胞に対しても細胞増殖活性を誘導することが明らかとなった。
3. *P. gingivalis* LPS刺激によりチロシンリン酸化が誘導される基質タンパク質としてRanが同定された。また、Ranは細胞増殖に伴って総量を増し、その際最も酸性側のRanの量が増すことが明らかとなった。

IV. 考察及び結論

歯周病原性細菌である *P. gingivalis* の LPS は TLR 4^{-/-} マウス B 細胞に対しても、強い細胞増殖活性を有することから、*P. gingivalis* LPS は TLR 4 とは異なるレセプターを介していることが示唆される。また、そのシグナル伝達系において、Ran のチロシンリン酸化反応と総量の増加、ならびに酸性側の Ran の増加が深く関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 木村重信 (口腔微生物学講座)

副査 教授 佐藤詔子 (口腔生化学講座)

副査 教授 加藤裕久 (歯科薬理学講座)

ヒトの歯周炎は、歯肉縁下プラーク中に存在する *Porphyromonas gingivalis* をはじめとする歯周病原性細菌の感染症であるが、その発症、進行には宿主の免疫担当細胞との相互作用が深く関わっていることが明らかにされている。歯周病原性細菌はグラム陰性菌であるためビルレンス因子としてリポ多糖 (LPS) を保有すること、歯周炎病巣歯肉組織中では B 細胞優勢の病理組織像を呈することを勘案すれば、特に、歯周病原性細菌の LPS による B 細胞活性化が歯周炎の発症、進行過程に重要な役割を演じている可能性が高い。しかし、LPS による B 細胞の活性化機構の詳細については依然不明な点が数多く残されている。本研究で著者は、ヒトの成人性 (慢性) 歯周炎の原因細菌である *P. gingivalis* の LPS を用いて、B 細胞の増殖反応にかかわる細胞内チロシンリン酸化反応の役割について検討し、チロシンリン酸化基質タンパク質の解析を行った。その結果、細胞内チロシンリン酸化反応が *P. gingivalis* LPS による B 細胞の増殖反応に必須であることを明らかにした。さらに、*P. gingivalis* LPS が TLR 4^{-/-} の C3H/HeJ B 細胞に対しても増殖活性を示したことから、*P. gingivalis* LPS 刺激による B 細胞の増殖反応では、これまでに単球/マクロファージで示されている LPS の TLR 4 を介するシグナル伝達経路とは異なるシグナル伝達経路が存在することを示唆した。さらに著者は、その経路に関与する B 細胞内リン酸化基質タンパク質の一つとして Ran があり、Ran 総量の変動および Ran のチロシンリン酸化の変動が *P. gingivalis* LPS による B 細胞の増殖反応に深く関与することを示唆した。

本研究は *P. gingivalis* のビルレンス因子である LPS による B 細胞の増殖反応とその細胞内シグナル伝達系の詳細について、細胞・分子レベルから詳細に解析したもので、得られた知見は歯周炎の病理発症機序の解明に寄与するばかりか、B 細胞の増殖活性にかかわる新たなシグナル伝達系の解明につながるものと期待されることから、学位に値するものと評価した。

試験・試問の結果の要旨

本研究の目的、概要について説明がなされ、研究結果および関連事項についての諮問を行った結果、的確な解答が得られた。また、今後の研究にも意欲を示すとともに後輩への指導能力も備えていることから、学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと判定した。