

岩手医科大学 学位審査報告

氏名 石河太知
 学位の種類 博士（歯学）
 学位授与番号 岩医大院歯博第248号
 学位授与の日付 平成22年3月4日
 学位論文題目 分泌型白血球プロテアーゼインヒビターによる歯肉上皮細胞の *Porphyromonas gingivalis* 感染制御

論文内容の要旨

I 研究目的

分泌型白血球プロテアーゼインヒビター (secretory leukocyte protease inhibitor : SLPI) は消化器, 呼吸器, 膣等の粘液中に存在し (Bergensfeldt ら; 1996), プロテアーゼ阻害活性 (Thompson ら; 1986), 抗ウイルス活性 (McNeely ら; 1995) および抗菌・抗真菌活性 (Hiemstra ら; 1996) を示すことから, 粘膜系での病原微生物に対する感染防御を担う自然免疫として機能する生体因子であることが示唆されている (Nakamura ら, 2003). 口腔においては, 唾液中に SLPI が含まれることは報告されているが, *Porphyromonas gingivalis* の LPS あるいは菌体と歯肉上皮細胞との相互作用について検討した報告はない. そこで本研究では, 歯肉上皮細胞における *P. gingivalis* 感染制御機構としての SLPI の役割を検討する目的で, 歯肉上皮細胞の SLPI 産生能, *P. gingivalis* 抗原による SLPI 産生誘導活性ならびに *P. gingivalis* のプロテアーゼに対する SLPI の阻害効果について検討した.

II 研究方法

歯肉上皮細胞としては, 口腔病理学講座 畠山節子博士より恵与を受けた株化マウス歯肉上皮細胞 (GE1) を用いた. *P. gingivalis* ATCC 33277 株の凍結乾燥全菌体より精製 LPS (Pg-LPS) を調製した. GE1 細胞の SLPI 産生能および Pg-LPS による SLPI 産生誘導活性は RT-PCR 法を用いて SLPI mRNA 発現から測定した. Pg-LPS による GE1 細胞からの炎症性サイトカインの産生誘導についても RT-PCR 法により検討した. *P. gingivalis* のプロテアーゼに対する SLPI の作用については, リコンビナント SLPI を用いて, *P. gingivalis* 培養上清プロテアーゼ画分の MCA ペプチド合成基質 (Z-His-Glu-Lys-MCA および Bz-Arg-MCA) に対する加水分解活性を指標に検討した.

III 研究成績

1. 培養時間を変えて GE1 細胞を培養したところ, 培養0日目から5日目までのいずれの GE1 細胞においても, 無刺激で SLPI mRNA の弱い発現を示し, 培養5日目までは有意の差は観察されなかった.
2. Pg-LPS 10 μ g/ml, *P. gingivalis* の全菌体 50 μ g/ml あるいは *Escherichia coli* の LPS 1 μ g/ml 刺激による SLPI mRNA の発現は無刺激と比べ優位に増強された. 同様に, 増殖反応も有意に誘導された.
3. Real-time RT-PCR においても Pg-LPS, *P. gingivalis* の全菌体あるいは *E. coli* の LPS 刺激による SLPI mRNA の発現が著明に増強した.
4. Pg-LPS, *P. gingivalis* の全菌体あるいは *E. coli* の LPS 刺激による SLPI mRNA の発現においても刺激後6時間から12時間で増強が認められた.
5. Pg-LPS, *P. gingivalis* の全菌体あるいは *E. coli* の LPS 刺激により炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF α および IL-6) の産生も誘導された. その発現のピークは刺激後12時間であった.
6. *P. gingivalis* のプロテアーゼに対する作用は, Bz-Arg-MCA を基質とした場合には阻害効果は認められな

かったが、Z-His-Glu-Lys-MCA を基質とした場合には強い阻害／抑制効果が認められた。

IV 考察及び結論

GE1 細胞は無刺激で SLPI mRNA の弱い発現を示したが、Pg-LPS 刺激によりその発現が著明に増強した。また、Pg-LPS 刺激により炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF α および IL-6) の産生も誘導された。しかし、炎症性サイトカインおよび SLPI の産生誘導がともに刺激後 6-12 時間で観察されたことから、Pg-LPS による GE1 細胞からの SLPI 産生誘導は産生されたサイトカイン (IL-6) による二次的なものではないことが強く示唆された。*P. gingivalis* のプロテアーゼに対する作用は、Bz-Arg-MCA を基質とした場合には阻害効果は認められなかったが、Z-His-Glu-Lys-MCA を基質とした場合には強い阻害／抑制効果が認められたことから、SLPI は *P. gingivalis* 主要プロテアーゼの一つである Lys-gingipain に対して強い抑制効果を示すことが示唆された。以上の成績より、歯肉上皮細胞は無刺激で SLPI を産生しているものの、*P. gingivalis* の付着／刺激により反応性に増強されることが明らかとなった。また、SLPI は、*P. gingivalis* の病原特異性を担うビルレンス因子の一つである Lys-gingipain に対する抑制効果を示したことから、歯肉上皮細胞の自然免疫による *P. gingivalis* 感染制御機構に重要な役割を演じていることが強く示唆された。

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 (口腔病因病態制御学講座 口腔微生物学免疫学分野)

副査 教授 國松和司 (口腔機能保存学講座 歯周病学分野)

副査 教授 石崎明 (口腔機能構造学講座 口腔生化学遺伝学分野)

分泌型白血球プロテアーゼインヒビター (SLPI) はプロテアーゼ阻害活性のみならず、抗ウイルス活性や抗菌・抗真菌活性を示し、口腔を含む粘膜系での病原微生物に対する感染防御を担う自然免疫として機能することが示唆されているが、歯肉溝／歯周ポケットにおける宿主自然免疫としての役割について検討した報告はない。本研究で著者は、歯肉溝上皮細胞の分化形質を保持した株化歯肉上皮細胞である GE1 細胞を用いて歯肉上皮細胞の SLPI 産生能、ならびに慢性歯周炎の原因細菌である、*P. gingivalis* の抗原 (LPS および全菌体抗原) との相互作用について検討を行った。さらに本研究で著者は、*P. gingivalis* の産生する主要プロテアーゼである 2 種類の gingipains (Arg-gingipain および Lys-gingipain) に対する SLPI の抑制効果についても検討を行った。その結果、GE1 細胞は SLPI mRNA を発現しており、*P. gingivalis* の抗原刺激によりその発現が増強したことから、歯肉上皮細胞は SLPI 産生細胞として機能していること、また、*P. gingivalis* 感染による抗原刺激を通して SLPI 産生が増強されることを強く示唆する結果を得た。さらに、Lys-gingipain に対する直接的な阻害活性を有することを明らかにし、SLPI が直接的に *P. gingivalis* の主要病原因子に対して抑制的に働くことを示した。

本研究結果は、歯肉上皮細胞の SLPI 産生能を明らかにするとともに、歯肉上皮細胞からの SLPI 産生が *P. gingivalis* の感染刺激を通して増強されることを示唆するもので、SLPI の *P. gingivalis* の病原プロテアーゼに対する直接的な阻害活性とともに、歯肉溝での *P. gingivalis* 感染に対する自然免疫として機能している可能性を強く示唆する初めての報告である。その成果は歯周病の病理発症機序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試問を行った結果、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幅広い経験と知識を有し後進への指導能力も備えているものと思われることから、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。