

## 論文の内容の要旨

氏名：渡辺典久

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Epstein-Barr virus LMP1 induces IL-8 production via regulation of the NF- $\kappa$ B pathway in human gingival epithelial cells  
(EBV LMP1 は NF- $\kappa$ B の活性化を介して歯肉上皮細胞からの IL-8 産生を誘導する)

歯周病は歯肉の炎症と歯槽骨の吸収を特徴とする慢性の炎症性疾患で、30歳以上の約8割が罹患している。歯を喪失する最も大きな要因となるだけでなく、誤嚥性肺炎などの呼吸器疾患、糖尿病および低体重児出産など様々な全身疾患の誘因となることも解ってきた。したがって、歯周病予防は口腔の健康のみならず、全身の健康維持にも重要なと考え方が広まっている。しかし、歯周病の病因論は未だ確立されていない。

これまでの研究から、*Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* などの嫌気性菌が歯周病の主な原因菌であることが知られている。しかし、これらの細菌がどのように歯周病の発症に関与しているのかは、現在でも明確に説明することは難しい。最近の研究では、歯周ポケットから検出される *P. gingivalis* や *F. nucleatum* の数が、患者と健常者において差がなかったとする報告に加え、*P. gingivalis* 等が患部から検出されなかったとする症例も報告されている。したがって近年では、歯周病の発症に細菌の関与は必須であるものの、主な原因は宿主側にあり、特に免疫機能の低下が重要な因子であるとの考えが広く認識されるようになった。そこで、宿主細胞内に寄生し感染局所や全身の免疫能低下を誘導するウイルス、特に Epstein-Barr virus (EBV) と歯周病発症に関する興味深い臨床研究データが世界各国から蓄積されている。これまでに、*P. gingivalis* や *F. nucleatum* が、エピジェネティック制御を通じて EBV の再活性化を誘導すること、歯周病患者の歯周ポケットや唾液中の EBV 検出率と歯周病の重症度とに相関があることが多数報告されている。さらに、EBV が歯肉上皮細胞にも感染していること、感染歯肉上皮細胞には EBV による癌化や炎症反応において重要な役割を担う Latent membrane protein 1 (LMP1) が発現していることが最近報告された。しかし、EBV がどのように歯周病の発症と進行に関与しているかは不明である。

そこで本研究では、EBV LMP1 が歯肉上皮細胞より炎症性サイトカインを誘導することで、歯周病の発症に関与しているのではないかと推察し実験を行った。

実験は、歯肉上皮細胞株 Ca9-22 細胞に、LMP1 の発現ベクターもしくはコントロールベクターを導入した。LMP1 の変異体として TNF receptor-associated factor (TRAF) 結合部位を欠損させた LMP1 $\Delta$ 187-351 と TNF receptor-associated death domain (TRADD) 結合部位を欠損させた LMP1 $\Delta$ 349-386 を使用した。培養上清と細胞抽出液を回収し、IL-8 の量は ELISA 法にて、遺伝子発現は real-time PCR 法にて定量した。転写因子 Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) の関与を調べるために、転写活性化はルシフェラーゼアッセイにより、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解および NF- $\kappa$ B p65 のリン酸化は、各々の抗体を用いた Western blotting 法により調べた。さらに、優勢変異型 I $\kappa$ B $\alpha$  ベクター：I $\kappa$ B $\alpha$ DN を細胞に導入し検討した。

はじめに、Ca9-22 細胞において、LMP1 が IL-8 の発現と産生を誘導するか否かを調べた。その結果、LMP1 発現ベクターの導入時間および導入量依存的に IL-8 の遺伝子発現と蛋白の産生を強く誘導した。また、LMP1 は TNF- $\alpha$  と IL-6 の遺伝子発現も導入量依存的に誘導した。IL-8 をはじめとする炎症性サイトカインの発現には NF- $\kappa$ B が深く関与することが知られている。そこで、LMP1 による IL-8 発現誘導機構における NF- $\kappa$ B の関与を検討した。NF- $\kappa$ B p65/p50 は通常、細胞質内で抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$  と結合した状態で存在し活性が抑えられている。外部刺激により I $\kappa$ B $\alpha$  が分解された後、p65 はリン酸化され p50 と共に核内に移行する。核移行した p65/p50 が遺伝子プロモーターに結合した結果、炎症性サイトカインの発現が誘導される。はじめに、Ca9-22 細胞において、LMP1 が NF- $\kappa$ B を活性化するか否かを検討した結果、LMP1 は I $\kappa$ B $\alpha$  の分解と p65 のリン酸化を誘導した。また、LMP1 は転写レベルで

NF- $\kappa$ B を活性化することがルシフェラーゼアッセイの結果から明らかとなった。次に、Ca9-22 細胞において実際に NF- $\kappa$ B が LMP1 誘導性の IL-8 産生に関与しているか否かを、I $\kappa$ B $\alpha$ DN を用いて検討した。その結果、I $\kappa$ B $\alpha$ DN は導入量依存的に LMP1 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化を抑制すると共に、IL-8 蛋白産生を抑制した。

さらに、LMP1 による NF- $\kappa$ B の活性化と IL-8 の発現誘導において、LMP1 のどの部位が関与しているのかを調べた。LMP1 は、NF- $\kappa$ B の活性化において重要なアダプター分子である TRAF と TRADD に直接結合出来ることが報告されている。そこで、LMP1 の TRAF および TRADD 結合領域をそれぞれ欠損させた変異型 LMP1 ベクターを Ca9-22 細胞に導入し、NF- $\kappa$ B の活性化と IL-8 蛋白産生を検討した。その結果、TRAF 結合領域欠損型 LMP1 : LMP1 $\Delta$ 187-351 では、wild type の LMP1 と比較して、NF- $\kappa$ B の活性化が約 7 割、IL-8 産生が約 3 割減少した。興味深いことに、TRADD 領域変異型 LMP1 : LMP1 $\Delta$ 349-386 の導入においては、NF- $\kappa$ B の活性化と IL-8 産生ともにほとんど誘導されないことが解った。

以上の結果より、LMP1 は NF- $\kappa$ B の活性化を介し歯肉上皮細胞より IL-8 の産生を強く誘導することが明らかとなった。またその作用には LMP1 の TRAF および TRADD 結合領域が関与しており、特に TRADD は LMP1 に NF- $\kappa$ B の活性化と IL-8 産生に必須であることが示唆された。

歯周病の進行に伴い患者の歯周ポケット内には IL-8 等の炎症性サイトカインが上昇することが報告されている。炎症性サイトカインは、破骨細胞の分化を促進し骨吸収にも深く関与する。本研究から EBV の LMP1 が歯肉上皮細胞において炎症性サイトカインを強く誘導することが明らかとなり、これまで細菌感染のみでは説明が困難であった歯周病発症機序の解明に繋がる可能性が示唆された。