

論文の内容の要旨

氏名：市川 一 國

博士の専門分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The effect of *Porphyromonas gingivalis* augmented invasion by TNF- α on gingival fibroblasts derived from Down syndrome

(TNF- α によって侵入が増大した *Porphyromonas gingivalis* の Down 症候群由来歯肉線維芽細胞への影響)

21 番染色体のトリソミーに起因する遺伝性疾患である Down 症候群 (DS) の歯周病は早期発症で急速に進行しやすいことが知られ、その原因の一つに免疫応答異常が挙げられる。我々は現在までに、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の Lipopolysaccharide (LPS) で Down 症候群由来歯肉線維芽細胞 (DGF) を刺激すると、健常者由来歯肉線維芽細胞 (NGF) よりも炎症関連物質の遺伝子発現およびタンパク産生量が増大することを報告している。しかしながら、DS における歯周病の易感染・発症のメカニズムについて未だ不明な点が多い。グラム陰性桿菌である *P. gingivalis* は歯肉上皮細胞 (hGE) や歯肉線維芽細胞 (hGF) に侵入することが知られているが、hGE においては、炎症関連物質である tumor necrosis factor (TNF) - α によってその侵入が増大されるとの報告がある。また TNF- α の発現は健常者と比較し DS で上昇しているとの報告がある。そこで我々は、DGF においても同様に、*P. gingivalis* の DGF 細胞内への侵入を TNF- α が増大させると共に、その影響は NGF よりも大きいのではないかと仮説を立て検証した。本実験は日本大学研究倫理委員会の承認（倫理審査承認番号：EC16-15-011-1）を得て遂行した。

患者の残余検体から得られた DGF および NGF を培養後、リコンビナント TNF- α (rTNF- α) を添加し、3 時間前処置を行った。その後 *P. gingivalis* を添加し、一定時間経過後に抗生薬により線維芽細胞に付着している *P. gingivalis* を殺菌し、細胞内へ侵入した細菌数のみを血液寒天培地上にて colony forming unit (CFU) を算出した。また、本実験系における DGF と NGF の細胞応答の相違を探った；① 遺伝子発現に関しては、炎症応答の指標である interleukin-6 (IL-6) および intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) について調査した。② TNF- α 受容体 (TNFR) I および II の発現量の比較を Western blotting 法を用いて行った。③ 細胞内シグナル伝達系への影響として p65 nuclear factor- κ B (NF- κ B) と extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化量を Western-blotting で確認した。すべて得られたデータは二元配置分散分析後、Tukey-Kramer test を用い有意水準 5% で統計処理を行った。

P. gingivalis の線維芽細胞内への侵入実験では、rTNF- α 添加によって DGF および NGF 共に *P. gingivalis* 侵入数は有意に増大した。さらに rTNF- α の添加の有無に係わらず、DGF が NGF よりも侵入数は有意に増大した。NGF での IL-6 遺伝子発現は、コントロール群 (rTNF- α , *P. gingivalis* 共に無添加群) と比較し rTNF- α 添加の有無に関わらず *P. gingivalis* 添加群の方が有意に高かった。一方、DGF では、コントロール群と rTNF- α 非存在下での *P. gingivalis* 添加群では有意差を認めず、rTNF- α 存在下での *P. gingivalis* 添加群では有意に高い結果となった。また、この IL-6 遺伝子発現は、*P. gingivalis* 添加 1.5 および 4 時間後の rTNF- α 前処理 DGF の方が同処理した NGF よりも有意に高かった。ICAM-1 遺伝子発現に関しては、コントロール群においても、DGF が NGF より有意に高かった。また、両線維芽細胞は共に、rTNF- α による前処理いかんに関わらず、*P. gingivalis* 添加群の方がコントロール群と比較し有意に高く発現し、同時にいずれも NGF よりも DGF の方が有意に高かった。TNFR I のタンパク発現量は、NGF は *P. gingivalis* 添加での rTNF- α 前処理の有無による有意差を認めなかったが、DGF においては rTNF- α 前処理により有意に増大した。一方 TNFR II については、両細胞共に rTNF- α 前処理の有無で有意差は認めなかった。p65 NF- κ B のリン酸化における *P. gingivalis* 添加の影響は rTNF- α 処理で両細胞共に有意に増大した。加えて、DGF の方が、rTNF- α 処理いかんに関わらず *P. gingivalis* 添加による p65 NF- κ B のリン酸化が NGF よりも高く現れた。また、*P. gingivalis* 添加による ERK1/2 のリン酸化は、NGF においては rTNF- α 処理の有無で有意差を認めなかったが、DGF では、rTNF- α 処理で有意に増大した。

P. gingivalis はエンドソームにより細胞内に侵入するが、DS では外的分子の取り込み、分解、再利用の過程であるエンドソーム、リソソーム、オートファジーにおける機能異常が報告されていることから、*P. gingivalis* の宿主細胞内への侵入が誘発されやすい可能性が考えられた。また、IL-6 遺伝子発現が DGF において *P. gingivalis* により誘発されないことから、生菌に対する DGF の応答性は低い事が考えられた。

ICAM-1 はウイルスや細菌の細胞内への侵入を助ける細胞間接着因子として知られており、DGF では恒常的に高く発現していることから、DGF において *P. gingivalis* の細胞内侵入を助けている可能性もあると推測された。さらに、p65 NF- κ B と ERK1/2 のリン酸化は、*P. gingivalis* を添加した rTNF- α 前処理後の DGF の方が同様の NGF に比べて顕著に高く確認されたことから、これらの因子が DGF での IL-6 や ICAM-1 遺伝子の発現増大に関与している可能性があると考えられた。21 番染色体上に存在し、DS の発症因子の 1 つである dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A は ERK を含めた MAPK のシグナルを強めることが知られており、本研究におけるリン酸化の増大に関連する異常な遺伝的背景の一因であるかも知れない。

以上の結果から、Down 症候群に認められる重篤な歯周炎の一因は、異常な遺伝的背景に起因すると思われる線維芽細胞での rTNF- α 発現上昇による *P. gingivalis* の細胞内侵入の増大や、それに伴う細胞内 IL-6 および ICAM-1 遺伝子発現の増大により、TNFR の発現パターンの異常や一部のリン酸化反応の異常な発現が関与する可能性が示唆された。