

論文の内容の要旨

氏名：高橋 佑 和

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：*Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbria induces both IL-6 and IL-8 production by human bronchial epithelial cells via Toll-like receptor 2

(*Porphyromonas gingivalis* Mfa1 線毛は Toll-like receptor 2 を介して気管支上皮細胞からの IL-6 と 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7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、及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わかってきた。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との考え方が広まっている。特に歯周病と肺炎との関連を示す臨床研究は多く報告されており、4 mm以上の歯周ポケットが10歯以上ある人は、歯周ポケットが正常な人に比べ、肺炎により死亡する危険性が約4倍高いことなどが示されている。一方、口腔健康管理が肺炎予防に有効であることもわかり、周術期や高齢者施設等において肺炎予防を目的とした口腔衛生管理と口腔機能管理が積極的に行われている。しかし、歯周病がどのように肺炎の発症や増悪に関与しているかは良くわかっていない。

歯周病の発症と進展には、バイオフィルムに生息する口腔細菌が複合的に関与している。中でもグラム陰性嫌気性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* は最も重要な歯周病原菌であり、線毛、ジンジパイン、及びリポ多糖(LPS)など様々な病原因子を有する。*P. gingivalis* の線毛は、遺伝子の違いから FimA 線毛と Mfa1 線毛とが存在することが知られている。FimA 線毛は long あるいは major fimbriae と呼ばれている線毛で、*fimA* 遺伝子の塩基配列の違いにより I～V型及びI型の亜型としてのI b型が存在する。一方、Mfa1 線毛は short あるいは minor fimbriae と呼ばれる線毛で、*mfa* 遺伝子がコードする Mfa1, Mfa2, Mfa3, Mfa4 及び Mfa5 蛋白質により構成される。FimA 線毛に関しては多くの研究成果が発表されており、歯周組織への定着と侵入やバイオフィルム形成において重要な役割を担っていることがわかっている。しかし、Mfa1 線毛に関する研究は近年始まったばかりで、その構造に関する報告がほとんどで宿主に対する作用は不明である。最近 Mfa1 が、マウスの口腔細胞においてケモカイン CXCL-1 の遺伝子発現を誘導するとの報告がなされ、Mfa1 が炎症に関与する可能性が指摘された。

そこで本研究では、歯周病原菌が肺炎を惹起するメカニズムのひとつとして、Mfa1 が肺炎において中心的役割を担う炎症性サイトカインを誘導するのではないかと推察し、ヒト気管支上皮細胞を用いて実験を行った。また、Mfa1 が作用する受容体についても併せて検討した。

Mfa1 は、*P. gingivalis* (ATCC33277 株)を破砕することにより線毛を離脱させ、線毛を含む上清を超遠心にかけて後、可溶性成分をイオンクロマトグラフィーにかけることにより精製した。ヒト気管支上皮細胞(BEAS-2B細胞)への作用は、既存の *P. gingivalis* 病原因子(LPS と FimA)とともに、種々の濃度の Mfa1 を添加した後、細胞抽出液と培養上清を回収し、IL-6 と IL-8 の遺伝子発現は real-time PCR 法にて、蛋白質産生は ELISA 法にて定量した。Mfa1 と Toll 様受容体(Toll-like receptor: TLR)との蛋白質相互作用を調べるために、Mfa1 と TLR2 及び TLR4 の結晶構造を Protein Data Bank から入手し、コンピューター上で分子結合をシミュレーションすることで、両者が結合する可能性とその部位について検討した。次に、実際の細胞上で Mfa1 が TLR に作用するか否かを調べるために、TLR が発現していないヒト胎児由来腎細胞(HEK293細胞)に TLR2 もしくは TLR4 をそれぞれ安定的に強制発現させた 293-TLR2 細胞と 293-TLR4 細胞を準備した。本細胞に、炎症性サイトカイン産生において重要な役割を担う転写因子 NF- κ B のプロモーターをトランスフェクションした後、Luciferase assay を行うことにより Mfa1 が TLR に作用するか否かを検討した。さらに、Mfa1 刺激前に BEAS-2B 細胞を TLR2 もしくは TLR4 の中和抗体で前処理することで、Mfa1 誘導性 IL-6 と IL-8 産生における TLR の関与を確認した。

実験の結果、高濃度の LPS もしくは FimA で BEAS-2B 細胞を刺激しても、IL-6 と IL-8 の遺伝子発

現は認められなかったが、Mfa1 は両炎症性サイトカインの遺伝子発現と蛋白質産生を強く誘導した。Mfa1 添加後、1 時間で IL-6 と IL-8 の遺伝子発現が認められ、その作用は Mfa1 の濃度依存的であった。次に、コンピューター上で Mfa1 と TLR2 もしくは TLR4 との蛋白質複合体の立体構造を解析した結果、Mfa1 は TLR2 と TLR4 の両方とそれぞれ結合する可能性があること、その結合に Mfa1 のプロリンリッチドメインが深く関与していることが推察された。そこで実際の細胞上で Mfa1 が TLR2 と TLR4 のどちらに作用するのかを 293-TLR2 細胞と 293-TLR4 細胞を用いて検討した。その結果、Mfa1 は TLR2 のリガンドであるリポタイコ酸同様、293-TLR2 細胞においてのみ濃度依存的に NF- κ B を活性化した。さらに、BEAS-2B 細胞において Mfa1 誘導性の IL-6 と IL-8 産生は、TLR2 の中和抗体により濃度依存的に抑制されたが、TLR4 中和抗体においては全く抑制が認められなかった。

以上の結果から、*P. gingivalis* Mfa1 は気管支上皮細胞において、IL-6 と IL-8 の産生を強く誘導すること、その際 TLR2 に結合することが明らかとなった。TLR4 への結合に関しては、Mfa1 がアダプター分子である MD2 と競合拮抗する可能性が示唆された。したがって、本研究から Mfa1 が気管支上皮細胞の TLR2 を介して炎症性サイトカインを誘導することにより、肺炎の発症と進展に深く関与していることが示唆された。