

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

高柳結平

論文題目

*Porphyromonas gingivalis* 由来 Mfa1 線毛のマウス歯  
肉線維芽細胞に対する免疫調節能および代謝調節能  
に関する研究

## I. 緒言

歯周炎は歯周病原細菌による慢性炎症性疾患であり、複数の細菌が原因となっている。その中で、*P. gingivalis*(*P. g.*)は主要な病原体である。*P. g.*は、lipopolysaccharides (LPS)、gingipines、fimbriae (線毛) を含む多くの病原性因子を保有あるいは分泌する。

*P. g.*の表面にある線維状構造物である線毛は、他の細菌や宿主組織との結合により、コロニー化に重要な役割を果たす。*P. g.* ATCC 33277 株は、FimA 線毛と Mfa1 線毛の2種類の線毛を有している。Mfa1 線毛はサブユニットタンパク質であり、主要な Mfa1 タンパク質に加えて、関連する Mfa2-5 タンパク質も存在する。Mfa2 はアンカーの役割を果たし、Mfa3 は *in vitro* で Mfa1/2/4/5 と結合し、結合タンパク質として他の線毛のサブユニットと結合する。これまでの研究で、FimA 線毛と Mfa1 線毛では、役割が異なることが示されている。FimA 線毛は歯周組織でのコロニー化と宿主細胞への侵入を媒介する主要な接着因子であり、様々な経路で歯周組織の炎症を誘導する。一方、Mfa1 線毛欠損株を用いた経口感染歯周炎モデルでは、歯槽骨吸収をほとんど起こさないことが示されているものの、Mfa1 線毛を用いた宿主免疫応答に関する研究報告はほとんどない。

本研究の目的は、*P. g.* Mfa1 線毛刺激がマウス歯肉線維芽細胞 (MGF) の免疫・代謝機構に及ぼす影響を検討することである。

## II. 材料および方法

## 1. Mfa1 線毛の精製

Mfa1 線毛は Hasegawa らの報告に従い精製し、JI-1 として以下の実験に使用した。また、Mfa5 が *ermF-B* によって破壊された Mfa5 変異体 (FMFA5) 株および遺伝子相補体 (FMFA5C) 株からも同様に線毛を精製し、それぞれ FMFA5 および FMFA5C として実験に使用した。

## 2. 細胞培養、刺激方法

MGF 細胞は、マウスの口蓋歯肉組織から採取した。細胞がコンフルエントに達した時点で、*P. g.* の各種線毛 (JI-1、FMFA5、FMFA5C、FimA) および LPS の存在下 (各刺激濃度 1  $\mu\text{g/ml}$ ) または非存在下で 2 時間培養した後、各実験に用いた。

## 3. PCR Array

回収した MGF 細胞より total RNA を抽出し、Antibacterial Response および Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT<sup>2</sup>Profile PCR Array を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。

## 4. Real-time quantitative PCR (qPCR)

回収した MGF 細胞より total RNA を抽出し、18S rRNA、Cxcl1、Cxcl3、IL-6、Icam1、Sele、TLR2、TLR4 のプライマー・プローブを用いた qPCR 分析による各種 mRNA 発現を検討した。

## 5. RNA 干渉 (SiRNA)

TLR2、TLR4 または control siRNA を MGF 細胞に作用させ、形質導入後、各

種因子の発現を qPCR にて解析した。

## 6. フローサイトメトリー

RNA 干渉によるノックダウンを確認するため、TLR2、TLR4 または control SiRNA を作用させた MGF 細胞に対して抗 CD282 phycoerythrin (PE)、抗 CD284 PE、および isotype control 抗体にて染色を施し、フローサイトメーターにて表面抗原の発現解析を行った。

## 7. 統計学的解析

各群の有意差の検定には、one-way ANOVA と Bonferroni multiple comparison test を用い、危険率は  $p < 0.05$  をもって有意とした。

## III. 結 果

### 1. Mfa1 線毛に対する Antibacterial Response PCR Array を用いた網羅的解析

MGF 細胞を各種刺激因子にて 2 時間刺激を行い、PCR Array 解析を行ったところ、Cxcl1 と Cxcl3 の mRNA 発現は、無刺激に比べ JI-1 で 4 倍以上の上昇を認めた。さらに、FimA では、無刺激に比べて Cxcl3 を含む多くの mRNA 発現上昇を認めた。一方、LPS では、無刺激と比較して顕著な変化は認められなかった。

### 2. 変異株由来 Mfa1 線毛刺激による CXCL1、CXCL3 および IL-6 遺伝子発現

MGF 細胞を各種刺激因子にて 2 時間刺激を行い、qPCR を用いて定量的解析

を行ったところ、JI-1 は FimA に比べて、Cxcl1 と IL-6 の mRNA 発現上昇が有意に高いことを認めた。さらに、FMFA5 では、Cxcl1、Cxcl3、IL-6 のいずれにおいても最も顕著な mRNA 発現上昇を認めた。

### 3. Mfa1 線毛に対する Extracellular Matrix & Adhesion Molecules PCR Array を用いた網羅的解析

MGF 細胞を各種刺激因子にて 2 時間刺激を行い、PCR Array 解析を行ったところ、Icam1 mRNA 発現は、無刺激に比べ FMFA5 で 4 倍以上の上昇を認めた。また、FMFA5C では ICAM-1 と Sele の顕著な遺伝子発現上昇を認めた。一方、JI-1、FimA、LPS では、無刺激と比較して顕著な変化は認められなかった。

### 4. 変異株由来 Mfa1 線毛刺激による ICAM-1、SELE 遺伝子発現

MGF 細胞を各種刺激因子にて 2 時間刺激を行い、qPCR を用いて定量的解析を行ったところ、Icam1、Sele の遺伝子発現は、FimA よりも JI-1 の方が高い傾向であった。さらに、FMFA5 において Icam1 と Sele の遺伝子発現の最も顕著な上昇を認めた。

### 5. 変異株由来 Mfa1 線毛刺激が TLR2/4 遺伝子発現に与える影響

MGF 細胞を各種刺激因子にて 2 時間刺激を行い、qPCR を用いて定量的解析を行ったところ、TLR2 は CXCL1 など今回検討した他の遺伝子発現と同様の発現変動パターンを認めたが、TLR4 は様々な刺激因子に対して有意な遺伝子発現変動を認めなかった。

### 6. TLR2, TLR4 siRNA の MGF 細胞への形質導入

TLR2 または TLR4 siRNA を形質導入した MGF 細胞は、コントロール SiRNA を形質導入した細胞と比較して、それぞれ TLR2, TLR4 mRNA の明らかな発現抑制を確認した。また、フローサイトメトリーにより、細胞表面 TLR2 または TLR4 の発現は、コントロールと比較して減少していることが確認された。

#### 7. TLR2, TLR4 ノックダウンした MGF 細胞の Mfa1 線毛に対する反応性

TLR2 または TLR4 siRNA を形質導入した MGF 細胞を各種刺激因子にて 2 時間刺激を行ったところ、各刺激において Cxcl1、Cxcl3 および Icam1、Sele の遺伝子発現上昇は、TLR4 をノックダウンすることで著しく抑制されていた。一方、TLR2 のノックダウンは、各刺激による遺伝子発現上昇を部分的に抑制したのみであった。

#### IV. 考 察

本研究で歯肉結合組織を構成する MGF 細胞に対する Mfa1 線毛の影響を調べたところ、好中球走化性因子である Cxcl1, Cxcl3 および炎症性サイトカインである IL-6 の mRNA 発現について JI-1 由来 Mfa1 線毛刺激の方が FimA 線毛刺激よりも強く亢進していた。これらのことから、Mfa1 線毛の免疫調節能は、FimA 線毛の免疫調節能を一部上回っている可能性が考えられる。次に、Mfa1 線毛の免疫調節能は線毛構造のどの部分が重要なのかを調べるために、JI-1 の先端 Mfa3-5 構造を除去した FMFA5 と、先端 Mfa3-5 構造を補完した FMFA5C を併せて用いて、免疫調節の誘導能を比較した。その結果、JI-1 と比較して FMFA5 では Cxcl1, Cxcl3, IL-6 の mRNA 発現が著しく上昇し、

FMFA5C では有意に減弱していた。さらに細胞接着因子である Icam1、Sele も同様の結果が得られた。これらの結果から、Mfa1 線毛による免疫調節能および細胞接着因子の制御は、シャフト部分の Mfa1 分子に大きく影響される可能性が示唆された。

本研究において、各種線毛または LPS で刺激した MGF 細胞における TLR2 と TLR4 遺伝子の発現を調べたところ、TLR2 は Cxcl1 など今回検討した他の遺伝子発現と同様の発現変動パターンを示したが、TLR4 は各種線毛や LPS に対して有意な遺伝子発現変動を示さなかった。さらに、TLR2 または TLR4 をノックダウンした MGF 細胞を用いた検討では、Mfa1 線毛による Cxcl1、Cxcl3、Icam1、Sele mRNA 発現亢進が、TLR4 をノックダウンするとほぼ消失していた。また、TLR2 をノックダウンした場合も、これらの発現亢進は部分的に減衰していた。このことから、Mfa1 線毛による細胞遊走や細胞接着に関連する遺伝子の発現には、TLR4 による認識が必須であることが示唆された。

## V. まとめ

Mfa1 線毛は歯周組織を構成する歯肉線維芽細胞の免疫調節能に大きな影響を与えることが明らかになった。さらに、Mfa1 線毛による好中球走化性因子や接着因子の遺伝子発現の誘導には、TLR4 による認識が必須であることが示唆された。歯周炎の進行における Mfa1 線毛の免疫調節能を解明するためには、今後、動物感染モデルを用いた解析など、より詳細な解析が必要である。

(論文内容の要旨)

No. 7

愛知学院大学