

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

乙 第 号	論文提出者 高柳 結平
論文題目 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 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。

Socransky らは、*Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola* が歯周炎の発症・進行の主な原因であることを示し、これら3つの細菌を「レッドコンプレックス」と呼ぶことを提唱している。この3菌種のうち、*P. gingivalis* は歯周炎に関連する主要な病原体である。*P. gingivalis* は、健常者よりも歯周病患者の罹患部位に多く存在することが証明されている。また、プラークサンプル中の *P. gingivalis* の菌数は、プラークスコアや臨床的付着レベルと関連する。一方、口腔内細菌叢の観点から、*P. gingivalis* は口腔バイオフィルムのディスバイオーシス(口腔内細菌叢の変化)を引き起こす重要な病原体として作用し、病的な骨破壊を引き起こす原因となると考えられている。*P. gingivalis* は、lipopolysaccharides(LPS)、gingipines、fimbriae を含む多くの病原性因子を発現している。

P. gingivalis の表面にある糸状のタンパク質性付属物である fimbriae 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. gingivalis* の病原性因子である *P. gingivalis* ATCC 33277 株は、FimA 線毛(FimA 遺伝子産物)と Mfa1 線毛(Mfa1 遺伝子産物)の2種類の fimbria を有し、それぞれの分子量は約 38kDa と約 75kDa である。Mfa1 線毛は、FimA 遺伝子を欠損した *P. gingivalis* 変異株(JI-1 株)において、2番目として発見された。Mfa1 線毛はサブユニットタンパク質であり、mfa1 遺伝子によってコードされており、その長さは 60~500nm である。成熟した線毛には、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。また、近年、Mfa3 ではなく Mfa1 の C 末端ドメインが、線毛タンパク質の凝集と成熟に影響を与えると報告された。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プロセスを誘導する。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. gingivalis* Mfa1 線毛刺激がマウス歯肉線維芽細胞の免疫・代謝機構に及ぼす影響を検討することである。本研究より、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は大きな影響を与えるが、代謝調節能には大きな影響を与えないことが明らかになった。また、Mfa1 線毛による細胞の遊走や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。このことは、歯周病の進行において *P. gingivalis* Mfa1 線毛が関与していることを証明する根拠となるものと考えられた。

II. 材料および方法

1. 細胞培養

マウス歯肉線維芽細胞(MGF)は、BALB/c マウスの健康な口蓋歯肉組織を採取し、以下のように回収した。10%ウシ胎児血清(Hyclone Laboratories Inc, UT, USA)、100 U/mL ペニシリン、100

$\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシンを含む Minimum Essential Medium α (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて、CO₂ インキュベーター中、37°C でコンフルエントまで培養した。その後、0.25% トリプシン-EDTA(Thermo Fisher Scientific)で処理することにより、細胞を分離し、遠心分離によって回収した。回収した細胞は 60mm ディッシュに MGF(1×10^6 cells/dish)を播種し、細胞がコンフルエントに達した時点で、*P. gingivalis* の各種線毛および LPS の存在下または非存在下で 2 時間 インキュベーションした後、各実験に用いた。LPS に関しては、*P. gingivalis* の超高純度 LPS を実験に用いた(InvivoGen, CA, USA)。

2. 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)株より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。

3. PCR Array 解析

回収した細胞より total RNA を NucleoSpin RNA(Macherey-Nagel Inc., PA, USA)を用いて抽出した。total RNA の純度および濃度評価は、超微量紫外可視分光光度計 NanoDrop Lite™(Thermo Fisher Scientific)を用いて A230/A260、A260/A280 比を測定して評価した。次に RT² First Strand Kit (Qiagen, CA, USA)を用いて total RNA から cDNA を調整し、Mouse Antibacterial Response RT²Profile PCR Array (Qiagen)および Mouse Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT²Profile PCR Array (Qiagen)による PCR Array に供した。増幅は、RT² SYBR Green/ROX qPCR master mix を用い、StepOnePlus™ Real-time PCR system と関連ソフトウェア(バージョン 2.3 ; Thermo Fisher Scientific)にて PCR Array を行った。

4. Real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

回収した細胞より、NucleoSpin RNA(Macherey-Nagel Inc., PA, USA)を用い、通法に従い total RNA を抽出した。超微量紫外可視分光光度計 NanoDrop Lite™(Thermo Fisher Scientific)を用いて A230/A260 および A260/A280 比を計算することにより純度および濃度を評価した。TaqMan Gene Expression Assay(Cxcl1(Mm04207460_m1) Cxcl3(Mm01701838_ml)、IL-6(Mm00446190_m1)、Icam1(Mm00516023_m1)、Sele(Mm00441278_m1)、TLR2(Mm00442346_m1)、TLR4(Mm00445273_m1)) (Thermo Fisher Scientific)および TaqMan Universal PCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific) を用いて、各種 mRNA 発現の qPCR 分析を行った。内部標準として、真核生物 18S rRNA(Hs99999901_s1) を用いた。qPCR は、StepOnePlus Real-Time System を用い、95°C10 分の後、95°C 15 秒、60°C1 分の 40 サイクルを行った。標的 mRNA の相対量は $\Delta\Delta\text{CT}$ 法を用いて解析した。

5. RNA 干渉 (siRNA)

MGF 細胞は通法に従って、Lipofectamine RNAiMAX(Thermo Fisher Scientific)を用いて、TLR2 および TLR4-targeting siRNA(Silencer Select Pre-designed siRNAs, Ambion, NY, USA)または non-targeting control siRNA(Ambion)を形質導入した。24 時間の形質導入後の細胞を、Mfa1(JI-1)、

FMFA5、FMFA5C、FimA および *P. gingivalis* の LPS で 2 時間刺激し、遺伝子レベルでの発現を 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の確認のため、JI-1、FMFA5、FMFA5C、FimA および *P. gingivalis* の LPS で 2 時間刺激した細胞を回収し、TLR2 および TLR4 発現レベルをフローサイトメトリーにより解析した。MGF 細胞(100 μ L、 1×10^2 細胞を含む)を anti-mouse CD282(TLR2) phycoerythrin (PE) (BioLegend, San Diego, CA, USA, Cat:148604), anti-mouse CD284(TLR4) (PE)(BioLegend, Cat:117605),または isotype control antibody (PE)(BioLegend, Cat:400508)で、MACSQuant analyzer と MACSQuantify software version 2.4 (Miltenyi Biotec)を用いてフローサイトメトリーで解析した。

7. 統計学的解析

全てのデータは、平均値 \pm 標準偏差で表した。統計学的解析には統計解析ソフト PASWStatistics ソフトウェア(Ver.18.0; SPSS Japan、東京、日本)を用いた。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 の網羅的解析

MGF 細胞の *P. gingivalis* JI-1 株由来 Mfa1 線毛に対する反応を確認するために、mouse antibacterial response PCR array を用いて、細菌-細胞間相互作用に関与する 84 個の遺伝子の発現の違いを調べた。興味深いことに、好中球走化性因子 Cxcl1 と Cxcl3 の mRNA 発現は、刺激しなかった細胞に比べ JI-1 刺激をした細胞で 4 倍以上の上昇を認めた。さらに、FimA 線毛刺激では、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、*P. gingivalis* LPS 刺激では、無刺激細胞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

PCR Array データを検証するために、MGF 細胞を線毛(JI-1、FMFA5、FMFA5C および FimA) あるいは LPS にて 2 時間刺激後の Cxcl1 と Cxcl3 mRNA 発現の qPCR 解析を行った。また、歯周炎の進行に深く関わる炎症性サイトカインである IL-6 についても、同様に解析した。JI-1 刺激は FimA 線毛刺激に比べて好中球走化性因子 Cxcl1、Cxcl3 および炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA 発現上昇が有意に高いことを認めた。さらに、FMFA5 刺激では、Cxcl1、Cxcl3、IL-6 のいずれにおいても顕著な mRNA 発現上昇を認めた。

3. Mfa1 線毛に対する細胞外マトリックスと接着分子の網羅的解析

次に、変異株由来 Mfa1 線毛に対する MGF 細胞の細胞外マトリックスと接着分子発現変化を確認するために、Mouse Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT²Profile PCR Array を用いて、細胞-細胞および細胞-マトリックス相互作用に関与する 84 個の遺伝子の発現の違いを調べた。Icam1 mRNA 発現は、FMFA5 刺激した細胞において、無刺激細胞に比べて 4 倍以上の上昇を認めた。また、FMFA5C 刺激では、FMFA5 刺激と同様、ICAM-1 の顕著な遺伝子発現上昇を認め

ただけでなく、E-selectin(Sele)の遺伝子発現上昇も顕著であった。一方、JI-1、FimA 線毛、LPS 刺激では、無刺激群と比較して標的遺伝子発現の顕著な変化は認めなかった。

4. 変異株由来 Mfa1 線毛刺激による細胞接着関連因子発現

PCR Array データを検証するために、MGF 細胞を各種線毛あるいは LPS にて 2 時間刺激後の Icam1 と Sele mRNA 発現の qPCR 解析を行った。細胞接着因子 ICAM-1 と E-selectin の遺伝子発現は、FimA 線毛刺激よりも JI-1 刺激の方が高い傾向であったが、有意な差は認めなかった。興味深いことに、FMFA5 刺激において ICAM-1 と E-selectin 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

細胞は、細菌に対してパターン認識受容体(PRR)を用いて、細菌固有の分子構造を認識する。Toll 様受容体(TLR)は、ヒトにおいて 10 種類、マウスにおいて 12 種類同定されており、細菌細胞壁成分の LPS は TLR4 が、Lipoprotein は TLR2 が認識すると報告されている。しかしながら、Mfa1 の認識受容体は、未だはっきりしていない。そこで、MGF 細胞を各種線毛あるいは LPS にて 2 時間刺激後の TLR2 と TLR4 の遺伝子発現の qPCR 解析を行った。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、LPS の受容体である 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

Mfa1 線毛の認識受容体に関するさらなる検討を行うために、MGF 細胞の TLR2 あるいは TLR4 をノックダウンして実験を進めることにした。TLR2,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、TLR2 あるいは 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解析により、これらの siRNA 導入 MGF 細胞において、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

次に、MGF 細胞の Mfa1 線毛に対する TLR2/4 を介した反応性を検討するために、TLR2 あるいは TLR4 をノックダウンした MGF 細胞を用い、JI-1、FMFA5 および FMFA5C にて 2 時間刺激後の cxcl1、cxcl3、Icam1、Sele mRNA 発現の qPCR 解析を行った。MGF 細胞において JI-1、FMFA5 および FMFA5C 刺激で認められた好中球走化性因子(CXCL1、3)および細胞接着因子(ICAM-1、E-selectin)遺伝子発現上昇は、TLR4 をノックダウンすることでほぼ完全に抑制されていた。一方、TLR2 のノックダウンでは、各刺激による遺伝子発現上昇の抑制は部分的であった。

IV. 考 察

本研究で、*P. gingivalis* の 2 つ目の fimbriae である Mfa1 が、MGF 細胞において好中球走化性・細胞接着の遺伝子発現を著しく亢進させ、その発現亢進は FimA 線毛よりも顕著であることを示した。さらに、TLR4 をノックダウンさせた MGF 細胞では、Mfa1 線毛による好中球走化性・細胞接着の遺伝子発現の亢進はほぼ完全に抑制されることを明らかにした。

歯肉結合組織を構成する MGF 細胞に対する JI-1 由来の 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 と CXCL3 および炎症性サイトカインである IL-6 の発現が顕著に亢進していることがわかった。これまでのヒトおよびラットでの報告において、歯周炎歯肉では、健常歯肉に比べて CXCL1 の発現が高いことが明らかになっている。また、歯肉溝滲出液中の CXCL1 レベルは、健常者と歯周病患者で有意な差を認めたと報告されている。CXCL1 は、歯肉線維芽細胞の走化性に関わり、歯周組織の治癒に関与している可能性がある。一方、CXCL3 については、歯周炎との関連を示す報告はないが、炎症の開始とその後の歯周組織破壊に重要な役割を果たすと考えられる CXCL2 と同様の活性を示すことより、CXCL3 も歯周炎の進行に関与している可能性がある。今回、Cxcl1 と Cxcl3 の mRNA 発現については、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。実際、FimA 線毛はマウス腹膜マクロファージの Cxcl1 遺伝子発現を誘導する。また、骨髄系樹状細胞に、FimA 線毛のみを発現する *P. gingivalis* あるいは Mfa1 線毛のみを発現する *P. gingivalis* を感染させると、Mfa1 線毛のみを発現する *P. gingivalis* の方が IL-6 遺伝子発現が上昇すると報告されており、今回の Mfa1 線毛による IL-6 発現上昇の結果を支持している。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上回っている可能性がある。

次に、Mfa1 線毛の免疫調節能に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 Mfa1(FMFA5)変異体と、先端 Mfa3-5 構造を補完した Mfa1(FMFA5C)変異体を用いて、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 刺激では遺伝子発現が著しく上昇し、FMFA5C 刺激では有意に減弱していた。この結果から、Mfa1 線毛による細胞接着因子の調節は、シャフト部分の Mfa1 分子に大きく影響されることが示唆された。本研究で、Mfa1 線毛が細胞外マトリックスや接着分子の発現に及ぼす影響を確認したところ、細胞接着因子である ICAM-1 と E-selectin の遺伝子発現が著しく増加していた。ICAM-1 欠損は *P. gingivalis* 感染後の歯槽骨破壊に対する感受性や重症度を増加させる。また、P/E-selectin 欠損マウスでは自然発症の早期歯槽骨破壊を認める。FimA 線毛や Mfa1 線毛はヒト大動脈内皮細胞において ICAM-1, E-selectin を誘導することが報告されている。今回の結果は、これらの線毛が歯肉線維芽細胞に対しても同様の作用を示すことを示唆している。好中球走化性因子についての結果と同様に、FMFA5 刺激では接着因子の遺伝子発現が著しく上昇し、FMFA5C の刺激では JI-1 刺激と比較して有意に減弱していた。すなわち、Mfa1 線毛による細胞接着因子の制御にも Mfa1 線毛軸部の分子が大きく寄与していることが示唆された。

宿主細胞は PRR によって病原体関連分子パターン(PAMP)を認識し、自己と非自己を区別している。病原体に対する宿主の自然免疫応答は、主に PRR の一つである TLR のシグナルを介して媒介されている。TLR2 と TLR4 は、様々な PAMP を認識する細胞外自然免疫受容体として最も広く研究されており、歯周炎の発症に関与していると考えられている。TLR4 は、一般的に細菌の細胞壁成分である LPS を認識することが知られている。興味深いことに、*P. gingivalis* の LPS は、TLR2 と TLR4 の両方を認識できる特徴があると報告されている。例えば、LPS1435/1449 と LPS1690 のアイソフォームは、ヒトの TLR2 と TLR4 の活性化において全く逆の作用があることが示されている。実際、*P. gingivalis* LPS と大腸菌 LPS は、ヒト歯肉線維芽細胞におけるサイトカイン産生を異なる形で制御しているようである。このような LPS の異質性は、*P. gingivalis* が歯肉組織における宿主の自然免疫応答を回避するための生存戦略の一つと考えられている。

一方、FimA 線毛の認識受容体については、様々な報告がある。FimA 線毛は、TLR2 と CD14 を介してヒト末梢血単球を活性化する。ヒト単球の CD14 を介した FimA 線毛の認識において、TLR2 依存性のシグナル伝達によって CD11b-CD18 の活性化を引き起こす。しかしながら、Mfa1 線毛の認識受容体については、未だ不明である。

歯肉線維芽細胞は、TLR2 と TLR4 を恒常的に発現している。本研究において、各種線毛や LPS で刺激した MGF 細胞における TLR2 および 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 刺激に対して有意な遺伝子発現変動を示さなかった。さらに、TLR2/4 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、Icam-1、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。この結果は、Mfa1 線毛で刺激されたマウスマクロファージの炎症性サイトカインの発現が、抗 TLR2 抗体の前処理により有意に抑制されたという報告とは異なるものとなる。一方、Hajishengallis らは、野生型の Mfa1 線毛は CD14/TLR2 依存性に炎症性サイトカインを誘導し、これは線毛関連の 12-kDa Lipoprotein によるものであると報告している。さらに、FimA 線毛様リポ蛋白質や FimA 線毛に関連するリポペプチドが、マクロファージにおける TLR2 を介したシグナル伝達とそれに続く TNF- α 産生の一部を担っているという同様の報告もある。また、LPS 刺激能についての報告として、*P. gingivalis* LPS 由来の Lipoprotein は、TLR2 を介した細胞活性化の主成分であることが示されている。さらに、*P. gingivalis* Lipoprotein 欠損変異体から抽出した LPS を用いると、TLR2 を介したシグナル伝達が著しく減少することが示されている。実際、リコンビナント FimA 線毛を用いた場合、THP-1 単核細胞の CD14 と TLR4 を介したサイトカイン産生を認めるものの、TLR2 は刺激しなかった。また、他のグループも、リコンビナント FimA 線毛は、ヒト末梢血単核細胞の TLR4/NF- κ B シグナル伝達経路を介して炎症反応を誘導すると報告している。*P. gingivalis* lipid A あるいはその合成物は、TLR4 依存性経路を介して細胞を活性化することが報告されている。本研究結果において、野生型の精製 Mfa1 線毛は、主に TLR4 に認識されているが、TLR2 は線毛の Lipoprotein を認識し、全体の作用に寄与していたと推測される。今後の検討として、Lipoprotein を除去した精製 Mfa1 線毛の反応性を確認する必要がある。

これまでに、歯周炎における TLR4 の重要性について、以下のような報告がある。TLR2 ではなく TLR4 の刺激能が高い患者のプラークと、そのプラークを採取した歯周囲のプラークスコアおよびプロービング時の出血は正の相関を認めた。また、患者のプラークによる TLR を介した刺激の TLR4/2 活性比率が高ければ高いほど、ポケット深さや臨床的付着レベルと正の相関を示すと報告されている。さらに、歯肉縁下プラークによる TLR4 刺激能はプラーク指数と関連していたが、TLR2 刺激能とプラーク指数との関連は認めなかった。これらのことより、Mfa1 線毛が刺激因子となって進行する歯周炎において、TLR4 が重要な役割を果たしている可能性がある。さらに最近の報告で、樹状細胞における Mfa1 線毛の認識には、PRR の 1 つである細胞内 DC-SIGN が重要であることが示唆されている。本研究においても、MGF 細胞を各種線毛刺激して、細胞内 DC-SIGN の発現を検討したが、検出できないことがわかった(データ未公開)。この食違いの

(学位論文の内容を要約したもの)

No. 7

愛知学院大学

理由は、検討された細胞が、一方では免疫細胞であり、他方は歯周組織構成細胞である、という細胞種の違いによるものと考えられる。

V.まとめ

本研究において、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。