
黒色色素産生菌によるヒト歯肉上皮細胞の 活性化機構の解明

研究課題番号 09671843

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2))

研 究 成 果 報 告 書

平成11年3月

研究代表者 菅 原 俊 二

(東北大学歯学部助手)

はしがき

歯周組織を構成する細胞は歯周組織の支持細胞として機能するばかりでなく、様々な菌体成分の刺激に応答して多様なサイトカインや増殖因子を産生し、局所の炎症の発症や治癒機転に積極的に関与している可能性が示唆されている。本研究は、代表的な歯周病関連菌である黒色色素産生菌によって引き起こされる歯周組織破壊におけるヒト歯肉上皮細胞の役割について解明することを目的とした。これまで、歯周組織破壊における歯肉線維芽細胞についての報告は多いが、微生物感染における一次防御としての歯肉上皮細胞の役割については、ほとんど研究が進んでいなかった。これは、ヒト歯肉上皮細胞の *in vitro* での培養が困難だったという理由によるが、著者らは、近年開発され市販されるようになった培地を用いることにより、歯肉上皮細胞を研究対象にすることを可能にした。特に、ヒト歯肉上皮細胞培養法のエキスパートである日本学術振興会特別研究員杉山明子博士（現、徳島大学歯学部助手）を平成9年度に研究組織に加えることにより本報告書にまとめたように多くの研究成果が得られた。また、歯肉上皮細胞に隣接し黒色色素産生菌の菌体表層成分に応答する歯肉線維芽細胞も研究対象に加え、歯周組織の応答について総合的に研究を重ねた。その結果、菌体表層成分のマルチリガンドレセプターとされる CD14 の発現に関して歯肉線維芽細胞は多様な細胞集団から成り、CD14 発現歯肉線維芽細胞は内毒素性リポ多糖 (LPS) ばかりでなく様々な菌体成分に応答するという事実も明らかとなり予想以上の研究成果を得ることができた。

東北大学図書



00010176358

附属図書館

研究組織

研究代表者：菅原俊二 （東北大学歯学部助手）
研究分担者：高田春比古 （東北大学歯学部教授）
研究分担者：力石秀実 （東北大学歯学部講師）
研究分担者：杉山明子 （日本学術振興会特別研究員）

研究経費

平成9年度	1,800 千円
平成10年度	1,200 千円
計	3,000 千円

研究発表

（1）学会誌等

菅原俊二, 高田春比古. 菌体表層成分と歯周病. 試論: 歯周組織における CD14 分子の役割. 歯科基礎誌 40 (1): 1-16, 1998.

Sugawara, S., A. Sugiyama, E. Nemoto, H. Rikiishi, and H. Takada. Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts: Characterization and CD14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. Infect. Immun. 66 (7): 3043-3049, 1998.

Arakaki, R., S. Sugawara, H. Nakashima, S. Kotani, and H. Takada. A lipoteichoic acid fraction of *Enterococcus hirae* activates cultured human monocytic cells via CD14-independent pathway to promote cytokine production, and the activity is inhibited by serum components. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 22 (4): 283-291, 1998.

Sugiyama, A., S. Sugawara, H. Rikiishi, T. Ogawa, and H. Takada. Activation of human gingival epithelial cells by surface components of black-pigmented bacteria. 発表予定.

(2) 口頭発表

菅原俊二, 杉山明子, 力石秀実, 高田春比古. ヒト歯肉線維芽細胞の多様性. CD14 の発現と LPS 応答能. 第 37 回歯科基礎医学会総会, 北九州, 1997 年 10 月 1 ~ 2 日

杉山明子, 菅原俊二, 力石秀実, 高田春比古. 菌体成分並びに炎症性サイトカインによる歯肉上皮細胞の活性化. 第 51 回日本細菌学会東北支部総会, 仙台, 1997 年 9 月 4 ~ 5 日

Sugawara, S., A. Sugiyama, E. Nemoto, and H. Takada. Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts. The 3rd World Congress on Inflammation, Tokyo, 1997 年 11 月 16 ~ 20 日

杉山明子, 菅原俊二, 高田春比古. 菌体成分に対する歯周組織構成細胞の反応. 第 18 回東北免疫研究会, 仙台, 1998 年 3 月 6 日

杉山明子, 菅原俊二, 力石秀実, 小川知彦, 高田春比古. 各種菌体成分に対するヒト歯肉上皮細胞の IL-8 産生ならびに ICAM-1 発現の増強. 第 71 回日本細菌学会総会, 松本, 1998 年 4 月 2 ~ 4 日

杉山明子, 菅原俊二, 力石秀実, 小川知彦, 高田春比古. 黒色色素産生菌の菌体表層成分によるヒト歯肉上皮細胞の活性化. 第 40 回歯科基礎医学会総会, 名古屋, 1998 年 10 月 17 ~ 18 日

研 究 成 果

緒言

ヒト口腔には様々な細菌が常在しており口腔組織の細胞はそれら菌体成分や菌体外産物に晒されている。我々はこれら菌体成分に対して口腔組織の細胞が過剰に反応した結果、組織破壊をともなう歯周病が発症するのではないかと考えて研究を進めてきた。ところで、上皮細胞は種々の刺激により様々なサイトカインを分泌したり細胞表層抗原を発現する。そこで歯周組織で最初に菌体成分に晒されると考えられる歯肉上皮細胞を供試して様々な菌体成分刺激に対する反応を検討した。

材料と方法

サイトカインとして natural human インターフェロン (IFN)- γ (林原生物化学研究所、岡山) および recombinant human インターロイキン (IL)-1 α (大日本製薬株式会社、大阪) を用いた。菌体成分として *Prevotella intermedia* ATCC 25611 から抽出した糖タンパク画分で、様々な生物活性を発揮する *Prevotella* glycoprotein (PGP) および石油エーテル・クロロホルム・フェノール混液 (PCP) 抽出した内毒素性リポ多糖 (LPS) また、*Porphyromonas gingivalis* 381 の fimbriae および熱フェノール・水 (PW) 抽出した LPS 画分を使用した。また、対照として *Salmonella abortusequi* から抽出した精製 LPS も用いた。

歯肉上皮細胞は便宜抜歯の際に得た歯肉片から調製した。その細胞を 6 穴プレートにケラチノサイト-SFM 培地 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) にて

コンフルエントに培養し、種々のテスト標品で刺激を加えて48時間培養した。その後培養上清中に含まれるサイトカインは ELISA で測定した。測定したサイトカインは、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-18、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)と腫瘍壊死因子 (TNF)の10種である。細胞表面の接着分子等の発現は Flow cytometry で検討した。また、種々のテスト標品で刺激後8時間の細胞から total RNA を抽出し逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行った。

結果

P. intermedia PGP 刺激によるサイトカインの誘導

P. intermedia PGP 画分でヒト歯肉上皮細胞を刺激すると、今回検討したサイトカインの中で IL-8、G-CSF および GM-CSF の分泌が亢進した(図1)。分泌されたサイトカインのレベルは対照とした IFN- γ および IL-1 α で誘導されたものよりうわまわっていた。一方、同菌の LPS には分泌亢進作用は認められなかった。また対照とした *S. abortusequi* の LPS も全く作用を示さなかった。IFN- γ 刺激では M-CSF の分泌亢進がみられた。

P. gingivalis によるサイトカイン産生誘導

次に *P. gingivalis* 菌体成分を供試して検討したところ、*P. gingivalis* の fimbriae, LPS は共に濃度依存的に、*P. intermedia* PGP 画分と同様に IL-8、G-

CSF および GM-CSF の分泌を増強させた (図 2)。また、IFN- γ 産生を強く誘導するサイトカイン IL-18 は、歯肉上皮細胞内に存在が確認されたが、供試したいずれの菌体成分で刺激しても上清への産生誘導はみられなかった。

黒色色素産生菌菌体成分刺激による接着分子 (intercellular adhesion molecule-1: ICAM-1) の発現増強

次に菌体成分の刺激を受けた歯肉上皮細胞が接着分子である ICAM-1 を発現するかどうかを検討した。無刺激の細胞では 4.9% の細胞しか ICAM-1 を発現していなかった。IFN- γ で刺激すると 98.7% の細胞に ICAM-1 の発現が見られるようになった。菌体成分で刺激すると *P. intermedia* の PGP 画分では 49.0%, *P. gingivalis* の fimbriae では 12.5%, LPS では 30.5% の細胞に ICAM-1 の発現が認められた。対照とした *S. abortusequi* の LPS はこの実験でも活性を示さなかった。データは省略したが、*P. intermedia* の LPS で刺激しても ICAM-1 の発現増強は起こらなかった。また、歯肉上皮細胞は、アポトーシス誘導分子 Fas (CD95) を発現していたが、いずれの菌体成分刺激でも発現増強はみられなかった。一方、IFN- γ は CD95 の発現を強く増強させた。歯肉線維芽細胞と異なり歯肉上皮細胞は、LPS の主要なレセプターであり菌体表層成分のマルチリガンドレセプターでもある CD14 は全く発現していなかった。

菌体成分による IL-8、G-CSF、GM-CSF および ICAM-1 mRNA の発現誘導

先にサイトカインの分泌誘導および接着分子の発現増強が mRNA レベルで

も起こっているのかを検討するために RT-PCR を行った。すると、ELISA や Flow cytometry の結果に一致して *P. intermedia* 標品では PGP 画分の刺激でサイトカイン、ICAM-1 のバンドが見られたが、LPS 刺激では見られなかった(図 4)。一方、*P. gingivalis* 標品では fimbriae ならびに LPS 刺激でサイトカインならびに ICAM-1 のバンドが増強された。

まとめ

本研究により以下の成果を得た。

1. ヒト歯肉上皮細胞は *P. intermedia* PGP 画分、*P. gingivalis* fimbriae および LPS 画分の刺激により IL-8, G-CSF および GM-CSF を分泌した。一方、IFN- γ 刺激では M-CSF の分泌を促した。
2. ヒト歯肉上皮細胞は *P. intermedia* PGP 画分、*P. gingivalis* fimbriae および LPS 画分の刺激に応じて膜表層の ICAM-1 発現を増強した。
3. 上述の各種サイトカイン産生誘導および接着分子発現増強は RT-PCR により mRNA レベルでも確認された。
4. ヒト歯肉線維芽細胞は主要な LPS レセプターである CD14 の発現に関して多様な細胞集団からなることが明らかとなったが、ヒト歯肉上皮細胞は供試しいずれの細胞にも CD14 の発現は認められず、黒色色素産生菌の菌体表層成分は、腸内細菌科の LPS とは異なる機構でヒト歯肉上皮細胞を活性化することが示唆された。昨年来、LPS のシグナル伝達分子として Toll-like receptor (TLR)

分子群の報告があり、高濃度では CD14 非依存性に細胞内にシグナルを伝達することが可能な分子群である。ヒト歯肉上皮細胞においても黒色色素産生菌の菌体表層成分が直接この分子を介して活性化されることが充分考えられ、この点について今後の研究課題としたい。

5. 近年、IFN- γ を強力に誘導する IL-18 の生物学的作用について注目を集めている。今回、ヒト歯肉上皮細胞は IL-18 を細胞内におそらく前駆体として保有していることが明らかとなった。今回供試した黒色色素産生菌の菌体表層成分やサイトカイン刺激では、ヒト歯肉上皮細胞からの IL-18 の成熟型としての分泌を促すことはできなかった。しかしながら、Fas 抗原を介したアポトーシスなど何らかの機構でヒト歯肉上皮細胞内の IL-18 が活性化され産生されることにより、免疫担当細胞からの IFN- γ 産生を促し、歯周組織での炎症の発症や治療機転に積極的に関与している可能性が考えられる。この点についても今後の研究課題としたい。

以上の結果を図 5 にまとめた。黒色色素産生菌の菌体表層成分である PGP, fimbriae および LPS で刺激を受けたヒト歯肉上皮細胞は IL-8, G-CSF および GM-CSF などのサイトカインや ICAM-1 のような接着分子を発現する。これらのサイトカインで活性化され、遊走能の高まった好中球は ICAM-1 を発現した上皮細胞と相互作用して歯肉上皮細胞層へ活発に浸潤するものと考えられる。集積した好中球はさらにサイトカインで活性化されてスーパーオキシドの産生等を通じて組織破壊を伴う歯周炎を成立させると考えられる。

図 1

P. intermedia PGP によるヒト歯肉上皮細胞の
サイトカイン産生誘導

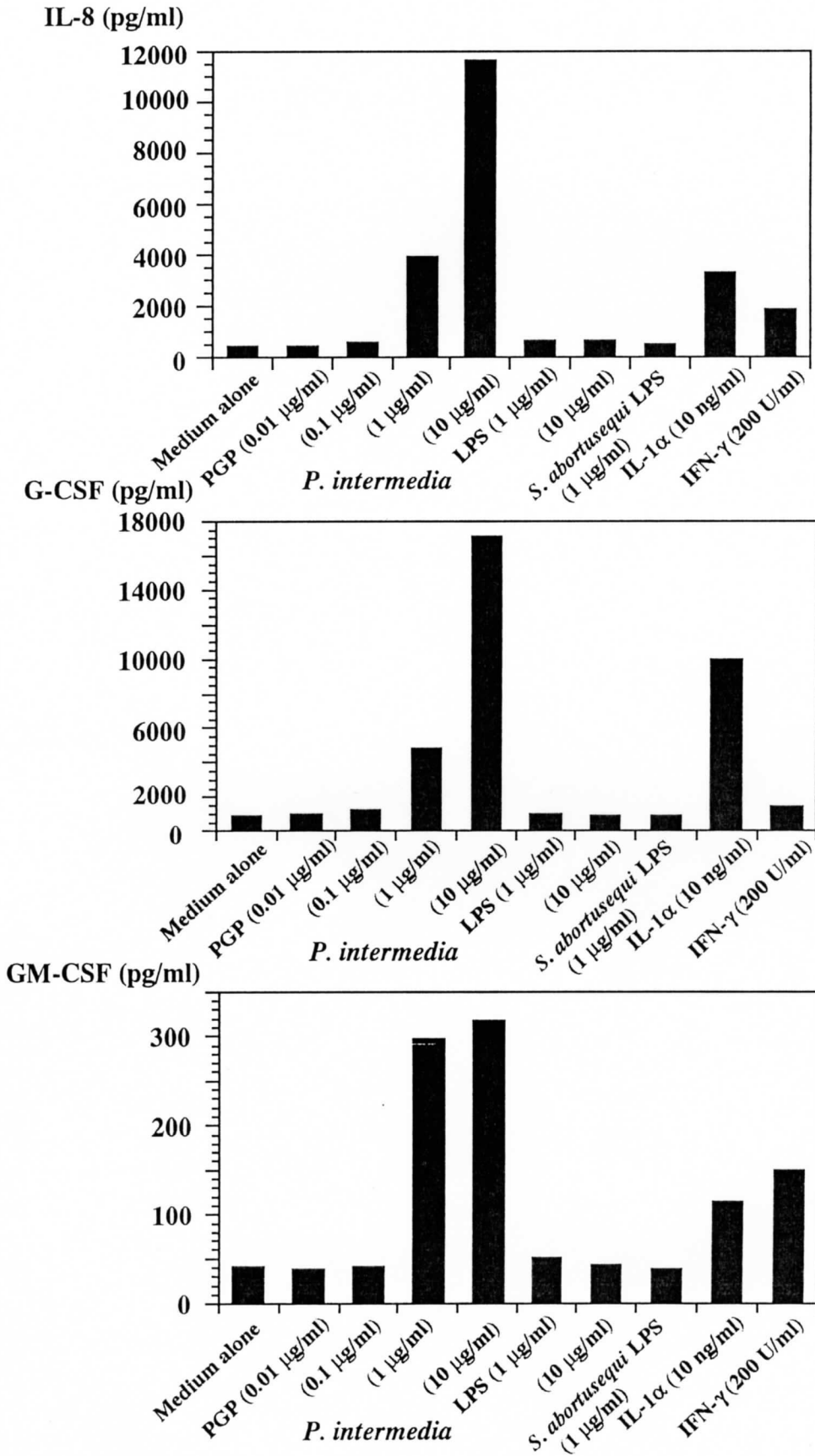


図 2

P. gingivalis 菌体成分によるヒト歯肉上皮細胞の
サイトカイン産生誘導

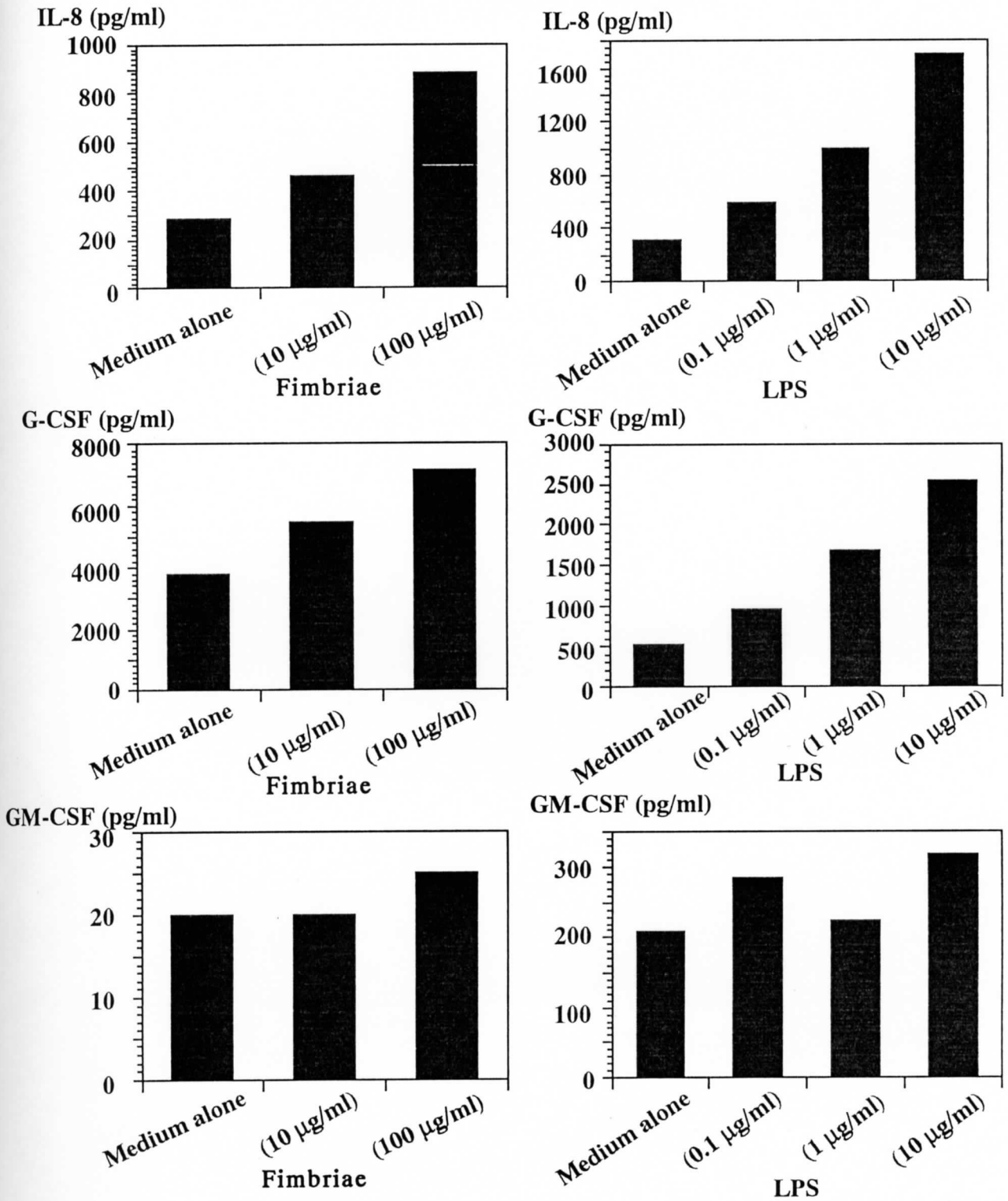


図 3

菌体表層成分の刺激を受けたヒト歯肉上皮細胞の ICAM-1発現

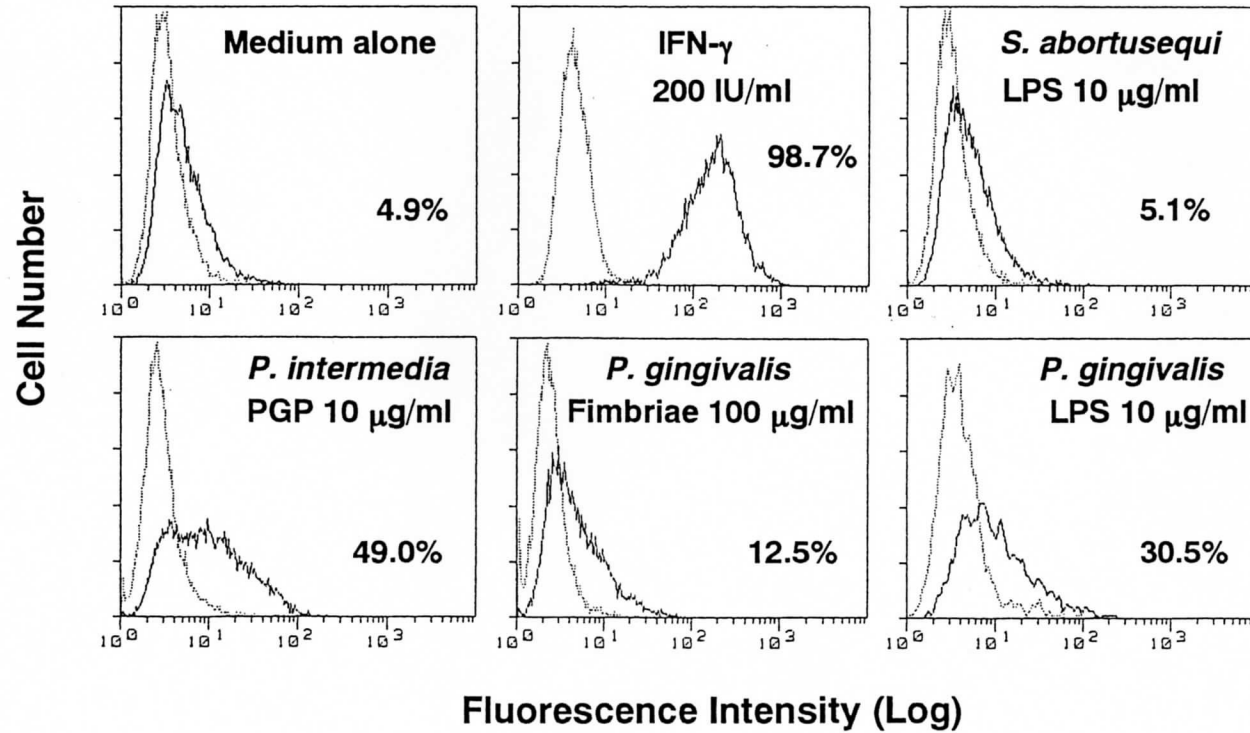


図 4

菌体成分によるサイトカインおよび
接着分子 mRNA 発現誘導

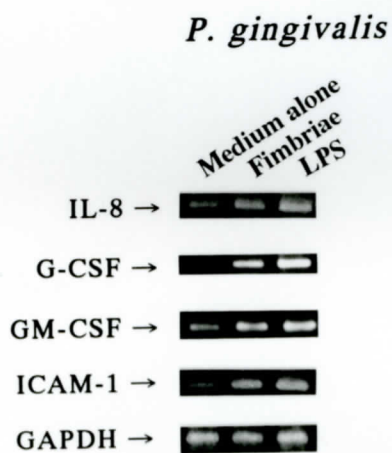
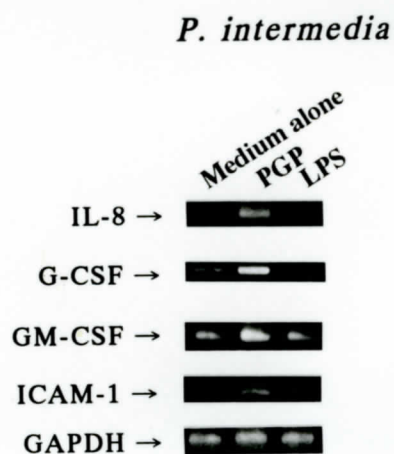
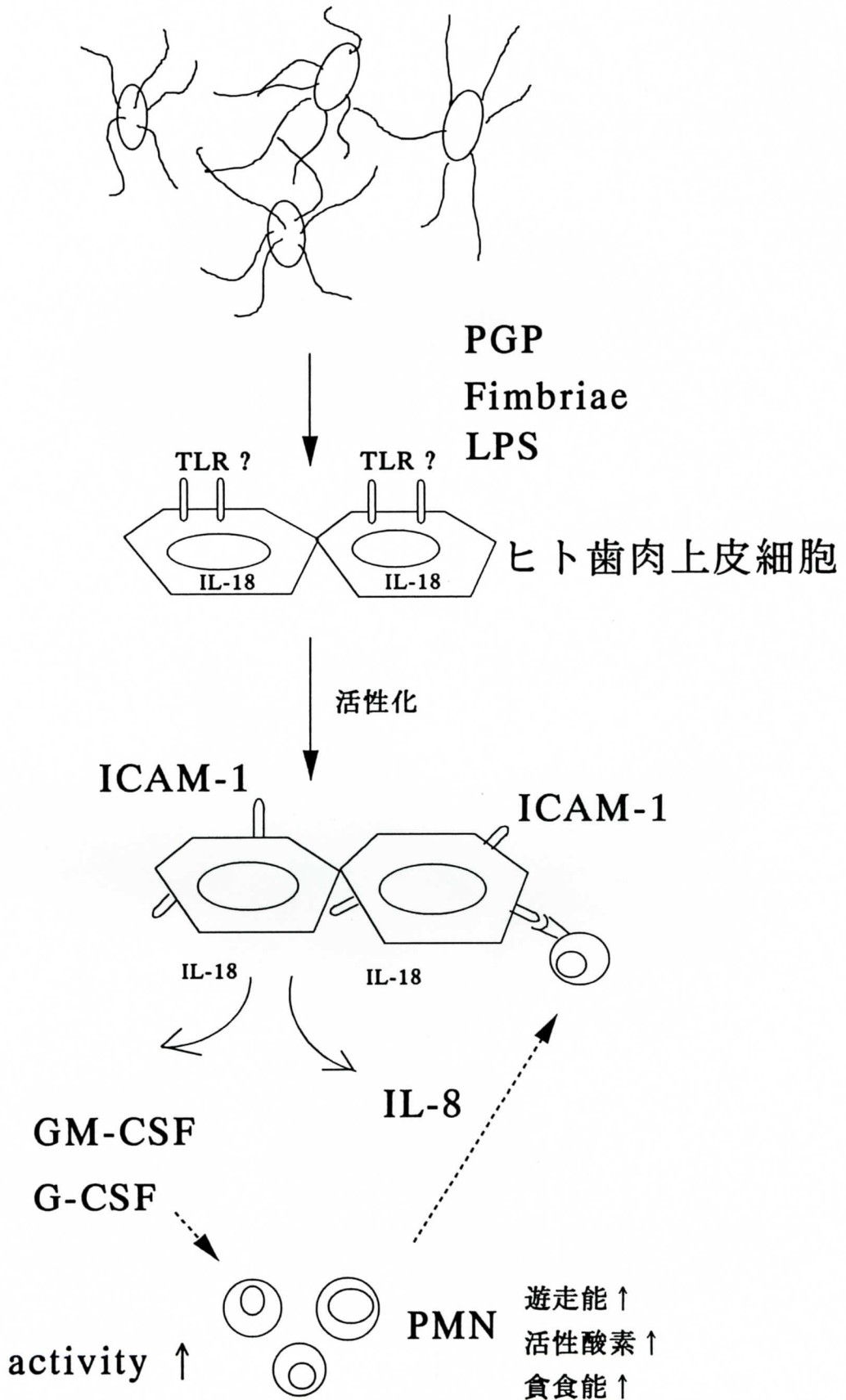


図 5

黒色色素産生菌



研究発表 (1) 学会誌等のリストのうち

既に発表した論文のコピーを掲載した。

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。