

氏名(本籍) : 多田浩之

学位の種類 : 博士(歯学) 学位記番号 : 歯博第254号

学位授与年月日 : 平成15年3月24日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯学臨床系専攻

学位論文題目 : *Porphyromonas gingivalis* システインプロテアーゼ(ジンジパイン)によるヒト
歯肉線維芽細胞のCD14分解とLPS低応答性

論文審査委員 : (主査) 教授 島内 英俊

教授 高田 春比古 教授 篠田 壽 教授 菅原 俊二

論文内容要旨

Porphyromonas gingivalis は、成人性歯周炎の発症・進行に係わる主要な病原菌と目されている。本研究では、同菌の産生するシステインプロテアーゼ(ジンジパイン)の歯周組織における自然免疫機構への関わりについて、種々の菌体成分のパターン認識レセプターであるCD14に着目して検討した。

P. gingivalis W83株とATCC 33277株の培養上清でヒト歯肉線維芽細胞を処理し、同細胞のCD14分子発現をフローサイトメトリーで測定したところ、濃度依存的にCD14分子発現は減少し、20%培養上清添加でほぼ完全に消失した。各種プロテアーゼインヒビターを供試した阻害実験の結果、基質タンパクのアルギニン残基のC末端を切断するジンジパイン-R(Rgps)が主として同作用を担っており、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼおよびアスパラギン酸プロテアーゼは関与しないことが判明した。3種の精製ジンジパイン(HRgpA, RgpBおよびKgp)をヒト歯肉線維芽細胞に作用させると、高分子量型のRgp(HRgpA)が最も強力にCD14分子発現を減少させた。すなわち、0.3 μ M HRgpAで30分間処理することによりCD14分子はほぼ完全に消失した。一方、Toll-like receptor 4を含む他の抗原の発現はHRgpA処理によって変化しなかった。HRgpA(0.3 μ M)処理によりCD14分子が消失したヒト歯肉線維芽細胞を10% FCS添加 α -MEM培地でさらに培養したところ、徐々にCD14分子の再発現がみられ、48時間後には80%以上の回復がみられた。細胞膜画分を供試したウェスタンブロッティングの成績から、HRgpAはCD14をタンパク分解していることが示唆された。GPIアンカー型タンパクであるCD14のGPI部位を分解するphosphatidylinositol-specific phospholipase Cで処理すると、上清中にCD14が検出されたのに対して、HRgpAおよび*P. gingivalis*培養上清処理ではいかなるバンドも検出されないことから、ジンジパインはCD14を多数の断片に分解することが明らかとなった。HRgpAで処理したヒト歯肉線維芽細胞では、CD14依存的な細胞応答を喪失し、内毒素性リポ多糖に応じたIL-8産生が著しく抑制された。一方、CD14非依存性のphorbol myristate acetateで刺

激した場合には、HRgpA 処理細胞の IL-8 産生量に変化はなかった。

これらの成績は、*P. gingivalis* のジンジパインがヒト歯肉線維芽細胞の CD14 を特異的に分解して、CD14 依存的な免疫応答を喪失させることによって、同菌が宿主の自然免疫機構をエスケープしている可能性を示唆している。

審 査 結 果 要 旨

Porphyromonas gingivalis は、成人性歯周炎の発症・進行に係わる主要な病原菌と目されている。申請者の多田浩之君は、同菌の産生するシステインプロテアーゼ（ジンジパイン）の歯周組織における自然免疫機構への関わりについて、種々の菌体成分のパターン認識レセプターである CD14 に着目して本研究を遂行した。

その結果、① *P. gingivalis* W83 株と ATCC 33277 株の培養上清でヒト歯肉線維芽細胞を処理し、同細胞の CD14 分子発現をフローサイトメトリーで測定したところ、濃度依存的に CD14 分子発現は減少し、20%培養上清添加ではほぼ完全に消失した、②各種プロテアーゼインヒビターを供試した阻害実験の結果、基質タンパクのアルギニン残基の C 末端を切断するジンジパイン-R (Rgps) が主としてこの作用を担っており、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼおよびアスパラギン酸プロテアーゼは関与しないことが判明した、③3種の精製ジンジパイン (HRgpA, RgpB および Kgp) をヒト歯肉線維芽細胞に作用させると、高分子量型の Rgp (HRgpA) が最も強力に CD14 分子発現を減少させた、④ Toll-like receptor 4 を含む他の抗原の発現は HRgpA 処理によって変化しなかった、⑤ HRgpA (0.3 μ M) 処理により CD14 分子が消失したヒト歯肉線維芽細胞を培地中でさらに培養したところ、CD14 分子発現は48時間後には80%以上の回復がみられた、⑥ウェスタンブロッティングの結果、歯肉線維芽細胞を HRgpA および *P. gingivalis* 培養上清処理した画分ではいかなるバンドも検出されないことから、ジンジパインは CD14 を多数の断片に分解することが明らかとなった、⑦ HRgpA で処理したヒト歯肉線維芽細胞では、CD14 依存的な細胞応答を喪失し、内毒素性リポ多糖に応じた IL-8 産生が著しく抑制されるのに対して、CD14 非依存性の phorbol myristate acetate で刺激した場合には、HRgpA 処理細胞の IL-8 産生量に変化はないことを明らかにした。これらの知見は、*P. gingivalis* のジンジパインがヒト歯肉線維芽細胞の CD14 を特異的に分解して、CD14 依存的な免疫応答を喪失させることによって、同菌が宿主の自然免疫機構をエスケープしている可能性を示唆するものである。

以上示した通り、多田君の論文は、歯周病原菌の新たな病原性発揮機構を提示したものであり、慢性感染症である歯周病の病態形成機構を解明する上で有用な情報を提供するものと考えられる。従って、当審査委員会は本論文を博士（歯学）の学位を授与するに相応しいものと判定した。