

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	加藤 佳子
論文審査 委員氏名	主査	野口 俊英	
	副査	中村 洋 金森 孝雄	
論文題名	TNF- α はRab5 と ICAM-1 を介した歯肉上皮細胞内への <i>Porphyromonas gingivalis</i> の侵入を増強する		

インターネットの利用による公表用

歯周病は、歯周病関連細菌の感染と宿主の免疫応答により過剰なサイトカイン産生を生じる慢性炎症性疾患である。歯周病関連細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の病原性の一つに、宿主細胞への付着、侵入能が挙げられる。*P. gingivalis* は細胞内へ侵入することで、抗菌剤や宿主免疫系から逃れ、感染症の難治化を引き起こす可能性が考えられている。

また、細菌が宿主細胞内へ侵入する機序の一つとして物質を取り込む機構であるエンドサイトーシスが挙げられる。**Rab5** はエンドサイトーシスの初期段階の制御に必須な低分子量 G タンパク質として知られている。

Tumor necrosis factor (TNF)- α は、結合組織の破壊や歯槽骨吸収を促進させるなど、歯周病の病態において中心的な役割を果たしている。しかし、歯周組織への *P. gingivalis* の侵入と TNF- α の関連性については明らかにされていない。そこで本研究では、歯肉上皮細胞内へ *P. gingivalis* が侵入する際の TNF- α の影響と、その際の分子機構について検討した。

実験には、ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 細胞を用い、TNF- α を添加して 3 時間培養した後、*P. gingivalis* ATCC33277 株と 1 時間培養した。*P. gingivalis* の細胞内侵入の量的変化を観察するため、抗菌剤を添加した後、滅菌水により細胞を破裂させ、同上清を寒天培地に塗抹する塗抹定量法を行った。また、*P. gingivalis* の細胞内局在を観察するため、免疫染色を行った。

本研究より得られた結果は以下の通りである。

1. TNF- α の *P. gingivalis* の上皮細胞内侵入時に与える影響について検討するため、塗抹定量法を行った。その結果、TNF- α 刺激した細胞では、無刺激の細胞と比較して *P. gingivalis* の侵入は有意に増加した。
2. TNF- α のシグナル伝達は、MAPK 経路と NF- κ B 経路を介することから、MAPK 阻害剤および NF- κ B 阻害剤を作用させ、*P. gingivalis* の細胞内侵入への影響を観察した。p38 阻害剤、JNK 阻害剤および、NF- κ B 阻害剤で前処理した際、*P. gingivalis* の侵入は有意に減少した。
3. Ca9-22 細胞における細胞接着分子 ICAM-1 の発現を確認するため、ウェスタンブロット解析を行った結果、TNF- α 刺激した際、ICAM-1 の発現増加が認められた。次に、*P. gingivalis* の細胞内侵入時への ICAM-1 の関与を調べるため、抗 ICAM-1 中和抗体を作用させ、塗抹定量法を行った結果、抗 ICAM-1 中和抗体で前処理した際、*P. gingivalis* の侵入は有意に減少した。
4. エンドサイトーシスの初期段階の制御に必須な Rab5 に着目し、*P. gingivalis* の細胞内侵入の関与について検討した。Rab5 siRNA を細胞に導入し、塗抹定量法を行った結果、Rab5 の発現が減少した細胞で、*P. gingivalis* の侵入は有意に減少した。
5. Rab5 の活性変化が物質の取り込みに重要であることから、TNF- α が Rab5 の活性変化に影響を与えるか検討するため、MAPK 経路を阻害した際の Rab5 の活性変化を観察した。Rabaptin-5 の活性型 Rab5 結合ドメインである

R5BD と活性型 Rab5 が結合することを利用し、GST-R5BD pull-down を行った。その結果、JNK 阻害剤で前処理した細胞では、Rab5 の活性が有意に減少した。以上の結果より、TNF- α 刺激によって起きる JNK 経路の活性化が、活性型 Rab5 の形成を促進したことが示された。

これらの結果から以下の知見が得られた。本研究から歯周病等により誘導された TNF- α が歯肉上皮細胞に作用し、NF- κ B 経路や MAPK 経路が活性化され、ICAM-1 の発現促進が起き、*P. gingivalis* の細胞付着が増加したことが考えられる。その後、細胞内へ *P. gingivalis* が侵入する際、TNF- α によって活性化された JNK 経路を介して Rab5 の活性変化が起ったと思われる。以上のことから、TNF- α 刺激による ICAM-1 の発現促進と Rab5 の活性変化の促進により、細胞内への *P. gingivalis* の侵入促進が生じたと考えられる。

以上、本研究は歯周病において *P. gingivalis* の細胞内侵入機構の一端を解明し、TNF- α 等のサイトカインの過剰産生を抑えることが重要であることを示した貴重なデータであり、歯科保存学、口腔生化学および関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。