

学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 加藤佳子
論文題目 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	

I. 緒言

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。歯周病の発症・進行には宿主因子、細菌性因子および、環境因子といった多くの因子が関与している。細菌性因子の中で、グラム陰性菌の *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は歯周病の発症や進行と強く関連することが知られている。*P. gingivalis* は、細胞外タンパク分解酵素を有し、組織破壊を引き起こすことが知られている。また、同菌は付着因子を分解し、コロニー形成を促進することが報告されている。歯周病の惹起や進行に関与する *P. gingivalis* の病原性の一つに、宿主細胞への付着、侵入能があげられる。*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。*P. gingivalis* は、エンドサイトーシスを利用して細胞内に侵入する細菌種と考えられている。一方、エンドサイトーシスを制御する重要な宿主因子として、低分子量 G タンパク質の **Rab** が関与しているが、中でも **Rab5** はエンドサイトーシス初期段階の制御に必須なタンパク質として知られている。しかし、*P. gingivalis* の細胞内侵入機構における **Rab5** の関与については未だ不明な点が多い。

歯周病に罹患した歯周組織は、歯周病関連細菌が常に接触していることにより上皮細胞の自然免疫応答が活性化され、また同菌の病原因子により炎症性サイトカインの産生が亢進された状態にある。本来、炎症性サイトカインは免疫反応に必須であるが、産生過剰になると組織破壊を引き起こす。これらのサイトカインの中でも、特に 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 および Rab5 の影響と、その際の分子機構について検討した。

II. 材料および方法

1. 塗抹定量 (*P. gingivalis* invasion assay)

ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 細胞に TNF- α を添加して 3 時間培養した。その後、*P. gingivalis* ATCC33277 株を接種し (Multiplicity of Infection : MOI=100)、1 時間培養した。次いで、抗菌剤を添加した後、滅菌水により細胞を破裂させ、同上清を血液寒天培地に塗抹した。

2. 蛍光免疫染色

P. gingivalis の細胞内局在を確認するため、免疫染色を行った。細胞に TNF- α を添加した後、*P. gingivalis* を接種した。その後、パラホルムアルデ

ヒドで固定し、抗 *P. gingivalis* 抗体を反応させた。画像は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

3. ウェスタンブロット解析

ICAM-1 と TNF 受容体 (TNFR) 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。細胞に TNF- α を添加した後、細胞を回収した。その後、Sample buffer を加え、SDS-PAGE を用いて電気泳動し、検出を行った。

4. Glutathione S-Transferase (GST) - Rab5 binding domain (R5BD) pull-down assay

TNF- α が Rab5 の活性に与える影響を調べるため、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 assay を行った。細胞に p38 阻害剤 (SB203580)、JNK 阻害剤 (SP600125) および、ERK 阻害剤 (PD98059) を添加した。次いで TNF- α を作用させ、回収した細胞融解液と GST-R5BD を結合させたビーズを混和することにより、ビーズに細胞融解液中の活性型 Rab5 を結合させた。その後、ウェスタンブロット解析によって検出を行った。

5. 統計学的解析

TNF- α 刺激の有無および、Rab5 ノックダウンによる細胞内菌数の定量における検定には、Student's t test を用い、 $P < 0.01$ をもって有意とした。また、その他の結果の解析は、one-way ANOVA (Bonferroni/Dunn 法) を用いて、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ をもって有意とした。

III. 結果

1. TNF- α による *P. gingivalis* の歯肉上皮細胞内侵入の増強

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細胞内に侵入した菌数が有意に増加した。次に、免疫染色を行って、細胞内の *P. gingivalis* の局在を観察した。その結果、TNF- α 刺激した細胞では、*P. gingivalis* の細胞内局在が多く認められた。

2. TNF- α による *P. gingivalis* 侵入増強への TNF 受容体 I (TNFR1) の関与

TNF- α 刺激による TNF 受容体を介してシグナル伝達が起きることから、Ca9-22 細胞における TNFR1 と TNFR2 の発現をウェスタンブロット解析によって確認したところ、TNFR1 の発現が確認された。次に、抗 TNFR1 中和抗体を用いて同細胞内への *P. gingivalis* の侵入を観察した結果、抗 TNFR1 抗体で前処理した細胞では、TNF- α による *P. gingivalis* の侵入増強は有意に抑制された。

3. TNF- α による *P. gingivalis* 侵入増強と MAPK および NF- κ B の関与

TNF- α 刺激による転写またはタンパク合成阻害を行い、*P. gingivalis* の細胞内侵入への影響を確認した。その結果、Actinomycin D、または Cycloheximide を作用させた際、*P. gingivalis* の侵入は有意に減少した。

TNF- α のシグナル伝達は、MAPK 経路と NF- κ B 経路を介していることが多数報告されている。そこで、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。

4. *P. gingivalis* の細胞侵入への ICAM-1 の関与

細胞接着分子 ICAM-1 の発現が細菌の細胞内侵入に関与することが報告されている。Ca9-22 細胞における 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。その結果、抗 ICAM-1 中和抗体で前処理した際、細胞内に侵入した菌数は有意に減少した。

5. *P. gingivalis* の細胞侵入への Rab5 の関与

次にエンドサイトーシスに必須な Rab5 と *P. gingivalis* の細胞内侵入の関与について検討した。まず、Rab5 siRNA を細胞に導入した結果、Rab5 の発現が減少した。次に、同 siRNA を細胞に導入し、塗抹定量法を行った。その結果、Rab5 の発現が減少した細胞では、細胞内に侵入した菌数が有意に減少した。

また、Rab5 の活性変化が *P. gingivalis* の細胞内侵入に及ぼす影響について検討した。細胞内の *P. gingivalis* の局在を GFP-Rab5Q79L (活性型 Rab5)、S34N (不活性型 Rab5) を導入した細胞を用いて免疫染色を行った結果、活性

型 Rab5 を発現した細胞で、Rab5 と *P. gingivalis* の共局在を認めた。次に、Rab5 の活性変化時における *P. gingivalis* の細胞内侵入の量的変化を調べた結果、活性型 Rab5 が発現した細胞では、細胞内に侵入した菌数は有意に増加した。

6. TNF- α 刺激による Rab5 の活性への影響

TNF- α が Rab5 の活性に与える影響を調べるため、MAPK 経路を阻害した際の Rab5 の活性を観察した。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 assay 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。

IV. 考察

TNF- α は結合組織の破壊や歯槽骨吸収を促進させるなど、歯周病の病態に重要な役割を果たすことが知られている。また、歯周病関連細菌は、TNF- α を含む種々のサイトカインを誘導する。今回我々は、*P. gingivalis* の細胞内への侵入と TNF- α に着目した。本研究では、*P. gingivalis* の歯肉上皮細胞内への侵入は TNF- α 刺激によって増強されることを初めて明らかにした。このことから、歯周組織における過剰な TNF- α 産生は、歯肉上皮細胞を活性化し、細胞内への *P. gingivalis* の侵入を促進することが考えられる。その結

果、*P. gingivalis* の感染が持続し、歯周組織における過度な免疫反応の延長を引き起こす可能性が示唆される。

また、本研究では TNF- α 刺激による歯肉上皮細胞内への *P. gingivalis* 侵入が増強される際に関与する分子を探索し、侵入機構の解明を行った。まず、エンドサイトーシスの制御に関連する因子として低分子量 G タンパク質である Rab5 に着目し、歯肉上皮細胞内への *P. gingivalis* の侵入過程において、Rab5 が関与することを示した。また、活性型 Rab5 を過剰発現させた細胞で *P. gingivalis* の細胞内侵入が促進されることが明らかとなった。一般的に物質が細胞表面に付着すると、Rab5 が活性化され、その後形成される小胞によって物質の輸送が起きる。同小胞が初期エンドソームと融合した後、Rab5 は不活性化される。このように、Rab5 の活性変化はエンドサイトーシスの初期段階において重要である。本研究の結果から、*P. gingivalis* の細胞内侵入時においても Rab5 の活性変化が関与していることが考えられた。また、TNF- α 刺激によって活性化された JNK 経路が、Rab5 の活性変化に関与することを明らかにした。よって、TNF- α は Rab5 を活性化することにより初期エンドソーム形成を誘導すると考えられた。さらに、TNF- α 刺激による ICAM-1 の発現促進が、それによる *P. gingivalis* の侵入増強に関与することが示された。

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 の発現促進が起きること

によって、*P. gingivalis* の細胞付着が増加したと考えられる。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。

V. まとめ

TNF- α 刺激により、歯肉上皮細胞株 Ca9-22 細胞内への *P. gingivalis* の侵入が増強された。また、同細胞内へ *P. gingivalis* が侵入する分子機構について検討したところ、ICAM-1 と Rab5 を介した経路によって細胞内へ侵入することが明らかとなった。また、TNF- α 刺激した細胞では、ICAM-1 の発現が増加した。さらに、TNF- α 刺激によって起きる JNK 経路の活性化を阻害した際、活性型 Rab5 の減少が認められた。以上の結果から、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って、歯肉上皮細胞内への *P. gingivalis* の侵入促進が生じることが示唆された。