

学 位 論 文 題 名

正常ヒト歯肉線維芽細胞に
intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) を誘導する
Mycoplasma salivarium 細胞膜リポタンパク質について

学位論文内容の要旨

[研究目的]

口腔感染症は内因感染症であり、混合感染症である。したがって、ある特定の病原体を見出そうという試みはほとんど無意味である。しかしながら、感染病巣において優位を占める微生物の生物学的性状の詳細、感染病巣における動態に関する知見なくして口腔感染症の病因論は成り立ち得ない。

歯垢ならびに歯肉溝を主たる生息部位としている *Mycoplasma salivarium* は歯周病巣をはじめとして口腔感染病巣で増殖しており、宿主はこれに対して抗体応答している。これは、*M. salivarium* が口腔感染病巣において何らかの病因的役割を果たしていることを示唆している。*M. salivarium* は潜在的に病原因子となりうる多彩な生物学的活性をそなえている。

本研究は、*M. salivarium* 細胞膜由来リポタンパク質の正常ヒト歯肉線維芽細胞に対する intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 産生誘導活性について検索し、併せて、炎症性サイトカイン産生誘導活性等についても調べることを目的として企画された。

[材料と方法]

M. salivarium 細胞膜の調製：*M. salivarium* ATCC 23064 をウマ血清(10%)添加培地で増殖せた。培養液を $15,000 \times g$ で 15 分間遠心して集め、洗浄した細胞を蒸留水に浮遊させて、超音波処理で破碎し、 $100,000 \times g$ 上清を捨て、沈殿物を細胞膜とした。

リポタンパク質(LPsal)の抽出：トリトン X-114 二相分離法でトリトン X-114 可溶性画分を LPsal とした。

ヒト由来細胞と培養：株化正常ヒト歯肉線維芽細胞 [Gin-1 ATCC CRL-1292 ならびに Gin-F、(旧) 解剖学第一講座]、株化正常ヒト歯根膜線維芽細胞 [PDLF、(旧) 解剖学第一講座]、株化ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC、生化学工業) ならびにヒト末梢単核球 (PBMC) をウシ胎児血清加 DME 培地、RPMI 1640 培地あるいは MCDB 104 培地で培養した。

接着分子ならびにサイトカインの mRNA の分析：*M. salivarium* 細胞膜あるいは LPsal で刺激した細胞から RNA を調製し、RT-PCR で接着分子ならびにサイトカインの mRNA の発現を確認した。

ICAM-1 の測定：Cell-ELISA 法で細胞表面に発現した ICAM-1 を測定した。

ICAM-1 産生誘導活性をもつリポタンパク質の解析：モノサイトブロッティング法で解析した。

[結果]

MS 細胞膜の接着因子 (ICAM-1 ならびに VCAM-1) 発現誘導活性: *M. salivarium* 細胞膜で Gin-1 細胞を刺激すると、ICAM-1 ならびに VCAM-1 の mRNA を発現し、ICAM-1 を細胞表層に発現した。

LPsal の ICAM-1 産生誘導活性: LPsal に *M. salivarium* 細胞膜の ICAM-1 産生誘導活性の約 37% が回収された。この活性は LPsal を proteinase K ならびに endoglucosidase H で処理しても変わらず、lipoprotein lipase 処理で 90% 以上失われた。

LPsal は SDS-PAGE で分子量の異なる多数の画分に分かれ、活性は 40 ~ 50 kDa、60 ~ 80 kDa の複数のリポタンパク質に認められた。これらのタンパク質は proteinase K で消化されて 10 kDa 以下の低分子量の物質となるが、その活性は変わらず、リピッド部分にあることが示唆された。なお、LPsal の活性は polymyxin B 存在下で失活しなかったため、LPS の影響を全く受けていないことが確認された。

LPsal のサイトカイン産生誘導活性: LPsal で Gin-F、PBMC ならびに HUVEC を刺激すると炎症性サイトカインが mRNA レベルで発現した。すなわち、Gin-F は IL-6、IL-8 ならびに MCP-1 を、PBMC は TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 ならびに MCP-1 を、そして HUVEC は IL-8 ならびに MCP-1 を、それぞれ、発現した。

[考察]

ICAM-1 は白血球に発現している LFA-1 ならびに Mac-1 と結合して、白血球の血管外遊出に深くかかわっている。白血球はセレクトインとグリカンとの緩い結合で血管壁に粘着してローリングする。白血球の流速が緩やかになるのに伴い、炎症部位で産生された炎症性サイトカインの刺激によって白血球の LFA-1 ならびに Mac-1 などのインテグリンが活性化され、セレクトインは細胞から遊離していく。インテグリンと血管内皮細胞の ICAM-1、VCAM-1 などとの結合により、白血球は血管内皮細胞へ緊密・強固に接着して、血管外へ遊出する。血管外へ遊出した白血球は IL-8、MCP-1 等のケモカインによって炎症の場へ引き寄せられ線維芽細胞に発現した ICAM-1 と結合し、炎症局所に留まる。

LPsal は血管内皮細胞と歯肉ならびに歯根膜線維芽細胞に ICAM-1 ならびにケモカインの産生を、末梢血単核球には炎症性サイトカインならびにケモカインの産生を誘導する炎症誘発因子であること、そしてその活性はリピッド部分に担われていることを、本研究は明らかにした。

M. salivarium は口腔感染病巣において優位を占める微生物群に属する。本研究は、*M. salivarium* の生物学的活性について新知見を追加し、口腔感染症の病因論に新たな問題を提起した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 邊 継 男

副 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 久保木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

正常ヒト歯肉線維芽細胞に

intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) を誘導する

Mycoplasma salivarium 細胞膜リポタンパク質について

審査委員は、個別に、学位申請論文の内容ならびに関連する事項について口頭試験で試験を行った。学位申請論文の要旨と審査の内容は下記の通りである。

[研究目的] 口腔感染症は内因感染症であり、混合感染症である。したがって、ある特定の病原体を見出そうという試みはほとんど無意味である。しかしながら、感染病巣において優位を占める微生物の生物学的性状の詳細、感染病巣における動態に関する知見なくして口腔感染症の病因論は成り立ち得ない。

歯垢ならびに歯肉溝を主たる生息部位としている *Mycoplasma salivarium* は歯周病巣をはじめとして口腔感染病巣で増殖しており、宿主はこれに対して抗体応答している。これは、*M. salivarium* が口腔感染病巣において何らかの病因的役割を果たしていることを示唆している。*M. salivarium* は潜在的に病原因子となりうる多彩な生物学的活性をそなえている。

本研究は、*M. salivarium* 細胞膜由来リポタンパク質の正常ヒト歯肉線維芽細胞に対する intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 産生誘導活性について検索し、併せて、炎症性サイトカイン産生誘導活性等についても調べることを目的として企画された。

[材料と方法] *M. salivarium* (MS) 細胞膜の調製：MS ATCC 23064 を馬血清 (10%) 添加培地で増殖せた。培養液を $15,000 \times g$ で 15 分間遠心して集め、洗浄した細胞を蒸留水に浮遊させて、超音波処理で破碎し、 $100,000 \times g$ 上清を捨て、沈殿物を細胞膜とした。

リポタンパク質(LPsal)の抽出：トリトン X-114 二相分離法でトリトン X-114 可溶性画分を LPsal とした。

ヒト由来細胞と培養：株化正常ヒト歯肉線維芽細胞 [Gin-1 ATCC CRL-1292 ならびに Gin-F、(旧) 解剖学第一講座]、株化正常ヒト歯根膜線維芽細胞 [PDLF、(旧) 解剖学第一講座]、株化ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC、生化学工業) ならびにヒト末梢単核球 (PBMC) をウシ胎児血清加 DME 培地、RPMI 1640 培地あるいは MCDB 104 培地で培養した。

接着分子ならびにサイトカインの mRNA の分析：MS 細胞膜あるいは LPsal で刺激

した細胞から RNA を調製し、RT-PCR で接着分子ならびにサイトカインの mRNA の発現を確認した。

ICAM-1 の測定: Cell-ELISA 法で細胞表面に発現した ICAM-1 を測定した。

ICAM-1 産生誘導活性をもつリポタンパク質の解析: モノサイトブロッティング法で解析した。

[結果] MS 細胞膜の接着因子 (ICAM-1 ならびに VCAM-1) 発現誘導活性: MS 細胞膜で Gin-1 細胞を刺激すると、ICAM-1 ならびに VCAM-1 の mRNA を発現し、ICAM-1 を細胞表面に発現した。

LPSal の ICAM-1 産生誘導活性: LPSal に MS 細胞膜の ICAM-1 産生誘導活性の約 37% が回収された。この活性は LPSal を proteinase K ならびに endoglucosidase H で処理しても変わらず、lipoprotein lipase 処理で 90% 以上失われた。

LPSal は SDS-PAGE で分子量の異なる多数の画分に分かれ、活性は 40 ~ 50 kDa、60 ~ 80 kDa の複数のリポタンパク質に認められた。これらのタンパク質は proteinase K で消化されて 10 kDa 以下の低分子量の物質となるが、その活性は変わらず、リポッド部分にあることが示唆された。なお、LPSal の活性は polymyxin B 存在下で失活しなかったため、LPS の影響を全く受けていないことが確認された。

LPSal のサイトカイン産生誘導活性: LPSal で Gin-F、PBMC ならびに HUVEC を刺激すると炎症性サイトカインが mRNA レベルで発現した。すなわち、Gin-F は IL-6、IL-8 ならびに MCP-1 を、PBMC は TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 ならびに MCP-1 を、そして HUVEC は IL-8 ならびに MCP-1 を、それぞれ、発現した。

[考察] ICAM-1 は白血球に発現している LFA-1 ならびに Mac-1 と結合して、白血球の血管外遊出に深くかかわっている。白血球はセレクトインとグリカンとの緩い結合で血管壁に粘着してローリングする。白血球の流速が緩やかになるのに伴い、炎症部位で産生された炎症性サイトカインの刺激によって白血球の LFA-1 ならびに Mac-1 などのインテグリンが活性化され、セレクトインは細胞から遊離していく。インテグリンと血管内皮細胞の ICAM-1、VCAM-1 などとの結合により、白血球は血管内皮細胞へ緊密・強固に接着して、血管外へ遊出する。血管外へ遊出した白血球は IL-8、MCP-1 等のケモカインによって炎症の場へ引き寄せられ線維芽細胞に発現した ICAM-1 と結合し、炎症局所に留まる。

LPSal は血管内皮細胞と歯肉ならびに歯根膜線維芽細胞に ICAM-1 ならびにケモカインの産生を、末梢血単核球には炎症性サイトカインならびにケモカインの産生を誘導する炎症誘発因子であること、そしてその活性はリポッド部分に担われていることを、本研究は明らかにした。

M. salivarium は口腔感染病巣において優位を占める微生物群に属する。本研究は、*M. salivarium* の生物学的活性について新知見を追加し、口腔感染症の病因論に新たな問題を提起した。

申請者は審査委員からの下記の質問に対して明快に回答し、専門領域のみならず、関連領域についても十分な知識を持っているものと判断された。

以上の所見に基づき、申請者は博士(歯学)を授与される資格があるものと認める。

1. *M. salivarium* 細胞膜で刺激した Gin-1 細胞に発現する VCAM-1 量の経時的変化。2. proteinase K 未処理 LPSal の 10 kDa 以下の画分に活性が認められない理由。3. ICAM-1 産生誘導活性を担うリポッドの種類と構造。4. PBMC で ICAM-1 の発現を調べなかった理由。5. Gin-1、Gin-F、HUVEC ならびに PDLF に対する ICAM-1 発現誘導活性の強度の順位。6. Gin-1、Gin-F、HUVEC、PDLF ならびに PBMC に対する VCAM-1 発現誘導活性を調べなかった理由。7. トリトン

X-114 二相分離法によるリボプロテイン分離法。 8. モノサイトウエスタン法の原理。
9. LPS の構造。 10. LPS とポリミキシン B との結合様式。 11. LPsal に対する Gin-1
細胞のレセプター。 12. マイコプラズマ細胞の構造。 その他。