

## 学位論文題名

## Oral microbial modulins capable of inducing interleukin-6 production by human gingival fibroblasts

(ヒト歯肉線維芽細胞によるインターロイキン6産生を誘導する口腔微生物由来モジュリン)

## 学位論文内容の要旨

Interleukin (IL)-6 は代表的な炎症性サイトカインのひとつであり、B 細胞を形質細胞へ分化させ抗体産生を誘導したり、T 細胞の活性化と増殖、CRP などの急性期蛋白の産生を誘導するなど、炎症に関わる多くの機能を有している。また、IL-6 は可溶性の IL-6 受容体の存在下で強力な骨吸収活性を発揮することも知られている。歯周病は歯槽骨の吸収を特徴とする病変であることから、IL-6 が歯周病において重要な役割を果たしていると考えられる。我々はヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に IL-6 産生を誘導する口腔微生物由来モジュリンの精製を試みた。なお、モジュリンとは宿主細胞にサイトカイン産生を誘導し、それにより細胞の挙動を調節し、病態に関与する微生物由来の物質をいう。本研究では、ヒトの口腔に存在する微生物の中で、2 種のマイコプラズマと *Bacteroides forsythus* のモジュリンについて調べたので、その成績を報告する。

マイコプラズマは細胞壁を欠く自己増殖可能な最小の微生物である。*Mycoplasma salivarium* はヒトの口腔から検出され、主に歯垢ならびに歯肉溝に常在している。*M. salivarium* は、*M. hominis*、*M. penetrans*、*M. pirum*、*M. pneumoniae*、*M. arthritidis*、*M. arginini* ならびに *M. fermentans* と同様に HGF に IL-6 ならびに IL-8 の産生を誘導することが報告されている。

*M. salivarium* 細胞を超音波で破碎し、細胞膜成分と細胞内成分 (可溶性画分) に分け、HGF に対する IL-6 産生誘導活性を測定した。その結果、細胞膜成分ならびに可溶性画分にモジュリンが存在することがわかった。そこで、*M. salivarium* 由来可溶性モジュリンの精製を試み、その性状を調べた。超音波で破碎した *M. salivarium* 細胞の 100,000 ×g 上清から、可溶性モジュリンをイオン交換クロマトグラフィーで精製した。最終標品では、20.6 kDa のタンパク質 (MsA) が活性に関与していることが示唆された。リポポリサッカライド (LPS) の活性発現には血清中に存在する LPS binding protein が必要であることから、MsA ならびに LPS の IL-6 産生誘導活性に対する牛胎児血清 (FBS) の影響を調べた。LPS の活性は FBS の濃度依存的に上昇したのに対し、MsA の活性は FBS の影響をまったく受けなかった。このことから、MsA は LPS と異なる経路で IL-6 の産生誘導を行っていることがわかった。また、MsA は単球・マクロファージ系細胞の THP-1 細胞に tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  産生

を誘導した。以上のことから、MsA は *M. salivarium* の可溶性モジュリンのひとつであり、HGF ならびにマクロファージの活性化に関与すると推測された。

*M. fermentans* はヒトの尿道から分離されたことから、尿道に常在しているものと考えられている。その後、リウマチ性関節炎患者やエイズ患者からも分離された。さらに、PCR 法によりヒト口腔や顎関節症患者の関節滑液からも検出された。そこで、*M. fermentans* 由来の可溶性モジュリンの存在について調べた。その結果、*M. fermentans* の培養上清には HGF に対して IL-6 産生を誘導する物質が存在することがわかった。本活性と生細胞数の関係を調べたところ、本活性は生細胞数の増加に伴って上昇し、培養開始から 150 時間で最高に達し、320 時間までそのレベルを維持していた。そこで、*M. fermentans* 培養上清の可溶性モジュリンの精製を試みた。

*M. fermentans* を 3 日間液体培地で培養し、培養上清から HPLC によるゲルろ過ならびに逆相クロマトグラフィーで可溶性モジュリンを精製した。最終標品の SDS-PAGE では 4.1 kDa のバンドのみが観察された。また、最終標品は anti-*M. fermentans* と反応したが *M. fermentans* 免疫前血清とは反応しなかったので、本標品は *M. fermentans* 細胞由来の物質であることがわかった。このことから、本活性は *M. fermentans* 細胞由来の 4.1 kDa のポリペプチド (P4.1) によるものであると推測された。P4.1 の活性は lipoprotein lipase の影響を受けなかったため、本活性がリポタンパク質によるものではないことがわかった。以上のことから、*M. fermentans* の培養上清には増殖に伴って P4.1 が産生され、HGF に対する IL-6 産生誘導活性に関与していることが示唆された。

*B. forsythus* はグラム陰性偏性嫌気性桿菌であり、歯周病原細菌のひとつと考えられている。*B. forsythus* は歯周病患者の深在性ポケットから検出され、活動期の歯周病患者の歯周ポケットで著しく増加することから、歯周病の悪化に関係があると考えられている。しかしながら、本菌の有する病原因子としてはトリプシン様プロテアーゼなど組織破壊性酵素活性や、付着因子として細胞表面タンパク質について報告されていただけである。最近、本菌ならびにその培養上清に、アポトーシス誘導活性を有するタンパク質の物質が存在すると報告された。我々は *B. forsythus* 由来リポタンパク質の生物活性に注目した。

Triton X-114 二相分離法により *B. forsythus* からリポタンパク質画分 (BfLP) を調製した。BfLP は HGF に対して濃度依存的に IL-6 産生を誘導した。BfLP を lipoprotein lipase ならびに proteinase K で処理すると、IL-6 産生誘導活性が 60% 程度減少した。また、Polymyxin B が BfLP の IL-6 産生誘導活性に影響を与えなかったことから、この活性は LPS の混入によるものではないことがわかった。CD14 あるいは CD14 ならびに Toll-like receptor (TLR) 2 あるいは 4 の遺伝子をトランスフェクトした Chinese hamster ovary 細胞を BfLP で刺激したところ、BfLP のレセプターは TLR2 であることが示唆された。また、monocyte western blotting 法により、*B. forsythus* には IL-6 産生誘導活性を有する複数のリポタンパク質が存在することがわかった。

以上のことから、*M. salivarium*、*M. fermentans* ならびに *B. forsythus* は LPS と異なるモジュリンを有しており、歯周病において何らかの病因的役割を果たしていることが示された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柴 田 健 一 郎  
副 査 教 授 鈴 木 邦 明  
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

## Oral microbial modulins capable of inducing interleukin-6 production by human gingival fibroblasts

(ヒト歯肉線維芽細胞によるインターロイキン6産生を誘導する口腔微生物由来モジュリン)

申請者はすでに出版された impact factor 1.07 ならびに 4.20 の 2 論文と、現在まとめている論文の 3 章からなる原著引用論文を提出している。審査は柴田、鈴木、田村審査員出席のもとに、申請者に対し提出論文の内容と、それに関する口頭試問が行われた。

マイコプラズマは最小の生命体ということで多くの研究がなされている。この微生物は細胞壁を有しないために、LPS、リポタイコ酸、ペプチドグリカンなどを欠如しているが、ヒトではマイコプラズマ肺炎、動物では肺炎、関節炎などの重篤な病気を惹起する。しかしながら、病原性については不明な点が多く残されている。

細菌学教室ではマイコプラズマが歯肉線維芽細胞 (HGF)、リンパ球ならびにマクロファージを活性化することを見出し、その原因物質に関する生物学的研究を一つのテーマとしている。申請者は口腔マイコプラズマならびに歯周病原細菌の一つである *Bacteroides forsythia* に存在する HGF を活性化する物質に関する生物学的研究を行っている。

申請者は本原著引用論文において以下のことを明らかにしている。

口腔マイコプラズマの一つである *M. salivarium* 細胞について以下のことを明らかにした。

*M. salivarium* は口腔疾患だけでなく、関節炎などとの関連性が注目されているマイコプラズマである。

1. 超音波で破碎した *M. salivarium* 細胞の 100,000 ×g 上清から、HGF を活性化し、IL-6 の産生を誘導する 20.6 kDa のタンパク質を精製した。本タンパク質はその精製法から細胞内のタンパク質であると考えられる。
2. 本タンパク質は HGF だけでなく、マクロファージを活性化し、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  産生を誘導する活性を有していた。
3. 本タンパク質による HGF ならびにマクロファージ活性化のメカニズムは、リポポリサッカライド (LPS) とは異なる。

尿道ならびに口腔に存在する *M. fermentans* について以下のことを明らかにした。*M. fermentans* はエイズ、リウマチ性関節炎ならびに尿道炎などにおける病因的役割が注目されている。

1. *M. fermentans* の培養上清には HGF に対して IL-6 産生を誘導する物質が存在する。本物質の有する活性は生細胞数の増加に伴って上昇し、培養開始から 150 時間で最高に達し、320 時間までそのレベルを維持していたことから、本マイコプラズマの細胞外に放出したものであると推測している
2. 本活性物質を精製し、4.1 kDa のポリペプチドであることを明らかにした。
3. 本物質は anti-*M. fermentans* と反応したが、免疫前血清とは反応しなかったことから、*M. fermentans* 細胞由来の物質であることを明らかにした。
4. 本物質の活性は lipoprotein lipase の影響受けなかったことから、リポタンパク質によるものではないことを明らかにした。

歯周病原細菌のひとつである *B. forsythus* について以下のことを明らかにした。*B. forsyth* は歯周病患者の深在性ポケットから検出され、活動期の歯周病患者の歯周ポケットで著しく増加することから、歯周病の悪化に関係があると考えられている。

1. Triton X-114 二相分離法により *B. forsythus* からリポタンパク質画分 (BfLP) を調製した。BfLP は HGF に対して濃度依存的に IL-6 産生を誘導した。
2. BfLP を lipoprotein lipase ならびに proteinase K で処理すると、IL-6 産生誘導活性が 60% 程度減少した。また、Polymyxin B が BfLP の IL-6 産生誘導活性に影響を与えなかったことから、この活性は LPS の混入によるものではないことがわかった。
3. CD14 あるいは CD14 ならびに Toll-like receptor (TLR) 2 あるいは 4 の遺伝子をトランスフェクトした Chinese hamster ovary 細胞を BfLP で刺激したところ、BfLP のレセプターは TLR2 であることが示唆された。
4. monocyte western blotting 法により、*B. forsythus* には IL-6 産生誘導活性を有する複数のリポタンパク質が存在することがわかった。
5. BfLP が単球系細胞株ならびに上皮細胞に細胞死を誘導することを明らかにした。

以上のことから、*M. salivarium*、*M. fermentans* ならびに *B. forsythus* は LPS と異なる物質を有しており、これらの物質が歯周病において何らかの病因的役割を果たしているのではないかと示唆した。

続いて、審査担当者から本研究およびその関連事項について種々の質問がなされた。

1. 関節炎に関係するとして場合の伝播の経路について
2. マイコプラズマのゲノムについて
3. *M. fermentans* の培養上清を硫酸分画したときに何%の活性化が回収されるのかについて
4. IR スペクトルの見方について
5. Toll-like receptor と名前の起源について
6. 細胞死の測定方法について
7. Toll-like receptor の細胞毒性との関与について
8. リポタンパク質の病因的役割について

以上より、本論文内容が高く評価されるとともに、申請者は広い知識を有し、博士 (歯学) を授与するのに値するものと判定された。