

学位論文題名

Signaling pathways induced by lipoproteins derived from *Mycoplasma salivarium* and a synthetic lipopeptide (FSL-1) in normal human gingival fibroblasts

(正常ヒト歯肉線維芽細胞における *Mycoplasma salivarium* 由来リポタンパク質ならびに合成リポペプチド (FSL-1) 誘導のシグナル経路)

学位論文内容の要旨

【目的】 *Mycoplasma salivarium* 由来リポタンパク質 (LPsal) はヒト正常歯肉線維芽細胞 (HGF) に interleukin-6 (IL-6)、IL-8 の産生ならびに細胞間接着分子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現を誘導する。*Mycoplasma salivarium* の細胞膜に存在する 44 kDa のリポタンパク質の活性部位は N 末端リポペプチド部分であり、その構造は S-(2,3-bisacyloxypropyl) CGDPKHPKSFTIEWVD-である。本研究では、その構造をもとに合成したリポペプチド S-(2,3-bisacyloxypropyl) CGDPKHPKSF (FSL-1) ならびに LPsal による Mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ)、転写因子 activator protein-1 (AP-1)ならびに nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性化について検討した。

【方法】 HGF は 10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DME) でコンフルエントに達するまで培養した。

Mycoplasma salivarium ATCC 23064 は 10% ウマ血清、1% 酵母抽出液ならびに 1% L-arginine を含む PPLO 培地で培養した。

LPsal は Triton-X 114 による二相分離法によって、*Mycoplasma salivarium* 細胞から抽出した。

コンフルエントに達した HGF に LPsal (最終濃度 40 μ g/ml) あるいは FSL-1 (最終濃度 50 ng/ml) を加え、0、15、30、60 分間インキュベートした後、SDS サンプルバッファで処理した。次に、リン酸化ならびに非リン酸化 p38、stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) ならびに extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) に対する抗体を用い、Western blotting 法を行うことにより、経時的に MAP キナーゼの活性化を調べた。なお、検出は化学発光法を利用した ECL キットを用いた。また、LPsal 刺激による HGF の IL-6 産生誘導活性に及ぼす SB203580 (p38 の阻害剤) ならび

に PD98059 (ERK1/2 を活性化する MEK-1 の阻害剤) の影響を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で調べた。

転写因子 AP-1 ならびに NF- κ B の活性化は、HGF を LPsal もしくは FSL-1 で 0、1、2、4 時間刺激後、mini-extract 法で核タンパクを抽出し、AP-1 もしくは NF- κ B の認識配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて electrophoretic mobility gel shift assay (EMSA) で測定した。なお、検出されたバンドの特異性は過剰量の非標識オリゴヌクレオチドを加えることによりシグナルが消失することで評価した。

I κ B のリン酸化は HGF に LPsal を加え、0、30、60 分間インキュベートした後、SDS サンプルバッファーで処理した。次に、リン酸化ならびに非リン酸化 I κ B- α の抗体を用いて Western blotting 法で調べた。

【結果】 HGF の LPsal もしくは FSL-1 刺激により SAPK/JNK ならびに p38 の活性化が誘導され、刺激後 30 分で最大に達し、60 分でもほぼそのレベルを維持していた。なお、活性化されていない SAPK/JNK ならびに p38 は無刺激でもバンドが検出され、かつ経時的な変化が見られなかった。ERK1/2 は無刺激でも活性化されており、LPsal もしくは FSL-1 刺激による活性化の程度は増強されることがなかった。

LPsal もしくは FSL-1 の IL-6 産生誘導活性は SB203580 で阻害されたが、PD98059 ではほとんど影響を受けなかった。

HGF の LPsal もしくは FSL-1 刺激により AP-1 ならびに NF- κ B の活性化が誘導された。

NF- κ B の阻害剤である I κ B- α は、刺激後 30 分でリン酸化され、60 分でもほぼそのレベルを維持していることがわかった。一方、非リン酸化 I κ B- α は無刺激でもシグナルが検出され、かつ経時的に伴い減少した。この結果は、EMSA で得られた NF- κ B が活性化されるという結果を支持するものである。

以上の結果から、*Mycoplasma salivarium* 由来リポタンパク質 LPsal およびその合成リポペプチド FSL-1 刺激により歯肉線維芽細胞 HGF に与えられたシグナルは MAP キナーゼ p38 ならびに SAPK/JNK を経由し、転写因子 AP-1 ならびに NF- κ B の活性化を通して IL-6 の産生に導かれることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 畑 昇

副 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Signaling pathways induced by lipoproteins derived from *Mycoplasma salivarium* and a synthetic lipopeptide (FSL-1) in normal human gingival fibroblasts

(正常ヒト歯肉線維芽細胞における *Mycoplasma salivarium* 由来リポタンパク質ならびに合成リポペプチド (FSL-1) 誘導のシグナル経路)

審査は柴田、鈴木および大畑審査委員全員が出席のもとに、まずは論文提出者に対して提出論文の内容の要旨を説明させ、提出論文の内容に関する審査委員の口頭試問を行った。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

1. 提出論文の要旨

Mycoplasma salivarium (Ms) 由来リポタンパク質 (LPsal) はヒト正常歯肉線維芽細胞 (HGF) に interleukin-6 (IL-6)、IL-8 の産生ならびに細胞間接着分子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現を誘導する。今回は、Ms の細胞膜に存在する 44 kDa のリポタンパク質の活性部位である N 末端リポペプチドの構造をもとに合成したりポペプチド (FSL-1) ならびに LPsal による Mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ)、転写因子 AP-1 ならびに NF- κ B の活性化について検討した。

HGF は 10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DME) でコンフルエントに達するまで培養した。

LPsal は Triton-X 114 による二相分離法によって、Ms 細胞から抽出した。

コンフルエントに達した HGF に LPsal (最終濃度 40 μ g/ml) あるいは FSL-1 (最終濃度 50 ng/ml) を加え、0、15、30、60 分間インキュベートした後、SDS サンプルバッファーで処理した。次にリン酸化された p38、stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) ならびに extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) に対する抗体を用い、Western blotting 法を行うことにより、経時的に MAP キナーゼの活性化を調べた。また、LPsal 刺激による HGF の IL-6 産生誘導活性に及ぼす SB203580 (p38 の阻害剤) ならびに PD98059 (ERK1/2 を活性化する MEK-1 の阻害剤) の影響を ELISA 法で調べた。

更に転写因子 AP-1 ならびに NF- κ B の活性化においては、HGF を LPsal もしくは FSL-1 で 0、1、2、4 時間刺激後、mini-extract 法で核タンパクを抽出し、AP-1 もしくは NF- κ B を特異的に認識するプローブを用いてゲルシフトアッセイを行った。尚、検出されたバンドの特異性は過剰量の非標識プローブを用いた競合実験で確認した。

HGF の LPsal もしくは FSL-1 刺激により p38 ならびに SAPK/JNK の活性化が誘導され、刺激後 30 分で最大に達し、60 分でもほぼそのレベルを維持していた。ERK1/2 は無刺激でも活性化されており、LPsal もしくは FSL-1 刺激による活性化の程度は増強されることがなかった。

LPsal もしくは FSL-1 の IL-6 産生誘導活性は SB203580 で阻害されたが、PD98059 では何の影響も受けなかった。

HGF の LPsal もしくは FSL-1 刺激により AP-1 ならびに NF- κ B の活性化が誘導され、刺激後 1 時間でピークが観られ、以後減少した。

以上の結果から、Ms 由来リポタンパク質 LPsal およびその合成リポペプチド FSL-1 刺激により歯肉線維芽細胞 HGF に与えられたシグナルは MAP キナーゼ p38 ならびに SAPK/JNK を経由し、転写因子 AP-1 ならびに NF- κ B の活性化を通して IL-6 の産生に導かれることが示唆された。

2. 審査委員からの質問

- (1) 炎症性サイトカインならびに細胞間接着因子 ICAM-1 の特徴について
- (2) Triton-X 114 による二相分離法のメカニズムについて
- (3) LPsal ならびに FSL-1 刺激における転写因子の活性化のピークの違いについて
- (4) NF- κ B 活性化のメカニズムについて
- (5) 微生物由来リポタンパク質リポペプチドを認識するレセプターの特徴について
- (6) 本研究の臨床的応用法ならびにその展望について

以上のような質問について、論文提出者はそれぞれに的確に解答し、考察・展望について明確に言及した。

論文提出者は、正常ヒト歯肉線維芽細胞における口腔マイコプラズマ由来リポタンパク質ならびにその合成リポペプチドのシグナル伝達系について検討した。本研究のような基礎的見解を今後の臨床へ応用する展望についても深く考察しており、将来性の点においても評価できる。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいと認めた。