

# 口腔マイコプラズマ由来リポタンパク質は Toll-like receptor 2 で認識される

## 学位論文内容の要旨

【目的】 歯周疾患は歯肉溝における細菌性プラークの蓄積と宿主免疫応答機構とのアンバランスにより惹起される慢性的な炎症性疾患であり、現時点では、ヒトの歯周疾患の発症には、ある特定のグラム陰性細菌群が重要な役割を果たしていると考えられている。

歯周疾患患者の炎症局所においては、リンパ球、マクロファージなどの浸潤が著明で、リンパ球と歯肉線維芽細胞(hGF)が直接相互作用していることが明らかにされている。現在、歯周病原性細菌と呼ばれているグラム陰性細菌はhGFにIL-1、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカインの産生とともに、細胞接着分子の1つであるintercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)の発現を誘導すること、また、その活性物質の1つはこれらの細菌のリポ多糖体(LPS)であることが明らかにされている。LPSはグラム陰性細菌の主要な細胞壁構成成分で、主要な病原因子の1つであり、上記のような活性以外にも様々な炎症反応の惹起に関わっていることが明らかにされている。近年、このLPSやリポタイコ酸等を有しない口腔マイコプラズマと歯周疾患との関連を示すいくつかの報告がなされている。マイコプラズマは、他の一般細菌群と構造が異なり、細胞壁を欠いた自己増殖可能な最小の微生物である。これまでに、口腔マイコプラズマとしていくつかの種が分離同定されているが、これらの中で*Mycoplasma salivarium*は最も高率に分離され、主な棲息部位はプラークと歯肉溝内であり、歯肉溝からの検出率ならびに抗体価は歯周疾患患者では健常者に比べて有意に高いことが知られている。また、*M. salivarium*がhGFに炎症性サイトカインであるIL-6、IL-8の産生ならびにICAM-1などの細胞接着分子の発現を誘導し、さらに、マクロファージを活性化することも報告されている。これらのことから、*M. salivarium*は歯周疾患を含むいくつかの口腔感染症において何らかの病因的役割を果たしているものと推測されている。

そこで、本研究では、hGFを活性化する*M. salivarium*由来物質ならびにその受容

体を同定することを目的として実験を行った。

【方法と結果】 hGF をコンフルエントの状態になるまで培養した後、口腔マイコプラズマで刺激したところ、*M. salivarium* 細胞、その細胞膜 (CM) ならびに *M. orale* 細胞は細胞変性活性を示した。また、*M. salivarium* 細胞と CM とを比較した場合、CM の活性が強いことが判明した。

これらのことから、hGF に対する *M. salivarium* の細胞変性活性を担う物質は CM に存在する物質ではないかと推測した。この細胞変性活性はアポトーシスにより説明できるのではないかと考え、染色体 DNA の断片化、カスパーゼの活性化等を調べたが、アポトーシスを実証する証拠は得られなかった。そこで、このような細胞変性活性を示すということは、これらのマイコプラズマが hGF と強い相互作用をし、何らかのサイトカインの産生を誘導しているのではないかと考えた。

hGF に *M. salivarium* 細胞の WC 浮遊液を加え、16 時間培養した後遠心し、上清と沈査に分離した。上清に含まれる IL-6 および IL-8 の産生量は ELISA 法で測定し、更に hGF 細胞から全 RNA を抽出し、サイトカインの mRNA の発現を RT-PCR 法で調べた。その結果、*M. salivarium* 細胞は hGF に IL-6 および IL-8 の産生ならびにそれらの mRNA の発現を誘導した。

これまでに、マイコプラズマのリポタンパク質 (LP) はマクロファージを活性化して炎症性サイトカインを誘導することが明らかにされている。そこで、*M. salivarium* の CM から TritonX-114 二相分離法により LP を抽出し (LPsal)、hGF に対する IL-6 産生誘導活性を調べた。

その結果、LPsal は濃度依存的に IL-6 産生誘導活性を示し、その活性は CM に比較し明らかに強いものであった。このことから、hGF に対する IL-6 産生誘導活性を担う物質はマイコプラズマ細胞膜の LP であることが示唆された。

次に、LPsal がどのような受容体で認識され、細胞内にシグナルが伝達されるのかをチャイニーズハムスター卵巣 (CHO-K1) 細胞を使用し、転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 依存性のレポーターアッセイ法により調べた。すなわち、CHO-K1 細胞に CD14 を導入した 3 E10 細胞に、pFLAG ベクター (Eastman Kodak 社) に導入したヒトの TLR2 あるいは TLR4 の cDNA 遺伝子を、NF- $\kappa$ B 依存性の CD25 レポーター遺伝子とともにトランスフェクトした細胞 (CHO/CD14、CHO/CD14/TLR2 ならびに CHO/CD14/TLR4) を用い、発現した CD25 をフローサイトメーターにより測定した。

その結果、LPsal 刺激により CHO/CD14 および CHO/CD14/TLR4 細胞において CD25 の発現は認められなかったが、CHO/CD14/TLR2 細胞においては CD25 の発現が認められた。このことから、CHO-K1 細胞における LP の細胞内シグナル伝達は TLR2 を介して行われているものと推測された。

我々は TLR2 分子ならびに mRNA が hGF に発現していることを既に明らかにして

いる(未発表データ)。そこで、抗 TLR2 抗体が hGF に対する LP の IL-6 産生誘導活性を阻害するのか否かを調べた。その結果、抗 TLR2 抗体濃度が増加するに従い IL-6 の産生が抑制された。このことから、hGF に対する LPsal の細胞内シグナル伝達は TLR2 を介して行われているものと推測された。

【考察と結論】 口腔マイコプラズマである *M. salivarium* は歯周結合組織である hGF に、炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 の産生を誘導した。その活性物質は *M. salivarium* の細胞膜に存在する LP であることが示唆された。また、この LP の受容体の同定を、CHO-K1 細胞のトランスフェクタントを用いて行ったところ、Toll-like receptor 2 (TLR2) により認識されることが明らかにされた。この TLR2 は、hGF 上においても発現が認められ、また、抗 TLR2 抗体により LP のサイトカイン誘導活性が阻害されたことから、hGF における *M. salivarium* 由来 LP のサイトカイン誘導活性は TLR2 を介して行われているものと推測された。

これらのことから、hGF における炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 の産生は、TLR2 による抗原の認識とそれによって惹起された細胞内シグナルにより誘導されたものと推測される。このように、*M. salivarium* が hGF に炎症性サイトカインならびに接着分子等を誘導する活性を有することは、本マイコプラズマが歯周疾患などの炎症局所で何らかの病因的役割を果たしているものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久  
副 査 教 授 柴 田 健 一 郎  
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

## 口腔マイコプラズマ由来リポタンパク質は Toll-like receptor 2 で認識される

審査は柴田、鈴木両副査が一同に会して、小口主査は個別に実施し、学位申請者に対して提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

ヒト正常歯肉線維芽細胞 (hGF) をコンフルエントの状態になるまで培養した後、代表的な口腔マイコプラズマである *M. salivarium* 細胞、その細胞膜ならびに *M. orale* 細胞で刺激したところ、hGF は形態変化を起こし、最終的には培養器から剥がれた。この細胞変性活性を *M. salivarium* 細胞と細胞膜とで比較したところ、細胞膜が強い活性を有していた。このことから、hGF に対する *M. salivarium* の細胞変性活性を担う物質は細胞膜に存在する物質ではないかと推測した。この細胞変性活性はアポトーシスにより説明できるのではないかと考え、染色体 DNA の断片化、カスパーゼの活性化などを調べたが、アポトーシスを実証する証拠は得られなかった。そこで、このような細胞変性活性を示すということは、これらのマイコプラズマが hGF と強い相互作用し、なんらかのサイトカインの産生を誘導しているのではないかと考えた。hGF を *M. salivarium* 細胞浮遊液で刺激したところ、炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 が産生されていることがわかった。さらに、hGF から全 RNA を抽出し、これらのサイトカインの mRNA の発現を RT-PCR 法で調べたところ、それらの mRNA の発現も誘導されていることが確認された。

マイコプラズマ細胞膜に存在するリポタンパク質 (LP) がマクロファージを活性化して炎症性サイトカインを誘導することがこれまでに明らかにされていることから、hGF に炎症性サイトカインを誘導する物質は LP ではないかと推測した。そこで、*M. salivarium* の細胞膜から TritonX-114 二相分離法により LP を抽出し、hGF に対する

IL-6 産生誘導活性を調べた。その結果、LP は濃度依存的に IL-6 産生誘導活性を示し、その活性は細胞膜に比較して明らかに強いものであった。このことから、hGF に対する IL-6 産生誘導活性を担う物質は *M. salivarium* 細胞の細胞膜に存在する LP であることが示唆された。

次に、マイコプラズマの細胞膜 LP がどのような受容体で認識され、細胞内にシグナルが伝達されるのかをチャイニーズハムスター卵巣 (CHO-K1) 細胞を使用し、転写因子 NF- $\kappa$ B 依存性のレポーターアッセイ法により調べた。すなわち、CHO-K1 細胞に CD14 を導入した細胞に、ヒトの Toll-like receptor 2 (TLR2) あるいは TLR2 と TLR4 の cDNA 遺伝子を NF- $\kappa$ B 依存性の CD25 レポーター遺伝子とともに導入した細胞 (CHO/CD14、CHO/CD14/TLR2 ならびに CHO/CD14/TLR4) を用いた。

その結果、LP 刺激により CHO/CD14 および CHO/CD14/TLR4 細胞において CD25 の発現は認められなかったが、CHO/CD14/TLR2 細胞においては CD25 の発現が認められた。このことから、CHO-K1 細胞における LP の細胞内シグナル伝達は TLR2 を介して行われているものと推測された。柴田らは TLR2 が hGF に発現していることを既に明らかにしている。そこで、抗 TLR2 抗体が hGF に対する LP の刺激により IL-6 産生の誘導活性を阻害するか否かを調べた。その結果、抗体濃度依存的に IL-6 の産生が阻害された。このことから、hGF に対する LP の細胞内シグナル伝達は TLR2 を介して行われているものと推測された。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われた。主な質問事項は以下のとおりである。

- 1) マイコプラズマの構造上の特性と *M. salivarium* の病原性について
- 2) 歯周疾患の炎症局所における炎症性サイトカイン (IL-6、IL-8) と細胞接着分子 (ICAM-1) の役割について
- 3) 自然免疫と Toll-like receptor の病原体認識機構について

これらの質問に対しそれぞれ適切な回答が得られ、また、本研究は、口腔マイコプラズマが hGF に炎症性サイトカインを誘導する物質が LP であり、そのレセプターが現在自然免疫系でもっとも注目されている TLR2 であることを明らかにした点、さらに口腔微生物由来リポタンパク質が歯周疾患においてなんらかの病因的役割を果たしている可能性を示唆した点が高く評価された。

現在、さらに詳細な解析の準備を進めており、将来の展望についても評価された。したがって、学位申請者は博士 (歯学) の学位授与に相応しい者と認められた。