

Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides induce maturation of dendritic cells with CD14+CD16+ phenotype

著者	金谷 聡介
号	29
学位授与番号	288
URL	http://hdl.handle.net/10097/36445

氏名(本籍) : 金谷聡介

学位の種類 : 博士(歯学) 学位記番号 : 歯博第288号

学位授与年月日 : 平成16年3月25日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides induce maturation of dendritic cells with CD14⁺CD16⁺ phenotype

(*Porphyromonas gingivalis* リポ多糖による CD14⁺CD16⁺ 樹状細胞の誘導)

論文審査委員 : (主査) 教授 島内 英俊

教授 高田 春比古 教授 真柳 秀昭

論文内容要旨

歯周病巣局所において、歯周病原性細菌あるいは同菌体成分の侵入に対して Th1 および Th2 タイプのヘルパーT細胞が集積され、これらに特異的な細胞性ならびに体液性免疫が活発に誘導されていることが、従来から報告されている。樹状細胞(DC)は、特異免疫応答の開始に重要な役割を果たすことが知られているが、歯周病巣局所においても歯周病原性細菌由来菌体成分により活性化された Langerhans cell や interstitial dendritic cell などの DC が、ナイーブあるいはメモリーT細胞に対する抗原提示を行うとともに、種々のサイトカイン産生などを介して免疫応答に調節的な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、歯周病原性細菌による DC の活性化についてはあまり明らかではない。そこで本研究では、成人性歯周炎の主たる病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) 由来の菌体成分である LPS による DC 活性化機構を検討した。DC はヒト末梢血単球から IL-4, GM-CSF 存在下で培養し、抗 CD14 抗体を用いたネガティブセレクションにて精製したものを実験に供試した。LPS は *Pg* 381 株菌体からフェノール水法で抽出したものをを用い、対照として *E. coli* LPS による刺激を行った。DC 表面抗原ならびに LPS レセプターの発現誘導は FACS あるいは RT-PCR 法により、また培養上清への sCD14 産生は ELISA にて検討した。各種菌体成分刺激後の DC からのサイトカイン産生は、24時間刺激後の培養上清を試料として ELISA 法で測定を行った。DC の貪食能は FACS を用いて検討した。なお、T細胞増殖誘導活性については [³H] の取込みを指標として測定した。

E. coli LPS 刺激 DC においては CD14, CD16 いずれの発現もみられないのに対し、*Pg* LPS 刺激では CD14⁺CD16⁺ の細胞群の明確な誘導がみられた。さらに、*Pg* LPS 刺激により著明な sCD14 の産生の増加がみられるのに対し、*E. coli* LPS 刺激ではごく弱い誘導しかみられなかった。また、*Pg* LPS 刺激 DC においても CD1a は無刺激および *E. coli* LPS 刺激 DC と同程度に発現がみられるが、DC 成熟化のマーカーである CD83 は *E. coli* LPS 刺激によって発現が増強するのに対し、*Pg* LPS 刺激では発現の増強がみられなかった。

このことから、*Pg* LPSはDCの成熟化を抑制するのではないかと考えられた。また、HLA-DRについては*E. coli* LPS、*Pg* LPSともに同様の誘導がみられたが、CD80、CD86およびCD40については、*Pg* LPSによる発現誘導が弱い傾向がみられた。また、CD54については両LPSで強い誘導がみられた。また、*Pg* LPS刺激によるDCからのIL-6、IL-8、IL-10、IL-12およびRANTES産生、さらにT細胞増殖誘導活性も*E. coli* LPS刺激に比べ弱かった。以上の結果から、*Pg* LPSはDCの強い成熟化を引き起こさず、特異なDCサブセットを誘導することが示唆され、これらの細胞群は歯周炎における慢性炎症成立に関与する可能性があると考えられる。

審 査 結 果 要 旨

樹状細胞 (Dendritic cells; DC) は、種々の歯周病原性細菌由来菌体成分により活性化されて、歯周病巣局所での特異免疫応答の開始ならびにその調節に重要な役割を果たすと考えられる。申請者の金谷聡介君は、成人性歯周炎の主要な病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来のリポ多糖 (LPS) による DC 活性化機構を明らかにすることを目的として、本研究を遂行した。

その結果、以下に示す知見が得られた。①ヒト末梢血単球を IL-4、GM-CSF 存在下で培養し、抗 CD14 抗体を用いたネガティブセレクションで精製した未成熟 DC を *P. gingivalis* 381株 (*Pg*) 菌体由来 LPS で刺激したところ、*Escherichia coli* O55 : B5 (*Ec*) LPS による刺激とは異なり CD14⁺CD16⁺ 細胞群の明確な誘導がみられた。② *Pg* LPS 刺激では、DC に著明な CD14 mRNA 発現の誘導及び上清中への分泌型 CD14 (sCD14) 産生の増加がみられた。③ DC 表面抗原をフローサイトメトリーで解析したところ、*Pg* LPS 刺激 DC においても CD1a は *Ec* LPS 刺激の場合と同程度に発現がみられるが、DC 成熟化のマーカーである CD83 は同刺激の場合と比べて弱かった。HLA-DR 発現は *Ec* LPS、*Pg* LPS ともに同程度の誘導がみられたが、CD80、CD86 および CD40 は、*Pg* LPS による発現誘導が弱い傾向がみられた。一方 CD54 についてはいずれの場合も強い誘導がみられた。④ IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 および RANTES の各サイトカイン産生については、いずれにおいても *Pg* LPS 刺激 DC の方が低かった。⑤ DC の貪食能をフローサイトメトリーで測定したところ、いずれの LPS 刺激の場合でも未成熟 DC と比べて低下していた。⑥ *Pg* LPS 刺激 DC の allo-genic T 細胞増殖誘導活性は、*Ec* LPS 刺激と比べて弱かった。これらの知見は、*Pg* LPS は、*Ec* LPS とは異なり DC の強い成熟化を引き起こさず、特異な DC サブセットを誘導することを初めて明らかにしたものである。CD14⁺CD16⁺ 細胞群が AIDS や自己免疫疾患患者などで見いだされることから、歯周病巣局所においても *P. gingivalis* 感染に伴う慢性炎症成立機構の一端を示すものと考えられる。

以上示した通り、金谷君の論文は、歯周病原性細菌の新たな病原性発揮機構を提示したものであり、慢性感染症である歯周病の病態形成機構を解明する上で有用な情報を提供するものとする。従って、当審査委員会は本論文を博士 (歯学) の学位を授与するに相応しいものと判定した。