

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 竹内 麻衣  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第424号  
学位授与の日付 平成31年3月25日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Indirect regulation of PCSK9 gene in inflammatory response by *Porphyromonas gingivalis* infection  
(*Porphyromonas gingivalis* 感染時炎症応答における PCSK9 遺伝子発現の制御機構)

論文審査委員 主査 教授 多部田 康一  
副査 教授 山崎 和久  
副査 教授 寺尾 豊

博士論文の要旨

学位申請者 竹内麻衣氏より提出のあった主論文 (英語) の要旨 (和訳) は以下の通りである。

【目的】 Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) は low-density lipoprotein receptor (LDLR) の分解を誘導するセリンプロテアーゼであり, 血中一細胞内コレステロールレベルの調節において機能し, 動脈硬化性疾患の発症や進行に関与する。慢性歯周炎患者の血中 PCSK9 濃度が有意に高く, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 感染マウスモデルにおいて, 血中 PCSK9 濃度の上昇と同時に, 脂質プロファイルが変化することが報告された。これらのことから, PCSK9 は歯周炎と動脈硬化性疾患に共通する血中バイオロジカルマーカーとしてのみならず, 両疾患の関連において機能することが示唆される。また, *P. gingivalis* LPS を投与したマウスでは, 血中 TNF- $\alpha$  と PCSK9 濃度が有意に上昇することから, Toll-like receptor (TLR) 2, 4 及びその下流で産生される TNF- $\alpha$  を介した自然免疫応答が PCSK9 の誘導に関与することが示唆される。本研究では核酸抗原を認識する TLR3, 7, 9 を介した宿主応答に着目し, *P. gingivalis* 感染及び炎症による PCSK9 産生誘導機構を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】6 週齢の C57BL/6 (wild-type) マウス及び TLR 3, 7, 9 機能を欠失する Unc93b1 ミュータントマウス (*3d*) に, *P. gingivalis* W83 株, 核酸抗原として TLR 3, 7, 9 のそれぞれのリガンドである Poly(I:C), R848, CpG-DNA を腹腔内投与した 16 時間後の肝臓及び血清を解析に供した。肝臓における *saa*, *tnf- $\alpha$* , *ifn- $\alpha$* , *ifn- $\beta$* , *pcsk9* 発現を real-time PCR 法にて, 血中 PCSK9 濃度を ELISA 法にて解析した。脂質プロファイルは高感度ゲルろ過 HPLC 法によるフラクション解析にて評価した。*In vitro* において, ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を, *P. gingivalis* または TNF- $\alpha$  にて刺激し, 直接的な PCSK9 産生の誘導について評価した。さらに, *P. gingivalis* 刺激したヒト単球由来細胞株 THP-1 と HepG2 を共培養し, 肝臓における自然免疫誘導時の TNF- $\alpha$  を含む液性因子産生と PCSK9 誘導の関連を検討した。いずれも 6 時間刺激後の HepG2 における *PCSK9* 及び *LDLR* の発現を real-time PCR 法にて解析した。

【結果と考察】*P. gingivalis* 腹腔内投与後の血中 PCSK9 濃度の上昇は wild-type マウスに比べて *3d* マウスにおいて有意に減少したことから, PCSK9 産生誘導に TLR 3, 7, 9 が関与することが明らかになった。wild-type マウスへの核酸抗原投与では, R848 及び CpG-DNA の投与にて血中 PCSK9 濃度が上昇した一方で, Poly(I:C) 投与では上昇しないことから, 核酸抗原認識経路のうち, TLR3 認識に特徴的な Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor (TRIF) 依存性経路は PCSK9 産生の誘導に関与しないことが示唆された。wild-type マウスへの Poly(I:C) 投与でも, 他の核酸抗原投与と同様に有意に *saa-1*, *tnf- $\alpha$* , *ifn- $\alpha$* , *ifn- $\beta$*  の発現が誘導され, LDL cholesterol (LDL-C) が上昇したことから, 炎症性メディエーターは直接的に PCSK9 産生に作用せず, 炎症応答下では PCSK9 非依存性に LDL-C が変動することが示唆された。HepG2 への *P. gingivalis* または TNF- $\alpha$  刺激では, *PCSK9* 発現の上昇を認めなかった一方で *LDLR* 発現は

TNF- $\alpha$  濃度依存的に上昇した。*P. gingivalis* 刺激した THP-1 との HepG2 の共培養においても、同様に PCSK9 発現が変動しないにも関わらず、LDLR 発現の上昇を認めた。さらに *P. gingivalis* 刺激した THP-1 と TNF receptor 1 の発現を選択的阻害した HepG2 との共培養により LDLR 発現の上昇が抑制され、TNF- $\alpha$  が LDLR の発現に関与することが明らかになった。以上の結果より、感染による自然免疫応答において産生された炎症性メディエーターが PCSK9 を直接誘導するのではなく、LDLR 発現やコレステロールレベルの変動によるフィードバックを介して、PCSK9 発現に作用することが示唆された。

【結論】核酸抗原は TRIF 非依存性経路により PCSK9 産生を誘導し、*P. gingivalis* 感染による誘導にも寄与する。TNF- $\alpha$  は PCSK9 を直接誘導しない。

#### 審査結果の要旨

本研究の学術的背景、学術的意義、新規性についての試問について以下の回答を得た。PCSK9 は、血中一細胞内コレステロールレベルの調節において機能する。PCSK9 の機能獲得変異は、冠動脈疾患の早期発症に関連し (Abifadel M *et al.*, Nat Genet 2003)、機能欠失変異は冠動脈疾患のリスクを低下する (Cohen J. C *et al.*, N. Engl J Med 2006)。申請者の所属する研究室ではこれまでに、中等度から重度慢性歯周炎患者の血中 PCSK9 濃度が有意に高く、好感度 CRP レベルと相関すること、*P. gingivalis* 感染マウスモデルにおいて、血中 PCSK9 濃度の上昇と同時に、脂質プロファイルが変化することを報告していることから、歯周病原細菌感染とこれに対する炎症応答が、PCSK9 産生や脂質代謝の変動に関与することが示唆される。さらに、血清中 PCSK9 レベルが歯周炎臨床パラメーターと相関することが明らかになっている。学術的意義は以下である。PCSK9 産生誘導における TLR および炎症応答の関与については、*E. coli* LPS や、*P. gingivalis* を投与したマウスモデルにおける報告から、TLR2, 4 およびその下流において産生される炎症性サイトカインを介した自然免疫応答が PCSK9 の誘導に関与することが示唆されている。しかしながら、その詳細な機構や、その他 TLR ファミリーを介した PCSK9 誘導機構については報告が無い。本研究は核酸抗原認識経路のうち TLR7 および TLR9 が PCSK9 産生に関与し、その下流で産生される炎症性メディエーターは直接的に PCSK9 を誘導しないことを明らかにしたことで、既存報告で示唆される、炎症性メディエーターによる PCSK9 の誘導機構とは異なる経路の存在を示したことに新規性を持つ。

研究方法の選択、妥当性に関する審査を行なった。歯周病を想定した研究課題において、動物モデルを用い、腹腔感染を行うことについての回答は以下であった。歯周病の本態は歯周病原細菌による感染症であり、宿主の免疫応答によって誘導される炎症が病態形成と進行に関与する。炎症と動脈硬化性疾患の関連においては、炎症性メディエーターが、肝臓における脂質代謝に影響を及ぼし、動脈硬化性疾患のリスク因子である LDL-C レベルの上昇に関与することが報告される (Khovidhunkit W *et al.*, J. Lipid Res. 2004)。歯周病原細菌感染に対する炎症および自然免疫応答と PCSK9 産生の誘導の詳細なメカニズムを検証するための実験モデルを選択した。

研究結果の解析、読解の適切性に関する審査を行ない、以下の回答を得た。*P. gingivalis* の CpG のうち抗原として認識される量の考察については、細菌の CpG-DNA は、マクロファージや樹状細胞といった貪食細胞のエンドソーム内において、溶菌した状態で TLR9 に認識されることから、貪食されたすべての *P. gingivalis* の CpG-DNA が抗原として認識されると考えられる。本研究では、*P. gingivalis* 腹腔内投与による血清中 PCSK9 の誘導量が、TLR3, 7, 9 の機能を欠失する *3d* マウスにおいて、WT マウスと比較しておよそ 40%低下した。*P. gingivalis* の構成成分としては、TLR3, 7 に認識される RNA の存在量が微量であることから、血清中 PCSK9 の誘導量を指標とした場合、*3d* マウスにおいて減少した約 40%が *P. gingivalis* を構成する CpG-DNA の抗原として寄与する量を反映すると考えられる。また、今回検討していないが、WT マウスへの *P. gingivalis* 投与においては、抗 TLR9 抗体を併せて投与することによって影響を検証することができる。と考える。

論旨、考察の展開に関する審査においては以下の回答を得た。炎症応答が LDLR 発現を変動させるという結果から推察される脂質代謝機構については、本研究において、炎症性メディエーターが直接的に PCSK9 を誘導せず、LDLR 発現を変動させること、さらに炎症応答下では血中

LDL-C レベルが PCSK9 非依存性に調整されることが明らかになった。これより仮説として炎症によって血中レベルが上昇した LDL-C を細胞内に取り込むため、あるいは炎症による血中 LDL-C レベルの変動とは独立して、LDLR 発現が増加するため、その結果、血中-細胞内コレステロールレベルのホメオスタシスが破綻することが考えられる。この補完機構として、LDLR を分解する転写後調整因子である PCSK9 産生量が増加することが推察される。

マウスで行った本研究から歯周病学, 歯周治療学に還元される内容と展開については以下である。核酸抗原認識経路のうち TLR7 および TLR9 が PCSK9 産生に関与し、その下流で産生される炎症性メディエーターは直接的に PCSK9 を誘導しないことが初めて明らかになった。さらに、炎症応答下では血中 LDL-C レベルが PCSK9 非依存性に調整されることが明らかになった。歯周炎および動脈硬化性疾患は、いずれも罹患率の高い生活習慣病である。これらに関連づけることが示唆される、PCSK9 産生誘導の詳細なメカニズムを解明することで、両疾患のリスクや治療効果の評価、さらに治療の標的としても活用が可能となる。今後は、PCSK9 誘導機構のみならず、歯肉における局所感染が全身の脂質代謝に影響を及ぼす機構を解明することが必要である。

学位申請者 竹内麻衣氏より提出のあった主論文をもとに上記事項のように審査を実施し、合格と判定した。

以上