

ふりがな	どもん ひさのり		
氏名	土門 久哲		
学位	博士(歯学)		
学位記番号	新大院博(歯)第129号		
学位授与の日付	平成20年3月24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	Early and preferential induction of IL-1 receptor-associated kinase-M in THP-1 cells by LPS derived from <i>Porphyromonas gingivalis</i> ( <i>Porphyromonas gingivalis</i> 由来 LPS により THP-1 細胞において IL-1 receptor-associated kinase-M が早期かつ優先的に誘導される)		
論文審査委員	主査	教授	山崎 和久
	副査	教授	吉江 弘正
		教授	織田 公光

#### 博士論文の要旨

##### 【目的】

歯周病原細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)由来の Lipopolysaccharide (LPS)は、腸内細菌である *Escherichia coli* (*E. coli*)由来のそれとは異なる生物活性を持っており、毒性や宿主細胞に対する炎症性サイトカイン誘導能は低いことが報告されている。しかしながら活性の違いがなぜ生じるかについての詳細については明らかとなっていない。一方、自然免疫系において微生物抗原認識機構をつかさどる Toll-like receptor (TLR)は LPS の認識に関与することが知られている。近年、その下流のシグナル伝達経路が解明される中、IRAK-M, SOCS-1, SHIP, MyD88s など TLR signaling に抑制的に作用する調節因子の存在が報告されている。そこで今回我々は、これらの negative regulator が *P. gingivalis* LPS に対する宿主細胞の低応答性に関与している可能性に注目し、*P. gingivalis* LPS によるマクロファージにおける TLR signaling negative regulator の発現動態について検討した。

##### 【材料および方法】

Myelomonocytic cell line, THP-1 を PMA (200nM)を添加した 10% FCS を含む RPMI1640 培地にて 48 時間培養し、マクロファージに分化させた。分化した細胞に抗原として *P. gingivalis*, *E. coli* の各菌種由来 LPS (0.01, 0.1, 1  $\mu$ g/ml)を 10% FCS 存在下で添加し刺激した。刺激後 24 時間における培養上清中の TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 産生量を ELISA 法にて検討した。また、刺激後の IRAK-1, IRAK-M mRNA 発現の経時的変化を Real-time PCR 法にて、IRAK-1, IRAK-M, SOCS-1, SHIP のタンパク発現を Western blot 法にて検討した。また、刺激後 9 時間における NF- $\kappa$ B の活性化を ELISA 法にて検討した。さらに IRAK-M 特異的 siRNA (40nM)をトランスフェクトしてノックダウンし、同様の実験を行った。

### 【結果】

1. *P. gingivalis* LPS 刺激 24 時間後における培養上清中の TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 産生量は, *E. coli* LPS 刺激によるものと比較して有意に低いことが認められた。
2. *P. gingivalis* LPS 刺激による IRAK-M の mRNA 発現およびタンパク発現は *E. coli* LPS 刺激によるものと比較して有意に増強されていた。
3. *P. gingivalis* LPS 刺激による SOCS-1 および SHIP のタンパク発現に影響は認められなかった。(data not shown)
4. いずれの菌種由来 LPS 刺激においても IRAK-1 の mRNA 発現に変動は認められなかった。
5. *P. gingivalis* LPS 刺激 9 時間後以降において, IRAK-1 の分解が抑制された。
6. IRAK-M 特異的 siRNA により *P. gingivalis* LPS 刺激 9 時間後における IRAK-1 の分解が促進された。
7. IRAK-M 特異的 siRNA により *P. gingivalis* LPS 刺激 9 時間後における NF- $\kappa$ B の活性化が促進された。

### 【考察】

*P. gingivalis* LPS はマクロファージにおける IRAK-M 発現を特異的に増強した。SOCS-1 および SHIP も TLR signaling に抑制的に作用することが知られているが, *P. gingivalis* LPS はそれらの発現に対して影響を及ぼさなかった。*P. gingivalis* LPS によりマクロファージにおける IRAK-1 の分解が抑制され, またその時間は IRAK-M が特異的に増強された時間と一致していた。さらに, IRAK-M 特異的 siRNA により, *P. gingivalis* LPS 刺激における IRAK-1 の分解, NF- $\kappa$ B の活性化, TNF- $\alpha$ 産生が促進された。これらより, *P. gingivalis* LPS は IRAK-M を介して炎症性サイトカイン産生を抑制する可能性が示され, さらには歯周炎の慢性化に関与する可能性も考えられる。しかしながら, IRAK-M 発現制御機構については解明されておらず, さらなる検討が必要である。

### 【結論】

*P. gingivalis* LPS は, マクロファージにおける IRAK-M 発現を特異的に増強してその下流のシグナル伝達を抑制することにより, 宿主細胞の低応答性に関与している可能性が示唆された。

### (審査結果の要旨)

グラム陰性細菌の外膜成分である Lipopolysaccharide (LPS) は主要な病原活性を持ち, 様々の細胞に対して炎症性サイトカイン産生を促す因子であると考えられている。LPS が誘導する炎症性サイトカインは, 細菌の増殖に抵抗するために必須であると同時に, それ自体が免疫応答の仲介をし, 歯周病においては結合組織の破壊や歯槽骨吸収を引き起こす。しかしながら炎症応答は内因性の抗炎症性メディエーターや, 近年発見された IRAK-M, SOCS-1 などの TLR シグナル調節因子によって解消される。このように生体内では様々な安全装置が炎症応答をコントロールしている。

IRAK-M は単球・マクロファージ系の細胞に特異的に発現している分子で, TLR 刺激により誘導され, MyD88 から IRAK-1 と IRAK-4 の解離を抑制することにより IRAK・TRAF-6 複合体の形成を阻害する。SOCS-1 も TLR 刺激により誘導され NF- $\kappa$ B や STAT-1 の活性化を阻害する。それに加え近年では SHIP や PI3K が LPS 誘導性炎症応

答に対する調節因子であることが報告されている。これら調節因子が宿主への過度のダメージを抑制し、ホメオスタシスに関わっている。

*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は歯周ポケットから高頻度で分離されるグラム陰性細菌であり、歯周病の主な病原細菌の一つと考えられている。*P. gingivalis* 由来 LPS は有力な病原因子であり、宿主細胞を刺激して炎症メディエーターの産生を促すが、その活性中心である Lipid A は、*Escherichia coli* (*E. coli*) 由来 LPS と比較して生物活性が低いことが知られている。*P. gingivalis* Lipid A は腸内細菌と比較して長い炭素鎖と特殊に枝分かれした脂肪酸を持っているため、もしくは *P. gingivalis* LPS が TLR4 でなく TLR2 により認識されるためにこのような低生物活性となることが考えられているが、未だその理由は明らかにされていない。そこで本研究では、*P. gingivalis* LPS が先述の調節因子の発現を促進することにより宿主細胞の低応答性が引き起こされる可能性を考え以下の方法で解析を行った。

単球系細胞株である THP-1 を PMA を添加した RPMI1640 培地にて 48 時間培養し、マクロファージに分化させ、抗原として *P. gingivalis*, *E. coli* の各菌種由来 LPS (0.01, 0.1, 1  $\mu$ g/ml) を添加し刺激した。刺激後 24 時間における培養上清中の TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 産生量を ELISA 法にて検討したところ、*P. gingivalis* LPS 刺激による上記のすべてのサイトカイン産生量は、*E. coli* LPS 刺激によるものと比較して有意に低いことが認められた。また *P. gingivalis* LPS 刺激による IRAK-M の mRNA 発現およびタンパク発現は *E. coli* LPS 刺激によるものと比較して有意に増強されていた。その一方、SOCS-1 および SHIP のタンパク発現はいずれの LPS 刺激によっても影響は認められなかった。また LPS 刺激による IRAK-1 の mRNA 発現に変動は認められなかったが、*P. gingivalis* LPS 刺激 9 時間後以降において、IRAK-1 の分解が抑制された。これは *P. gingivalis* LPS 刺激により IRAK-M 発現が上昇した時間帯と一致していた。ここでさらに IRAK-M 特異的 siRNA をトランスフェクトしてノックダウンし、同様に刺激を行ったところ、IRAK-M 特異的 siRNA により *P. gingivalis* LPS 刺激 9 時間後における IRAK-1 の分解が促進され、同時時間帯における NF- $\kappa$ B の活性化が促進された。以上より、*P. gingivalis* LPS は IRAK-M を介して炎症性サイトカイン産生を抑制する可能性が示され、さらには歯周炎の慢性化に関与する可能性が示唆された。

本研究テーマは自然免疫系の制御機構の解明という基礎的な面ばかりでなく、免疫抑制のメカニズム分子機構に基づく新たな抗炎症療法の開発につながる可能性がある。また、これらの結果は歯周炎の病態形成メカニズムの解明にも寄与するものであり、学位論文として十分な価値を認める。