

論 文 内 容 要 旨

題 目

Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Stimulate Gingival Epithelial Cells to Induce Pro-Inflammatory Cytokines via the MAPK and STING Pathways

(*Porphyromonas gingivalis*の外膜小胞は歯肉上皮細胞を刺激しMAPKとSTING 経路を介して炎症性サイトカインを産生させる)

著 者

植村勇太

内容要旨

歯周病は、歯肉溝や歯周ポケットに形成されるプラークや歯石に存在する細菌が原因となって引き起こされる感染症である。*Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) は、慢性歯周炎に関連する主要な歯周病原細菌で、リポ多糖 (LPS)、ジンジパイン、DNAおよびRNA等を含む外膜小胞 (OMVs) を生成し放出する。OMV は、菌体間相互作用、栄養獲得、宿主免疫調節不全と調節、宿主細胞間相互作用およびバイオフィーム形成等に関与することが報告されている。*Pg*-OMVは歯周病の病態に関与していると考えられるが、これまでにOMVが歯周組織に及ぼす影響についてはほとんど報告がなされていない。また、歯肉上皮は、歯周病原細菌と宿主が最初に遭遇する場であることから、歯周病の発症に重要な役割を果たしている。歯周ポケットと呼ばれる深い溝の部分では、増殖し定着した歯周病原細菌の刺激によって上皮細胞から炎症性サイトカイン等が産生され、さらに歯肉上皮バリアが破綻する。破綻した上皮バリアから侵入した歯周病原細菌由来の病原因子であるLPS等によりサイトカインやケモカインの発現や産生が誘導される。これらにより、炎症部位には好中球などの炎症性細胞が遊走し、局所の免疫応答が生じる。このように、細菌の病原性因子による免疫反応・サイトカインストームにより歯周組織の破壊が進行する。そこで本研究では、*Pg*由来OMV (*Pg*-OMV)がヒト歯肉上皮細胞株OBA-9に及ぼす影響とそのメカニズムについて検討を行った。

【材料と方法】

Pg ATCC33277株およびgingipain欠失株である*Pg* KDP136 (RGPとKGP両欠損株)、*Fusobacterium nucleatum* (*Fn*)を用いた。これらを培養し、培養液を遠心分離した上清からTotal Exosome Isolation Reagent (Invitrogen社)を用いて*Pg*-OMVおよび*Pg*KDP-OMV、*Fn*-OMVを精製した。また、菌体を含まない培地から精製した試料を*Pg*-OMVのコントロールとした。抽出した*Pg*-OMVに含まれるジンジパインの活性を不活化させるために70°Cで1時間熱処理し、これをHT (Heat Treated) *Pg*-OMVとした。*Pg*由来LPS (*Pg*-LPS)のエンドトキシン活性を基準にして、LPS 100 ng/mlと同程度の活性にあわせたOMVで刺激したOBA-9細胞における炎症性サイトカインInterleukin (IL)-6およびIL-8の発現・産生レベルをrealtime RT-PCRとELISAを用いて解析した。また、OMV刺激による炎症性サイトカイン発現誘導経路に関しては、抗リン酸化抗体を用いたWestern Blot法およびシグナル伝達経路特異的阻害剤を用いて検討した。さらに、インターフェロン遺伝子刺激因子(STING)の関与については、siRNAを用いて解析した。

【結果】

Pg-OMV は、OBA-9 細胞において炎症性サイトカイン IL-6 および IL-8 の発現・産生を増強した。*Pg*-OMV は熱耐性であり、ジンジパイン以外の病原因子も炎症反応誘導物質として *Pg*-OMV に含まれていることが示された。さらに、*Pg*-OMV は、OBA-9 細胞において、Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)1/2, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK や NF- κ B のシグナル伝達経路を介して IL-6 および IL-8 の産生を誘導した。また、*Pg*-OMV のみならず *Fn*-OMV によっても IL-6 と IL-8 の発現・産生は誘導され、さらに STING 特異的 siRNA によってその発現・産生が部分的に抑制されたことから、STING を介した誘導経路も示された。

【考察】

Pg-OMV は LPS やジンジパインのみならず、多数の病原性因子を含有しており、ヒト歯肉上皮細胞において MAPKs、NF- κ B や STING を含む複雑なシグナル伝達経路を介して炎症性サイトカイン IL-6 および IL-8 の発現・産生誘導に関与していることが示唆された。これらの結果により、*Pg*-OMV は歯肉上皮細胞に対して様々な経路を活性化することにより、歯周炎の発症や進行に重要な役割を果たす可能性が示唆された。