

〔学位論文〕

歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の血管内皮への付着機構の解析

小松 寿明

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

E-selectin mediates *Porphyromonas gingivalis* adherence to human endothelial cells

Toshinori KOMATSU

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Key words : periodontitis, atherogenesis, outer membrane protein, vascular inflammation

緒 言

アテローム性動脈硬化症は、炎症性細胞やコレステロールなどの脂質が血管内腔に集積した状態を呈し、これが慢性に経過すると虚血性心疾患や脳梗塞などの発症へと繋がる。アテローム性動脈硬化症は様々な要因により引き起こされるが、近年歯周病との関連を報告している。また、歯周組織の慢性炎症が全身に波及し、血管の炎症や脂質代謝の異常が誘発され、アテローム性動脈硬化症が惹起される可能性があると報告している。一方、ヒトのアテローム性動脈硬化巣から、*P. gingivalis*等の歯周病関連細菌が検出されることが報告されている。しかし、歯周病関連細菌が、血管内皮細胞にどのような機序で付着するのかについての詳細は、十分には解明されていない。

本研究では、歯周病のアテローム性動脈硬化症への関与として、血流に侵入した*P. gingivalis*の血管内皮細胞への付着に、E-selectinを介しているという仮説を立て、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) を用い、*P. gingivalis*の付着機序について検討した。

方 法

血管内皮細胞は3～7回継代したHUVECを用いた。*P. gingivalis*は、ATCC33277 (野生株) およびその派生株であるFimA線毛欠損株 ($\Delta fimA$)、FimA/Mfa1線毛欠

損株 ($\Delta fimA \Delta mfa1$)、およびOmpA様タンパク質Pgm 6/7欠損株 ($\Delta pgm6/7$) を用いた。感染実験は、TNF- α (10ng/ml) で刺激、あるいは未刺激のHUVECに、*P. gingivalis*を接種し、CO₂インキュベータに静置して行った。未付着の*P. gingivalis*を洗浄除去後、蛍光免疫染色し、顕微鏡観察像を画像解析して付着菌数を定量した。また、競合的付着阻害実験として、菌接種と同時に、抗E-selectin抗体、精製可溶性E-selectinおよび精製sLeXを投与した。同様に、野生株および各変異株由来の表層膜画分、精製FimA線毛、および精製Pgm 6/7の投与による阻害実験を行った。HUVECの細胞応答を検討するため、培養液中に分泌されるinterleukin (IL) -8、von Willebrand factor (vWF) およびNO₂をELISAで測定した。

結果および考察

まず、TNF- α 刺激によりHUVECに誘導されるE-selectinの発現を検討した。E-selectinの産生はTNF- α 添加3時間後にピークを示したので、TNF- α 添加3時間後に、*P. gingivalis*を接種することにした。次に、*P. gingivalis*の接種菌数を検討した。MOI (multiplicity of infection, 1細胞当たりの接種菌数) = 1000ではHUVECの傷害が激しかった。一方、MOI = 100では感染5時間後においても細胞への傷害はほとんど認められなかった。そこで、以降の検討ではMOI = 100で行うことにした。

受付：平成24年10月12日

P. gingivalis 野生株を TNF- α 刺激および未刺激の HUVEC に接種し、0.5、1 および 3 時間後に付着菌数を測定した。その結果、いずれの時間においても未刺激に比して TNF- α 刺激では、付着菌数が顕著に増加した。この付着における E-selectin の関与を検証するため、抗 E-selectin 抗体による競合的付着阻害実験を試みた。すなわち、*P. gingivalis* の接種と同時に抗 E-selectin 抗体を投与し、0.5 時間後に付着菌数を評価した。その結果、TNF- α 刺激により増加する付着菌数が抗 E-selectin 抗体投与で著明に抑制された。同様の阻害効果が精製 E-selectin の投与によっても認められた。さらに、sLeX の投与でも著明な阻害がみられた。以上のことから、*P. gingivalis* は E-selectin との結合を介することで、HUVEC への付着が促進されることが示された。また、E-selectin の *P. gingivalis* が結合する部位は、sLeX の結合部位であることも示唆された。

次に、E-selectin との相互作用に関連する *P. gingivalis* の分子を検討した。初めに、*P. gingivalis* の上皮細胞への付着やバイオフィーム形成に重要な役割を演じることが知られている FimA 線毛の欠損株 ($\Delta fimA$) の HUVEC への付着を検討した。予想に反し、TNF- α 未刺激および刺激のいずれにおいても付着菌数は野生株と同等あるいはやや多い傾向を示した。さらに、*P. gingivalis* のもう一つの付着性線毛である Mfa 1 線毛の影響も検討するため、FimA および Mfa 1 の両線毛欠損株の付着を検討したが、やはり付着菌数は減少せず、むしろ増加した。次に、*P. gingivalis* の菌体表面に大量に発現し、本菌の形態の安定性に寄与していることが報告されている Pgm 6 / 7 (Pgm 6 と Pgm 7 の複合体) の欠損株と HUVEC との相互作用を検討した。その結果、同欠損株の TNF- α 刺激 HUVEC への付着は野生株のそれと比べ有意に減少することが明らかとなった。次に、野生株、 $\Delta fimA$ 、および $\Delta pgm6/7$ のそれぞれの菌株から調整した表層膜画分を、野生株接種と同時に投与する競合的付着阻害実験を行った。その結果、野生株および $\Delta fimA$ 由来膜画分の投与では、TNF- α 刺激で誘導される付着増加が抑制されたが、 $\Delta pgm6/7$ 由来膜画分では抑制されなかった。さらに、精製 FimA 線毛および精製 Pgm 6 / 7 を用いて同様の阻害実験を行なった。その結果、精製 FimA 線毛の添加では野生株の HUVEC への付着に変化がみられなかったのに対し、精製 Pgm 6 / 7 の添加では HUVEC への野生株の付着が顕著に抑制された。以上のことから、TNF- α 刺激 HUVEC への *P. gingivalis* の付着には、Pgm 6 / 7 が関与することが示された。Pgm 6 / 7 の相同分子である大腸菌 OmpA は菌体表面に露出しており、上皮細胞への付着や

侵入に機能することが報告されている。Pgm 6 / 7 も菌体表面に露出していることから、OmpA と同様に細胞と相互作用することは予想されるが、これまでそのような報告はない。今回の研究は、Pgm 6 / 7 と宿主細胞の相互作用を示す初めての報告である。

最後に、本研究で観察した *P. gingivalis* の付着亢進により、HUVEC の炎症応答が誘導されるか否かについて検討した。HUVEC を TNF- α で 3 時間刺激した後に *P. gingivalis* 野生株を接種した。さらに 1 時間培養後、培養上清中の IL-8、vWF および NO₂⁻ の濃度をそれぞれ測定した。TNF- α で前処理した HUVEC 培養系において、*P. gingivalis* の接種により IL-8、vWF および NO₂⁻ の有意な産生増強が認められた。加えて、*P. gingivalis* の接種でみられた NO₂⁻ の分泌上昇は、抗 E-selectin 抗体の投与で抑制された。以上の結果から、E-selectin を介した血管内皮細胞への *P. gingivalis* の付着は、同細胞の炎症応答を促進することが明らかになった。

結 論

P. gingivalis は、OmpA 様分子 Pgm 6 / 7 と E-selectin との結合を介して血管内皮細胞に付着することが示された。また、*P. gingivalis* の付着により血管内皮細胞の炎症応答が増強された。したがって、アテローム性動脈硬化症の発症あるいは進行の要因の一つとして、歯周組織から血管内に流入した *P. gingivalis* の血管内皮細胞への直接的な付着が関与する可能性があると考えられる。



小松 寿明

平成19年 3月 北海道医療大学歯学部歯学科卒業

平成24年 3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程卒業