〔学会記録II〕

東日本歯学会第21回学術大会　一般講演抄録

1．*Porphyromonas gingivalis*とLDLのinteractionに関する研究

○宮川　博史，中村　麗子，鎌口　有秀，馬場　久衛
（北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座）

【目的】心血管系疾患であるatherosclerosisは初期病変部の特徴の一つとしてマクロファージが修飾されたLDLを取り込んで形成したfoam cellを蓄積していることが知られている．近年，歯周病原細菌である*Porphyromonas*(*P.*) *gingivalis*によって刺激されたマクロファージがLDLを取り込んでfoam cellを形成することが報告されるなど，歯周疾患とatherosclerosisとの関係が示唆されている．今回我々は*P. gingivalis*381株とその変異株およびそれらのouter membrane vesicles (OMVs) がLDLに対してどのような直接的な影響を与えるか検討した．

【方法，結果および考察】最初にLDLの凝集を検討した結果，kgp変異株では凝集は見られなかったが，親株やその他の変異株ではLDLを凝集し，OMVsでも同様な結果が得られた．プロテアーゼの影響が示唆されたが，精製したプロテアーゼでは凝集を起こさなかった．また，LDLは*P. gingivalis*菌体やOMVsのタンパク質と特異的に結合することがwest-western blottingで示された．これらのことから，凝集にはプロテアーゼと菌体成分とLDLの結合が必要である可能性が示唆された．次に，LDLの主要タンパク質であるApo Bのdegradationを検討した結果，*P. gingivalis*菌体およびそのOMVsは凝集が起こるよりも低濃度でApo Bのdegradationを示した．このdegradationは精製したkgpでも同様に観察された．また，LDLの脂質の酸化について調べると，アガロース電気泳動法ではLDLの移動度は変化したが，TBARS法ではほとんど変化が見られず，脂質の酸化は示されなかった．その上，このアガロースゲル電気泳動法によるLDLの移動度は*P. gingivalis*のプロテアーゼ阻害剤で減少し，活性を高める還元剤の存在下で増加したことから，プロテアーゼによる効果であることが示唆された．さらに，こうして凝集したLDLはマクロファージに取り込まれてfoam cell形成を誘導した．これらのことより，*P. gingivalis*はマクロファージを刺激してfoam cell形成を誘導するだけではなくて，直接LDLのタンパク質をdegradationして構造を変えて凝集させることによってfoam cell形成を誘導し，atherosclerosisの発病に関与している可能性が示唆された．（会員外共同研究者H. K. Kuramitsu）

2．*P. gingivalis*のRGP産生に対するquorum sensingの関与の可能性

○中村　麗子*，鎌口　有秀*，渡部　俊弘**，大山　徹**，馬場　久衛*
（*北医療大・歯・口腔細菌，**東京農大）

【目的】細菌においてもcell to cell communicationが行われていることが報告された．これは，細菌の濃度を感知し，遺伝子発現を調節する機構として発見され，quorum sensingとされた．これらに関与する物質はautoinducer-1(AI-1)，AI-2およびペプチド因子が知られている．*Porphyromonas gingivalis*もAI-2産生に関与する*luxS*遺伝子を保有することが報告された．*P. gingivalis*のバイオフィルムへの参入機構およびバイオフィルム内

における*P. gingivalis*のタンパク質発現にquorum sensingが関与するかは不明である．今回は*P. gingivalis*の親株および*luxS*変異株における菌体タンパク質をプロテオーム的に解析し若干の検討を行った．

【方法】*P. gingivalis* ATCC33277の*luxS*遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入し変異株を作製した．親株と変異株を培養後，菌体の2次元電気泳動を行った．スポットボリュームに差異のみられたもののアミノ酸シークエンスを行い，データベースより物質を特定した．

【結果および考察】親株と*luxS*変異株の菌体の2次元電気泳動の結果，親株の方がスポットボリュームが大きいスポットはarginine-specific cystein proteinase (RGP) であり，変異株の方が大きいのはNAD-specific glutamate dehydrogenase, alanine dehydrogenaseであった．また，菌体のRGP活性も親株の方が強い傾向がみられた．以上のことより*luxS*遺伝子が関与するAI-2が*P. gingivalis*のRGP産生に若干影響している可能性が示唆された．(会員外共同研究者：相根義昌（東京農大))

3．各種ディフェンシンペプチドの口腔扁平上皮癌細胞株への影響

○西村　学子*，安彦　善裕*，山崎　真美*，草野　　薫*，荒川　俊哉**，田隈　泰信**，賀来　　亨*
(*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・**北海道医療大学歯学部口腔生化学講座)

【目的】抗細菌ペプチドは，生体を細菌感染から防御するための重要な働きを担っている．その一つであるディフェンシンはα (HNPs) とβ (hBDs) に分けられ，前者は主として好中球，後者は様々な上皮細胞での発現が確認されている．HNPsは，細菌への毒性以外に高濃度ではある種の真核細胞にも毒性を示すとの報告がある．今回われわれは，HNPsとhBDsが口腔上皮細胞に与える影響について検討した．

【方法】細胞は正常口腔上皮および扁平上皮癌細胞株 (SCC-9, SAS, Ca-9, HSC-4, KB, BSC-OF) を用いた．それぞれの細胞は無血清DMEM培地にHNP-1, hBD-1, -2を各0～50ug/ml濃度で添加し24時間および48時間後の細胞増殖率をdirect cell count法，BrdU incorporation，さらにXTTおよびDNA fragmantationによる細胞毒性についても検索した．また，細胞増殖効果のみられたものについては，それがEGF receptorやMAP kinaseを介したものであるか否かを検索するために，EGF receptor inhibitor tryphostin AG1478を10uM濃度，MAP kinase inhibitor UO126を25uM濃度でそれぞれ添加して細胞増殖効果を検討した．

【結果および考察】HNP-1およびhBDsは濃度依存的に細胞増殖傾向を示し，特にHNP-1が10ug/mlで有意な結果を得た．また，MAP kinase inhibitorを添加したものでは有意な増殖抑制効果を認めた．以上のことから，ディフェンシンのα，βいずれにおいても，低濃度では口腔扁平上皮癌細胞株の増殖促進効果があり，それにはMAP kinaseの系が関与していることが示唆された．

4．バイオインフォーマティックスにより存在が予想された新規βディフェンシンの諸臓器での発現

○山崎　真美*，安彦　善裕*，西村　学子*，草野　　薫*，荒川　俊哉**，田隈　泰信**，賀来　　亨*
(*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・**北海道医療大学歯学部口腔生化学講座)

【目的】βディフェンシン (hBD) は主として上皮細胞が分泌する抗細菌性タンパクであり，ヒトではこれまでに6種類のタイプが単離されてきている．最近のcomputational searchにより31種類のhBDの存在していることが予想された (PNAS, 2002)．今回われわれは，この中でNCBIにmRNAの情報が公開されているものの，全身諸臓器での発現，およびそれらのサイトカイン等による誘導性について検索した．

【方法】材料には全身諸臓器から得られたcDNA (Multiple Tissues cDNA, Clontech社) および，皮膚，口腔上皮のケラチノサイトから得られたcDNAを用いた．NCBIから予想されるmRNAの情報を引き出し，hBD-18, -19, -20, -22, -23, -25, -26, -27, -29に対するprimerをデザインしてRT-PCR法およびLightCycler™による定量的PCR法を行った．また，ケラチノサイトでの発現の観察されたものについては，皮膚，口腔上皮由