

Title	15 : Treponema denticola の病原性発現における transcriptional regulator 様遺伝子の役割の解明
Author(s)	久永, 理央; 北村, 友里恵; 山下, 慶子; 齋藤, 淳; 石原, 和幸
Journal	歯科学報, 122(2): 233-233
URL	http://hdl.handle.net/10130/5949
Right	
Description	

No.15: *Treponema denticola* の病原性発現における transcriptional regulator 様遺伝子の役割の解明

久永理央¹⁾²⁾, 北村友里恵¹⁾, 山下慶子¹⁾, 齋藤 淳¹⁾²⁾, 石原和幸²⁾³⁾ (東歯大・歯周)¹⁾
(東歯大・口科研)²⁾ (東歯大・微生物)³⁾

目的: 主要な歯周病原細菌の一種である *Treponema denticola* は、様々な病原因子を持ち、歯周炎の発症・進展に寄与する。Dentilisin および dentipain は本菌の代表的な病原因子であり、宿主免疫からの回避や細胞外マトリックスの分解等の作用を示すが、これらの発現調節機構は明らかにされていない。これまでに我々は、dentilisin および dentipain の欠損株において、転写調節因子をコードする可能性のある遺伝子、HxlR family transcriptional regulator 様遺伝子 (HxlR 様遺伝子) の発現が変化していることを確認した。本研究では、HxlR 様遺伝子の機能について本菌の病原性発現における役割に焦点を当て解析を行った。

方法: *T. denticola* ATCC 35405株 (野生株) から、相同組み換えにより HxlR 様遺伝子欠損株を作出した。作出した欠損株と野生株を用い、遺伝子発現および表現型の比較検討を行った。増殖曲線は、TYGVS 培地を用いて培養開始から静止期までの OD 値を測定することにより評価した。欠損株の遺伝子発現を DNA マイクロアレイおよび qRT-PCR を用い解析した。dentilisin 活性、トリプシン様酵

素活性は、発色基質 (SAAPNA, BAPNA) を用いて測定した。

結果: 増殖曲線の比較では、欠損株の培養液は野生株と比較し対数増殖期以降の濁度が有意に低かった。DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析では、欠損株において病原性や栄養源の取り込みに関わる遺伝子の発現に変動を認めた。qRT-PCR による解析では、欠損株における dentilisin をコードする遺伝子 *prtP* の発現は、野生株と比較し有意に低かった。また、欠損株の dentilisin およびトリプシン様酵素活性は、野生株と比較し有意に低かった。

考察: *prtP* の発現および酵素活性測定の結果から、HxlR 様遺伝子は本菌の病原性に関わることが示唆された。また、HxlR 様遺伝子の欠損により、本菌の対数増殖期以降の増殖能は低下し、栄養源の取り込みに関わる遺伝子の発現が変化した。このことから、HxlR 様遺伝子は栄養源の取り込みに関わる遺伝子の転写調節を介し、対数増殖期以降における本菌の生存および増殖に関わることが示唆された。

No.16: 細胞傷害性 T リンパ球抗原-4 (CTLA-4)-Ig が歯周炎による歯槽骨吸収に与える影響とそのメカニズムの検討

中根 咲¹⁾²⁾, 今村健太郎¹⁾²⁾, 石原和幸²⁾³⁾, 齋藤 淳¹⁾²⁾ (東歯大・歯周)¹⁾ (東歯大・口科研)²⁾
(東歯大・微生物)³⁾

目的: 細胞傷害性 T リンパ球関連抗原-4 (CTLA-4) は、免疫チェックポイント機構としてがん免疫の分野で注目されている。これまでに、CTLA-4 は単球やマクロファージに結合し、関節リウマチ患者の骨吸収を抑制したことが示されている。しかし、その詳細なメカニズムや歯槽骨への影響については未だ不明な点が多い。本研究は、CTLA-4-Ig が歯槽骨吸収に与える影響とそのメカニズムを解明することを目的とした。

方法: 本研究は東京歯科大学動物実験委員会の承認のもと行った (No. 212204)。C57BL/6 マウス第二臼歯に絹糸を結紮し (Day 0)、歯周炎を誘発した。CTLA-4 の細胞外ドメインと IgG 1 の Fc 領域よりなる融合タンパクである CTLA-4-Ig を Day 1, 3 の 2 回、腹腔内投与した。Day 5 に、 μ CT および H-E 染色、TRAP 染色により、CTLA-4-Ig が歯槽骨吸収に与える影響を評価した。In vitro では、RANKL と CTLA-4-Ig を RAW264.7 細胞に添加し、TRAP 染色、Pit assay により、CTLA-4-Ig が破骨細胞分化、活性化に及ぼす影響を検討した。破骨細胞分化マーカー (C-fms, CaII, Cat-K,

TRAP) とプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) の mRNA 発現量を qRT-PCR により測定、NF- κ B p65 リン酸化を ELISA、ウエスタンブロット分析により評価した。さらに、siRNA 導入により PP2A 遺伝子発現を抑制した細胞を用い、CTLA-4-Ig が破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。

結果および考察: 歯周炎マウスモデルにおいて、CTLA-4-Ig 群の歯槽骨吸収量と破骨細胞様細胞数は、非投与群と比較して有意に低い値を示した。In vitro では、RANKL + CTLA-4-Ig 群における破骨細胞様細胞数、Pit 面積および破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現量は RANKL 単独群と比較して低い値を示した。また、CTLA-4-Ig 添加は NF- κ B p65 リン酸化を抑制、PP2A 発現を増加させた。PP2A 発現抑制下では、CTLA-4-Ig による Cat-K 発現抑制は確認されなかった。以上より、CTLA-4-Ig は破骨細胞分化と活性化の阻害により、歯槽骨吸収を制御することが示唆された。また、NF- κ B 経路と PP2A 発現の調節は、CTLA-4-Ig が破骨細胞の働きを抑制するメカニズムの 1 つであると考えられた。