

奥川 剛志 論文内容の要旨

主 論 文

NOD1 and NOD2 Mediate Sensing of Periodontal Pathogens

(NOD1 と NOD2 は歯周病原細菌を認識する)

(奥川剛志、金子高士、吉村篤利、Neal Silverman、原宜興)

(Journal of Dental Research • 掲載時期は未定)

[ページ数未定]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

(主任指導教員：原 宜興 教授)

緒 言

歯周病は細菌によって引き起こされる慢性炎症性疾患であり、歯周組織局所における細菌認識とその後誘導される宿主防御反応は歯周病の病態形成に重要である。*Porphyromonas gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* などのグラム陰性細菌が歯周炎と関連し、これらの菌体の構成成分であるペプチドグリカン (PGN) は炎症惹起物質としてよく知られている。PGN は N アセチルグルコサミンと N アセチルムラミン酸の繰り返し構造からなる多糖鎖と、N アセチルムラミン酸に結合するステムペプチドからなり、ステムペプチドが三番目のジアミノ酸によって架橋された網目状構造をとっている。また、このジアミノ酸はグラム陽性菌では主に L-Lys、グラム陰性菌では *meso*-DAP と異なっている。近年、Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD) 1 と NOD2 が PGN 認識に関与する新たな細胞内病原体認識受容体として発見された。NOD1 は主にグラム陰性菌の PGN に存在する *gamma*-D-glutamyl-*meso*-DAP (iE-DAP) によって、そして NOD2 は全ての細菌の PGN に存在する N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) によって活性化され、NF- κ B を活性化し、種々のサイトカインを産生することが報告されている。また、現在まで *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* 感染において、菌体認識、免疫応答や排菌に NOD が関連することが報告されている。

歯周炎歯肉における NOD の発現を免疫組織学的手法で調べた実験では、NOD の発現量は炎症の強い上皮において顕著だったことから、歯周病においても NOD は重要な役割を持っていると推測されている。しかしながら PGN の構造は菌種によって異なっており、歯周病原細菌感染に対する自然免疫応答に NOD が関連しているかはいまだ不明のままである。よって本実験では NOD1、NOD2 過剰発現細胞と歯肉上皮細

胞を用いて、NOD の *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* 菌体あるいはそれらの PGN の認識能に関して実験を行った。

対象と方法

歯周病原細菌として *P. gingivalis* ATCC 33277、W83、TDC60、TDC117、TDC275、SU63、GAI7802、*A. actinomycetemcomitans* Y4、*F. nucleatum* ATCC 10953 を、そして非歯周病原細菌として *Escherichia coli* MC4100 と *Aerococcus viridans* ATCC 10400 を実験に使用した。これらの菌体から PGN を精製し、さらにミュータノライシン（ムラミダーゼ）で処理し、可溶化 PGN（sPGN）を得た。

Human embryo kidney（HEK）293T 細胞に NOD1、または NOD2 を遺伝子導入し、菌体もしくは sPGN にて 12 時間刺激して、NF- κ B の活性化をルシフェラーゼを用いたリポーターアッセイにて計測した。グラム陰性細菌の sPGN の生物学的活性はシヨウジョウバエ S2*細胞を用いて確認した。

さらにヒト口腔上皮細胞株 HSC-2 を IFN γ でプライミングした後、sPGN で刺激した。そして 24 時間後の上清中の IL-8 の産生量を ELISA にて計測した。

結 果

NOD1 もしくは NOD2 を発現させた HEK 細胞を NOD1 リガンド A-iE-DAP もしくは NOD2 リガンド MDP で刺激するとそれぞれの NOD に特異的な NF- κ B の活性化が観察された。NOD1 発現 HEK 細胞に対して、*A. actinomycetemcomitans* Y4、*F. nucleatum* ATCC 10953 は強い活性能を認めたが、*P. gingivalis* ATCC 33277 の NF- κ B 活性化能は他の 2 菌種と比較して有意に低いものであった。sPGN による刺激でも菌体刺激と同様の傾向を示し、*P. gingivalis* の活性化能が一番弱かった。NOD2 発現 HEK 細胞では菌体刺激では *A. actinomycetemcomitans* でのみ活性化が認められた。また、sPGN 刺激ではすべての細菌の sPGN で活性化が認められたが、*P. gingivalis* の活性が一番弱かった。また *P. gingivalis* の弱い NOD1 活性化能は今回使用した *P. gingivalis* すべての菌株に共通して認められたが、NOD2 活性化能は菌株によって差がみとめられ、W83、GAI7802 は比較的強い活性化能を示した。

HSC-2 を sPGN で刺激を行った結果、*P. gingivalis* と比較して *A. actinomycetemcomitans*、*F. nucleatum* は IL-8 を強く誘導した。

考 察

菌種により PGN の組成が異なることがわかっており、*A. actinomycetemcomitans* は NOD1 活性化に重要な meso-DAP を持つが、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* はそれぞれ meso-DAP が L.L-DAP、meso-Lanthionine に置換されていることが報告されている。また過去の研究でステムペプチド三番目のアミノ酸の違いにより NOD2 の活性化能が異なることが報告されている。今回の研究において見られた菌による活性の違いは、このような構造の違いによるものと考えられた。

P. gingivalis は *A. actinomycetemcomitans* や *F. nucleatum* 同様、歯肉上皮細胞などの宿主細胞へ侵入することが報告されている。細胞内に侵入した細菌の認識はそれら細菌の排除にとって重要な因子となると考えられる。今回の実験で *P. gingivalis* が他の菌種と比較して NOD に対する活性化能が低かったことは、歯周ポケットや細胞内でこの菌が生存しやすいことを意味しているのかもしれない。