

学位研究紹介

Porphyromonas gingivalis-
lipopolysaccharide刺激により好中
球はsupervillin, vascular endothelial
growth factorのmRNA発現を増強する
Elevated mRNA expression for
supervillin and vascular endothelial
growth factor in human neutrophils
stimulated with lipopolysaccharide
from *Porphyromonas gingivalis*

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野

両角 俊哉

Division of Periodontology, Department of Oral Biological
Science, Course for Oral Life Science, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
Toshiya Morozumi

【目 的】

歯周病関連細菌である*Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)と好中球の関係について、現在まで*Pg*-lipopolysaccharide (LPS) が好中球を刺激して数多くの蛋白質を発現することが確認されている。しかし、それらの発現が好中球遺伝子の転写促進によるものなのか、並びにその機序については不明な点が多い。我々はこれまでに、好中球を*Pg*-LPSで刺激した際NF- κ B活性化に伴うIL-8転写の増加が起こることを明らかにし、好中球での転写調節の重要性とIL-8がその後の好中球の遊走に影響を及ぼす可能性を報告している (Sugita et al., 1998)。また、*Pg*-LPSと*Escherichia coli* (*Ec*)-LPSについてはその構造に違いが見られること (Aida et al., 1995) がわかっているが、その違いが好中球の遺伝子発現に影響を及ぼすかどうか、またそのメカニズムについては未知の点が多い。

これまでに我々は遺伝子発現の差をゲル上でフィンガープリントとして捉える画期的な方法であるRNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) 法を用い、健康人の好中球において*Pg*-LPS刺激と*Ec*-LPS刺激で遺伝子発現に違いが見られることを明らかにしている。そこで本研究において我々は*Pg*-LPS刺激により好中球から特異的に発現する遺伝子を検索し、他の細菌のLPS刺激による発現量と

比較・検討した。

【材料および方法】

健康かつ喫煙習慣を持たない成人男性8名の末梢血より比重遠心法により好中球を分離し、LPS (*Pg*-LPS, *Ec*-LPS, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-LPS, *Prevotella intermedia*-LPS, 合成Lipid A) にて刺激し、total RNAの抽出、DNAse処理後、逆転写酵素反応によりcDNAを合成した。45種類のarbitrarily PCR primersの組み合わせを用いてRAP-PCRを行い、アガロースゲル電気泳動後mRNA発現量において5倍以上の濃度差のあるバンドを選定し、DNA断片を精製した。その後サブクロニング、シークエンシングにより得られた塩基配列データからホモロジー検索にて遺伝子を特定した。特定された遺伝子に対し刺激菌種によるmRNA発現量をRT-PCRにて比較した。

【結果と考察】

RAP-PCRにより*Pg*-LPS刺激の好中球は42~100個のバンドが強く、53~116個のバンドが弱く発現した。シークエンシングの結果、ほとんどはrRNAをコードする遺伝子であった。好中球機能に関連するもので再現性が強く*Pg*-LPS刺激の好中球に強く発現したのものとしてSupervillin (SVIL) とvascular endothelial growth factor (VEGF) が同定された。この2つをRT-PCRで半定量した結果、他菌種のLPS刺激と比較して*Pg*-LPS刺激において強く発現することが確認された。

Pg-LPS刺激の好中球においてSVILやVEGFのmRNAが他菌種のLPSに比べ有意に発現増強したことから、LPSの種類により好中球の発現するmRNAのプロフィールも異なっていくことが示唆された。また、機能的な面からはSVILの発現増強は細胞骨格に変化をもたらす好中球機能にも影響する可能性が考えられ、VEGFにおいては急性炎症の増長に関与する可能性が示唆された。

【文 献】

Kubota T, Morozumi T, Yoshie H: Differential gene expression of human neutrophils induced by lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* using RAP-PCR. Dent Jpn (Tokyo) 1999; 35: 109-112.

Morozumi T, Kubota T, Sugita N, Ohsawa Y, Yamazaki K, Yoshie H : Elevated mRNA expression for supervillin and vascular endothelial growth factor in human neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res 2001; 36 : 160-168.

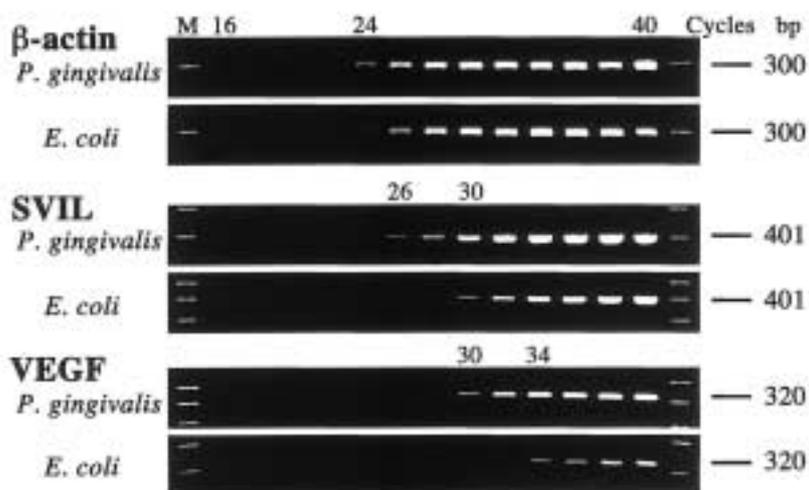


Figure Ethidium bromide staining pattern of RT-PCR products. β -actin, SVIL and VEGF mRNAs were semiquantified in neutrophils stimulated with *P. gingivalis*- and *E. coli*-LPS. Five μ l of the PCR amplified aliquots were taken with the interval of 2 cycles from the 16th to 32nd cycles to assess the rate of amplification, then dissolved and electrophoresed in a 2% agarose gel. Lane M : molecular size markers (100bp ladder) Note the SVIL mRNA is detected from 26th cycle in *P. gingivalis*-, from 30th cycle in *E. coli*-tests. VEGF mRNA is detected from 30th cycles in *P. gingivalis*-, from 34th cycles in *E. coli*-tests.

Table . Transcript levels of SVIL and VEGF relative to β -actin

stimuli	<i>P. gingivalis</i> -LPS	<i>A. actinomycetem</i> - <i>comitans</i> -LPS	<i>P. intermedia</i> -LPS	Synthetic Lipid A	<i>E. coli</i> -LPS
n	8	4	4	4	8
SVIL	22.5 \pm 6.4*	12.9 \pm 2.2	9.3 \pm 2.3	3.8 \pm 1.0	10.5 \pm 2.6
VEGF	8.7 \pm 3.3**	5.8 \pm 1.7*	3.6 \pm 0.9	2.5 \pm 0.6	2.5 \pm 1.1

All values are expressed as mean \pm s.d. (%).

** : significantly high relative to the expression level of *E. coli* -LPS stimulated controls, p<0.01

* : significantly high relative to the expression level of *E. coli* -LPS stimulated controls, p<0.05