

歯周組織破壊に導く歯周病原細菌ー宿主間相互作用の解明

金子 高士

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科, 歯周病学

Interactions between periodontal pathogens and host cells in periodontal tissue destruction

Takashi Kaneko

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

はじめに

歯周病はプラーク中の歯周病原細菌により誘導される慢性炎症性疾患で、歯と歯肉の付着の喪失と歯槽骨の吸収を特徴とする。歯周病の組織病理学的研究は、その初期においては歯肉軟組織への好中球やマクロファージを主体とする炎症性細胞の浸潤と毛細血管の拡張、増殖を特徴とする急性炎症的な組織像を呈し、より炎症が進行すると浸潤細胞の主体はリンパ球へと変化するとともに歯肉溝や接合上皮の増殖、コラーゲン線維の減少が顕著になることを示している¹⁾。最終的には形質細胞が浸潤細胞の大半を占めるようになり、接合上皮の根尖側移動と歯槽骨吸収がおこることを示している。このように歯周炎の病態形成には歯周病原細菌感染と上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨細胞などの歯周組織構成細胞そして好中球、マクロファージ、T細胞、B細胞などの炎症、免疫細胞の複雑な相互作用が深く関連していると考えられる。

口腔や腸管を含む体表面には多数の微生物が存在し、常在細菌叢を形成している。しかしこれらの常在

細菌叢は炎症反応を惹起することはなく、反対に病原細菌の繁殖の抑制や免疫システムの恒常性の維持に関与し、むしろ生体にとって有利に働いている。歯周ポケット内には多くの嫌気性グラム陰性細菌が生息しているが、それらの中で歯周病の病態と臨床的あるいは実験的に深く関連し、いわゆる歯周病原細菌と推測されているものはあまり多くはない。細胞侵入能や細胞毒素の産生などが病原性を発揮する因子として考えられているが、歯周病原細菌が歯周組織破壊する機序は未だ完全には解明されていない。

どのようにして我々宿主は、生体内に侵入した細菌を異物と認識し、排除するのであろうか？免疫システムは自然免疫と獲得免疫の二つに分けられるが、それらは協調して宿主防御や免疫学的記憶など、有効な抗菌反応を惹起する。自然免疫は微生物に共通に存在し、かつ自己に存在しない構造や分子 (Pathogen-associated Molecular Patterns: PAMPs) を特異的に認識することにより侵入細菌を早期に検知する。抗原特異受容体を発現するリンパ球のクローン選択のための遺伝子再配列を必要とする獲得免疫とは対照的に、PRMs (Pattern Recognition Molecules) は遺伝子に

連絡先：金子高士

〒 852-8588 長崎市坂本 1-7-1

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科, 歯周病学

Takashi Kaneko

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8588, Japan

E-mail : takashi@nagasaki-u.ac.jp

コードされたタンパク質であり、感染した細菌に存在するリポ多糖 (LPS)、ペプチドグリカン (PGN)、リポタンパク、フラジェリンと CpG DNA などの PAMPs を素早く検知する。一方、PRMs には Toll-like receptor (TLR)、CD14 や NOD-like receptor (NLR) などが含まれ、これらは細胞の細胞質、細胞膜上やエンドソーム膜上にユビキタスに発現しており、細胞内侵入菌や細胞外の菌やその細菌構成成分に幅広く対応することができる。PRMs の活性化は、炎症性サイトカイン、接着分子や抗菌ペプチドなどの発現、ファゴサイトーシス、アポトーシスやオートファジーの誘導、アジュバント作用と関連している。

本稿においては、歯周病における細菌宿主相互作用と歯周組織破壊に関して、特に歯周病原細菌の LPS と PGN の活性に主眼を置いて、私と共同研究者が行ってきた結果を踏まえて総説する。

自己抗体

歯周炎歯肉内には IgG, IgM, IgA を発現している B 細胞と形質細胞が数多く浸潤している²⁻⁴⁾。これらの B 細胞/形質細胞の中には細菌構成成分に対する抗体を発現しているものの他に、コラーゲンや IgG などの自己成分に反応する細胞、すなわち自己抗体産生細胞が存在することが報告されている⁵⁻⁷⁾。そして歯肉溝浸出液中でも自己抗体が検出されることも報告されている⁸⁾。筆者らも歯周病罹患患者の歯周組織におけるリウマチ因子 (RF) 発現細胞を免疫組織学的に検索したところ、RF 発現細胞は慢性歯周炎、侵襲性歯周炎、増殖性歯肉炎などすべての病態の患者の一部において、口腔上皮近くのリンパ球や形質細胞が密集して浸潤した部位に認められた⁹⁾。興味あることに RF 発現細胞は歯周病の種類によってその発現率が異なっていた。歯周病で検出される自己抗体の誘導メカニズムは不明であるが、Hirsch らは歯周炎歯肉には抗コラーゲン type I や抗コラーゲン type III 抗体産生細胞が検出されたが、抗コラーゲン type IV 産生細胞は検出できなかったことから、抗コラーゲン type I や抗コラーゲン type III 抗体産生細胞は多クローンのではなく、特異的に誘導されると推測している⁶⁾。また The らは歯周病患者で認められる RF は細菌の抗原エpiteop と交差反応したことを報告し、自己抗体が多反応性である可能性を示している¹⁰⁾。CD5 陽性 B 細胞 (B-1 細胞) が RF などの自己抗体の産生に関与すること、そしてこれらの細胞が産生する抗体は多反応性、低親和性で自己成分とも交差結合することが知られている¹¹⁾。この B-1 細胞は歯周炎歯肉内に多く浸潤していること、そして歯肉中の B 細胞の大部分を占める

ことから、炎症歯肉中で検出される自己抗体の産生に関与している可能性が考えられた^{12, 13)}。グラム陰性細菌の LPS は B 細胞を多クローン性に活性化することから、筆者らは歯周病原細菌の LPS に着目し、*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga ochracea* より LPS を精製し、それらの RF 誘導能に関して実験を行った。これらの LPS をマウスに腹腔投与し、血清中の RF 量を測定したところ、*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *C. ochracea* LPS は血清 IgM-RF, IgG-RF とともに強く誘導したが、*P. gingivalis* の LPS は他の LPS と異なり、RF の誘導能が低いことが明らかになった¹⁴⁾。さらに他の自己抗体である抗 T 細胞抗体の誘導能に関して実験を行ったところ RF と同様の結果を示した¹⁵⁾。次に誘導された抗 T 細胞抗体が B-1 細胞に由来するか調べるために、マウス腹腔細胞より B-1 細胞を、脾臓細胞より CD5 陰性 B 細胞 (B-2 細胞) を分離し、*in vitro* において LPS で刺激したところ、両細胞ともに IgM を産生したが、IgM 抗 T 細胞抗体は B-1 細胞によって産生されていた。以上のことから歯周病原細菌の LPS は B-1 細胞をポリクローナルに活性化することにより、RF や抗 T 細胞抗体などの自己抗体を誘導することが示唆された。

多形核白血球

多形核白血球は Interleukin-8 (IL-8)、CXC ケモカインや fMLP などの細菌性ペプチド、そして補体の活性化によって産生された C3a や C5a などによって歯周炎局所の歯周ポケットおよび歯肉上皮内を含む歯周組織に遊走する。そして歯周ポケット上皮を通過し、歯周ポケットに存在する細胞のほとんどを占める。多形核白血球はオプソニン化された細菌の貪食と殺菌、脱顆粒によるタンパク分解酵素や抗菌ペプチドの放出、そして炎症性サイトカインの産生などにより感染最前線部位で宿主防御に大きな役割を担っている。我々はヒト末梢血多形核白血球の歯周病原細菌 LPS 刺激時の炎症性サイトカイン産生に関して検討した。*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *C. ochracea* の LPS は IL-1 β , TNF- α , IL-8 の産生を有意に刺激したが、*P. gingivalis* と *C. ochracea* LPS の活性は *A. actinomycetemcomitans* より有意に低かった¹⁶⁾。

P. gingivalis の LPS は自己抗体の誘導能の結果と同様に、低い活性を示したが、*C. ochracea* の LPS は高い自己抗体誘導能をもちながら、ヒト PMN の炎症性サイトカイン誘導に対して弱い活性しか示さなかった。

この理由は不明であるが、実験対象となった種や細胞の種類の違いが考えられた。しかし当時はLPS受容体の同定はなされておらず、なぜ菌種の違いによってLPSの活性に違いがあるのか明らかにするにはいたらなかった。

LPS誘導性骨吸収

LPSの生物学的活性に骨吸収誘導能がある。*P.gingivalis*や*A.actinomycetemcomitans*のLPSは*in vitro*において骨吸収活性をもつことが示されている。これらのLPSはマクロファージや線維芽細胞よりIL-1を産生させること、そしてIL-1は歯周炎における歯槽骨破壊と関連していることが報告されている。我々はこれらのLPSをマウス歯肉に頻回投与し、*in vivo*における骨吸収活性と歯肉中のIL-1量を調べた¹⁷⁾。骨吸収誘導能は*P.gingivalis* LPS、*A.actinomycetemcomitans* LPSともにほぼ同程度の活性を示したが、*A.actinomycetemcomitans* LPS投与マウスが*P.gingivalis* LPS投与マウスよりもより早期に骨吸収を起こしていた。両LPS共にIL-1 α 、IL-1 β を誘導したが、その量は*A.actinomycetemcomitans* LPS投与マウスで高かった。この結果は*P.gingivalis* LPSによって誘導される骨吸収は*A.actinomycetemcomitans* LPSによるものとはメカニズムが異なる可能性を示している。

Toll-like receptors (TLRs)

1996年にショウジョウバエの発生期の背腹軸決定に重要な役割をもつTollを欠損させたところ、このハエは通常は無害の真菌による感染によって死に至ることが報告された¹⁸⁾。Tollの細胞内ドメインはIL-1受容体のもとの相同性を示した。LPSやPGN刺激によって引き起こされる細胞応答はIL-1刺激のものと同様であることから、これらの受容体の発見を目指して、哺乳類のTollホモログの探索、研究が進められた。

現在ではヒトで10種類のTLRsが同定され、TLRsが様々な細菌構成成分の認識に携わっていることが解明された¹⁹⁾(図1)。TLRsはタイプIの膜貫通型受容体で細胞膜もしくはエンドソーム膜上に発現している。細胞外領域のLeucine-rich repeat (LRR)はPAMPsの認識に、そして細胞内のToll/Interleukin-1 receptor (TIR)ドメインは細胞内シグナリングに関与する。TLR4は共同受容体のMD-2とともにLPSの認識に、そしてTLR2はPGNの認識に、またTLR2はTLR1またはTLR6とヘテロダイマーを形成することによりそれぞれトリアシルリポ蛋白とジアシルリポタンパクの認識に関与するが、TLR2によるPGN

に認識には異論も存在する^{20, 21)}。血清LPS結合タンパク(LBP)やGPIアンカー受容体型もしくは可溶性のCD14はLPSやPGNを捕獲し、TLR4/MD-2複合体やTLR2に引き渡す役割をもっていると考えられており、細胞のLPSやPGNに対する反応を増加させる。TLR2とTLR4の活性化は細胞内アダプター分子のMyD88を介して、転写因子NF- κ Bの活性化やJNK, p38, ERKなどのMAPK活性化を誘導することにより、炎症性サイトカインや接着分子などの発現に関与する。またTLR4はMyD88を介する細胞内シグナリング経路に加えて、TRIFをリクルートすることにより、転写因子IRF3の活性化によるI型インターフェロン(IFN α/β)の産生にも関与する。TRIFはさらにRIP homotypic interaction motif (RHIM)を介してRIP1と相互作用し、遅延性のNF- κ Bの活性化にも関与している²²⁾。LPSで樹状細胞を刺激するとTh1反応を誘導するIL-12p70, IFN γ の産生が強く見られるのに対して、Pam₃Cysでの刺激はIL-12の産生を抑制し、Th2反応を誘導するIL-10やIL-5, IL-13を強く誘導する²³⁻²⁵⁾。我々もヒト末梢血単核球をLPSもしくはPam₃CSK₄で刺激したところTNF- α はLPSにより、そしてIL-8はPam₃CSK₄によって強く誘導された²⁶⁾。このようなTLR2とTLR4リガンドによる細胞応答の相違は、上述したようなシグナリング経路の相違によるものと考えられている。

LPS

LPSはグラム陰性細菌の外膜外葉に存在する。菌種、菌株によって多様性を示す多糖の繰り返し構造のO抗原、菌種間で構造が保存されているコア多糖、そして内毒素活性中心であるlipid Aよりなる²⁷⁾。*E. coli*のlipid A(化合物506)は β 1,6結合のグルコサミン2糖体にエステル結合もしくはアミド結合した6本の脂肪酸と1,4'位にリン酸が結合した構造をとっている(図2)。Lipid Aはその受容体のヒトTLR4/MD-2に対してアゴニストとして作用するのに対して、脂肪酸が4本の*E. coli*のlipid A前駆体lipid IVa(化合物406)はヒトに対してアンタゴニスト、マウスに対してアゴニストとして作用する²⁸⁾。そのため実験動物によってデータの解釈には注意が必要となる。菌種によりlipid Aの脂肪酸の種類そして数の相違や1,4'位のリン酸の脱リン酸化やホスホエタノールアミンへの置換が認められるが、これらの変化はTLR4の活性化能に影響することが報告されている²⁹⁾。

以前より*P.gingivalis*のlipid Aは腸内細菌のものとは異なりLPS不応答マウスのC3H/HeJマウスに対

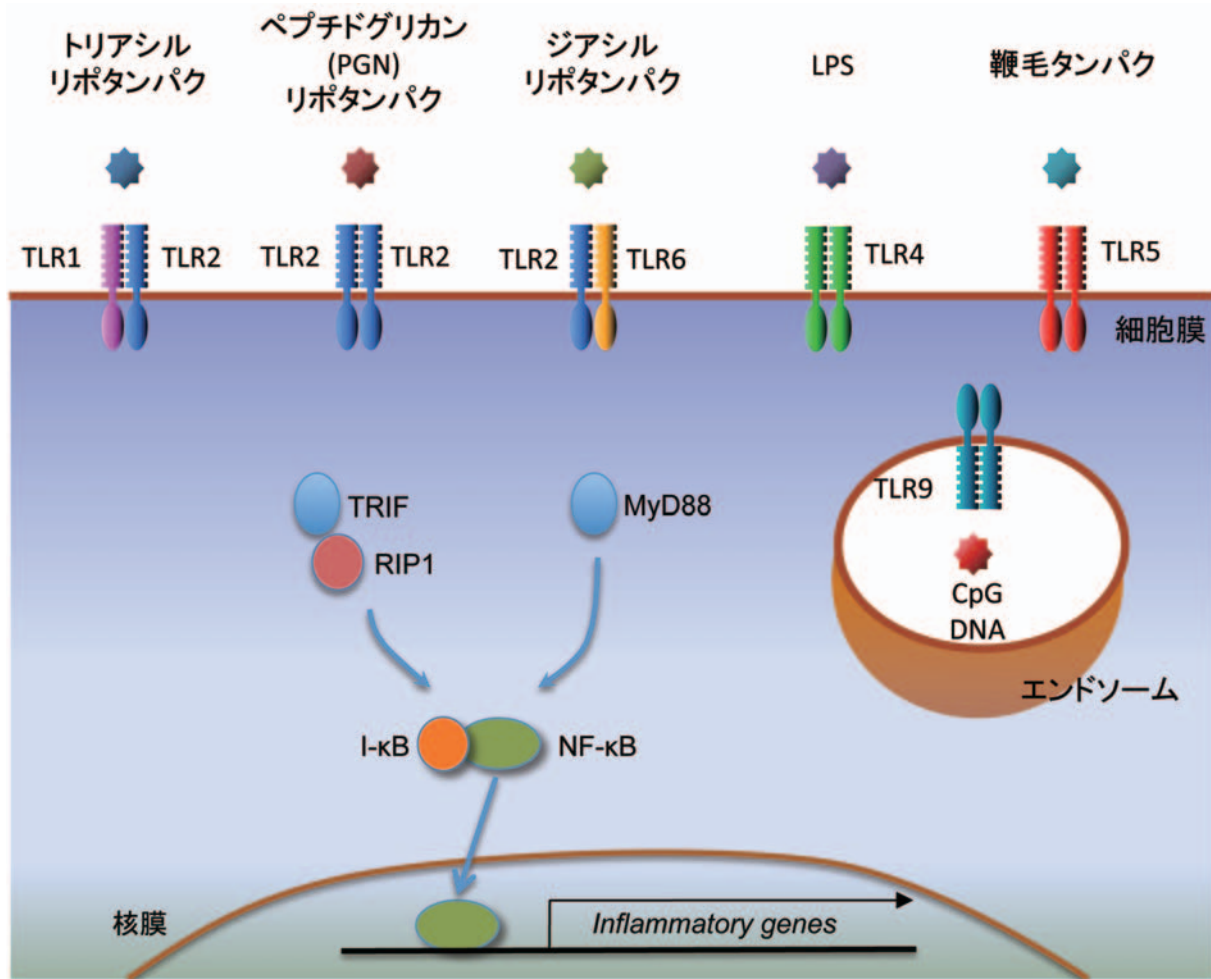


図1 TLRsによる細菌構成成分の認識

して活性を示すことが示されていた³⁰⁾。当初, *P.gingivalis* LPSはTLR2とTLR4によって認識されるとする報告があった³¹⁾。後にこのTLR2活性化能はLPS精製時に混入したリポ蛋白によること,そして*P.gingivalis*の合成lipid AはTLR2を活性化せず,弱くTLR4を活性化することが報告された^{32, 33)}。我々は*E.coli* LPS刺激によるアストロサイトーマ細胞株のU373細胞,末梢血単核細胞と歯肉線維芽細胞のIL-6, IL-1βの産生とICAM-1の発現は*P.gingivalis* LPSの添加により抑制されること,すなわち*P.gingivalis* LPSのアンタゴニスト活性を発見した³⁴⁾。また*C.ochracea* LPSにも同様の活性が認められた。現在まで*A.actinomycetemcomitans*, *F.nucleatum*, *P.gingivalis*のlipid Aの構造が解析されているが,*A.actinomycetemcomitans*, *F.nucleatum* lipid Aは*E.coli*のものと同様である³⁵⁻³⁹⁾。これに対して,*P.gingiva-*

lis lipid Aは報告によって構造が異なり,*E.coli*よりも長いアシル鎖をもつこと,そして,その本数が少ないこと,さらにリン酸基が脱リン酸されていたり,ホスホエタノールアミンに置換されていることが報告されている。近年,*P.gingivalis*は培養条件によってlipid Aの構造を変化させることが報告された。培養時のヘミン濃度が高く栄養条件が良い場合にはLPSはTLR4アンタゴニストとして作用し,ヘミン濃度が低い場合,培養温度が高い場合にはTLR4アゴニストとして働く^{39, 40)}。*P.gingivalis*のTLR4アンタゴニスト活性は,歯周病におけるこの細菌の重要性を考えると興味深い。*P.gingivalis*のLPSは*P.gingivalis*のみならず歯周ポケット内に存在する他の細菌の認識を抑制することによってこれらの細菌に対する免疫応答を抑制している可能性が考えられる。

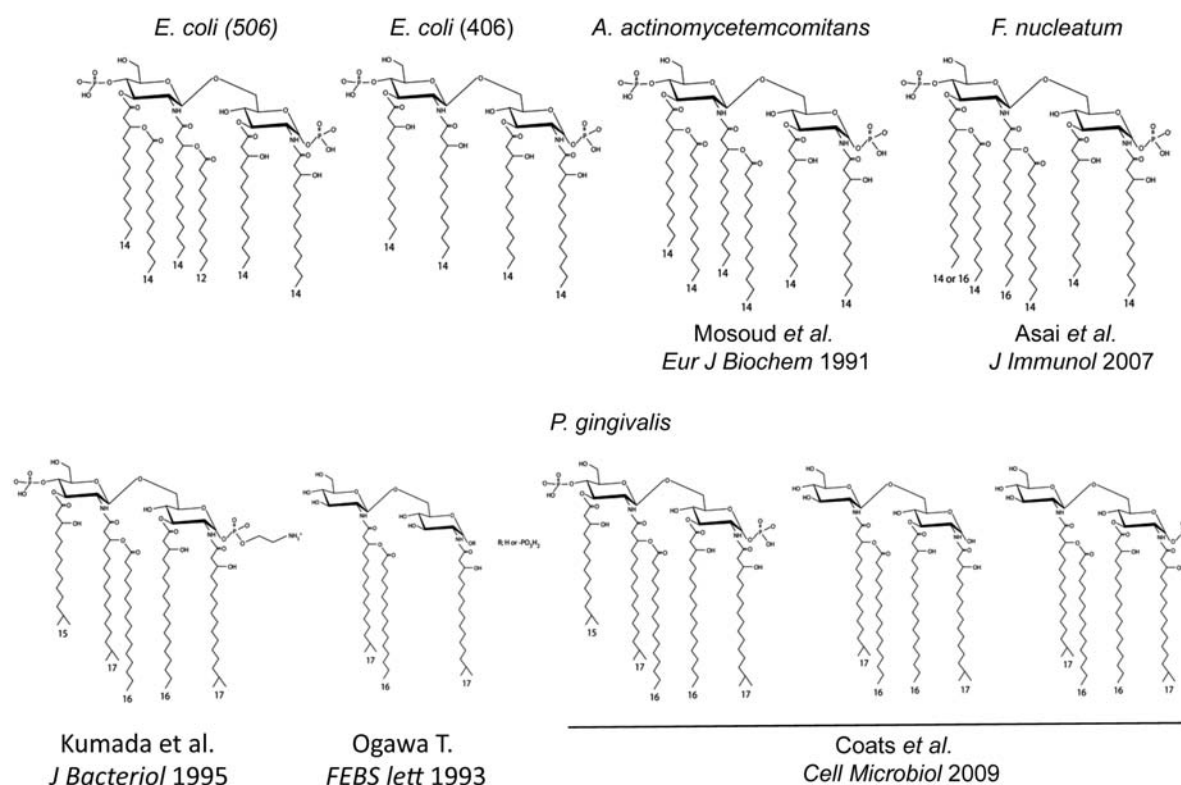


図2 歯周病原細菌の Lipid A の構造

ショウジョウバエにおける PGN の認識

私は2002年からアメリカマサチューセッツ大学でショウジョウバエのグラム陰性菌の認識機構に関して実験を行った。ショウジョウバエの自然免疫シグナリングは Toll 経路と Imd 経路に分類される⁴¹⁾。グラム陽性菌は体液中の Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-SA と PGRP-SD そして Gram-negative binding protein (GNBP)-1 によって認識され、種々のセリンプロテアーゼカスケードの活性化の結果、切断された Spatzle が Toll に結合することで、Toll 経路が活性化され、抗菌ペプチドの Drosomycin を発現する。すなわちショウジョウバエの Toll は直接的な細菌認識には関与しない。一方、グラム陰性菌は細胞膜貫通タンパクの PGRP-LC によって認識され、ヒトの TNFR 経路に相当する Imd 経路を活性化することにより、グラム陰性菌に有効な抗菌ペプチド Diptericin を誘導する。すなわちショウジョウバエはグラム陽性菌と陰性菌を異なる種類の PGRP で区別し、それぞれの菌に対して有効に作用する抗菌ペプチドを誘導する^{42, 43)}。

PGN は β 1,4 結合により結合した N アセチルグルコサミン (GlcNAc) と N アセチルムラミン酸 (MurNAc)

の繰り返し構造からなる多糖鎖と、MurNAc 結合するステムペプチドからなる (図3)。そしてステムペプチドの3番目のジアミノ酸が近接するステムペプチドの D-Ala 間で架橋した網目状構造をとっている。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-ジアミノピメリン酸 (meso-DAP) と異なっている⁴⁴⁾。ショウジョウバエマクロファージ細胞株を用いた実験では Diptericin の発現はグラム陰性菌の PGN のポリマーとモノマー (TCT: Tracheal cytotoxin) の刺激でのみ強く誘導され、グラム陽性菌の PGN の刺激では誘導されなかった⁴⁵⁾。

PGRP-LC には細胞質ドメインが同一で細胞外 PGRP ドメインのアミノ酸配列が異なる3つのサブライシングアイソフォーム、PGRP-LCa, PGRP-LCx, PGRP-LCy が存在する。これらのどのアイソフォームがグラム陰性 PGN の認識に関与しているか調べるために、それぞれのアイソフォームに特異的な dsRNA を用いて RNAi 実験を行った結果、meso-DAP 型の PGN ポリマーの認識には PGRP-LCx が、そして meso-DAP 型モノマーの認識には PGRP-LCx と PGRP-LCa が関与することが明らかになった⁴⁵⁾。その後 PGRP-LC のエクストドメイン

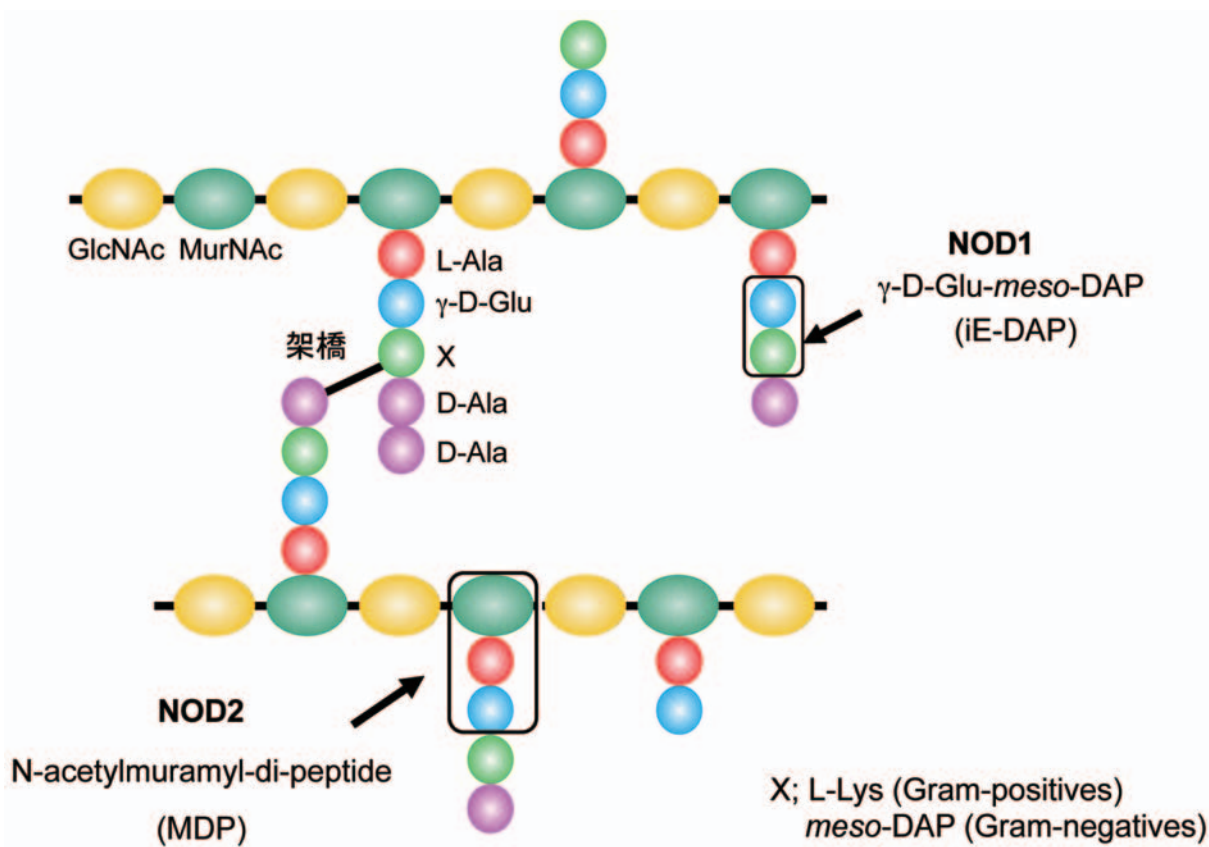


図3 ペプチドグリカンの構造

の結晶解析が行われ、PGRP-LCaはTCTと結合できないこと、そしてPGRP-LCxはTCTに結合し立体構造の変化がoccurり、PGRP-LCaとのdimerizationがおこることが示された⁴⁶⁾。

また、ハエ生体ではPGRP-LCの他にPGRP-LEもDAP型のPGNの認識に関与していることが明らかになった⁴⁷⁾。PGRP-LEは細胞膜貫通領域を欠損しており、細胞内に存在するDAP型PGNポリマーまたはTCTの認識に関与している。PGRP-LEはTCTと結合することにより多量体化する⁴⁸⁾。PGRP-LEは抗菌ペプチドの発現のみならずオートファジーの誘導にも関与し、細胞内寄生菌の排除にも関与している⁴⁹⁾。PGRP-LCとPGRP-LE内に哺乳類におけるTRIFとRIP1の相互作用に必要なRHIMに相同性をもつドメインが発見された。PGRP-LCとPGRP-LEのRHIM様ドメインの変異および欠失はIMD経路の活性化を抑制したが、IMDとの相互作用には影響しなかった⁴⁷⁾。このRHIM様ドメインのIMD調整メカニズムに関しては更なる実験が必要と思われる。

ヒトPGRP

ヒトは4種類のPGRP、PGLYRP-1 (PGRP-S)、PGLYRP-2 (PGRP-L)、PGLYRP-3 (PGRP-Iα)、PGLYRP-4 (PGRP-Iβ)を持っているが、ショウジョウバエと異なり、いずれのPGRPもシグナル伝達受容体としては機能しない⁴¹⁾。PGLYRP-1は好中球や上皮細胞に発現し、グラム陽性、陰性菌に対して抗菌タンパクとして作用する⁵⁰⁾。PGLYRP-2は血清アミダーゼであり、肝臓で恒常的に発現している⁵¹⁾。上皮細胞においては細菌やサイトカインの刺激によって誘導される。近年PGLYRP-2がPGN誘導性の関節炎モデルにおいて、NOD2とPGLYRP-2の両者が必要であること、そしてPGNとMDPで誘導されるケモカインや炎症性サイトカインの産生は抑制されていることが示された⁵²⁾。このメカニズムについては不明であるが、PGNによって発現、分泌されたPGLYRP-2がオートクラインに自己細胞上にある何らかの受容体に作用する機序が推測されている。PGLYRP-3とPGLYRP-4も上皮、腺細胞に発現し、細菌刺激によりその発現は増加する、グラム陽性、陰性菌に対して作

用する抗菌タンパクと考えられている。PGLYRP-1,3,4の抗菌活性には亜鉛イオンを必要とし、これらは他の抗菌ペプチドのPhospholipase A2, α -もしくは β - defensin そして BPI (Bactericidal permeability-increasing protein) と協調的に働くことによって、より効率的に抗菌的に作用することが報告されている⁵³⁾。

NOD

NOD1 および NOD2 はそのアミノ酸構造の N 末にシグナル伝達に関与する CARD ドメイン、中央部に NOD ドメイン、C 末に LRR をもつ⁵⁴⁾。NOD1 は上皮細胞をはじめとするさまざまな細胞にユビキタスに発現しているのに対して、NOD2 の発現はマクロファージや腸上皮細胞などに認められる。NOD1 および NOD2 は細胞質に存在し、それぞれグラム陰性菌に特有な構造である iE-meso-DAP と全ての細菌の PGN に共通する構造である MDP の認識に関与する。リガンド刺激で NOD の多量体化がおこると、下流に存在する RIP2 がリクルートされる。NOD の刺激は JNK などの MAPK や NF- κ B を活性化し、炎症性サイトカインや β -defensin などの抗菌ペプチドの発現を誘導する。NOD は *Chlamydia*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* や *Salmonella typhimurium* などの細胞内寄生菌だけでなく、*Helicobacter pylori* のような細胞外に存在する細菌認識への関与も報告されている⁵⁵⁾。NOD1 は *H. pylori* が 4 型分泌機構によって胃上皮内に注入された PGN 断片の認識に関与している。さらに *S. flexneri* 感染において、NOD はオートファジータンパクの ATG16L1 と相互作用することにより、RIP2 及び NF- κ B に非依存的にオートファジーを誘導することが示されている⁵⁶⁾。

細菌感染は NOD や TLR などの複数の PRMs を同時に刺激すると考えられる。NOD は TLR とともに NF- κ B や MAPK を活性化するが、これらのシグナリングにはクロストークが存在すると考えられており、NOD1 もしくは NOD2 リガンドによる刺激は TLR 刺激によるサイトカイン産生を相乗的に増強する。

歯周疾患において、ヒト歯肉上皮細胞は NOD1 および NOD2 を発現しており、炎症部位の発現量は健康部位よりも多いことから歯周炎における NOD の関与が推測されている⁵⁷⁾。*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* は歯肉上皮細胞や血管内皮細胞に侵入、増殖することが報告されており、NOD の細胞内寄生菌に対する役割を考えると、NOD がそれらの認識に関与する可能性は高い。そこで歯周病原細菌の PGN の NOD1 および NOD2 活性化能につい

て解析した結果、*P. gingivalis* PGN の NOD1 および NOD2 活性化能は *A. actinomycetemcomitans* や *F. nucleatum* の PGN と比較して 10–100 倍ほど低いことが明らかになった。さらに口腔上皮細胞の PGN 刺激時の IL-8 産生量も、*P. gingivalis* は *A. actinomycetemcomitans* と *F. nucleatum* と比較して弱い活性を示した⁵⁸⁾。*P. gingivalis* PGN の低 NOD 刺激性は *P. gingivalis* 感染によって血管内皮細胞がオートファジーを強く誘導できなかつた結果と関連しているかもしれない⁵⁹⁾。

歯周病原細菌の PGN の構造を調べてみると、ステムペプチド三番目のアミノ酸 meso-DAP が、*P. gingivalis* および *F. nucleatum* では、それぞれ L,L-DAP, meso-Lanthionine に置換されていることが報告されている^{60, 61)}。過去の合成ムラミルトリペプチド(MTP)を用いた報告で、PGN 中に存在するステムペプチド3番目のアミノ酸により NOD 活性化能に差があることが示されている⁶²⁾。meso-DAP を含有する MTP が NOD1 の活性は最も高く、meso-Lanthionine の MTP はその活性は若干弱く、そして L,L-DAP の MTP は活性がなかつたことが示されている。IFN γ や TNF α は腸上皮細胞において NOD1 もしくは NOD2 の発現を増強することが報告されている。我々の実験においても IFN γ による口腔上皮細胞の前処理で NOD1 リガンドへの反応性の増強が認められている⁵⁸⁾。Th1 細胞などの IFN γ 発現細胞は歯周炎歯肉において病理組織学的に観察されていること、そして歯肉溝浸出液中の IFN γ は歯周炎において増加していることから、IFN γ が上皮細胞の NOD1 の発現に影響し、歯周病原細菌への反応性に影響しているかもしれない。

おわりに

今回総説したように *P. gingivalis* は LPS の TLR4 低刺激性、TLR4 アンタゴニスト活性、NOD 低刺激性など宿主細胞による検知から逃避する特殊な機構をもっていると思われる。またこの他にも Gingipain による CD14, C3 やサイトカインの分解、また線毛が CXCR4 を活性化することで TLR2 刺激による NF- κ B 活性化を抑制することにより自然免疫を抑制することが報告されている⁶³⁾。もちろん歯周病は *P. gingivalis* 以外の歯周病原細菌もその発症、進行に関与している混合感染であり、これらの細菌の細菌間、細菌—宿主間、そして歯周組織細胞間の相互作用を分子レベルで解明することは、創薬をはじめとする新規歯周治療法の開発に重要と考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の遂行にご指導いただきました加藤伊八長崎大学名誉教授、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病学、原宜興教授をはじめとする多くの皆様に感謝致します。またショウジョウバエの研究でご指導いただいた米国マサチューセッツ州立大学医学部、Neal Silverman 准教授、Douglas Golenbock 教授に感謝致します。

文 献

- 1) Page RC, Schroeder HE: Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, 34: 235-249, 1976.
- 2) Mackler BF, Frostad KB, Robertson PB, Levy BM: Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *J Periodontal Res*, 12: 37-45, 1977.
- 3) Seymour GJ, Greenspan JS: The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodontal Res*, 14: 39-46, 1979.
- 4) Ogawa T, Tarkowski A, McGhee ML, Moldoveanu Z, Mestecky J, Hirsch HZ, Koopman WJ, Hamada S, McGhee JR, Kiyono H: Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cells from localized chronic inflammatory tissue. *J Immunol*, 142: 1150-1158, 1989.
- 5) Hirsch HZ, Tarkowski A, Koopman WJ, Mestecky J: Local production of IgA- and IgM-rheumatoid factors in adult periodontal disease. *J Clin Immunol*, 9: 273-278, 1989.
- 6) Hirsch HZ, Tarkowski A, Miller EJ, Gay S, Koopman WJ, Mestecky J: Autoimmunity to collagen in adult periodontal disease. *J Oral Pathol*, 17: 456-459, 1988.
- 7) The J, Ebersole JL: Rheumatoid factor (RF) distribution in periodontal disease. *J Clin Immunol*, 11: 132-142, 1991.
- 8) Gargiulo AV, Jr., Robinson J, Toto PD, Gargiulo AW: Identification of rheumatoid factor in periodontal disease. *J Periodontol*, 53: 568-577, 1982.
- 9) 金子高士, 原 宜興, 岩崎由佳, 市丸英二, 岩永正憲, 加藤伊八: 歯周炎歯肉における抗ヒト IgG 抗体保有細胞の存在に関する免疫組織学的研究. *日歯周誌*, 35: 236-242, 1993.
- 10) The J, Ebersole JL: Rheumatoid factor from periodontitis patients cross-reacts with epitopes on oral bacteria. *Oral Dis*, 2: 253-262, 1996.
- 11) Berland R, Wortis HH: Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*, 20: 253-300, 2002.
- 12) Sugawara M, Yamashita K, Yoshie H, Hara K: Detection of, and anti-collagen antibody produced by, CD5-positive B cells in inflamed gingival tissues. *J Periodontal Res*, 27: 489-498, 1992.
- 13) Donati M, Liljenberg B, Zitzmann NU, Berglundh T: B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions. *J Periodontal Res*, 44: 683-688, 2009.
- 14) Hara Y, Kaneko T, Yoshimura A, Kato I: Serum rheumatoid factor induced by intraperitoneal administration of periodontopathic bacterial lipopolysaccharide in mice. *J Periodontal Res*, 31: 502-507, 1996.
- 15) Kaneko T, Hara Y, Yoshimura A, Kato I: Induction of anti-thymocyte/T lymphocyte antibodies in mice injected with lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res*, 34: 105-112, 1999.
- 16) Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I: Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res*, 32: 279-286, 1997.
- 17) Nishida E, Hara Y, Kaneko T, Ikeda Y, Ukai T, Kato I: Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res*, 36: 1-8, 2001.
- 18) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86: 973-983, 1996.
- 19) Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11: 373-384, 2010.
- 20) Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C, Boneca IG: Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep*, 5: 1000-1006, 2004.
- 21) Dziarski R, Gupta D: *Staphylococcus aureus* peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect Immun*, 73: 5212-5216, 2005.
- 22) Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J: RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*, 5: 503-507, 2004.
- 23) Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, Pulendran B: Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regu-

- lated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol*, 171: 4984-4989, 2003.
- 24) Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B: A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol*, 172: 4733-4743, 2004.
- 25) Kapsenberg ML: Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*, 3: 984-993, 2003.
- 26) Yamaguchi R, Yoshimura A, Yoshioka H, Kaneko T, Hara Y: Ability of supragingival plaque to induce toll-like receptor 4-mediated stimulation is associated with cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *J Periodontol*, 80: 512-520, 2009.
- 27) Raetz CR, Whitfield C: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71: 635-700, 2002.
- 28) Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CR: Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem*, 266: 19490-19498, 1991.
- 29) Cekic C, Casella CR, Eaves CA, Matsuzawa A, Ichijo H, Mitchell TC: Selective activation of the p38 MAPK pathway by synthetic monophosphoryl lipid A. *J Biol Chem*, 284: 31982-31991, 2009.
- 30) Ogawa T, Shimauchi H, Uchida H, Mori Y: Stimulation of splenocytes in C3H/HeJ mice with *Porphyromonas gingivalis* lipid A in comparison with enterobacterial lipid A. *Immunobiology*, 196: 399-414, 1996.
- 31) Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun*, 72: 5041-5051, 2004.
- 32) Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T: Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *Int Immunol*, 16: 1431-1437, 2004.
- 33) Sawada N, Ogawa T, Asai Y, Makimura Y, Sugiyama A: Toll-like receptor 4-dependent recognition of structurally different forms of chemically synthesized lipid As of *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Exp Immunol*, 148: 529-536, 2007.
- 34) Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y: Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infect Immun*, 70: 218-225, 2002.
- 35) Ogawa T: Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* lipopolysaccharide. *FEBS Lett*, 332: 197-201, 1993.
- 36) Masoud H, Weintraub ST, Wang R, Cotter R, Holt SC: Investigation of the structure of lipid A from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4 and human clinical isolate PO 1021-7. *Eur J Biochem*, 200: 775-781, 1991.
- 37) Kumada H, Haishima Y, Umemoto T, Tanamoto K: Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 177: 2098-2106, 1995.
- 38) Asai Y, Makimura Y, Kawabata A, Ogawa T: Soluble CD14 discriminates slight structural differences between lipid A that lead to distinct host cell activation. *J Immunol*, 179: 7674-7683, 2007.
- 39) Coats SR, Jones JW, Do CT, Braham PH, Bainbridge BW, To TT, Goodlett DR, Ernst RK, Darveau RP: Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. *Cell Microbiol*, 11: 1587-1599, 2009.
- 40) Curtis MA, Percival RS, Devine D, Darveau RP, Coats SR, Rangarajan M, Tarelli E, Marsh PD: Temperature dependent modulation of *Porphyromonas gingivalis* lipid A structure and interaction with the innate host defences. *Infect Immun*, 2011.
- 41) Royet J, Dziarski R: Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat Rev Microbiol*, 5: 264-277, 2007.
- 42) Kaneko T, Silverman N: Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cell Microbiol*, 7: 461-469, 2005.
- 43) Kaneko T, Golenbock D, Silverman N: Peptidoglycan recognition by the *Drosophila* Imd pathway. *J Endotoxin Res*, 11: 383-389, 2005.
- 44) Schleifer KH, Kandler O: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*, 36: 407-477, 1972.
- 45) Kaneko T, Goldman WE, Mellroth P, Steiner H, Fukase K, Kusumoto S, Harley W, Fox A, Golenbock D, Silverman N: Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity*, 20: 637-649, 2004.
- 46) Chang CI, Chelliah Y, Borek D, Mengin-Lecreux D, Deisenhofer J: Structure of tracheal cytotoxin in complex with a heterodimeric pattern-recognition receptor. *Science*, 311: 1761-1764, 2006.
- 47) Kaneko T, Yano T, Aggarwal K, Lim JH, Ueda K,

- Oshima Y, Peach C, Erturk-Hasdemir D, Goldman WE, Oh BH, Kurata S, Silverman N: PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat Immunol*, 7: 715-723, 2006.
- 48) Lim JH, Kim MS, Kim HE, Yano T, Oshima Y, Aggarwal K, Goldman WE, Silverman N, Kurata S, Oh BH: Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. *J Biol Chem*, 281: 8286-8295, 2006.
- 49) Yano T, Mita S, Ohmori H, Oshima Y, Fujimoto Y, Ueda R, Takada H, Goldman WE, Fukase K, Silverman N, Yoshimori T, Kurata S: Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol*, 9: 908-916, 2008.
- 50) Lu X, Wang M, Qi J, Wang H, Li X, Gupta D, Dziarski R: Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *J Biol Chem*, 281: 5895-5907, 2006.
- 51) Zhang Y, van der Fits L, Voerman JS, Melief MJ, Laman JD, Wang M, Wang H, Li X, Walls CD, Gupta D, Dziarski R: Identification of serum N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase as liver peptidoglycan recognition protein 2. *Biochim Biophys Acta*, 1752: 34-46, 2005.
- 52) Saha S, Qi J, Wang S, Wang M, Li X, Kim YG, Nunez G, Gupta D, Dziarski R: PGLYRP-2 and Nod2 are both required for peptidoglycan-induced arthritis and local inflammation. *Cell Host Microbe*, 5: 137-150, 2009.
- 53) Wang M, Liu LH, Wang S, Li X, Lu X, Gupta D, Dziarski R: Human peptidoglycan recognition proteins require zinc to kill both gram-positive and gram-negative bacteria and are synergistic with antibacterial peptides. *J Immunol*, 178: 3116-3125, 2007.
- 54) Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T: Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*, 6: 9-20, 2006.
- 55) Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL: Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, 5: 1166-1174, 2004.
- 56) Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nunez G, Girardin SE, Philpott DJ: Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*, 11: 55-62, 2010.
- 57) Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y, Kusumoto S, Fukase K, Shibata K, Sugawara S, Sasano T, Takada H: Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res*, 85: 524-529, 2006.
- 58) Okugawa T, Kaneko T, Yoshimura A, Silverman N, Hara Y: NOD1 and NOD2 mediate sensing of periodontal pathogens. *J Dent Res*, 89: 186-191, 2010.
- 59) Yamatake K, Maeda M, Kadowaki T, Takii R, Tsukuba T, Ueno T, Kominami E, Yokota S, Yamamoto K: Role for gingipains in *Porphyromonas gingivalis* traffic to phagolysosomes and survival in human aortic endothelial cells. *Infect Immun*, 75: 2090-2100, 2007.
- 60) Vasstrand EN, Hofstad T, Endresen C, Jensen HB: Demonstration of lanthionine as a natural constituent of the peptidoglycan of *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun*, 25: 775-780, 1979.
- 61) Barnard MR, Holt SC: Isolation and characterization of the peptidoglycans from selected gram-positive and gram-negative periodontal pathogens. *Can J Microbiol*, 31: 154-160, 1985.
- 62) Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, Sansonetti PJ, Mengin-Lecreulx D: Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem*, 278: 41702-41708, 2003.
- 63) Hajishengallis G, Wang M, Liang S, Triantafilou M, Triantafilou K: Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 13532-13537, 2008.
-