

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15790

研究課題名(和文) 歯周病細菌による肝臓内侵入・定着機構のバイオイメーシングを用いた解析

研究課題名(英文) Analyses using bioimaging of invasion and colonization mechanisms by periodontal bacteria in the liver

研究代表者

筑波 隆幸 (TSUKUBA, Takayuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：30264055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病細菌は口腔内の血流に乗って全身へ播種し、様々な全身疾患の憎悪に深く関与している。最近、歯周病細菌が非アルコール性脂肪性肝疾患の発症にも関与していることが報告されたが、詳細なメカニズムは不明である。本研究では、バイオイメーシング解析により、歯周病細菌が血流に乗ってどのように肝臓に定着・侵入して、どのような影響を及ぼすのかに関して、培養細胞を用いた変化を観察した。その結果歯周病細菌は主にオートファゴソームやリソソームに存在する事が明らかとなった。また細胞内に脂肪滴が存在すると同菌の感染初期での生存率が增大すること、さらに脂肪滴は菌排除のオートリソソーム形成に影響を及ぼすことも分かった。

研究成果の概要(英文)：Invasion of periodontal bacteria from the oral cavity into the blood circulation causes several systemic diseases. Recently, infection with *P. gingivalis* was reported to accelerate the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease. However, the detailed mechanisms remain unknown. In this study, using bioimaging analysis, we observed invasion and colonization of the periodontal bacteria in the culture hepatocytes. As a result, we found that periodontitis bacteria were present mainly in autophagosomes and lysosomes. It was also found that the presence of lipid droplets within the cells increases the survival rate at the early stage of the infection of the same fungus, and that lipid droplets influence autolysosome formation of bacterial exclusion.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：バイオイメーシング 歯周病細菌

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌は口腔内の血流に乗って全身へ播種し、感染性心内膜炎やアテローム性動脈硬化症などの様々な全身性疾患の増悪に深く関与している。我々の研究グループは、歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. gingivalis*) を用いて、アテローム性動脈硬化症モデルを用いて、歯周病細菌による心循環器系の組織化学的解析と血清蛋白質の変化について報告した (Hashimoto et al. J Biochem. 2006。) さらに、ヒト大動脈内皮細胞を用いて、同菌が貪食された後、オートファジーを誘導するものの、リソソームでの分解に耐性を示すメカニズムを世界に先駆けて報告した。 (Yamatake et al. Infect. Immun. 2007) 2012 年に *P. gingivalis* が非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) や非アルコール性脂肪肝 (NASH) の発症に関与することが初めて報告された。これらの疾患はアルコール摂取がないにもかかわらず、肝臓に脂肪蓄積と炎症があり、やがて肝硬変へと進行する生活習慣病の 1 種である。NASH 患者に対する解析から、*P. gingivalis* の感染率が有意に高いこと、さらにマウスを用いた動物モデルによる解析でも高脂肪摂取のマウスには非感染群に比べて肝臓への顕著な脂肪蓄積と肥大化が認められ、ヒト NASH 患者類似の病態を呈することが明らかとなった。しかしながら、血流に乗った歯周病菌がどのように肝臓へ定着し、肝細胞内で増殖ないしは分解を受けるのかは全く不明である。

### 2. 研究の目的

本研究ではバイオイメージング解析により、歯周病菌が血流に乗ってどのように肝臓に定着・侵入して、どのような影響を及ぼすのかに関して、培養細胞やマウス個体を用いた生体内での変化を観察する。このように、歯周病菌が起こす肝臓への侵入経路について時間的空間的变化により、動脈血中に侵入から各種病変へ至る変化をリアルタイムな解析を可能とする。

### 3. 研究の方法

*P. gingivalis* は培養細胞での解析結果、歯肉上皮細胞と血管内皮細胞では異なる細胞動態を取ることが知られている。歯肉上皮細胞では半数は初期エンドソームへ取り込まれた後、リサイクリングエンドソームへ輸送されて大部分は細胞外へ放出される。一方、血管内皮細胞では初期エンドソームへ取り込まれた後、後期エンドソームからリソソームあるいはオートファゴソームへ移送される。しかし肝細胞内での動態は明らかになっていない。そこで、ヒト肝細胞由来の細胞株である HepG2 細胞を用いて歯周病細菌の *P. gingivalis* の接着・侵入機構を解析した。1 細胞当たり 100 細菌を添加して、抗生物質なしの培地に 20 分間培養した後、6、12、24

時間抗生剤入りの培地で培養した。肝細胞内での生存率を算出するために、感染後の肝細胞をホモジネートした後、血液寒天培地でコロニーを算出して細菌の生存数を計算した。

培養細胞に脂肪肝形成モデルを誘導する方法としては培地に、オレイン酸とアルブミンの混液を添加させることで作成可能であった。具体的には無血清培地で培養後、培地にオレイン酸にアルブミンを 1 : 4 の割合で混和後培地中に添加し、1 日後には細胞内に脂肪滴が蓄積した。これをオイルレッド O 染色すると細胞内に脂肪滴が蓄積することが確認できた。

### 4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* は脂肪滴には存在せず、オートファゴソームやリソソームに存在する: ヒト肝細胞様 HepG2 細胞にオレイン酸 2mM を添加し 24 時間培養を行ったところ、細胞内に脂肪滴が蓄積できた。この条件を脂肪肝モデルとした。その際、*P. gingivalis* を MOI:100 で感染させても細胞毒性は認められなかった。この条件で共焦点レーザー蛍光顕微鏡解析を行ったところ、*P. gingivalis* は脂肪滴には局在せず、LAMP2 陽性のリソソームや LC3 陽性のオートファゴソーム内に存在することが分かった。(図 1 及び 2 参照)

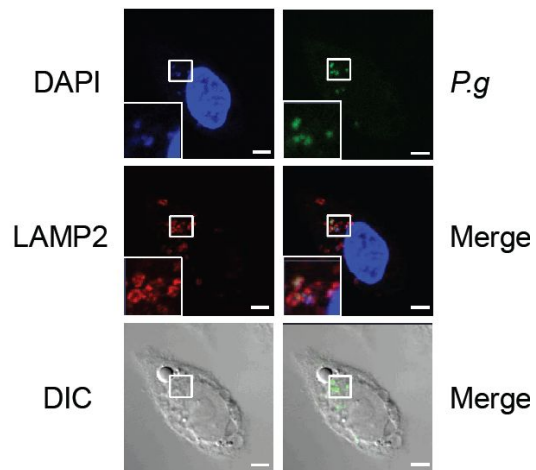


図 1 : LAMP2 と *P. gingivalis* の局在

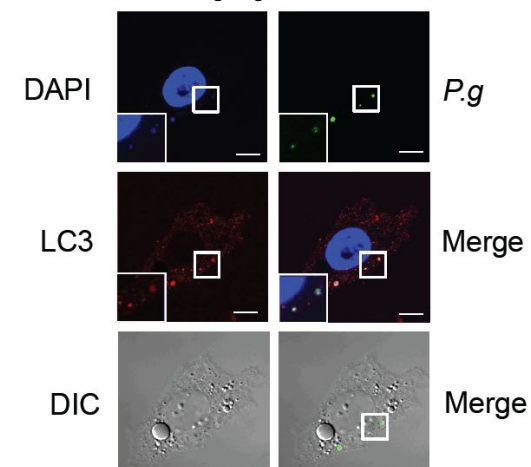


図 2 : LC3 と *P. gingivalis* の局在

(2) 脂肪滴が存在すると *P.g.* の感染初期での生存率が増大する

正常および脂肪肝モデルに *P. gingivalis* を添加し、細胞内に侵入した細菌数を比較したところ、侵入した細菌数に差は見られなかった。さらに添加後、6、12、24、48 時間経過時の細胞内の細菌数を比較したところ、6 時間後には脂肪肝モデルでは有意に多く検出された。この結果から脂肪滴が存在すると *P. gingivalis* の6時間までの感染初期での生存率が増大し、その後は同程度に排除されていくことが分かった。

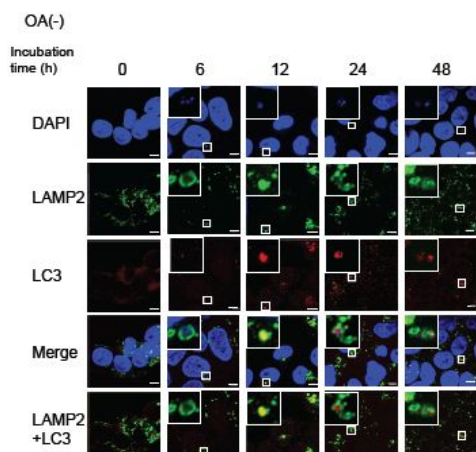


図3：正常肝細胞での *P.gingivalis* の動態

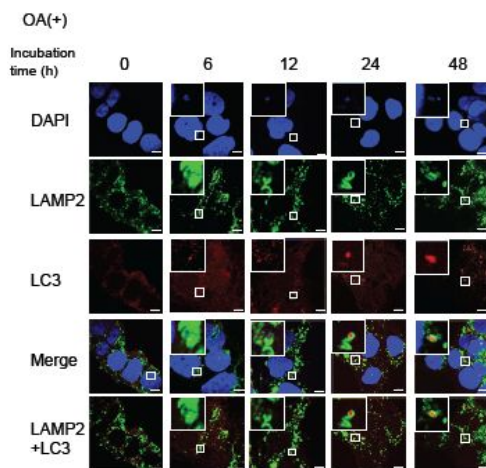


図4：脂肪肝細胞での *P.gingivalis* の動態

(3) 脂肪滴は *P.gingivalis* を排除するオートリソソーム形成に影響を及ぼす

正常および脂肪肝モデルに関して *P. gingivalis* を添加し細胞内のコンパートメントを共焦点レーザー蛍光顕微鏡で解析した。*P. gingivalis* を添加後6~48時間経過時のオートファゴソーム(LC3+/LAMP2-)、オートリソソーム(LC3+/LAMP2+)、リソソーム(LC3-/LAMP2+)での局在を確認した。正常モデルでは侵入した *P. gingivalis* の大部分は時間経過と共にオートファゴソームに存在していることが明らかとなった。(図3及び4参照)。しかし脂肪肝モデルでは、侵入した *P. gingivalis* の大部分は感染12時間

後からリソソームに局在することが分かった。(図3及び4参照)この違いを確認するために、パフィロマイシン A1でオートファジーとリソソームの融合を阻害し、ウエスタンブロッティングで解析を行った。その結果、正常と比較して脂肪肝モデルでは LC3- の発現の増加が認められ、オートファゴソームでの局在が増えている形態学的解析とほぼ一致していた。

以上の結果から、細胞内に脂肪滴が存在する場合、*P. gingivalis* は脂肪滴に寄生する可能性は低いと考えられた。しかし、脂肪滴が細胞内に蓄積していると *P. gingivalis* は感染初期時に生菌数が増大し、その原因はオートファジー・リソソームの膜輸送が変化することが明らかとなった。これらの結果より、細胞内に脂肪滴が存在すると、*P. gingivalis* のオートファジー・リソソーム経路による排除機構が遅延する。その結果、炎症や細胞性傷害が長引くために NAFLD 発症が増悪する可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

1. Yamaguchi Y, Sakai E, Okamoto K, Kajiya H, Okabe K, Naito M, Kadowaki T, Tsukuba T.: Rab44, a novel large Rab GTPase, negatively regulates osteoclast differentiation by modulating intracellular calcium levels followed by NFATc1 activation. *Cell Mol Life Sci.* 75(1):33-48 2018 査読有
2. Sakamoto H, Yamashita K, Okamoto K, Kadowaki T, Sakai E, Umeda M, Tsukuba T.: Transcription factor EB influences invasion and migration in oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis.* 印刷中 2018. 査読有
3. Takii R, Kadowaki T, Tsukuba T, Yamamoto K.: Inhibition of gingipains prevents *Porphyromonas gingivalis*-induced preterm birth and fetal death in pregnant mice. *Eur J Pharmacol.* 824:48-56 2018. 査読有
4. Fukuma Y, Sakai E, Komaki S, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T.: Rutaecarpine attenuates osteoclastogenesis by impairing M-CSF and RANKL-stimulated signaling pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 印刷中 2018. 査読有
5. Narahara H, Sakai E, Yamaguchi Y, Narahara S, Iwatake M, Okamoto K, Yoshida N, Tsukuba T: Actin binding LIM 1 (abLIM1) negatively controls osteoclastogenesis by regulating cell migration and fusion. *J Cell Physiol.* 印刷中 2018 査読有
6. Komaki S, Sakai E, Fukuma Y, Nishihsita K, Okamoto K, Tsukuba T:

Dihydroartemisinin represses osteoclastogenesis of bone marrow macrophages through reduced NFATc1 expression and impaired phosphorylation of I B . **Biomed Res** 印刷中 2018 査読有

7. Yamashita K, Iwatake M, Okamoto K, Yamada SI, Umeda M, Tsukuba T: Cathepsin K modulates invasion, migration and adhesion of oral squamous cell carcinomas in vitro. **Oral Dis**. 23(4): 518-525, 2017. 査読有

8. Inamitsu H, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Murata H, Tsukuba T: The dental resin monomers HEMA and TEGDMA have inhibitory effects on osteoclast differentiation with low cytotoxicity. **J Appl Toxicol**. 37(7): 817-824, 2017. 査読有

9. Sakai E, Morita M, Ohuchi M, Kido MA, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Itoh K, Yamamoto M, Tsukuba T. Effects of deficiency of Kelch-like ECH-associated protein 1 on skeletal organization: a mechanism for diminished nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 during osteoclastogenesis. **FASEB J**. 31(9):4011-4022, 2017. 査読有

10. Iwatake M, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: The Rho-specific guanine nucleotide exchange factor Plekhg5 modulates cell polarity, adhesion, migration, and podosome organization in macrophages and osteoclasts. **Exp Cell Res**. 359(2):415-430, 2017. 査読有

11. Tsukuba T, Sakai E, Nishishita K, Kadowaki T, Okamoto K: New functions of lysosomes in bone cells **J Oral Biosci** 59, 92-95 2017. 査読有

12. Yoneshima E, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Yoshida N, Tsukuba T: The Transcription factor EB (TFEB) regulates osteoblast differentiation through ATF4/CHOP-dependent pathway. **J Cell Physiol**. 231(6): 1321-33, 2016 査読有

13. Zaitu Y, Iwatake M, Sato K, Tsukuba T: Lipid droplets affect elimination of Porphyromonas gingivalis in HepG2 cells by altering the autophagy-lysosome system. **Microbes Infect**. 18(9): 565-71, 2016 査読有

14. Sakai E, Aoki Y, Yoshimatsu M, Nishishita K, Iwatake M, Fukuma Y, Okamoto K, Tanaka T, Tsukuba T: Sanguin H-6, a constituent of Rubus parvifolius L., inhibits receptor activator of nuclear factor- B ligand-induced osteoclastogenesis and bone resorption in vitro and prevents tumor necrosis factor- induced osteoclast formation in vivo. **Phytomedicine** 23(8): 828-37, 2016

査読有

15. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, --- Tsukuba T, (2005 番目) --- Zorzano A, Zughaier SM (他 2325 名): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**. 12(1):1-222, 2016 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 鍛冶屋浩, 岡部幸司, 門脇知子, 筑波隆幸: 新規高分子量 G タンパク質 Rab44 は Ca<sup>2+</sup>流入及び NFATc1 経路を介して破骨細胞分化を負に制御する 第 90 回日本生化学会大会, 神戸, 12 月, 2017
2. 坂元裕, 山下健太郎, 岡元邦彰, 門脇知子, 梅田正博, 筑波隆幸: 扁平上皮癌細胞の増殖能・浸潤能・転移能における転写因子 TFEB の役割 第 90 回日本生化学会大会, 神戸, 12 月, 2017
3. 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Keap1 遺伝子欠損は Nrf2 の活性化を介して破骨細胞分化を抑制する 第 90 回日本生化学会大会, 神戸, 12 月, 2017
4. 榎原峻, 坂井詠子, 山口優, 榎原春菜, 門脇知子, 岡元邦彰, 朝比奈泉, 筑波隆幸: 破骨細胞分化を負に制御する新規 Kelch タンパク質の同定と機能解析 第 90 回日本生化学会大会, 神戸, 12 月, 2017
5. 榎原春菜, 坂井詠子, 岡元邦彰, 吉田教明, 筑波隆幸: Actin-Binding LIM protein 1 は破骨細胞における細胞骨格形成と細胞機能を制御する 第 59 回日本歯科基礎医学会, 松本, 9 月, 2017
6. 岡元邦彰, 坂井詠子, 筑波隆幸: コバルトプロトポルフィリンの破骨細胞分化および活性化に対する影響 メタルバイオサイエンス研究会 2017, 岡山, 10 月, 2017
7. 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: ヘムオキシゲナーゼ 1 の発現抑制はカスパーゼ 3 の活性化、HMGB1 の細胞外遊離と破骨細胞分化に必要な (シンポジウム) 第 59 回日本歯科基礎医学会, 松本, 9 月, 2017
8. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 鍛冶屋浩, 岡部幸司, 門脇知子, 筑波隆幸: 破骨細胞分化を制御する新規 Rab タンパク質の同定と機能解析 第 59 回日本歯科基礎医学会 松本, 9 月, 2017
9. 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Keap1 遺伝子欠損は Irf8 と MafB の発現上昇を介して破骨細胞分化を抑制する 第 59 回日本歯科基礎医学会, 松本, 9 月, 2017
10. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 門脇知子, 筑波隆幸: 破骨細胞分化を制御する新規 Rab タンパク質の同定と解析 第 22 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 大阪, 8 月, 2017
11. 筑波隆幸: エンドソーム・リソソーム機能と骨細胞 (シンポジウム) 第 90 回日本

薬理学会年会，長崎，3月，2017  
12. 坂井詠子，福間裕，西下一久，岡元邦彰，筑波隆幸：Keap1 遺伝子欠損は in vivo および in vitro において骨の細胞分化を抑制する 第90回日本薬理学会年会，長崎，3月，2017  
13. 福間裕，坂井詠子，小巻俊介，西下一久，岡元邦彰，筑波隆幸：Rutaecarpine の破骨細胞分化抑制効果 第90回日本薬理学会年会，長崎，3月，2017  
14. 山下健太郎，岩竹真弓，山田慎一，岡元邦彰，梅田正博，筑波隆幸：カテプシン K は口腔扁平上皮癌の転移、遊走、接着を制御する 第90回日本薬理学会年会，長崎，3月，2017  
15. 稲光宏之，岡元邦彰，坂井詠子，西下一久，村田比呂司，筑波隆幸：歯科レジンモノマーHEMA 及び TEGDMA は低い細胞毒性で破骨細胞抑制活性を持つ 第90回日本薬理学会年会，長崎，3月，2017  
16. 小巻俊介，坂井詠子，福間裕，西下一久，岡元邦彰，筑波隆幸：Dihydroartemisinin の破骨細胞分化抑制効果 第90回日本薬理学会年会，長崎，3月，2017  
17. 坂井詠子，山口優，福間裕，西下一久，岡元邦彰，筑波隆幸：tert-Butylhydroquinone による Irf8 と MafB の発現増加を介した破骨細胞分化抑制機構 第89回日本生化学会大会，仙台，9月，2016  
18. 岡元邦彰，坂井詠子，西下一久，筑波隆幸：骨芽細胞分化における転写因子 TFEB の関与 第58回日本歯科基礎医学会 札幌，8月，2016  
19. 坂井詠子，福間裕，西下一久，岡元邦彰，筑波隆幸：Keap1 遺伝子欠損は Irf8 の発現上昇を介して破骨細胞分化を抑制する 第58回日本歯科基礎医学会，札幌，8月，2016  
20. 岩竹真弓，岡元邦彰，筑波隆幸：破骨細胞におけるリソソーム/エンドソームに關与するタンパク質の同定とその機能解析 第21回日本病態プロテアーゼ学会 豊中市，8月，2016  
21. 財津有未，岩竹真弓，佐藤啓子，筑波隆幸：ヒト肝細胞内での脂肪滴はオートファジー リソソームシステムによる歯周病細菌排除に影響する 第21回日本病態プロテアーゼ学会，豊中市，8月，2016

〔図書〕(計1件)

大谷啓一 監修、鈴木 邦明・戸苅 彰史・青木 和広・兼松 隆・筑波 隆幸 編 医歯薬出版、現代歯科薬理学(第6版)pp425 (p44-55, p159-163, p265-277) 2018

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept\\_op.html](http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_op.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

筑波 隆幸 (TSUKUBA, Takayuki)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：30264055

(2)研究分担者

岡元 邦彰 (OKAMOTO, Kuniaki)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：10311846

坂井 詠子 (SAKAI, Eiko)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教  
研究者番号：10176612

門脇 知子 (KADOWAKI, Tomoko)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授  
研究者番号：70336080