

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04378

研究課題名(和文) 歯周病細菌による歯周疾患発症と全身性疾患増悪における病原性理解の新機軸

研究課題名(英文) Understanding the pathogenicity of periodontal disease onset and systemic disease exacerbation caused by periodontal bacteria

研究代表者

大原 直也 (OHARA, Naoya)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70223930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が産生するプロテアーゼ「ジンジパイン」に着目し、単球・マクロファージ系細胞におけるシグロオキシゲナーゼ(COX)-2発現およびプロスタグランジン(PG)E2産生の分子機序を解析した。*P. gingivalis*感染におけるジンジパインによるCOX-2発現およびPGE2産生には、ERK1/2とIKKの活性化、転写因子であるAP-1(c-Jun/c-Fos)とNF- κ Bp65の活性化、さらには細胞外から細胞内流入によるカルシウムイオンの濃度上昇が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Porphyromonas gingivalis*をはじめとする歯周病細菌の持続感染は、歯周組織の破壊を招き、歯牙の喪失に至る。また歯周病は誤嚥性肺炎や糖尿病の発症・増悪因子となるなど全身性疾患との関連性が高く、その予防・治療の重要性は高い。本研究により*P. gingivalis*の病原因子やその発現機構が解明されることは、細菌感染における病態形成機構の解明、新規予防法や治療戦略への重要な足掛かりになる。また、全身性疾患の発症機構の解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the proteases "gingipains", which is one of the virulence factors produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. We studied the molecular mechanism of COX-2 expression and PGE2 production induced by gingipains on *P. gingivalis*-infected monocyte/macrophage cells. In these events, we found the activation of ERK1/2 and IKK, activation of transcription factors AP-1 (c-Jun/c-Fos) and NF- κ Bp65. Furthermore, we clarified that gingipains-induced COX-2 expression and PGE2 production required the increase in calcium ion concentration due to intracellular influx from outside the cells.

研究分野：細菌学

キーワード：Porphyromonas gingipain 歯周病細菌 ジンジパイン シグナル伝達 病原因子

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、*P. gingivalis*の病原因子 HbR タンパク質やジンジパイン(プロテアーゼ)の解析を行ってきた。HbR タンパク質については IL-8 の発現誘導能を有していること (Fujita et al. Infect. Immun. 2014)、ジンジパインについては、タンパク質 Skp-1 like protein (PGN_0300) がジンジパインの産生・分泌に関与していること、およびその機能を明らかにした。(Taguchi et al. Infect. Immun. 2015)。そして、ジンジパインが宿主歯肉上皮細胞の生存・増殖、グルコース代謝などに重要な PI3K/Akt の抑制とその経路の攪乱を起こすことを示した (Nakayama et al. J. Biol. Chem. 2015)。さらに歯肉上皮細胞および破骨前駆細胞では、*P. gingivalis* 感染によって PI3K/Akt 経路下流の基質タンパク質の活性レベルの攪乱や歯槽骨喪失に繋がる炎症応答と骨代謝バランス破綻が生じること、また、単球系細胞ではジンジパインによって炎症性メディエーターであるプロスタグランジン (PG)E2 の産生が促されることを見いだした。いずれも細胞機能維持あるいは炎症の誘発の観点から極めて重要な知見であるとともに、「歯周病」や「歯周病に関連する疾患 (誤嚥性肺炎・糖尿病)」の発症や増悪につながる重要な知見である。しかし、これらの現象が生じる機構には不明な点が多く、明らかにする必要がある。また、ジンジパインの分泌に関わる分子についても未だ不明な点が多く、さらなる解析が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病細菌と宿主細胞間で起こる感染現象の分子基盤を細胞・分子生物学的アプローチにより構築し、歯周病および歯周病関連疾患の発症機序を細菌感染・免疫応答の観点から解明することを目的とした。これまでに我々は *P. gingivalis* が産生するジンジパインが宿主細胞の生存・増殖、グルコース代謝などに重要な PI3K/Akt 経路を攪乱し、歯周組織の破壊に関与している可能性を示した。さらに歯周組織の炎症には炎症性メディエーターである PGE2 の産生が報告されており、*P. gingivalis* と PGE2 産生とを結ぶ分子解析は LPS や線毛以外の報告はほとんどない。我々のグループでは、ジンジパインが PGE2 産生に関与することを見出している。そこで本研究では、宿主細胞におけるジンジパインによる PGE2 産生の分子機序を中心に詳細に調べた。

3. 研究の方法

宿主細胞におけるジンジパインによる COX-2 発現と PGE2 産生の分子機序を調べるために、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 に対して *P. gingivalis* の感染実験を行なった。*P. gingivalis* の野生株 ATCC33277、ジンジパイン完全欠損株および FimA 欠損株などを用いて、multiplicity of infection (MOI) of 100 になるように THP-1 に対して感染実験を行なった。THP-1 細胞は 10% ウシ血清 (FCS) 含有 RPMI1640 を用いて培養し、また感染実験の基礎培地には 10%FCS 不含有 RPMI1640 を使用した。24 well プレートに 3×10^5 個の THP-1 細胞に対して MOI of 100 で *P. gingivalis* の野生株および各種変異株を感染させ、その後細胞溶解液を作製し、それぞれ各種特異的抗体を用いて Western blotting にて解析した。さらに *P. gingivalis* 感染時の COX-2 発現におけるカルシウムイオン (Ca^{2+}) の関与とその供給経路を調べた。細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させるイオノマイシン ($0 \sim 1 \mu\text{M}$) と細胞内 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA-AM ($0 \sim 10 \mu\text{M}$) を用いて、前処理した THP-1 細胞に対して *P. gingivalis* を感染させ、比較解析した。 Ca^{2+} の供給経路は、細胞内貯蔵からの流出を調べるために小胞体膜上の Ca^{2+} -ATPase 阻害剤である Thapsigargin (TG: $0 \sim 1 \mu\text{M}$) と細胞外カルシウムキレート剤である EGTA ($0 \sim 1 \text{mM}$) を用いて THP-1 細胞を前処理し、*P. gingivalis* の感染実験を行なった。評価は各種特異的抗体を用いた Western blotting により解析した。

4. 研究成果

本研究では歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* が産生する主要な病原因子であるシステインプロテアーゼ「ジンジパイン」に着目し、歯周病発症メカニズムの解明および歯周病関連疾患との関連性について調べた。本研究では細菌学的観点から、歯周炎でみられる COX-2 発現や PGE2 産生につながる *P. gingivalis* と宿主細胞間で起こる感染現象の分子解析を行なった。*P. gingivalis* の野生株と変異株を用いた感染実験から、単球・マクロファージ系細胞 THP-1 における COX-2 発現と PGE2 産生にはジンジパインが重要であることがわかった。ジンジパインによる COX-2 発現および PGE2 産生の分子機序を調べたところ、ERK1/2 と IKK の活性化を介して、それぞれの下流に位置する転写因子である AP-1 (c-Jun/c-Fos) と NF- κ Bp65 の関与が示された。次に、ジンジパインによる COX-2 発現において、免疫細胞の活性化に重要な細胞内 Ca^{2+} の関与を調べた。その結果、イオノマイシン使用による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に応じて COX-2 発現は増加し、一方で BAPTA-AM の使用では COX-2 発現は顕著に減少した。また Thapsigargin の使用ではイオノマイシンと同様に COX-2 発現は上昇した。したがって、ジンジパインによる COX-2 発現誘導には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が必要であることがわかった。また EGTA 使用におけるジンジパイン

による COX-2 発現への影響を調べたところ、COX-2 の発現は減少した。この結果から、*P. gingivalis* 感染における COX-2 発現につながる細胞内 Ca^{2+} の供給は、細胞外から細胞内への流入であることが示唆された。以上のことから、*P. gingivalis* の感染において、本菌が産生するジンジパインが COX-2 発現および PGE2 産生に強く関与する病原因子であり、その分子メカニズムは「細胞外から細胞内への Ca^{2+} の流入」「ERK1/2 と IKK の活性化」「転写因子 AP-1 (c-Jun/c-Fos) と NF- κ Bp65 の活性化」で起こることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shintaro Ono, Masaaki Nakayama, Masato Tachibana, Abu Saleh Muhammad Shahriar, Wang Heling, Shogo Takashiba, Naoya Ohara	4. 巻 73
2. 論文標題 Construction and characterization of a PGN_0297 mutant of Porphyromonas gingivalis: evidence for contribution of PGN_0297 to gingipain activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 315-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/56933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shahriar Abu Saleh Muhammad, Ono Shintaro, Nakayama Masaaki, Ohara Naoko, Ohara Naoya	4. 巻 62
2. 論文標題 Construction and characterization of the PGN_0296 mutant of Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 322-326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2020.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Urmi Alam Saki, Inaba Hiroaki, Nomura Ryota, Yoshida Sho, Ohara Naoya, Asai Fumitoshi, Nakano Kazuhiko, Matsumoto Nakano Michiyo	4. 巻 23
2. 論文標題 Roles of Porphyromonas gulae proteases in bacterial and host cell biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cmi.13312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山 真彰, 内藤 真理子, 中山 浩次, 大原 直也
2. 発表標題 P. gingivalis ジンジパイン誘導性COX-2発現における細胞外カルシウム流入の関与
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山 真彰, 内藤 真理子, 中山 浩次, 大原 直也
2. 発表標題 P. gingivalis ジンジパインによるCOX-2発現誘導における細胞内Ca ²⁺ の関与
3. 学会等名 第72回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 真彰, 内藤 真理子, 中山 浩次, 大原 直也
2. 発表標題 Involvement of intracellular calcium on Porphyromonas gingivalis gingipains-induced COX-2 expression and PGE2 production
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 真彰, 内藤 真理子, 中山 浩次, 大原 直也
2. 発表標題 歯周病菌が産生するジンジパインによるCOX-2発現におけるカルシウムの役割
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大原直也
2. 発表標題 歯周病細菌Porphyromonas gingivalisが産生するプロテアーゼによるPGE2産生の分子機序
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会・第66回日本化学療法学会総会合同学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山真彰、内藤真理子、橘理人、中山浩次、大原直也
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis gingipains によるMEK/ERK/AP-1およびIKK/NF-kBp65 の活性化を介したCOX-2 発現およびPGE2 産生の誘導機構
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王鶴齡, 中山真彰, 小野晋太郎, Abu Saleh Muhammad Shahriar, 中山真彰, 橘理人, 大原直也
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis PGN_0301 の機能解析の試み
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山真彰、橘理人、内藤真理子、中山浩次、大原直也
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisジンジパインによるCOX-2発現とPGE2産生の分子機序
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山真彰、内藤真理子、橘理人、中山浩次、大原直也
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisジンジパインによるCOX-2発現とPGE2産生の分子解析
3. 学会等名 第70回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大原直也
2. 発表標題 口腔細菌と全身疾患の関連性
3. 学会等名 第87回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 第60回日本感染症学会中日本地方会学術集会, 第65回日本化学療法学会西日本支部総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山真彰, 内藤真理子, 橘理人, 中山浩次, 大原直也
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisジンジパインによるCOX-2発現誘導を介したPGE2 産生の分子解析
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也
2. 発表標題 P. gingivalisジンジパインによる COX-2 発現と細胞外カルシウム流入の分子機序
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也
2. 発表標題 P. gingivalisジンジパインによる COX-2 発現における細胞外カルシウム流入の重要性
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中山 真彰 (NAKAYAMA Masaaki) (10579105)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究 分担者	大原 直子 (OHARA Naoko) (80301365)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------