

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11668

研究課題名(和文) 歯周病細菌が産生するプロテアーゼによる歯周組織破壊機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of periodontal tissue destruction by proteases from periodontal bacteria *Porphyromonas gingivalis*.

研究代表者

中山 真彰 (Nakayama, Masaaki)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：10579105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、「歯周病原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、歯周病菌が産生する病原性プロテアーゼの機能解析を行ない、歯周病の発症機序を解明する」ことである。ジンジパインによるCOX-2発現の分子機序について宿主細胞応答を調べたところ、ERKとIKKの2つのシグナル伝達経路の活性化とそれぞれ転写因子c-Jun/c-FosとNF-kBp65の活性化が重要であることを示し、またセカンドメッセンジャーである細胞内カルシウムの関与を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は歯周病細菌が産生するプロテアーゼが炎症を誘導する因子であることを示す研究である。それを明らかにできれば、プロテアーゼを産生する口腔細菌が歯周病に関与する重要な細菌であることがわかり、プロテアーゼ産生細菌を増やさないようにすることが歯周病予防に努める指標となると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the molecular mechanism of infection between periodontal pathogenic bacteria and host cells using cellular and molecular biological approaches, and to analyze the function of pathogenic proteases produced by periodontal pathogenic bacteria to clarify the pathogenesis of periodontal disease. In this study, we focused on gingipains, which are cysteine proteases, produced by *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), to elucidate the pathogenesis of periodontal disease infected with *P. gingivalis*. We examined the host cell response to the molecular mechanism of COX-2 expression by gingipains and showed that activation of two signaling pathways, ERK and IKK, and found that intracellular calcium is required for COX-2 expression and PGE2 production as the upstream factors.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯周病菌 歯周炎 ジンジパイン 炎症応答 細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

Porphyromonas gingivalis (以下、*P. gingivalis*)は慢性歯周炎の病巣から高頻度に分離される歯周病で最も関連が深い細菌である。歯周病に関連する細菌の慢性的な感染は、歯周組織の炎症や歯槽骨の破壊をともなう歯周病態の発症と形成に寄与している。歯周病は糖尿病や血管疾患など全身性疾患と関連性があるとされており、歯周疾患の理解は関連する全身性疾患との関与を理解する上でも非常に重要である。歯周病は単一の細菌による感染ではなく、混合感染として考えられているため、発症機序や病態の形成機序に統一見解がなされていないと考えられている。またその発症の要因には感染している細菌種だけでなく、宿主の免疫力や口腔内環境などの多様なバランスも重要な要因とされており、複雑な疾患である。そこで、歯周病の病態発症および形成を理解するために、宿主と細菌の感染現象を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

歯周病原細菌の感染局所および周縁部では、歯肉上皮細胞の破壊に引き続き、歯根膜や歯槽骨の破壊・吸収が生じ、歯周炎が惹起される。さらにはその炎症には炎症性メディエーターであるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2の発現誘導やプロスタグランジン(PG)E2の産生が認められ、慢性炎症の重要な指標となるファクターとなっている。そこで、歯周病発症機序の分子理解のために、我々は歯周病原細菌 *P. gingivalis* と宿主免疫系細胞との相互作用によって起こる細胞生物学的現象を明らかにすることに焦点を当てた。本研究では、*P. 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、単球・マクロファージ系細胞におけるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2の発現誘導やプロスタグランジン(PG)E2の産生の関与について調べた。

3. 研究の方法

研究方法は、単球・マクロファージ系細胞を用いた細菌感染実験により、ジンジパインによるCOX-2の発現誘導やプロスタグランジン(PG)E2の産生における細胞・分子生物学的アプローチにより分子解析を行ない、歯周病の発症機序における関連性を調べた。培養細胞は、ヒト単球・マクロファージ系細胞株 THP-1、およびヒト末梢血由来 CD14 陽性の正常単球細胞 HMCs (TOYOBO)を用いた。培養法はそれぞれ 10%ウシ血清含有 RPMI1640 およびメーカー指定培地を用いて培養を行なった。*P. gingivalis*は野生株 ATCC33277 (WT 株) とジンジパイン完全欠損株 (KDP136 株)を用いて multiplicity of infection (MOI) of 100 になるように感染実験を行なった。また、ジンジパイン特異的阻害剤 (KYT-1/36) を WT 株と 10 分間前処理した条件も同様に感染実験を行なった。THP-1 細胞と HMCs 細胞は 1.5 ml チューブに 3×10^5 個を調製し、それぞれの細胞に対して MOI of 100 で WT 株と KDP136 株を 6 時間感染させ、その後細胞溶解液を作製し、COX-2 に対する特異的抗体を用いた Western blotting を行なった。また同様な条件で細菌を 12 時間感染させ、その培養上清を回収して、ELISA 法にて PGE2 産生濃度測定を行なった。次に、COX-2 発現に関与する上流因子の解析を行なった。THP-1 細胞と HMCs 細胞に対して MOI of 100 で WT 株と KDP136 株、およびジンジパイン阻害剤処理の WT 株を 2 時間まで感染させ、細胞溶解液を作製し、Western blot 法を行なった。それぞれの条件で可溶化した細胞溶解液を SDS-PAGE にてタンパク質を分離、PVDF 膜に転写し、ERK1/2、p38、JNK、IKK、c-Jun、c-Fos、NF- κ B p65 に対する各種特異的抗体にて各タンパク質の発現やリン酸化レベルの変化を調べた。COX-2 に繋がる分子解析のために、各種キナーゼ阻害剤、標的遺伝子の siRNA による発現抑制や過剰発現法を用いた分子生物学的手法を用いて、ジンジパインによる COX-2 発現における分子機序の解析を行なった。評価方法は上記と同様に、各種特異的抗体を用いた Western blot 法や ELISA 法にて解析した。さらには、COX-2 遺伝子上流領域に存在する転写因子結合箇所を利用したレポーターアッセイも行なった。レポーターアッセイには、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼを用いた Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) にて評価を行なった。COX-2 上流領域の転写因子結合領域は、野生型、 κ B 結合サイト欠損型、c-Jun/c-Fos 複合体 AP-1 結合サイト欠損型などの欠損型プラスミドを利用して、ジンジパインによる COX-2 発現における転写因子の決定も行なった。

4. 研究成果

単球・マクロファージ系細胞の THP-1 細胞と HMCs 細胞 (3×10^5 個/tube) を調製し、それぞれの細胞に対して MOI of 100 で WT 株と KDP136 株を 6 時間感染させ、COX-2 発現に対する特異的抗体を用いた Western blotting を行なった。また同様な条件で細菌を 12 時間感染させ、その培養上清を回収して、ELISA 法にて PGE2 産生濃度測定を行なった。その結果、WT 株の感染で COX-2 発現と PGE2 産生が認められ、KDP136 株の感染ではそれらの誘導は認められなかった。従って、*P. gingivalis* の単球・マクロファージ系細胞に対する感染による COX-2 発現と PGE2 産生には、ジ

ンジパインが重要な病原因子であることがわかった。COX-2 発現に関与する上流因子の解析では、THP-1 細胞と HMCs 細胞に対して MOI of 100 で WT 株と KDP136 株、およびジンジパイン阻害剤処理の WT 株を 2 時間まで感染させ、ERK1/2、p38、JNK、IKK、c-Jun、c-Fos、NF- κ B p65 に対する各種特異的抗体を用いた Western blot 法を行った。その結果、WT 株の感染では、非感染の対照と比べて、ERK1/2、p38、JNK、IKK の活性化が認められ、c-Jun、c-Fos、NF- κ B p65 の発現レベルとリン酸化レベルも非感染の対照のものとは比べて、それらのタンパク発現およびリン酸化レベルが上昇した。KDP136 株とジンジパイン阻害剤処理の WT 株の感染では、ERK1/2、p38、JNK、IKK のリン酸化レベルに非感染の対照のものとは比べて変化がほとんどなかった。また c-Jun、c-Fos、NF- κ B p65 の発現レベルとリン酸化レベルの変化も非感染の対照のものとは大きな差は認められなかった。COX-2 に繋がる分子解析のために、各種キナーゼ阻害剤、標的遺伝子の siRNA による発現抑制や過剰発現法を用いた分子生物学的手法を用いて、ジンジパインによる COX-2 発現と PGE2 産生における分子機序の解析を行なった。その結果、ERK1/2 阻害剤 PD98059 と IKK 阻害剤 BAY 11-7082 を用いた場合において、ジンジパインによる COX-2 発現と PGE2 産生が顕著に抑制された。さらには、ERK1/2 が制御する転写因子 c-Jun と c-Fos、IKK が制御する NF- κ B p65 の活性化においてもこれらの阻害剤が活性抑制に関与することが明らかとなった。COX-2 遺伝子レポーターアッセイを用いた実験においても、ERK/AP-1 (c-Jun-c-Fos)、IKK/NF- κ B p65 の経路が極めて重要な役割を持っていることが明らかとなった。今後は、ジンジパインによる COX-2 発現につながる上流因子の詳細な分子機序を解析し、病態発症との因果関係やその意義を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tomomi Kawakita, Tetsu Mukai, Mitsutoshi Yoshida, Hiroyuki Yamada, Masaaki Nakayama, Yuji Miyamoto, Masato Suzuki, Noboru Nakata, Takemasa Takii, Akihide Ryo, Naoya Ohara and Manabu Ato	4. 巻 167
2. 論文標題 Point mutation in the stop codon of MAV_RS14660 increases the growth rate of Mycobacterium avium subspecies hominissuis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mic.0.001007.	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 該当する
1. 著者名 Keiichi Taniguchi, Daisuke Hayashi, Naomi Yasuda, Mao Nakayama, Kaori Yazawa, Shouta Ogawa, Yuji Miyatake, Saki Suda, Haruka Tomita, Miki Tokuda, Saotomo Itoh, Jun-Ichi Maeyama, Naoya Ohara, Saburo Yamamoto, Shigeaki Hida, Kikuo Onozaki and Takemasa Takii	4. 巻 6
2. 論文標題 Comparative Study of the Susceptibility to Oxidative Stress between Two Types of Mycobacterium bovis BCG Tokyo 172	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00111-21.	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 該当する
1. 著者名 Abu Saleh Muhammad Shahriar, Shintaro Ono, Masaaki Nakayama, Naoko Ohara, Naoya Ohara	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Saki Nakagawa, Kazuhiro Omori, Masaaki Nakayama, Hiroki Mandai, Satoshi Yamamoto, Hiroya Kobayashi, Hidefumi Sako, Kyosuke Sakaida, Hiroshi Yoshimura, Satoki Ishii, Soichiro Ibaragi, Kimito Hirai, Keisuke Yamashiro, Tadashi Yamamoto, Seiji Suga, Shogo Takashiba	4. 巻 26
2. 論文標題 The fungal metabolite (+)-terrein abrogates osteoclast differentiation via suppression of the RANKL signaling pathway through NFATc1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunopharmacol	6. 最初と最後の頁 106429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2020.106429	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 該当する

1. 著者名 Shintaro Ono, Masaaki Nakayama, Masato Tachibana, Abu Saleh Muhammad Shahriar, Wang Heling, Shogo Takashiba, and 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 Satoshi Yamamoto, Kazuhiro Omori, Hiroki Mandai, Masaaki Nakayama, Saki Nakagawa, Hiroya Kobayashi, Tadashi Kunimine, Hiroshi Yoshimura, Kyosuke Sakaida, Hidefumi Sako, Soichiro Ibaragi, Tadashi Yamamoto, Hiroshi Maeda, Seiji Suga, and Shogo Takashiba	4. 巻 4
2. 論文標題 Fungal metabolite (+)-terrein suppresses IL-6/sIL-6R-induced CSF1 secretion by inhibiting JAK1 phosphorylation in human gingival fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e00979.	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 Masaaki Nakayama, Naoya Ohara	4. 巻 59
2. 論文標題 Novel function of Porphyromonas gingivalis gingipains in the PI3K/Akt signaling pathway	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 131-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Masaaki Nakayama, Naoya Ohara	4. 巻 53
2. 論文標題 Molecular mechanisms of Porphyromonas gingivalis-host cell interaction on periodontal diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review,	6. 最初と最後の頁 134-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2017.06.001	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17件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 谷口恵一, 林大介, 安田直美, 中山真央, 伊藤佐生智, 山本三郎, 大原直也, 肥田重明, 小野寄菊夫, 瀧井猛将
2. 発表標題 結核ワクチンBCG Tokyo172のサブタイプ間の酸化ストレス応答の違い
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaaki Nakayama
2. 発表標題 The significant role of Porphyromonas gingivalis “Gingipains” as a virulence factor on periodontal inflammation
3. 学会等名 Japanese Association for Dental Research(JADR), a Division of the International Association for Dental Research (招待講演) (国際学会)
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 Porphyromonas gingivalis gingipainsによるCOX2発現とPGE2産生における細胞内カルシウムの関与
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
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 ポスター発表
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 口頭発表
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 ポスター発表
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 ポスター発表
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 真彰
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis ジンジパインのCOX-2発現/PGE2産生の分子機序
3. 学会等名 第71回日本細菌学会関西支部総会 口頭発表(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 P. gingivalisジンジパインによるCOX-2発現とPGE2産生における細胞内Ca ²⁺ の重要性
3. 学会等名 第71回日本細菌学会中国・四国支部総会
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大会
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 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, 橘 理人, 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発現およびPGE2産生の分子機序
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 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 gingipains induce PGE2 production via COX-2 expression
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaaki Nakayama
2. 発表標題 Functions of the virulence factor from periodontal pathogens on periodontal diseases
3. 学会等名 第65回JADR総会・学術大会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaaki Nakayama, Mariko Naito, Koji Nakayama, Naoya Ohara
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis gingipains induce PGE2 production via COX-2 expression by activation of MEK1/2 and NF-kB
3. 学会等名 PgMelbourne2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaaki Nakayama, Mariko Naito, Koji Nakayama, Naoya Ohara
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis gingipains disturb Akt signaling pathway via inactivation of PI3K
3. 学会等名 IUMS 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaaki Nakayama, Kaori Shirasaki, Masato Tachibana, Saburo Yamamoto, Takemasa Takii, Mayuko Okabe, Manabu Ato, Naoya Ohara
2. 発表標題 Inhibitory mechanism of JTY3476 expression by JTY3475 in BCG Tokyo
3. 学会等名 The 52nd US-Japan Mycobacteria Panel Meeting 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 中山真彰	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館 / ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 アレルギーの臨床-特集「アレルギー疾患とマイクロバイーム」-口腔細菌叢と疾患-口腔細菌の病原因子による歯周疾患への影響2019年2月号 (2019年1月25日刊行)	

1. 著者名 中山真彰	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 Biology Topics (BIOLOGICAL TOPICS (基礎系)) 「歯周病細菌の病原性プロテアーゼと歯周炎」B10 Clinica-特集「口腔疾患と慢性炎症」-2018年別冊春20号 (2018年9月25日刊行)	

1. 著者名 中山真彰	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館 / ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊「細胞」-特集「口腔疾患のサイエンス」-「歯周組織炎症における歯周病菌の病原性プロテアーゼの機能解析」2018年9月号 (2018年8月22日刊行)	

1. 著者名 中山真彰	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 月刊「地域ケアリング」-特集「混合介護への期待と課題」-福祉の現場から「歯周病菌が産生するプロテアーゼの歯周疾患における重要性」北隆館2018年7月号（2018年6月12日刊行）	

1. 著者名 中山真彰 (Topics from special edition)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 北隆館 / ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 600
3. 書名 特集「病原性細菌の制御」-Topics from special edition「歯周病菌が産生するプロテアーゼの病原性」	

〔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	大森 一弘 (Omori Kazuhiro) (20549860)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	後藤 和義 (Goto Kazuyoshi) (20626593)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	大原 直也 (Ohara Naoya) (70223930)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (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
---------	---------