

平成21年 4月 3日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18592236

研究課題名 (和文) 歯周病原性菌 (A. a) の産生する未知のビルレンス因子

研究課題名 (英文) The virulence factor that produced by *A. actinomycetemcomitans*

研究代表者 鈴木 淳司 (SUZUKI JUNJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90263714

## 研究成果の概要：

*A. actinomycetemcomitans* (A. a) による歯槽骨の喪失は、宿主の免疫システムと骨芽細胞自身との相互作用による破骨細胞分化の活性化によって歯槽骨吸収が促進されることにより説明されており、A. a が直接的に骨芽細胞の分化に影響を与え、若年性歯周病の発症に関与するとの報告はない。我々は本課題により A. a 培養上清が *in vitro* で骨芽細胞の分化を阻害することを発見し、次年度にはその活性中心がA. aの産生するlipopolysaccharide (LPS)にあることを明らかにした。

最終年度である平成20年度はLPSによる骨芽細胞の分化阻害様式を明らかにすることを目的とした。その結果、LPSにより誘導される骨芽細胞自身のケミカルメディエーターにより分化阻害が起こっているのではないこと、またLPS骨芽細胞の細胞間ネットワークを阻害することで分化阻害を引き起こす可能性が示された。さらに細胞間ネットワークの阻害は、膜タンパクである connexin43 の細胞内局在を変化させることで行われることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 800,000   | 0       | 800,000   |
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 720,000 | 3,920,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：骨芽細胞, *A. actinomycetemcomitans*, 分化

## 1. 研究開始当初の背景

小児における侵襲性歯周炎、いわゆる若年性歯周炎は比較的にまれな疾患であり、その発症率はアジア系人種においては0.1～0.2%程

度と報告されている (1)。侵襲性歯周炎の患児においては、好中球の走化性低下とともに、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a) が高頻度で検出され、A. a の感染が侵襲

性歯周炎の発症に深く関与していると考えられている (2, 3)。A. a が歯周疾患の発症と増悪に関与する因子としては白血球毒素であるロイコトキシン (4, 5) や細胞致死膨化毒素 CDT (6, 7) などが報告されている。なかでも A. a の lipopolysaccharide (LPS) は様々な生物活性を持ち歯周疾患に強く関与することが知られている (8, 9)。LPS による歯槽骨吸収は、LPS が骨芽細胞に作用して Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand (RANKL) の発現を促進するとともに、osteoprotegerin (OPG) の発現抑制を介して破骨細胞の分化誘導を促進し、歯槽骨吸収が促進すると報告されている (図 1-1) (10, 11)。すなわち、A. a の LPS による歯槽骨の破壊は骨吸収の促進が主たる原因であるとされており、LPS の骨形成系、すなわち骨芽細胞の分化へ影響については十分な検討がなされていない。

歯槽骨を含むすべての骨は骨芽細胞と破骨細胞により常にターンオーバーが繰り返されており、両者のバランスの上で恒常性を維持していると考えられている (12)。つまり A. a の LPS が骨破壊と骨新生の両方に影響を与えることは、このバランスをより崩しやすくする効果があると考えられ、骨芽細胞の分化への影響が歯周炎の発症に強く関与している可能性があるといえる。

骨芽細胞は様々な情報によって分化が制御されている。例えば transforming growth factor -  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) や bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) などの増殖因子は遠位の細胞から細胞膜上のレセプターに伝達され、伝達された情報は細胞内シグナル伝達を介して核に伝達される。一方、成熟した骨組織内に埋入されている osteocyte においては細胞外からの情報伝達を受けにくいため、gap junction による細

胞間情報伝達、すなわち細胞間ネットワークが細胞の恒常性維持などに重要な役割を果たしている (13)。gap junction は connexin とよばれる膜タンパクの 6 量体で構成され、隣接する細胞同士の細胞膜を貫通するチャンネルを形成している (図 1-2, 3) (14, 15)。このチャンネル内をおよそ分子量 1,000Da 以下のイオンや second messenger が通過することで、隣接する細胞が情報を共有し、分化や増殖などの制御及び同調が行われている。現在までに骨芽細胞の分化と細胞間ネットワークの関係は数多く報告されており、いまだ詳細なメカニズムは不明なもの骨芽細胞の細胞間ネットワークの亢進によって骨芽細胞分化が促進されたという報告 (16, 17) や細胞間ネットワークにより伝達された情報が MEK/ERK を介して骨芽細胞の分化の調節を行うとの報告がある (18)。そこで本研究では 1. A. a が骨芽細胞分化へ及ぼす影響の検討、2. A. a が骨芽細胞の細胞間ネットワークへ及ぼす影響を検討し、A. a による若年性歯周炎の発症機構を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

思春期性あるいは前思春期性歯周炎の発症には宿主の好中球走化性低下と A. actinomycetemcomitans の感染が必須であるとされている。A. actinomycetemcomitans が引き起こす若年性の歯周炎は非常に特異な病態のため、現在までに良く研究されており、ビルレンス因子としてはこれまでに Leukotoxin や CDT, 内毒素 (LPS) などが報告されている。特に LPS は宿主のマクロファージを刺激することで、さまざまなサイトカイン、ホルモンを分泌させ骨芽細胞自身との interaction により破骨細胞の分化が誘導さ

れることが明らかにされ始めた。

本研究では宿主の免疫システムを刺激するという既知のビルレンスではなく、*A. actinomycetemcomitans* が骨芽細胞に直接的な影響を与える未知のビルレンス因子を明らかにする。これにより従来考えられてきた *A. actinomycetemcomitans* による若年性歯周炎の発症機序に新しい概念を導入することができる可能性がある。

*A. actinomycetemcomitans* と思春期性あるいは前思春期性歯周炎との関係については多くの報告がある。また *A. actinomycetemcomitans* の骨吸収のメカニズムに果たす役割についても多くの研究がなされている。しかしながらそれらのほとんどは *A. actinomycetemcomitans* と宿主の免疫システムに関するものであり、今回の研究計画のように *A. actinomycetemcomitans* が免疫系を刺激することなく、直接的に骨芽細胞に影響を与えることを報告したものはいまだにない。

そこで本研究では *Actinobacillus actinomycetemcomitans* に宿主の免疫システムを介することなく、直接的に骨芽細胞に影響を与える未知のビルレンス因子が存在することを明らかにするために、以下の項目について検討する。

(1) *A. actinomycetemcomitans* が骨芽細胞の増殖、分化に及ぼす影響

(2) *A. actinomycetemcomitans* が骨芽細胞の細胞間ネットワークに及ぼす影響

(3) 骨芽細胞の増殖、分化、細胞間ネットワークに影響を与える因子の精製

(4) ビルレンス因子の与える刺激の情報伝達系路を明らかにする

### 3. 研究の方法

(1) *A. actinomycetemcomitans* 培養上清が骨芽細胞の増殖に及ぼす影響

*A. actinomycetemcomitans* ATCC437171 株を BHI 培地に接種し、微好気条件下で3日間培養する。遠心により菌体を分離する。得られた培養上清を濾過滅菌したものを試料として以下の実験に用いる。

マウス由来正常骨芽細胞 MC3T3-E1 をプラスチックディッシュで上に  $10^3$  個接種する。1日間培養後上記試料を各種濃度加える。その後1, 2, 4日間培養後 MTT assay により細胞数を計測する。

(2) *A. actinomycetemcomitans* 培養上清が骨芽細胞の分化に及ぼす影響

マウス由来正常骨芽細胞 MC3T3-E1 をコンフルエントになるまで培養後、上記培養上清試料を各種濃度加え、3日間培養する。

Trizol 試薬を用いて total RNA を抽出し、agarose gel 電気泳動により RNA の量および品質を確認する。

骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、骨シアロプロテインの mRNA の発現量を測定する。mRNA の測定にはそれぞれの cDNA に特異的なプライマーと TaqMan probe を用いた Real-Time RT-PCR を行う。

*A. actinomycetemcomitans* 培養上清を加えずに培養したコントロールとの mRNA の発現量を比較検討する。

上記 a と同様に処理した細胞からリン酸緩衝液によりタンパク質を回収し、アルカリフォスファターゼの酵素活性を測定する。

(3) *A. actinomycetemcomitans* 培養上清が骨芽細胞の細胞間ネットワークに及ぼす影響

MC3T3-E1 をプラスチックディッシュ上でコ

ンフルエントになるまで培養し、A. actinomycetemcomitans 培養上清試料を各種濃度加え、1日間培養する。

Scrape Loading/Dye Transfer 法により Gap Junction 依存性細胞間ネットワークを測定する。

上記 a と同様に処理した細胞から 20% SDS の可溶化画分を回収し、Western blot により細胞間ネットワークを司る膜タンパクである Connexin43 の発現を観察する。

#### (4) ビルレンス因子の同定

大量培養した A. actinomycetemcomitans 培養液を遠心分離し、上清から硫化アンモニウム沈殿によりタンパクを濃縮して得る。粗タンパク画分をリン酸ナトリウム緩衝液にて透析したものを凍結乾燥にて濃縮し出発試料とする。

細胞間ネットワーク阻害活性を指標として、出発試料よりゲル濾過カラムおよび疎水性カラムを用いて精製する。また効率的に精製が出来るアフィニティカラムの検索も同時に行う。

得られた精製標品の精製度はポリアクリルアミド電気泳動にて確認する。

精製された標品を用いて、再度骨芽細胞の増殖、分化、細胞間ネットワークに対する影響を確認する。

#### 4. 研究成果

本課題により以下の成果を得た。

(1) A. a 培養上清は骨芽細胞の増殖を促進し、分化を抑制した。

(2) 分化抑制因子は lipopolysaccharide (LPS)であった。

(3) LPS は骨芽細胞の細胞間ネットワークを

阻害した。

(4) 細胞間ネットワークの阻害は connexin43 の局在を細胞膜上から細胞質内へと変化させることで行われていた。

(5) LPS は細胞間ネットワークを阻害することで二次的に骨芽細胞の分化を阻害する可能性が示唆された。

歯周病は単なる感染症ではなく、様々な因子が関係して発症する複合的な疾患である。特に小児における侵襲性歯周炎は一般的な成人性歯周炎とは異なりプラーク付着が少なく、好中球の走化性低下など宿主側の因子が重要であるとされる (54)。またその主たる原因菌と考えられている A. a も LPS だけではなくロイコトキシンや CDT などさまざまなビルレンス因子を有している (4-6)。さらに LPS の作用としても、今回示した骨芽細胞における分化と細胞間ネットワークの阻害のほか、マクロファージに対して IL-6 の発現を促進して炎症を増悪させたり、骨芽細胞に対して PGE2 や IL-6, RANKL の発現を活性化して骨吸収を促進させるなどの影響が明らかとなっている (49)。今回の結果は小児における侵襲性歯周炎の発症メカニズムの限定的な一面を検討したに過ぎないが、これまでに十分検討がなされていなかった A. a の LPS の骨形成系への影響を明らかにしたものである。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① M Kuramoto, J Suzuki, K Kozai; Novel role of lipopolysaccharide derived from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis; International Association for Dental Research; 2008.7.4; Toronto, Canada

② 蔵本銘子, 鈴木淳司, 香西克之; *A. actinomycetemcomitans* は細胞間ネットワークを介して骨芽細胞の分化を阻害する; 第45回日本小児歯科学会大会; 平成19年7月19日; 東京都江戸川区

③ 蔵本銘子, 鈴木淳司, 香西克之; *A. actinomycetemcomitans* による細胞間ネットワークの阻害; 第40回広島大学歯学会; 平成19年6月16日; 広島県広島市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 淳司 (SUZUKI JUNJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 90263714

### (2) 研究分担者

香西 克之 (KOZAI KATSUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 10178212

### (3) 連携研究者