

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09615

研究課題名(和文) 歯肉上皮組織自然免疫システムの調節により歯周病原細菌の結合組織侵入を阻止できるか

研究課題名(英文) Inhibition of invasion of periodontal pathogens into gingival connective tissue by the innate immunity

研究代表者

金子 高士 (Kaneko, Takashi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：10284697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌のPorphyromonas gingivalis由来のLPSの口腔上皮細胞株のHSC-2細胞やマクロファージ細胞株のTHP-1細胞内への配送は細胞死を誘導した。Escherichia coliのLPSをコントロールとして使用した。THP-1細胞においてはカスパーゼ1とカスパーゼ4の断片化がみとめられた。さらにこの細胞死はカスパーゼ1抑制剤、カスパーゼ4抑制剤そしてNLRP3抑制剤により抑制されたことから、この細胞死にはカスパーゼ4を介した非定型NLRP3活性化経路が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周ポケット内の上皮細胞には上皮細胞死に伴う潰瘍が形成されていることが示されている。上皮細胞によるバリアー機能の消失は歯周ポケット内に生息する歯周病原細菌が上皮下の結合組織内に侵入する機序の一つであると考えられているが、細胞死にいたる機序は明らかにされていない。本研究からグラム陰性細菌のLPSの細胞内への侵入はカスパーゼ4により検知され、NLRP3インフラマソーム活性化の結果ピロトーシスと呼ばれる細胞死を誘導することが明らかになった。このことはカスパーゼ4やNLRP3を標的とした歯周病予防や新規歯周治療法の開発の可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Cytosolic delivery of LPS from one of periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis to oral epithelial cell line, HSC-2 or macrophage cell line, THP-1 induced cell death. LPS from Escherichia coli was used as control. Degradation of caspase-1 and caspase-4 were detected in THP-1 cells. In addition, this cell death was inhibited by caspase-1 inhibitor, caspase-4 inhibitor or NLRP3 inhibitor. These results suggest the noncanonical NLRP3 activation via caspase-4 might be involved in this pyroptotic cell death.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病原細菌 カスパーゼ4 NLRP3 インフラマソーム カスパーゼ1 ピロトーシス LPS

## 1. 研究開始当初の背景

歯周ポケット内の上皮細胞には上皮細胞死に伴う潰瘍が形成されていることが示されている。上皮細胞によるバリアー機能の消失は歯周ポケット内に生息する歯周病原細菌が上皮下の結合組織内に侵入する機序の一つであると考えられているが、細胞死にいたる機序は明らかにされていない。近年、グラム陰性細菌の感染時においては、その細胞膜構成成分であるリポ多糖(LPS)が細胞質内タンパクのカスパーゼ4やカスパーゼ5により検知され、NLRP3 インフラマソームの活性化誘導することが報告された(非定型 NLRP3 活性化経路)。活性化されたカスパーゼ4、5とNLRP3 インフラマソームにより活性化されたカスパーゼ1により切断されたガスダーミンDのN末端は細胞膜に多量体を形成する。この多量体により形成された小孔はピロトーチスと呼ばれる細胞死を誘導する。我々は歯周病原細菌のLPSが歯周ポケット内の上皮組織のピロトーチスを誘導し、歯周病原細菌の結合組織へ侵入に導くのではないかという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

歯周病の病態形成には歯周病原細菌のLPSが深く関与すると考えられている。ヒトにおいては細胞質内に存在するカスパーゼ4、5が細胞内に侵入したグラム陰性細菌のLPSを認識し、NLRP3 インフラマソーム複合体を介したカスパーゼ1の活性化を誘導することが知られている。活性化カスパーゼ4、5やカスパーゼ1はIL-1やIL-18のプロセッシングによる活性化やピロトーチスと呼ばれる細胞死の誘導に関与している。しかしながら歯周病原細菌の *Porphyromonas gingivalis* のLPSは *Escherichia coli* などの腸内細菌のLPSと比較して構造的にアシル基が長いこと、またその数が少ないことが報告されており、カスパーゼ4やカスパーゼ5を介したNLRP3活性化経路を活性化できるかどうかは明らかではない。そこで本研究では *P. gingivalis* LPSの非定型NLRP3活性化について検討した。

## 3. 研究の方法

ヒト単球・マクロファージ細胞株のTHP-1細胞もしくはヒト歯肉上皮細胞株のHSC-2細胞を実験に使用した。これらの細胞にInvitrogen社製のNEON®を用いた電気穿孔法(Electroporation, EP)もしくはLipofectamine LTX®を用いたリポフェクション法により *P. gingivalis* LPSを細胞質内に配送した。*E. coli*のLPSを対照として使用した。またカスパーゼ4欠損THP-1細胞とそのコントロール細胞はinvivogen社から購入したものを使用した。これらの細胞の細胞質へのLPS配送後の細胞死はトリパンブルー染色および乳酸脱水素酵素(LDH)の放出を指標に計測した。NLRP3とカスパーゼ1、4、5のmRNA発現はRT-PCRにて、そしてタンパク発現もしくはそのプロセッシングは免疫ブロッティング法により解析した。

## 4. 研究成果

過去の報告において、非定型NLRP3活性化は単球・マクロファージを用いて実験されていたことから、最初にTHP-1細胞を用いて実験をおこなった。THP-1細胞に対して *P. gingivalis* と *E. coli* のLPSのEPを行った4時間後にトリパンブルーで染色したところ、両LPS共にEPによりトリパンブルー色素の取り込みが誘導された。この時の細胞培養上清中のLDH活性を測定したところ *E. coli* と *P. gingivalis* のLPSのLDHの放出は両者ともに約70%で有意に増加していたが、LPSを加えずにEPを行った時、もしくはLPSを加えてもEPを行わなかった時にはLDHの放出は認められなかった(図1)。

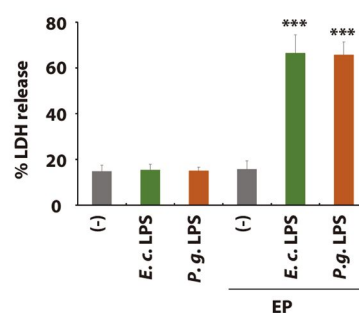


図1

*E. coli* LPSの存在下でEPを行った時のTHP-1細胞のLDHの放出は2~5時間で最大になった。またEP4時間後のTHP-1のLDHの放出は刺激したLPSの量依存的に増加した。次にEPとは異なる手法すなわちリポフェクション法によりLPSを細胞質内に配送した。*E. coli* と *P. gingivalis* LPSをリポフェクション法によりTHP-1細胞内配送した時も、濃度依存的にLDH放出を誘導したが、*P. gingivalis* LPSの活性は *E. coli* よりも低かった。またLPSをリポフェクション法によりHSC-2細胞内配送した時には *E. coli* はLDH放出を誘導したが、*P. gingivalis* は誘導しなかった。

次に THP-1 細胞から分離した total RNA の RT-PCR 解析ではカスパーゼ 4、カスパーゼ 1、NLRP3 の mRNA は発現していたが、カスパーゼ 5 の発現は認められなかった。そのため以降はカスパーゼ 4 に焦点をあてて実験を行った。

LPS 細胞内配送による細胞死における非定型 NLRP3 活性化経路の各分子の役割を調べるために、カスパーゼの抑制剤として z-VAD-fmk、カスパーゼ 1 の抑制剤として z-YVAD-fmk、カスパーゼ 4 の抑制剤として NLRP3 抑制剤として MCC950 を使用し、それらの存在下にて実験をおこなった。結果、LDH の放出は z-VAD-fmk、z-YVAD-fmk、カスパーゼ 4 抑制剤として MCC950 により有意に抑制された(図 2)。このことから LPS 配送による THP-1 細胞のピロトーシスにはカスパーゼ 4、カスパーゼ 1 そして NLRP3 が関与することが明らかになった。

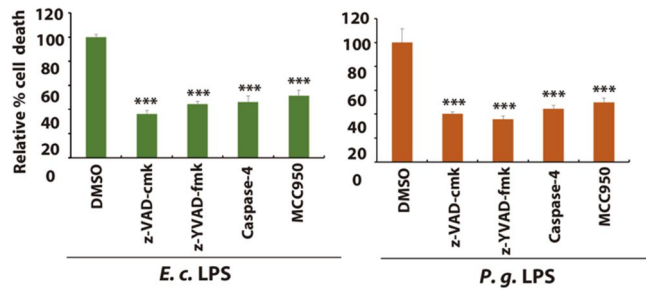


図 2

次に *E. coli* として *P. gingivalis* LPS EP 時の細胞内もしくは細胞培養上清中のカスパーゼ 1 とカスパーゼ 4 の動体を免疫プロテイング法により解析した。両 LPS ともに EP により細胞内に配送すると、THP-1 培養上清中のカスパーゼ 1 とカスパーゼ 4 の断片化が免疫プロテイング解析により示された(図 3)。このことはこのことから LPS 細胞内配送による細胞質内のカスパーゼ 1 とカスパーゼ 4 には断片化は観察されなかったことから、細胞死が誘導された細胞においてカスパーゼ 1 とカスパーゼ 4 のプロセッシングが誘導され、細胞死により細胞外に放出されたと考えられた。

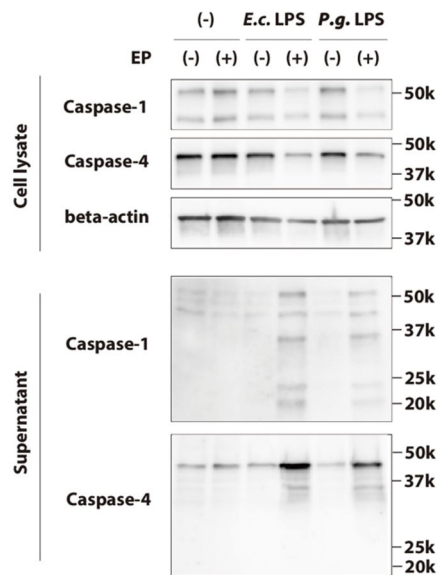


図 3

次にカスパーゼ 4 の役割を明らかにするために、まカスパーゼ 4 欠損 THP-1 細胞を用いて実験をおこなった。カスパーゼ 4 欠損 THP-1 細胞 (THP-1 CASP4-deficient 細胞) に対して *E. coli* と *P. gingivalis* 由来の LPS の EP を行った。コントロール細胞 (THP-1 null12 細胞) では、*E. coli* と *P. gingivalis* の EP はそれぞれ 48% と 39% の細胞死を誘導したのに対して、THP-1 CASP4-deficient 細胞では両 LPS ともに細胞死は観察されなかった(図 4)。

これらの実験から *P. gingivalis* の LPS は *E. coli* LPS と同様に、細胞質内に配送されると、細胞質内のカスパーゼ 4 に認識され、NLRP3 インフラマソーム活性化を介したピロトーシスを誘導することが明らかになった。

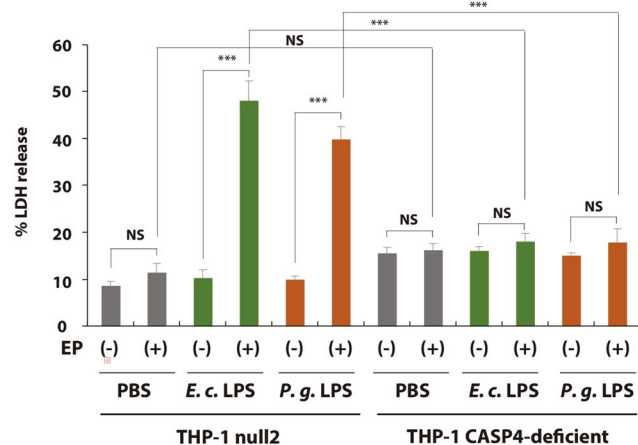


図 4

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ozaki Yukio, Kishimoto Takaaki, Yamashita Yasunori, Kaneko Takashi, Higuchi Kanako, Mae Megumi, Oohira Masayuki, Mohammad Alam Ibtehaz, Yanagiguchi Kajiro, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 122
2. 論文標題 Expression of osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic cytokines differs in mouse gingiva injected with lipopolysaccharide, peptidoglycan, or both	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104990 ~ 104990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2020.104990	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 Kawahara Y., Kaneko T., Yoshinaga Y., Arita Y., Nakamura K., Koga C., Yoshimura A., Sakagami R.	4. 巻 99
2. 論文標題 Effects of Sulfonylureas on Periodontopathic Bacteria-Induced Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 830 ~ 838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520913250	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 Arita Yoichi, Yoshinaga Yasunori, Kaneko Takashi, Kawahara Yuri, Nakamura Keiko, Ohgi Kimiko, Arita Seiichi, Ryu Takanori, Takase Minoru, Sakagami Ryuji	4. 巻 55
2. 論文標題 Glyburide inhibits the bone resorption induced by traumatic occlusion in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 464 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12731	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 Kawahara Y, Kaneko T, Yoshinaga Y, Arita Y, Nakamura K, Koga C, Yoshimura A, Sakagami R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of Sulfonylureas on Periodontopathic Bacteria-Induced Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	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) 10.1177/0022034520913250	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 Arita Y, Yoshinaga Y, Kaneko T, Kawahara Y, Nakamura K, Ohgi K, Arita S, Ryu T, Takase M, Sakagami R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Glyburide inhibits the bone resorption induced by traumatic occlusion in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	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) 10.1111/jre.12731	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 Kaneko Takashi	4. 巻 61
2. 論文標題 Peptidoglycan and periodontal diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (Journal of the Japanese Society of Periodontology)	6. 最初と最後の頁 73~80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2329/perio.61.73	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 Ziauddin SM, Yoshimura A, Montenegro Raudales JL, Ozaki Y, Higuchi K, Ukai T, Kaneko T, Miyazaki T, Latz E, Hara Y.	4. 巻 53
2. 論文標題 Crystalline structure of pulverized dental calculus induces cell death in oral epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 353-361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12520	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 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金子高士, 中村恵子, 吉永泰周, 坂上竜資
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis LPSによる非定型NLRP3インフラマソーム活性化に関する研究
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子高士, 中村恵子, 吉永泰周, 坂上竜資
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis LPSによる非定型NLRP3インフラマソーム活性化
3. 学会等名 第49回福岡歯科大学学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉永泰周、有田陽一、金子高士、河原ゆり、中村恵子、古賀千尋、有田誠一、笠孝成、高瀬稔、坂上竜資
2. 発表標題 糖尿病治療薬グリブリドは実験的咬合性外傷による骨吸収を抑制する
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾崎幸生、山下恭徳、前めぐみ、大平真之、Ziauddin SM、Alam IM、樋口賀奈子、金子高士、吉村篤利
2. 発表標題 ペプチドグリカンおよびリポ多糖投与マウス歯槽骨面上の破骨細胞形成におけるIL-10の役割
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原ゆり、金子高士、吉永泰周、有田陽一、笠孝成、中村恵子、古賀千尋、吉村篤利、坂上竜資
2. 発表標題 歯周病原細菌によるIL-1 の活性化に対するスルホニル尿素薬の影響
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎幸生、山下恭徳、岸本隆明、Sm Ziauddin、樋口賀奈子、金子高士、吉村篤利
2. 発表標題 ペプチドグリカン投与マウス歯槽骨面上の破骨細胞形成におけるIL-17の役割
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠孝成、内田邦敏、有田晴一、八田光世、金子高士、吉永泰周、山崎純、坂上竜資
2. 発表標題 ヒト歯肉口腔上皮細胞にPorphyromonas gingivalisが与える変化
3. 学会等名 令和元年度日本歯周病学会九州五大学日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ziauddin SM, Yoshimura A, Montenegro Raudales JL, Ozaki Y, Higuchi K, Kaneko T, Ukai T, Hara Y.
2. 発表標題 Dental calculus alters the permeability of HSC-2 oral epithelial cell monolayer.
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有田陽一、吉永泰周、金子高士、河原ゆり、中村恵子、古賀千尋、大城希美子、山本南奈、廣松亮、有田晴一、坂上竜資
2. 発表標題 NLRP3インフラマソームは外傷性咬合による骨吸収に関与する
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎幸生, 岸本隆明, 山下恭徳, エスエムジャウディン, 樋口加奈子, 金子高士, 吉村篤利
2. 発表標題 リポ多糖およびペプチドグリカン局所投与マウス歯槽骨面上の破骨細胞形成への炎症性および抗炎症性サイトカインの関与
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ziauddin SM, 尾崎幸生, 樋口賀奈子, 金子高士, 吉村篤利
2. 発表標題 歯石中の結晶構造および菌体成分がHSC-2口腔上皮細胞とマクロファージの細胞死に及ぼす影響
3. 学会等名 平成30年度日本歯周病学会九州五大学日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有田陽一, 吉永泰周, 金子高士, 河原ゆり, 笠孝成, 中村恵子, 古賀千尋, 大城希美子, 山本南奈, 廣松亮, 有田晴一, 坂上竜資
2. 発表標題 実験的咬合性外傷による骨吸収におけるNLRP3インフラマソームの関与
3. 学会等名 平成30年度日本歯周病学会九州五大学日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河原ゆり, 金子高士, 吉永泰周, 有田陽一, 笠孝成, 中村恵子, 古賀千尋, 大城希美子, 山本南奈, 廣松亮, 有田晴一, 吉村篤利, 坂上竜資
2. 発表標題 歯周病原細菌によるNLRP3インフラマソームの活性化に対してスルホニル尿素薬が及ぼす影響
3. 学会等名 平成30年度日本歯周病学会九州五大学日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 尾崎幸生, 山下恭徳, 岸本隆明, Ziauddin SM, 樋口賀奈子, 金子高士, 吉村篤利
2. 発表標題 リボ多糖およびペプチドグリカン局所投与マウスにおける歯槽骨吸収には異なるサイトカインが関与する
3. 学会等名 平成30年度日本歯周病学会九州五大学日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有田陽一, 吉永泰周, 金子高士, 河原ゆり, 笠孝成, 中村恵子, 古賀千尋, 大城希美子, 山本南奈, 廣松亮, 有田晴一, 坂上竜資
2. 発表標題 NLRP3インフラマソームの咬合性外傷による骨吸収への関与
3. 学会等名 第45回福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河原ゆり, 金子高士, 吉永泰周, 有田陽一, 中村恵子, 古賀千尋, 大城希美子, 山本南奈, 廣松亮, 有田晴一, 佐藤博信, 坂上竜資
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis LPSのカスパーゼ4活性化に関する研究
3. 学会等名 第45回福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福岡歯科大学  
<https://www.fdcnet.ac.jp/col/index.php>  
 福岡歯科大学口腔医療センター  
<https://www.fdcnet.ac.jp/cod/>

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	吉永 泰周  (Yoshinaga Yasunori)  (60452869)	福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授     (37114)	

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