

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17066

研究課題名（和文）歯周病原性細菌による上皮間葉転換誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of induction of epithelial-mesenchymal transition by periodontal pathogenic bacteria

研究代表者

大嶋 淳 (Ohshima, Jun)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：30755450

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、主要な歯周病原性細菌である*P. gingivalis*によって誘導される上皮-間葉転換（EMT）に着目し、歯周病原性細菌がもつ歯肉のバリア機能を破綻させる新規メカニズムの解明を目指した。結果として、*P. gingivalis*感染は β -カテニンシグナルを介してEMTを誘導していることが明らかとなり、 β -カテニンと相互作用する核内転写因子としてはFOXO1が重要な働きを示すことがわかった。さらに、口腔常在菌の一種である*Streptococcus gordonii*はFOXO1の核内移行の阻害することによって、*P. gingivalis*によるEMT誘導を有意に抑制することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*P. gingivalis*による病的なEMTの促進は、歯肉上皮細胞の上皮としての特性を失わせることにつながり、歯肉の物理的・生物学的なバリア機能を大きく破綻させる可能性がある。したがって、本研究によって得られたEMT誘導機構における新たな知見により、*P. gingivalis*がもつ歯周病における病原性発現機序の新たな側面を明らかにすることができた。また、本研究を通じて明らかとなった歯周病原性細菌による病的EMT誘導に関わる分子（ β -カテニン、FOXO1など）を標的とした新規の創薬・治療戦略につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by *P. gingivalis*, a major periodontal pathogenic bacterium, and aimed to elucidate a novel mechanism by which periodontal pathogenic bacteria disrupt gingival barrier function. As the results, we found that *P. gingivalis* induces EMT through β -catenin signaling, indicating that FOXO1 is an important nuclear transcription factor that interacts with β -catenin. Furthermore, *Streptococcus gordonii*, an oral indigenous bacterium, significantly inhibited the induction of EMT by *P. gingivalis* by preventing the nuclear translocation of FOXO1.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯学 微生物学 口腔細菌学 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯肉溝など清掃が行き届かない局所で定着・増殖した細菌と、それに対する生体側の免疫応答の結果、歯周組織に炎症が生じて組織傷害をきたす感染性疾患です。口腔内には多種多様な微生物が生息し、複雑な微生物叢を形成しています。グラム陰性嫌気性桿菌 *Porphyromonas gingivalis* は、重度歯周炎患者の歯周ポケットより検出されるだけでなく、根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外バイオフィルムからも高頻度で同定され、辺縁性および根尖性歯周炎の進行に重要な病原性細菌であると考えられています。

一方、歯周組織において細菌と直接対峙し、細菌の組織侵入に対する最前線の防御壁として機能する細胞として、歯肉上皮細胞があります。また近年では、上皮細胞は単なる受動的な障壁ではなく、むしろ細菌の存在を感知し免疫細胞へその存在を知らせるインタラクティブなインターフェースを構成することが認識され始めています。

これらのことを背景に申請者はまず、細菌感染時の歯肉上皮細胞の遺伝子発現パターンを検討するため RNA シークエンス解析を行いました。その結果、*P. gingivalis* 感染はヒト歯肉上皮細胞株において上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) と呼ばれる現象に関与する遺伝子群の発現を強く上昇させることが明らかとなりました。EMT とは、上皮細胞が間葉系様細胞に変化して運動性を獲得するプロセスを言います。EMT は当初、胚発生や創傷治癒において観察されていましたが、上皮系がん細胞の浸潤・転移機構においても重要な役割を果たすことが明らかとなった現在では、悪性腫瘍領域でも多くの研究が報告されています。

2. 研究の目的

本研究では、この歯周病原性細菌に誘導される EMT という現象に着目し、「*P. gingivalis* がいかんして歯肉上皮細胞に EMT を誘導し、間葉系細胞の特性をもたらすのか」という問いを究明することにより、歯周病原性細菌がもつ歯肉のバリア機能を破綻させる新規メカニズムの解明を目指しました。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* による EMT 誘導の主要シグナル伝達経路の探索

TGF- β 、EGF、HGF といった増殖因子やサイトカイン、Notch シグナルを介した細胞間相互作用など、EMT を誘導する複数のシグナル伝達経路がこれまでに知られており、*P. gingivalis* もこれら既知のシグナルのいずれかを利用して歯肉上皮細胞に EMT を誘導している可能性があります。そこで、それぞれのシグナルに特異的な阻害剤や主要遺伝子のノックダウン試薬を用いてヒト歯肉上皮細胞株 (TIGK) を処理し、*P. gingivalis* 依存的な ZEB2 の発現上昇に影響があるかどうかをリアルタイム定量 PCR にて検討しました。

(2) *P. gingivalis* 感染が ZEB2 の発現を上昇させる分子メカニズムの解明

上述の(1)で明らかにした *P. gingivalis* 誘導性 EMT の主要シグナル伝達経路について、さらにその分子メカニズムの解明を目指し、ZEB2 の発現上昇を指標としてさらなる検討を加え、ZEB2 発現を直接的に誘導する転写因子の同定を試みました。具体的には、(1)で明らかにしたシグナルの最下流に存在する、ZEB2 発現を直接的に誘導する転写因子の同定を目指してルシフェラーゼ発現プラスミドを用いた ZEB2 のプロモーターアッセイにより ZEB2 発現に関わる転写因子を探索し、さらにクロマチン免疫沈降法によりプロモーター結合領域を検討しました。

(3) *P. gingivalis* による ZEB2 の発現上昇が上皮細胞の遊走性に及ぼす影響

まず、蛍光免疫染色による解析を行い、*P. gingivalis* による感染が上皮細胞における ZEB2 の細胞内局在を変化させるかどうかを検討しました。さらに、*P. gingivalis* による ZEB2 の発現上昇が上皮細胞の遊走性と創傷治癒機転にどのように影響するかを評価するために、RNA 干渉を用いて ZEB2 を特異的に発現抑制した細胞に *P. gingivalis* を感染させ、マトリゲルインベージョンチャンバーを用いた培養による遊走能の評価を行いました。

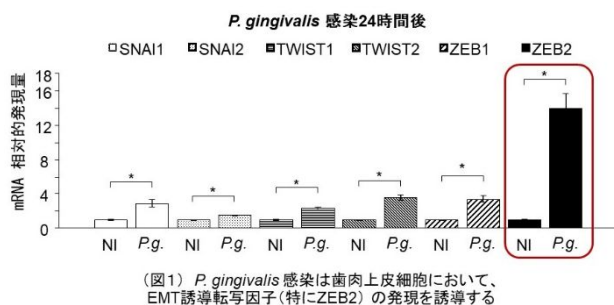
(4) *P. gingivalis* と他種細菌との混合感染による相互作用についての検討

実際の口腔粘膜において、*P. gingivalis* は単独ではなく他種細菌と複雑に相互作用しながら共同体を形成し定着しています。このことを考慮して、歯肉上皮細胞を *P. gingivalis* と他の口腔内常在細菌とを同時に刺激した場合の ZEB2 の発現についてもリアルタイム定量 PCR を用いて検討しました。

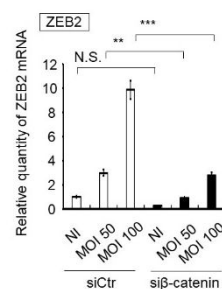
4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* による EMT 誘導の主要シグナル伝達経路の探索

我々はまず、RNA シークエンス解析とリアルタイム定量 PCR による予備実験を行い、*P. gingivalis* が歯肉上皮細胞において EMT 誘導転写因子群の中でも ZEB2 という遺伝子の発現を特異的に強く誘導することを明らかにしました(図 1)。そこで以降の計画では、「*P. gingivalis* による歯肉上皮細胞における EMT 誘導」を ZEB2 の発現上昇を指標として、多角的に検討していくこととしました。また、EMT を誘導することが知られている様々なシグナルについて特異的な阻害剤や主要遺伝子のノックダウン試薬を用いて検討したところ、 β -カテニンに対する阻害剤および siRNA 処理が、*P. gingivalis* による ZEB2 発現を有意に抑制することが明らかとなりました(図 2)。



(図1) *P. gingivalis* 感染は歯肉上皮細胞において、EMT誘導転写因子(特にZEB2)の発現を誘導する



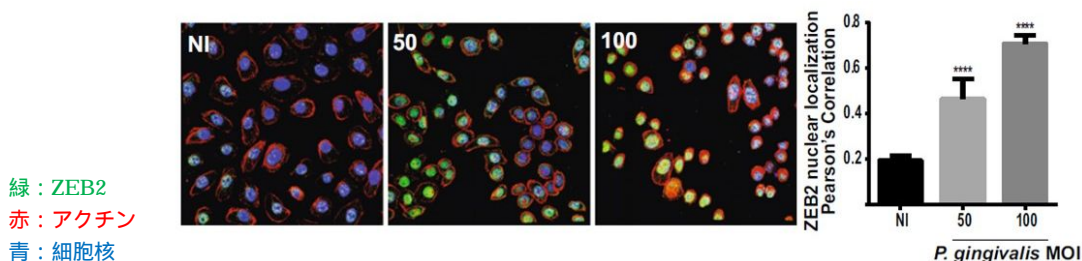
(図2) β -カテニンのノックダウンは *P. gingivalis* による ZEB2 発現を抑制する

(2) *P. gingivalis* 感染が ZEB2 の発現を上昇させる分子メカニズムの解明

ZEB2 のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ発現プラスミドを用いたプロモーターアッセイにより、 β -カテニンの核内相互作用分子として FOXO1 が重要であることが明らかとなり、さらにクロマチン免疫沈降法によりプロモーター結合領域の同定にも成功しました。

(3) *P. gingivalis* による ZEB2 の発現上昇が上皮細胞の遊走性に及ぼす影響

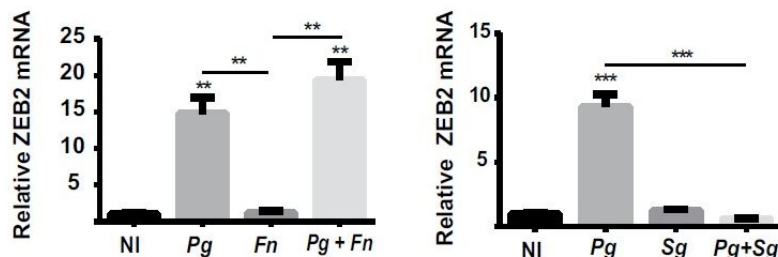
蛍光免疫染色による解析の結果、*P. gingivalis* 感染によって ZEB2 が核内に移行することがわかりました(図 3)。さらに、マトリゲルインベーションチャンバーを用いて細胞遊走能を評価した結果、*P. gingivalis* による ZEB2 の発現上昇が上皮細胞の遊走性を高めること、そしてその効果は ZEB2 を特異的に発現抑制した細胞では阻害されることが明らかとなりました。



(図3) *P. gingivalis* が感染するとEMT関連転写因子ZEB2が活性化し、核に移行する

(4) *P. gingivalis* と他種細菌との混合感染による相互作用についての検討

代表的な口腔常在菌である *Streptococcus gordonii* と共感染させた際には *P. gingivalis* による ZEB2 発現誘導が有意に阻害されることがわかりました。このような阻害作用は同じく口腔内に観察される *Fusobacterium nucleatum* との共感染では認められませんでした(図 4)。また、免疫染色およびプロモーターアッセイを用いた解析の結果、*S. gordonii* は FOXO1 の核内移行の阻害することによって、*P. gingivalis* による EMT 誘導を有意に抑制することが明らかとなりました。



(図4) *P. gingivalis* によるZEB2の活性化は、*S. gordonii* によって阻害される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohshima Jun, Wang Qian, Fitzsimonds Zackary R., Miller Daniel P., Sztukowska Maryta N., Jung Young-Jung, Hayashi Mikako, Whiteley Marvin, Lamont Richard J.	4. 巻 116
2. 論文標題 Streptococcus gordonii programs epithelial cells to resist ZEB2 induction by Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 8544 ~ 8553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1900101116	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 Jung Young-Jung, Miller Daniel P., Perpich John D., Fitzsimonds Zackary R., Shen Daonan, Ohshima Jun, Lamont Richard J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Tyrosine Phosphatase Php1 Promotes Community Development and Pathogenicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e02004 ~ e02019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.02004-19	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大嶋 淳、林 美加子
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisは -カテニンシグナルを介して歯肉上皮細胞に上皮間葉転換を誘導する
3. 学会等名 第148回日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fitzsimonds ZR, Ohshima J, Wang Q, Sztukowska MN, Miller DP, Lamont RJ
2. 発表標題 Streptococcus gordonii antagonizes Porphyromonas gingivalis-mediated signaling in epithelial cells
3. 学会等名 97th International Association for Dental Research General Session（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohshima J, Hayashi M, Lamont RJ
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis induces mesenchymal-like transition through beta-catenin signaling
3. 学会等名 97th International Association for Dental Research General Session (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----