

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791610
 研究課題名 (和文) 歯周病原細菌による免疫エスケープ機構の分子基盤の確立
 研究課題名 (英文) Elucidation of immune escape mechanisms by periodontopathic bacteria
 研究代表者
 本田 朋之 (HONDA TOMOYUKI)
 新潟大学・医歯学系・特任助教
 研究者番号：30447635

研究成果の概要：歯周病原細菌の1つ *Porphyromonas gingivalis* は、免疫による排除機構から逃れ、感染を慢性化させている可能性が考えられる。この細菌のもつ病原因子が歯周組織の構成細胞（マクロファージ、上皮細胞）によって認識される過程において IRAK-M の発現が高まる。IRAK-M は免疫を抑制する分子の一つとして既に知られているが、歯周組織の細胞においても免疫応答性を低下させ、感染を慢性化させるメカニズムの一端が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病原細菌, *Porphyromonas gingivalis*, IRAK-M, マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

歯周炎の発症・進行は、歯周組織における慢性的な細菌感染が関わっている。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) については、以前よりその毒性が弱く、宿主細胞に対する炎症性サイトカイン誘導能が低いことが報告されている。このことについては歯周炎に限らず他の慢性感染症に対する原因/関連細菌、すなわち動脈硬化症における *Chlamydia pneumoniae*, 慢

性胃炎における *Helicobacter pylori* についても同様のことが知られている。宿主の免疫応答性を弱めることで免疫系による排除機構から逃れ、感染を慢性化させる原因になっていると考えられる。

リポポリサッカライド (Lipopolysaccharide ; LPS) はグラム陰性細菌の外膜成分であり、最も強力な病原因子の一つである。歯周炎においても宿主細胞を活性化し、炎症性サイトカインを介して歯周組織破壊に関与することが明らかとなって

いる。我々も歯周炎をモデルとしてその免疫機構を解析する過程で *P. gingivalis* 由来 LPS の作用についても研究を進めている。 *P. gingivalis* LPS を用いて歯肉線維芽細胞において炎症性サイトカインが誘導され、それが LPS 受容体として知られている Toll-like receptor (TLR) 4 の認識を介して行われることを以前報告した。この *P. gingivalis* LPS については、腸内細菌由来 LPS に比較して炎症性サイトカイン誘導能が低いことが *in vitro* においても示されており、我々も単球系細胞株 THP-1 およびこれを PMA にて分化させたマクロファージを用いた実験系において、 *P. gingivalis* LPS 刺激が *Escherichia coli* (*E. coli*) 由来 LPS に比較して炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-12) の産生量が 20~70% 低いことをすでに確認している。また我々は、歯周炎が冠動脈心疾患に及ぼす影響を明らかにする研究から、 *P. gingivalis* LPS により冠動脈由来血管内皮細胞に対しても炎症性サイトカイン・ケモカインが誘導されることを示したが、 *E. coli* LPS に比較するとやはりその誘導能が低いことを明らかにした。このように *P. gingivalis* LPS のもつ宿主細胞に対する低応答性は他の歯周病原細菌あるいは腸内細菌由来の LPS ではみられない特性として捉えられ、宿主の免疫応答を弱めることで感染の持続を図り、炎症の遷延化を導くものと考えられる。LPS の活性中心である lipid A の分子構造が *P. gingivalis* において *E. coli* のそれと異なっており、従って *P. gingivalis* LPS が TLR4 ではなく TLR2 により認識されるとの報告もある。この認識機構の違いにより宿主細胞の応答性に違いが生じていると考えられているが、十分な解明に至っていないのが現状である。最近の報告により *P. gingivalis* LPS が TLR2 および TLR4 のいずれでも認識されることがわかり、この宿主細胞に対する低応答性について LPS の認識機構だけでは説明することはできない。

LPS の作用の一つとしてエンドトキシントレランスの誘導が挙げられる。エンドトキシントレランスは低容量の LPS 刺激後に再度 LPS で刺激をしても炎症性サイトカイン産生が上昇しない現象を指す。現在、この分野の研究は自然免疫系のなかで最も注目されているテーマの一つである。LPS による炎症性サイトカイン産生は TLR と下流のシグナル伝達分子により制御され、最終的に転写因子 NF- κ B の活性化を介して行われる。TLR を介して入ったシグナルは MyD88 \rightarrow IRAK1,4 \rightarrow TRAF6 とリン酸化が進むが、interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK) ファミリー分子の一つである IRAK-M、さらには SOCS-1, SHIP といった分子が IRAK-1,4 を抑制することで TLR の

シグナル伝達系における Negative regulator としてエンドトキシントレランスの成立に関与していることがわかっている。

これらの背景を受けて我々は、 *P. gingivalis* LPS が示す宿主細胞に対する低応答性について TLR のシグナル伝達系に注目し、IRAK-M をはじめとする Negative regulator の関与があるのではないかと考えるに至った。THP-1 より分化させたマクロファージに対して LPS にて刺激した実験系において、 *E. coli* LPS に比較して *P. gingivalis* LPS の作用により IRAK-M の発現が特異的に増強することを我々はすでに明らかにしており、他の Negative regulator である SOCS-1 および SHIP の発現については *P. gingivalis* LPS による影響は認められなかった。さらに IRAK-M に特異的な siRNA を用い、その発現をノックダウンさせた実験系において *P. gingivalis* LPS による炎症性サイトカイン産生が上昇した。このことから *P. gingivalis* LPS によるマクロファージの低応答性について IRAK-M の影響が十分に考えられる。

2. 研究の目的

(1) *P. gingivalis* LPS によって増強した IRAK-M の TLR シグナル伝達系に対する作用：

IRAK-M 発現の増強がサイトカイン産生に及ぼす影響は示されたが、さらにそれが TLR のシグナル伝達系を介しての作用であるか検討する必要がある、サイトカイン産生がどのように制御されているのか明確にする。

(2) IRAK-M 発現制御因子の同定：

IRAK-M の発現制御機構については全くわかっていない。DNA マイクロアレイ解析を応用し *P. gingivalis* LPS により特異的に発現の変動する遺伝子の情報を得て、IRAK-M の発現制御に関わる分子群について網羅的検索を行う。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* LPS によって増強した IRAK-M の TLR シグナル伝達系に対する作用：

TLR シグナル伝達系において、IRAK-1 はリン酸化して MyD88 から分離し TRAF6 と複合体を形成して NF- κ B を活性化した後に分解することが知られている。IRAK-M は、MyD88 からの IRAK-1 の分離を抑制することにより TLR シグナル伝達系を抑制的に制御していると報告されている。 *P. gingivalis* LPS により特異的に増強した IRAK-M によ

り IRAK-1 の分解は抑制されると考えられ、これを明らかにすると同時に数多くの炎症性サイトカイン発現の転写に関わっている NF- κ B の活性も測定した。

① IRAK-M による IRAK-1 の分解抑制：

ヒト単球系細胞株 THP-1 を 200nM PMA 存在下で 48 時間培養しマクロファージ様細胞に分化させた上で（以下、マクロファージとする）、*P. gingivalis* LPS および *E. coli* LPS を各々 1 μ g/mL の濃度で刺激し、刺激後 6, 9, 12, 15 時間において細胞よりタンパクを抽出しウェスタンブロット法により IRAK-1 の発現動態を検討した。また、IRAK-M に特異的な siRNA をマクロファージにトランスフェクトし(40nM), IRAK-M がノックダウンした状態において LPS 刺激時の IRAK-1 の発現をさらに検討した。

② NF- κ B の活性：

マクロファージを①と同様に LPS で刺激し、刺激後 6, 9, 12, 15 時間における核タンパクを抽出し、NF- κ B p50 および p65 を特異的に検出する ELISA キットを用いて NF- κ B の活性を測定した。

(2) 歯肉上皮細胞における IRAK-M の関与：

IRAK-M は、単球・マクロファージ系の細胞に特異的に発現していると報告された分子であるが、我々はこの分子が歯肉上皮細胞にも恒常的に発現していることを確認した (unpublished data)。歯肉上皮は、ポケット内細菌に対しての物理的な防御として機能するだけでなく、積極的に免疫応答にも関与することがすでに報告されているが、その詳細について明らかになっていない部分は多い。

① *P. gingivalis* 刺激による歯肉上皮細胞における IRAK-M 発現：

SV40 T 抗原を遺伝子導入したヒト歯肉上皮細胞株（以下 epi4, 大阪大学大学院歯学研究科口腔治療学教室の村上伸也教授より供与）を Humedia-KG2 培地にて継代培養し実験に供した。抗原として *P. gingivalis* 381 株の生菌 (MOI: 50) および同菌株由来 LPS (1 μ g/mL), TLR2 リガンドである Pam3CSK4 (各 1 μ g/mL) を用いて刺激した。刺激 12 時間後の epi4 における IRAK-M 遺伝子発現を Real-time PCR 法にて検討した。

② 歯肉上皮細胞におけるケモカイン産生に対する IRAK-M の作用：

Epi4 に対して、IRAK-M に特異的な siRNA (10nM) をトランスフェクトしノックダウンさせた。その効果を検証するため、トランスフェクト 24 時間後の epi4 における IRAK-M

発現について Western Blot 法にて確認した。その上でトランスフェクト 24 時間後に①と同様の抗原にて epi4 を刺激し、その 12 時間後の IL-8 および MCP-1 遺伝子発現を Real-time PCR 法にて検討した。また、刺激 24 時間後の培養上清中の IL-8 および MCP-1 産生を ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* LPS によって増強した IRAK-M の TLR シグナル伝達系に対する作用：

① IRAK-M による IRAK-1 の分解抑制：

いずれの菌種由来 LPS 刺激においても IRAK-1 の mRNA 発現に変動は認められなかった。マクロファージにおいて *P. gingivalis* LPS により刺激後 9 時間以降で特異的に IRAK-M の発現が増強することをすでに確認している。IRAK-1 のタンパクレベルの発現を検討したところ、*P. gingivalis* LPS 刺激 9 時間以降において IRAK-1 の分解が抑制された。IRAK-M のノックダウンにより *P. gingivalis* LPS 刺激 9 時間において IRAK-1 の分解が促進された。

② NF- κ B の活性：

いずれの菌種由来 LPS 刺激においても NF- κ B の活性が上昇した。IRAK-M をノックダウンすると、*P. gingivalis* LPS 刺激による NF- κ B の活性はさらに上昇した。

P. gingivalis は IRAK-M を介しその下流のシグナル伝達系を抑制することにより、宿主細胞の低応答性に関与している可能性が示唆された。以上の成果を含め、雑誌論文 (Domon H, Honda T *et al.*, *J Leukoc Biol.*, 2008.) に報告した。

(2) 歯肉上皮細胞における IRAK-M の関与：

① *P. gingivalis* 刺激による歯肉上皮細胞における IRAK-M 発現：

P. gingivalis 生菌および LPS 刺激により epi4 における IRAK-M 遺伝子発現の上昇が認められた。Pam3CSK4 についても同様の所見が得られた。

② 歯肉上皮細胞におけるケモカイン産生に対する IRAK-M の作用：

Epi4 への IRAK-M siRNA トランスフェクトにより、約 70% のノックダウン効果が確認された。各刺激にて IL-8 遺伝子発現は上昇し、*P. gingivalis* 生菌以外の刺激にて MCP-1 遺伝子発現は上昇した。IRAK-M のノックダ

ウンにより各遺伝子発現はさらに上昇した。生菌以外の刺激にて IL-8 および MCP-1 産生は上昇した。IRAK-M のノックダウンにより MCP-1 産生はさらに上昇したが、IL-8 産生への影響は認められなかった。

歯肉上皮細胞において、*P. gingivalis* 刺激により誘導されるケモカイン産生は IRAK-M を介して抑制的に制御されているが、最終産物としてのケモカインの種類により IRAK-M の作用が異なっていることが示唆された。以上の成果を第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会（高橋、本田ら、2008 年 10 月）にて報告した。

P. gingivalis に対するマクロファージおよび歯肉上皮細胞の低応答性について IRAK-M の影響が明らかとなり、IRAK-M を介し炎症反応が制御され、免疫エスケープ機構による感染の慢性化に関与していることが示唆された。本研究により、歯周病のみならず慢性感染症の免疫エスケープ機構に基づく病態解明にも寄与するものと考えられる。今後、マクロファージに加え歯肉上皮細胞を用いて IRAK-M に関わる発現制御因子の候補を検索していく。

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 3 件)

① Domon H, Takahashi N, Honda T, Nakajima T, Tabeta K, Abiko Y, Yamazaki K. Up-regulation of the endoplasmic reticulum stress-response in periodontal disease. Clin Chim Acta. 2009; 401: 134-140. 査読あり

② Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, Tabeta K, Okui T, Kajita K, Domon H, Yamazaki K. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. Clin Chim Acta. 2008; 395: 137-141. 査読あり

③ Domon H, Honda T, Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. Early and preferential induction of IL-1 receptor-associated kinase-M in THP-1 cells by LPS derived from *Porphyromonas gingivalis*. J Leukoc Biol. 2008; 83: 672-679. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① 高橋直紀, 本田朋之, 奥井隆文, 土門久哲, 吉江弘正, 多部田康一, 山崎和久. ヒト

歯肉上皮細胞のケモカイン産生における IRAK-M の関与. 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会 (抄録: 日歯周誌 50 巻 秋季特別号 95 ページ), 四日市市, 2008 年 10 月 19 日.

② Domon H, Honda T, Oda T, Yamazaki K. Differential induction of interleukin-1 receptor-associated kinase-M in THP-1 cells by lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis*. 13th International congress of mucosal immunology. Tokyo, Japan. July 11, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 朋之 (HONDA TOMOYUKI)
新潟大学・医歯学系・特任助教
研究者番号: 30447635

(2) 研究分担者 なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

土門 久哲 (DOMON HISANORI)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・
研究員
研究者番号: なし
高橋 直紀 (TAKAHASHI NAOKI)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・
大学院生
研究者番号: なし