

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390528

研究課題名(和文) 歯周自然免疫として働くメンブレントラフィック機構の分子基盤解析

研究課題名(英文) Molecular dissection of membrane traffic machinery for innate immunity

研究代表者

天野 敦雄 (AMANO ATSUO)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50193024

研究成果の概要(和文)：

歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* が有する顕著な宿主細胞侵入性は、歯周病の進行と慢性化に大いに貢献していると考えられている。本研究では *P. gingivalis* が宿主細胞のエンドサイトーシス経路を介して歯肉上皮細胞に侵入し細胞障害を引き起こした後、さらに細胞外へ脱出し他の細胞に再侵入し、歯周感染の拡大を果たしていることを示した。また、本菌の細胞外脱出に、GTPase である Rab11 と RalA、および Exocyst complex の関与が示された。このことより、*P. gingivalis* が宿主細胞のリサイクリング経路を利用し、細胞外へ脱出し更に別細胞へ再感染することで歯周病が進行しているという、新規の歯周病態が示された。

研究成果の概要(英文)：

*Porphyromonas gingivalis*, the most well-known periodontal pathogen, can enter gingival epithelial cells and pass through the epithelial barrier into deeper tissues. However, it is poorly understood how this pathogen exits from infected cells for further transcellular spreading. The present study was performed to elucidate the cellular machinery exploited by *P. gingivalis* to exit from immortalized human gingival epithelial cells. *P. gingivalis* was internalized with early endosomes, and about half of the intracellular bacteria were found to be sorted to lytic compartments, including autolysosomes and late endosomes/lysosomes, while a considerable number of the remaining organisms were sorted to recycling endosomes. Small GTPases (Rab11 and RalA) and exocyst complex subunits (Sec5, Sec6, and Exo84) were also shown to be involved in the exit of *P. gingivalis*. The recycling pathway is exploited by intracellular *P. gingivalis* to exit from infected cells to neighboring cells as a mechanism of cell-to-cell spreading.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

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：歯学、歯周病菌、歯周病、感染症、シグナル伝達、細菌・組織

## 1. 研究開始当初の背景

近年、歯周組織の細胞に歯周病細菌が侵入し細胞傷害性を発揮することが歯周病の慢性化と進行に寄与していると示唆されている。しかし、細胞側も侵入してきた細菌を殺し分解する機能を有する。この機能こそが自然免疫におけるメンブレントラフィックの役割である。メンブレントラフィックとは、細胞内の物質輸送ネットワークであり、細胞内外への物質輸送により神経系や免疫系などの高次生体機能を支える。メンブレントラフィックの自然免疫機能としては、マクロファージによる細菌貪食がよく知られている。さらに近年、歯周細胞などの非貪食細胞でも、メンブレントラフィックのエンドサイトーシス経路を利用して細菌貪食を行い、対細菌戦の最前線として歯周自然免疫に貢献していると推測されているが、その詳細は未だ明かではない (Amano, *Front Biosci*, 2007)。

数年前まで、非貪食細胞の細菌貪食はエンドサイトーシス経路にのみ依存し、この経路を突破して細胞質に逃れた菌を殺すすべはないと考えられていた。しかし、3年前に我々は、もうひとつのメンブレントラフィックであるオートファジーが、細胞質に現れた細菌を捕獲・分解することを見いだした (Nakagawa et al., *Science*, 2004)。オートファジーは、細胞質の不要成分をオートファゴソームという膜構造で包み、消化する経路で、本来代謝に働くと考えられていた。このオートファジーが、生体防御機能ももつというこの画期的な発見以降、オートファジーと病原体に関する報告が相次ぎ、自然免疫・細胞生物研究に新たな分野が形成されつつある。

## 2. 研究の目的

歯周感染から宿主を防御するメンブレントラフィックの自然免疫機能の分子基盤を明らかにするとともに、侵入してきた歯周病細菌を細胞が殺すためのメンブレントラフィック機能の個人差と歯周病感受性との関連に検討を加えることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* と細胞内コンパートメントとの局在を共焦点顕微鏡で観察。

(2) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出の確認

(3) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出への small GTPases と exocyst complex subunits の関与を当該遺伝子の Dominant negative 型、Constitutive active 型の作成、またはノックダウンを用いて評価

## 4. 研究成果

(1) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の全ては Lytic compartment へ輸送されない。

(2) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* は細胞外に脱出する。

(3) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出に Rab11 が関与する。

(4) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出に RalA が関与する。

(5) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出に Exocyst complex が関与する。

これらの結果より、歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の一部は Rab11 と RalA が制御するリサイクリング経路を利用して細胞外へ脱出することが示された。この脱出にはアクチン・チューブリンの重合・脱重合、リピッドラフトが関与していることが示され、*P. gingivalis* を内含する輸送小胞と細胞膜との融合にはエキソシスト複合体が関与していることが示された。

本研究の結果、歯肉上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis* は細胞内で分解を受けつつも一部は細胞外に脱出し、さらに近接細胞へ再侵入し、歯周組織の感染拡大を果たしていることが示唆された。

## 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 42 件)

## Original articles (全て査読有り)

① Takeuchi H, Furuta N, Morisaki I, Amano

- A\*** (2011): Exit of intracellular *Porphyromonas gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway.  
**Cellular Microbiology**, in press.
- ② **Kawai S\***, Abiko Y, **Amano A** (2010): *Odd-skipped related 2* regulates genes related to proliferation and development.  
**Biochemical and Biophysical Research Communications**, 398(2): 184-190.
- ③ **Kawai S\***, **Amano A** (2010): *Odd-skipped related 2* is epigenetically regulated in cellular quiescence.  
**Biochemical and Biophysical Research Communications**, 396(4): 831-836.
- ④ **Furuta N**, Fujita N, Noda T, **Yoshimori T**, **Amano A\*** (2010): Combinational soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive actor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate the fusion of antibacterial and canonical autophagosomes with lysosomes.  
**Molecular Biology of the Cell**, 21(6):1001-1010.
- ⑤ **Furuta N**, Takeuchi H, **Amano A\*** (2009): Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment.  
**Infection and Immunity**, 77(11), 761-4770.
- ⑥ Inaba H, Kuboniwa M, Bainbridge B, Yilmaz O, Katz J, Shiverick KT, **Amano A**, Lamont RJ\* (2009): *Porphyromonas gingivalis* invades human trophoblasts and inhibits proliferation by inducing G1 arrest and apoptosis.  
**Cellular Microbiology**, 11(10):1517-1532.
- ⑦ **Furuta N**, Tsuda K, Omori H, **Yoshimori T**, Yoshimura F, **Amano A\*** (2009): *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments.  
**Infection and Immunity**, 77(10), 4187-4196.
- ⑧ Kuboniwa M, **Amano A\***, Inaba H, Hashino E, Shizukuishi S. (2009): Homotypic biofilm structure of *Porphyromonas gingivalis* is affected by FimA type variations.  
**Oral Microbiology and Immunology**, 24(3): 260-263.
- ⑨ Inaba H, Hokamura K, Nakano K, Nomura R, Katayama K, Nakajima A, Yoshioka Y, Taniguchi K, Kamisaki Y, Ooshima T, Umemura K, Murad F, Wada K\*, **Amano A** (2009): Upregulation of S100 calcium-binding protein A9 is required for induction of smooth muscle cell proliferation by a periodontal pathogen.  
**FEBS Letters**, 583(1):128-134.
- ⑩ Yamauchi M, **Kawai S\***, **Kato T**, Ooshima T, **Amano A** (2008): *Odd-skipped related 1* gene expression is regulated by *Runx2* and *Ikzf1* transcription factors.  
**Gene**, 426: 81-90.
- ⑪ Makiura N, Ojima M, Kou Y, **Furuta N**, Okahashi N, Shizukuishi S, **Amano A\*** (2008): Relationship of *Porphyromonas gingivalis* with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment.  
**Oral Microbiology and Immunology**, 23(4):348-351.
- ⑫ Ohno T, Okahashi N\*, Morisaki I, **Amano A** (2008): Signaling pathways in osteoblast proinflammatory responses to infection by *Porphyromonas gingivalis*.  
**Oral Microbiology and Immunology**, 23(2):96-104.
- ⑬ **Kato T**, Tsuda T, **Kawai S**, Inaba H, Okahashi N, Shibata Y, Abiko Y, **Amano A\*** (2008): *Porphyromonas gingivalis* gingipains cause G1 arrest in osteoblastic/stromal cells.  
**Oral Microbiology and Immunology**, 23(2):158-164.
- ⑭ Inaba H, Tagashira M, Honma D, Kanda T, Kou Y, Ohtake Y, **Amano A\*** (2008): Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E<sub>2</sub>

production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 31(3):527-530.

- ⑮ Inaba H, Nakano K, Kato T, Nomura R, Kawai S, Kuboniwa M, Ishihara K, Ooshima T, Amano A\* (2008): Heterogenic virulence and related factors among clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae. **Oral Microbiology and Immunology**, 23(1):29-35.
- ⑯ Kou Y, Inaba H, Kato T, Tagashira M, Honma D, Kanda T, Ohtake Y, Amano A\* (2008): Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols. **Journal of Periodontology**, 79(1):174-180.
- ⑰ Tsuda K, Furuta N, Inaba H, Kawai S, Hanada K, Yoshimori T\*, Amano A (2008): Functional analysis of alpha5beta1 integrin and lipid rafts in invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicles. **Cell Structure and Function**, 33(1):123-132.

#### Review articles (全て査読有り)

- ⑱ Amano A\* (2010): Host-parasite interactions in periodontitis: Microbial pathogenicity and innate immunity. **Periodontology 2000**, 54: 9-14.
- ⑲ Kuboniwa M, Inaba H, Amano A\* (2010): Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. **Periodontology 2000**, 54: 136-159.
- ⑳ Amano A\*, Takeuchi H, Furuta N (2010): Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. **Microbes and Infection**, 12(11):791-798.
- ㉑ Furuta N, Amano A\* (2010):

**Cellular machinery** to fuse antimicrobial autophagosome with lysosome. **Communicative & Integrative Biology**, 3(4): 385-387.

- ㉒ Inaba H, Amano A\* (2010): Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases - From molecular mechanisms to clinical cases: Implication of periodontal diseases in development of systemic diseases. **Journal of Pharmacological Sciences**, 113(2), 103-109.
- ㉓ Furuta N, Yoshimori T, Amano A\* (2010): Mediator molecules that fuse autophagosomes and lysosomes. **Autophagy**, 6(3): 417-418.
- ㉔ Amano A\* (2010): Host-parasite interactions in periodontitis: Subgingival infection and host sensing. **Periodontology 2000**, 52: 7-11.
- ㉕ Amano A\* (2010): Bacterial adhesions to host components in periodontitis. **Periodontology 2000**, 52: 12-37.
- ㉖ Amano A\*, Furuta N, Tsuda K (2010): Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oral pathogens. **Periodontology 2000**, 52: 84-93.
- ㉗ Yoshimori T\*, Amano A (2009): Group A *Streptococcus*. A loser in the battle with autophagy. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 335: 217-226.
- ㉘ Amano A\*, Murakami J, Akiyama S, Morisaki I (2008): Etiologic factors of early-onset periodontal disease in Down syndrome. **Japanese Dental Science Review**, 44(2): 118-127.

[学会発表] (計 44 件)

特別講演・シンポジウム

- ① **天野敦雄**、稲葉裕明  
 歯周病菌と4つの全身疾患  
 シンポジウム「ここまでわかった口腔細菌による全身疾患：最新の研究と臨床知見」  
 第31回日本臨床薬理学会年会，2010年12月3日，京都市
- ② **天野敦雄**、竹内洋輝、古田信道  
 上皮細胞への細菌侵入とメンブレントラフィック  
 サテライトシンポジウム「歯学領域におけるメンブレントラフィック研究」  
 第52回歯科基礎医学会学術大会，2010年9月20日，千葉
- ③ **Amano A**  
 Systemic diseases and periodontal pathogen.  
 Leeds & Osaka Universities International Symposium in Dentistry, 2010/7/5, Leeds, England.
- ④ **天野敦雄**、竹内洋輝、古田信道  
 細胞内ロジスティクス機構による細菌感染症の制御  
 新学術領域「細胞内ロジスティクス」班会議 2010年6月30日，札幌市
- ⑤ Takeuchi H, Furuta N, **Amano A**  
 Intracellular Localization of *Porphyromonas gingivalis*.  
 Kyungpook-Osaka University International Symposium in Dentistry,  
 2009/12/11 (Daegu, Korea)
- ⑥ **天野敦雄**、古田信道  
 細胞内ロジスティクス機構による細菌感染症の制御  
 The 1<sup>st</sup> Conference on Intracellular Logistics,  
 2009年11月11日，沖縄県国頭郡恩納村
- ⑦ **天野敦雄**、古田信道、稲葉裕明  
*Porphyromonas gingivalis* の侵入による細胞傷害と全身疾患の関連  
 学術フロンティア推進事業シンポジウム，2009年10月3日，千葉県松戸市
- ⑧ **天野敦雄**  
 長寿を支える歯の健康  
 厚生労働省 長寿総合研究事業 公開市民講座「高齢者とお口の健康管理 ～いつまでも美味しく食べるために～」，  
 2009年3月22日，大阪

- ⑨ **Amano A**  
 Outer membrane vesicles are “bombs” of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis.  
 Korea-Japan Symposium for Dentistry,  
 2009/6/2, Daegu, Korea
- ⑩ **天野敦雄**、稲葉裕明  
 歯周病菌：歯垢から全身疾患へ  
 「循環器系全身疾患における口腔細菌の役割：分子メカニズムから臨床知見まで」第82回日本薬理学会年会，2009年3月16日，横浜
- ⑪ **Amano A**  
 Outer membrane vesicles are “Bombs” of *Porphyromonas gingivalis*.  
 Sino-Japanese Symposium of Conservative Dentistry, 2008/9/9, Chendu, China.

〔図書〕（計3件）

- ① **天野敦雄**，浜田茂幸（2011）：「カラーアトラス 口腔嫌気性グラム陰性桿菌」病原菌の今日的意味（4版 松本慶蔵 編）医薬ジャーナル，大阪，印刷中。
- ② **天野敦雄**，浜田茂幸（2011）：「口腔嫌気性グラム陰性桿菌：歯周病を惹起するプラーク細菌」病原菌の今日的意味（4版 松本慶蔵 編）医薬ジャーナル，大阪，印刷中。
- ③ **天野敦雄**，加藤隆大，稲葉裕明，河合伸治，岡橋暢夫（2008）：「歯周病研究のフロンティア：歯周病細菌から組織再生まで」生命歯科医学のカッティングエッジ（米田俊之 編）大阪大学出版会，大阪，98-108。

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計1件）

名称： ホップ製剤の製造方法、ホップ製剤、  
 抗炎症剤、飲食品および口腔用品  
 発明者： 稲葉裕明、本間 大樹、田頭素行、  
 神田智正、**天野敦雄**  
 権利者：アサヒビール株式会社  
 種類：特許  
 番号：JP2007066148  
 取得年月日：2010年01月26日  
 国内外の別：国内

[その他]  
ホームページ  
<http://www.dent.osaka-u.ac.jp/~methodol/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

天野 敦雄 (AMANO ATSUO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：50193024

### (2)研究分担者

河合 伸治 (KAWAI SHINJI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：40362678

加藤 隆大 (KATO TAKAHIRO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：20423139  
(H20 迄分担者として参画)

古田 信道 (FURUTA NOBUMICHI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：50452446

### (3)連携研究者

吉森 保 (YOSHIMORI TAMOTSU)  
大阪大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：60191649