

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2011

課題番号：21390496

研究課題名（和文）歯周病発症におけるオートファジー機能の解明と治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of autophagy in development of periodontitis and its application of therapy

研究代表者：筑波隆幸（TSUKUBA TAKAYUKI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30264055

研究成果の概要（和文）：重度の歯周病を発症する遺伝子疾患の多くは、リソソーム関連遺伝子の機能異常である。しかし、その分子メカニズムは明らかになっていない。最近我々は、歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis*（以下 *P. gingivalis*）を細胞に感染させるとオートファジーが誘導され、排除される可能性があると想定している。本研究では、新しい生体防御システムとして明らかにされつつあるオートファジー機構について、特に歯科領域で重要な歯周病に関するメカニズムを解明することを目標にし、口腔疾患の新たな予防、診断、治療法の分子基盤の確立を目指す。

研究成果の概要（英文）：Various genetic disorders in severe periodontitis are caused by abnormalities of lysosomal-related genes. However, the detailed mechanisms are still unknown. Recently, we have assumed that autophagy is involved in elimination of *Porphyromonas gingivalis*, a major periodontal pathogen, after infection. In this study, we have elucidated the detailed mechanisms of autophagy in periodontitis, an important issue of dental science, in order to provide clues to the molecular basis of new methods for prevention, diagnosis, and therapy in oral sciences.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：機能系基礎歯科学

科研費の分科・細目：歯科薬理学

キーワード：オートファジー、カテプシン、リソソーム関連遺伝子、歯周病、歯周病原性細菌

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、様々な遺伝的要因と環境的要因が複雑に影響する多因子疾患である。歯周病では、生活習慣が最も影響を及ぼすことから、環境的要因が遺伝的要因よりも影響が大き

いと考えられてきた。しかし、最近の研究により、歯周病も単一の遺伝子変異によって発症する遺伝子病である可能性が明らかになった。単一の遺伝子異常により重度の歯周病

を発症する疾患を示す。重要な事は、Chediak-Higashi 症候群、Papillon-Lefevre 症候群、Haim-Munk 症候群、周期性好中球減少症の4つの疾患は、リソソーム関連遺伝子の機能異常によって惹起していることである。しかし、なぜこれらのリソソーム関連遺伝子の機能異常が歯周病を惹起する原因は、ほとんど明らかにされていない。

最近、リソソームを利用する分解メカニズムの1つにオートファジーが注目されるようになってきた。オートファジーとは、元来、栄養源が枯渇したときに、自分自身の細胞質や細胞内小器官を分解することでアミノ酸を供給する防御システムのことであり、自食とも呼ばれている。従って、オートファジーについて解析すれば、今まで分からなかった歯周病の感染メカニズムについて、詳細な情報が得られると予測される。

2. 研究の目的

歯周病を発症するリソソーム機能異常遺伝子疾患では、オートファジー機構の異常によって惹起されている可能性を示唆するものである。本研究では、歯周病におけるオートファジー機構の解明を行うことによって、共通の歯周病発症のメカニズムを解明することを目指す。

3. 研究の方法

野生型マウスと各種カテプシンに関するノックアウトあるいは遺伝子変異マウスを用いてオートファジーに関する解析を行う。その際に、実験的歯周炎を惹起させた個体レベルでの解析、さらに、好中球・マクロファージなどを用いて細胞レベルでの解析を行いあらゆる角度から、歯周病におけるオートファジーのメカニズムについて解析する。

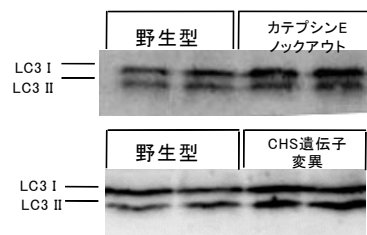
4. 研究成果

(A) 個体レベルでの解析—実験的歯周炎に

よる上顎骨での骨吸収—野生型マウスとノックアウトあるいは遺伝子変異マウス (Lyst, cathepsin E) を用いて、口腔内に *P. gingivalis* (1×10^9 CFU) に粘調性を付与するため2%カルボキシメチルセルロースと共に経口投与し、3日おきに投与を6週間繰り返した。病理組織を解析すると、野生型マウスに比べ、ノックアウトあるいは遺伝子変異マウスは若干炎症の程度が大きいものの、浸潤した細胞や組織破壊の程度には大きな差異は認められなかった。

(B) 細胞レベルでの解析—マクロファージによる解析—まず、免疫担当細胞であるマクロファージを用いて解析した。用いたのは Chediak-Higashi 症候群 (CHS 遺伝子変異) のモデルマウスである Lyst マウスや、カテプシンEノックアウトマウスである。図1に示すように、両変異マウスでは、オートファジーのマーカータンパク質である LC3—II が細胞内で増大していることから、オートファジーの異常が観察できた。

図1 リソソーム関連遺伝子異常によるオートファジーの停滞



マウス マクロファージのLC3抗体によるウエスタンブロットニング

また、*P. gingivalis* を感染させるとさらなるオートファジーの亢進が惹起され、差異として顕著になった。

形態学的観察でも野生型に対し、カテプシンE欠損マクロファージではオートファジーの異常が観察された (図2)。

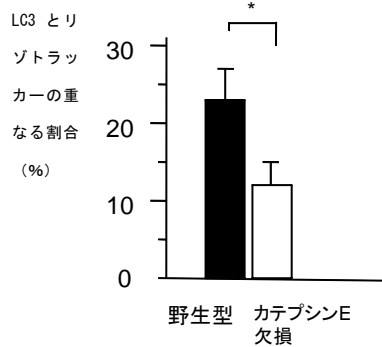
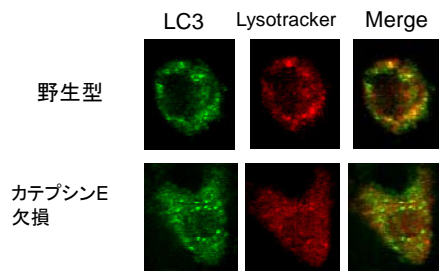


図2:野生型及びカテプシンE欠損マクロファージのLC3とリソソームとの融合

オートファゴソーム膜に存在するタンパク質 LC3—II は野生型に比べ、カテプシン E 欠損マクロファージではリソソームとの融合する割合が低いことが明らかになった。この結果は、カテプシン E 欠損マクロファージがオートファジーの異常によって、様々な免疫反応や殺菌能の低下に関与する可能性が示唆された。すなわち、我々が以前の研究で、カテプシン E 欠損マウスが *P. gingivalis* に対して高い感受性を示すこと、さらに同菌に対して低い殺菌能を持つという知見に、新たにオートファジーの異常が関与していることを示す。

このように、本研究によって、歯周病原菌の排除機構に関与するエンドソーム・リソソーム異常には、オートファジーが関与していることが明らかとなった。

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 14 件)

1. Tsukuba T, Yanagawa M, Okamoto K, Okamoto Y, Yasuda Y, Nakayama K-I, Kadowaki T, Yamamoto K: Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. *J Biochem* 145 (5): 565-573, 2009
2. Yasuda Y, Yasuda Y, Ohtomo E, Tsukuba T, Okamoto K, Saito T. Carbon dioxide laser irradiation stimulates mineralization in rat dental pulp cells. *Int Endod J.* 42(10): 940-906 2009
3. Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K: Interaction between gustatory depolarizing receptor potential and efferent-induced slow depolarizing synaptic potential in frog taste cell. *Cell Mol Neurobiol Mar*; 29(2): 243-52, 2009
4. Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K: Effect of gap junction blocker beta-glycyrretinic acid on taste disk cells in frog. *Cell Mol Neurobiol Jun*; 29(4): 503-12, .2009
5. Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K: The receptor potential of frog taste cells in response to cold and warm stimuli. *Chem Senses.* Jul; 35(6): 491-499, 2010
6. Kawakubo T, Yasukochi A, Okamoto K, Okamoto Y, Nakamura S, Yamamoto K: The role of cathepsin E in terminal differentiation of keratinocytes. *Biol. Chem.* Apr; 392(6): 571-585, 2011
7. Yukitake H, Naito M, Sato K, Shoji M, Ohara N, Yoshimura M, Sakai E, Nakayama K: Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol.* Mar; 55(3): 141-153, 2011
8. Ikeda H, Sumita Y, Ikeda M, Ikeda H, Okumura T, Sakai E, Nishimura M, Asahina I: Engineering bone formation from human dental pulp- and periodontal ligament-derived cells.

Ann Biomed Eng. 39(1): 26-34, 2011

9. Yamamoto K, Kawakubo T, Yasukochi A, Tsukuba T: Emerging roles of cathepsin E in host defense mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 1824, 105-112, 2012

10. Okamoto K, Okamoto Y, Kawakubo T, Iwata J, Yasuda Y, Tsukuba T, Yamamoto K. : Role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the murine cathepsin E gene. *J Biochem*. 151, 263-272. 2012

11. Sakai E, Shimada-Sugawara M, Nishishita K, Fukuma Y, Naito M, Okamoto K, Nakayama K, Tsukuba T: Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. *J Cell Biochem*. 113, 486-498. 2012

12. Tsukuba T, Okamoto K, and Yamamoto K.: Cathepsin E is critical for proper trafficking of cell surface proteins *J Oral Biosci*. 54, 48-53, 2012

13. Narahara S, Matsushima H, Sakai E, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T :Genetic backgrounds and redox conditions influence morphological characteristics and cell differentiation of osteoclasts in mice. *Cell Tissue Res*. 348, 81-94, 2012

14. Fumimoto R, Sakai E, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T : The Coffee Diterpene Kahweol Prevents Osteoclastogenesis via Impairment of NFATc1 Expression and Blocking of Erk Phosphorylation. *J Pharmacol Sci*. 118(4), 479-486, 2012

[学会発表] (計 27 件)

1. Takayuki Tsukuba, Michiyo Yanagawa, Tomoko Kadowaki, Yoshiko Okamoto, Kuniaki Okamoto, and Kenji

Yamamoto: IMPAIRMENT OF AUTOPHAGY ACCOMPANIED BY INCREASED ABERRANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS IN CATHEPSIN E DEFICIENT MACROPHAGES, 5th International Symposium on Autophagy, Ohtsu, Japan, September, 2009

2. 筑波隆幸, 柳川三千代, 門脇知子, 岡本美子, 坂井詠子, 岡元邦彰, 山本健二 : カテプシンE欠損によるオートファジー低下とそれに伴うミトコンドリア機能低下と酸化ストレスの増大, 第14回日本病態プロテアーゼ学会, 大阪, 8月2009

3. 坂井詠子, 嶋田めぐみ, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 中山浩次, 筑波隆幸 : 鉄代謝を介した新規の破骨細胞分化機構, 第51回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 9月2009

4. 筑波隆幸, 門脇知子, 坂井詠子, 岡元邦彰, 山本健二 : カテプシンE欠損マクロファージにおけるオートファジーの低下とそれに伴うミトコンドリア機能異常と酸化ストレスの上昇, 第51回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 9月2009

5. 坂井詠子, 嶋田めぐみ, 福間裕, 西下一久, 内藤真理子, 岡元邦彰, 中山浩次, 筑波隆幸 : 破骨細胞分化における鉄代謝とミトコンドリアストレスの重要性, 鉄バイオサイエンス学術集会, 2009

6. Takayuki Tsukuba, Michiyo Yanagawa, Tomoko Kadowaki, Yoshiko Okamoto, Kuniaki Okamoto, Kenji Yamamoto Autophagy impairment associated with increased aberrant mitochondria and oxidative stress in cathepsin E-deficient macrophage 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 3月2010

7. Kuniaki Okamoto, Yoshiko Okamoto, Tomoyo Kawakubo, Kenji Yamamoto, Takayuki Tsukuba: Transcription factor

- Sp1 regulates the expression of the murine cathepsin E gene in gastric adenocarcinoma cells, 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 2009
8. 筑波隆幸, 岡元邦彰: カテプシン群によるメンブレントラフィックへの影響, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, シンポジウム 松戸, 9 月 2010
9. 西下一久, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: アスパラギン酸プロテアーゼナプシンの比較遺伝学的分析と生化学的解析, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 松戸, 9 月, 2010
10. 坂井詠子, 嶋田めぐみ, 西下一久, 福間 裕, 岡元邦彰, 中山浩次, 筑波隆幸: HO-1 は HMGB1 の遊離を抑制し破骨細胞形成を阻害する, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 松戸, 9 月, 2010
11. 榎原 峻, 松島春菜, 坂井詠子, 筑波隆幸: RANKL 誘導性破骨細胞分化における遺伝子型の影響, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 松戸, 9 月, 2010
12. 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 福間 裕, 坂元 裕, 文元玲子, 山口 優, 山本健二, 筑波隆幸: カテプシン E 欠損における破骨細胞分化への影響, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12 月 2010
13. 坂井詠子, 西下一久, 福間 裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: HO-1 の発現誘導は RANKL を介した HMGB1 の細胞外遊離と破骨細胞分化を阻害する, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 12 月, 2010
14. Eiko Sakai, Megumi Shimada, Kazuhisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto and Takayuki Tsukuba: Receptor activator of NF- κ B ligand dependent heme oxygenase-1 suppression is required for high mobility group box 1 release, caspase-3 activation, and subsequent osteoclastogenesis. 第 84 回日本薬理学会, 横浜, 3 月, 2011
15. Reiko Fumimoto, Hiroshi Sakamoto, Yu Yamaguchi, Eiko Sakai, Kuniaki Okamoto and Takayuki Tsukuba: Nrf2 activators inhibit osteoclastogenesis induced by receptor activator of NF- κ B ligand. 第 84 回日本薬理学会, 横浜, 3 月, 2011
16. 文元玲子, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Kahweol の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of Kahweol on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 9-10 月, 2011
17. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: *tert*-Butylhydroquinone の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of *tert*-Butylhydroquinone on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 9-10 月, 2011
18. 坂元裕, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Deltamethrin の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of deltamethrin on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 9-10 月, 2011
19. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: RANKL 依存的な HO-1 発現抑制は HMGB1 の遊離に必要である (Suppression of RANKL-dependent HO-1 is required for HMGB1 release.), 第 53 回歯科基礎医学

- 会学術大会, 岐阜, 9-10月, 2011
20. 西下一久, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: アスパラギン酸プロテアーゼナプシン A およびナプシン B の生化学的解析 (Biochemical analyses of napsin A and napsin B), 第 53 回歯科基礎医学学会学術大会, 岐阜, 9-10月, 2011
21. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 福岡裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞分化における RANKL 依存的な HO-1 発現抑制の役割, 第 64 回日本薬理学会西南部会, 福岡, 11月, 2011
22. 菅原めぐみ, 坂井詠子, 西下一久, 福岡裕, 岡元邦彰, 吉田教明, 筑波隆幸: フィセチンによる破骨細胞分化抑制作用, 第 64 回日本薬理学会西南部会, 福岡, 11月, 2011
23. Kenji Yamamoto, Tomoyo Kawakubo, Atsushi Yasukouchi, and Takayuki Tsukuba: Cathepsin E-induced growth arrest and apoptosis of cancer cells and the related signaling. 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月 (シンポジウム)
24. Kuniaki Okamoto, Yoshiko Okamoto, Eiko Sakai, Kazuhisa Nishishita, Kenji Yamamoto, and Takayuki Tsukuba: Identification of two transcripts and in vivo promoter analysis for cathepsin E. 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月
25. Takayuki Tsukuba, Tomoko Kadowaki, Kuniaki Okamoto, Kenji Yamamoto: Accumulation of NADPH oxidase (NOX2) and increased oxidative stress in cathepsin E-deficient macrophages. 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月
26. Eiko Sakai, Megumi Sugawara, Kazuhisa Nishishita, Yutaka Fukuma,

- Kuniaki Okamoto and Takayuki Tsukuba: Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for Receptor activator of NF- κ B ligand dependent suppression is required for high mobility group box 1 and osteoclastogenesis. 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月
27. Megumi Sugawara, Eiko Sakai, Kazuhisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto, Noriaki Yoshida and Takayuki Tsukuba: Fisetin prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012 年 3 月

[その他]
ホームページ等
http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_op.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者
筑波隆幸 (TSUKUBA TAKAYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30264055
- (2) 研究分担者
岡元邦彰 (OKAMOTO KUNIAKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 10311846
- 西下 一久 (NISHISHITA KAZUHISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20237697
- 坂井 詠子 (SAKAI EIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 10176612