

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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390553

研究課題名（和文） 器官形成シグナルのコントロールを基盤にした歯周病に対する新規治療戦略

研究課題名（英文） New strategy based on the organogenesis signal control for periodontal disease

研究代表者

和泉 雄一（IZUMI YUICHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60159803

研究成果の概要（和文）：歯周炎局所での Wnt5a mRNA 発現を調べたところ、健常歯周組織と比較して、慢性歯周炎組織において Wnt5a mRNA の発現が有意に上昇していた。ヒト単球系細胞 THP-1 において、*P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a mRNA 発現が有意に上昇した。ヒト単球系細胞 THP-1 において *P. gingivalis* LPS 誘導の IκBα 分解、および Wnt5a 発現は NF-κB 特異的阻害剤により抑制され、*P. gingivalis* LPS 誘導の NF-κB の DNA への転写活性は有意に上昇した。さらに、IFN-γ は *P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a 産生を相乗的に増強させた。また、STAT1 siRNA を用いることにより、STAT1 は *P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a 発現に重要な役割を果たすことが示された。

研究成果の概要（英文）：Wnt5a mRNA expression was up-regulated in chronic periodontitis tissue as compared to healthy control tissue. *P. gingivalis* LPS induced Wnt5a mRNA in the human monocytic cell line THP-1 with a peak at 4 hrs after stimulation. *P. gingivalis* LPS induced higher up-regulation of Wnt5a mRNA than *E. coli* LPS. The LPS receptors TLR2 and TLR4 were equally expressed on the surface of THP-1 cells. *P. gingivalis* LPS induced IκBα degradation and was able to increase the NF-κB binding activity to DNA. *P. gingivalis* LPS-induced Wnt5a expression was inhibited by NF-κB inhibitors, suggesting NF-κB involvement. Furthermore, IFN-γ synergistically enhanced the *P. gingivalis* LPS-induced production of Wnt5a. Pharmacological investigation and siRNA experiments showed that STAT1 was important for *P. gingivalis* LPS-induced Wnt5a expression. These results suggest that the modulation of Wnt5a expression by *P. gingivalis* may play an important role in the periodontal inflammatory process and serve a target for the development of new therapies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			

総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000
----	------------	-----------	------------

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：歯周免疫機能学

1. 研究開始当初の背景

Wnt は胚の発生、血球の分化、発癌に関与している。哺乳類において Wnt シグナルは、幹細胞の恒常性、リンパ球分化に不可欠である。Wnt5a はマウスにおいて初めて同定され、活性化抗原提示細胞および関節リウマチの炎症性滑膜細胞より分泌されることが知られている。Wnt5a シグナルは敗血症におけるマクロファージの全身的な炎症性反応に不可欠であるとされ、ヒト抗原提示細胞のトル様受容体 (TLR) シグナル、および炎症性調節因子 NF- κ B 依存である。さらに、慢性炎症および関節リウマチにおいて、IL-6 ファミリーが gp130-STAT3 シグナルカスケードを活性化し Wnt5a 転写を上昇させることが報告された。しかし、歯周炎における Wnt ホモログの発現機構はほとんど知られていない。

歯周炎は歯牙表面および歯肉縁下の歯周病原細菌による慢性の炎症性疾患である。重度のケースでは、歯肉の炎症・歯周組織の崩壊・歯槽骨吸収を伴う。歯周病原細菌はリポ多糖 (LPS) やペプチドグリカンなど多くの毒性因子を産生し、炎症性サイトカイン産生を含む宿主免疫反応を誘発する。進行性歯周炎患者の歯周組織および歯肉溝滲出液より、高レベルの IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、TNF- α などの炎症性サイトカインが観察された。これらの炎症性サイトカインは前破骨細胞表面の RANK に結合する RANKL の産生を上昇させることが知られている。この結合により、破骨前駆細胞の分化を促進し、成熟破骨細胞が活性化され、歯槽骨吸収に至る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性歯周炎組織における Wnt5a 発現を評価し、歯周病原細菌による Wnt5a 遺伝子発現機構を解析することである。

3. 研究の方法

歯肉組織サンプリング：本研究は東京医科歯科大学倫理審査委員会・コンケン大学倫理審査委員会によって承認された。歯周外科手術時・便宜抜歯時に歯周炎組織 13 サンプルおよび健康歯周組織 14 サンプルを採取した。

細胞培養：ヒト単球系細胞 THP-1、ヒト歯肉線維芽細胞 HGF-1 を用い、それぞれ 10% FBS、1% 抗生物質含有の RPMI 1640 および DMEM にて 37°C・5%CO₂ 下で培養した。

細菌、試薬： *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 超音波破砕物、*Porphyromonas gingivalis* 381 超音波破砕物、*P. gingivalis* LPS、*E. coli* 055:B5 LPS、rhTNF- α 、rhIL-6、rhIFN- β 、rhIFN- γ により刺激を行った。シグナル伝達阻害剤として、AG490 (JAK/STAT 阻害剤)、Fludarabine (STAT1 阻害剤)、STA21 (STAT3 阻害剤)、Wedelolactone・IKK inhibitor VII (IKK α 、IKK β 阻害剤) を用いた。

RT-PCR: RNeasy Mini kit を用いて RNA 抽出、RT-PCR 法にて Wnt5a、 β -actin、GAPDH を検出した。QuantiTect PrimerAssay・SYBR Green PCR Master Mix を用いたリアルタイム RT-PCR 法にて Wnt5a mRNA および GAPDH mRNA を定量した。

フローサイトメトリー：細胞表面上の TLR2 および TLR4 の発現レベルを FITC 抗ヒト TLR2 抗体および PE 抗ヒト TLR4 抗体により染色し、FACS Calibur を用いて評価した。

ウエスタンブロッティング：THP-1 細胞を RIPA バッファーにて溶解し、タンパク量 $10\mu\text{g}$ を SDS-PAGE に泳動、ニトロセルロースメンブレン上に転写した。抗体として、抗 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 抗体、抗 $\beta\text{-actin}$ 抗体、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体、HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いた。

遺伝子導入、ルシフェラーゼレポーターアッセイ：ドミナントネガティブな $\text{I}\kappa\text{B}$ ベクター、野生型 STAT1 強制発現ベクター、STAT1 siRNA、NF- κB ルシフェラーゼレポータープラスミドを遺伝子導入した。ルミネッセンサーにより、ルシフェラーゼ活性を測定した。ゲルシフトアッセイ (EMSA)：NF- κB オリゴヌクレオチドを [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP にてラベルし、核内タンパク-DNA 複合体を同定した。p65 特異的抗体を用いてスーパーシフトを行った。

4. 研究成果

慢性歯周炎組織において Wnt5a は有意に上昇：Wnt5a mRNA 発現はすべての歯肉組織サンプルより検出されたが、健常歯周組織と比較して、歯周炎組織では Wnt5a mRNA 発現は有意に上昇していた。

ヒト単球系細胞 THP-1 において *P. gingivalis* LPS 刺激により Wnt5a mRNA が発現：ヒト歯肉線維芽細胞 HGF-1 およびヒト単球系細胞 THP-1 を用いて *A. actinomycetemcomitans* 超音波破砕物、*P. gingivalis* 超音波破砕物、*P. gingivalis* LPS、TNF- α により 4 時間刺激を行った。HGF-1 では Wnt5a mRNA 発現は恒常的であったにも関わらず、THP-1 では *P. gingivalis* LPS

刺激により強く Wnt5a mRNA が誘導された。*P. gingivalis* LPS 刺激は、*E. coli* LPS と比較してより高い Wnt5a mRNA 発現を誘導した。フローサイトメトリーを用いた結果より、*P. gingivalis* LPS および *E. coli* LPS 刺激後の THP-1 表面の TLR2 および TLR4 の発現は刺激前後で変化は見られなかった。

P. gingivalis LPS 誘導 Wnt5a 発現：THP-1 において、*P. gingivalis* LPS 刺激による $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解をウエスタンブロット法により測定したところ、細胞内 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ レベルは著しく減少した。NF- κB 結合部位を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドの遺伝子導入を行ったところ、*P. gingivalis* LPS 刺激後、NF- κB 活性は有意に上昇していた。さらに、NF- κB の DNA への結合能をゲルシフトアッセイ (EMSA) により測定したところ、*P. gingivalis* LPS 刺激によるタンパク-DNA 複合体および抗 p65 抗体によるスーパーシフトが確認された。

IKK α および IKK β 特異的阻害剤である Wedelolactone・IKK inhibitor VII により、*P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a mRNA 発現は抑制された。さらに、ドミナントネガティブな $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 発現プラスミドの遺伝子導入により、*P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a mRNA 発現は抑制された。以上より、*P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a mRNA 発現は NF- κB 依存であることが示された。

Wnt5a 発現は部分的に JAK/STAT シグナル経路を介する：AG490、Fludarabine、STA21 を用いたところ、AG490 および Fludarabine により、*P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a mRNA 発現は抑制された。さらに、STAT1 siRNA を用いたところ、*P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a 発現は抑制された。しかし、STA21 に

より *P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a mRNA 発現は増強された。

Wnt5a mRNA 発現は *P. gingivalis* LPS/IFN- γ 共刺激により上昇した：*P. gingivalis* LPS と IFN- γ との共刺激により Wnt5a mRNA 発現はさらに上昇した。IFN- γ は STAT1 のリン酸化とホモダイマーの形成を誘導することが知られており、野生型 STAT1 の強制発現ベクター遺伝子導入後、*P. gingivalis* LPS/IFN- γ により共刺激を行ったところ、Wnt5a mRNA 発現は顕著に上昇した。さらに、STAT1 siRNA を用いたところ、*P. gingivalis* LPS/IFN- γ 共刺激による Wnt5a mRNA 発現は抑制された。以上のことより、*P. gingivalis* LPS/IFN- γ 共刺激による Wnt5a mRNA 発現は STAT1 を介することが示唆される。

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 8 件)

1) Hiromi Nanbara, Nawarat Wara-aswapati, Toshiyuki Nagasawa, Yasuhiro Yoshida, Reiko Yashiro, Yukiko Bando, Hiroaki Kobayashi, Janjura Khongcharoensuk, Doosadee Hormdee, Waranuch Pitiphat, Jason A. Boch, Yuichi Izumi. Modulation of Wnt5a expression by periodontopathic bacteria. Plos ONE, 7(4) e34434, 2012

2) Izumi Yuichi, Aoki Akira, Yamada Yuichi, Kobayashi Hiroaki, Iwata Takanori, Akizuki Tatsuya, Suda Tomonari, Nakamura Sayaka,

Wara-Aswapati Nawarat, Ueda Minoru, Ishikawa I.

Current and future periodontal tissue engineering.

Periodontol 2000. 2011 Jun;56(1):166-87.

3) Tsumanuma Y, Iwata T, Washio K, Yoshida T, Yamada A, Takagi R, Ohno T, Lin K, Yamato M, Ishikawa I, Okano T, Izumi Y. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. Biomaterials, 32(25): 5819-25, 2011.

4) Kobayashi C, Yaegaki K, Calenic B, Ishkitiev N, Imai T, Ii H, Aoyama I, Kobayashi H, Izumi Y, Haapasalo M. Hydrogen Sulfide Causes Apoptosis in Human Pulp Stem Cells. J Endod, 37: 479-484, 2011

5) Aoyama N, Suzuki J, Wang D, Ogawa M, Kobayashi N, Hanatani T, Takeuchi Y, Izumi Y, Isobe M. *Porphyromonas gingivalis* promotes murine abdominal aortic aneurysms via matrix metalloproteinase-2 induction. J Periodontal Res, 46(2): 176-183, 2011.

6) Tanaka K, Iwasaki K, Fegali K, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y. Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. Arch Oral Biol, 56: 380-388, 2011.

7) Nagasawa T, Noda M, Katagri S, Takaichi M, Takahashi Y, Wara-Aswapati N, Kobayashi H, Ohara S, Kawaguchi Y, Tagami T, Furuichi

Y, Izumi Y. Relationship between Periodontitis and Diabetes – Importance of a Clinical Study to Prove the Vicious Cycle. Internal Med, 49(10): 881-885, 2010.

8) Suzuki J, Aoyama N, Ogawa M, Hirata Y, Izumi Y, Nagai R, Isobe M. Periodontitis and cardiovascular diseases. Expert Opin Ther Targets, 14(10): 1-5, 2010.

[学会発表] (計5件)

1) Nanbara H, Kobayashi H, Izumi Y et al, . Wnt5a expression by *Porphyromonas gingivalis* LPS via NF- κ B and STAT1. The 10th World Congress on Inflammation. 2011.6.25-29. Paris, France

2) 南原弘美、小林宏明、和泉雄一ら、ヒト単球系細胞 THP-1 における歯周病原細菌刺激による Wnt5a 遺伝子発現について第 54 回日本歯周病学会春季学術大会 2011.5.27-28 博多

3) Nanbara H, Kobayashi H, Izumi Y et al, Induction of Wnt5a in THP-1 cells by periodontopathic bacteria . 88th International and American Association for Dental Research 2010, 7, Barcelona, Spain

4) Nanbara H, Kobayashi H, Izumi Y et al, *P. gingivalis* LPS induce Wnt5a via NF- κ B and STAT1 signaling pathway . 14th International Congress of Immunology 2010.8 神戸

5) Nanbara H, Kobayashi H, Izumi Y et al, Functions of PI3K and MAPK on Wnt5a expression in THP-1. 58th Japanese Association for Dental Research 2010.11

Kokura, Japan

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和泉雄一 (IZUMI YUICHI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 60159803

(2) 研究分担者

長澤敏行 (NAGASAWA TOSHIYUKI)

北海道医療大学・准教授

研究者番号：90262203

小林宏明 (KOBAYASHI HIROAKI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50396967

岩崎剣吾 (IWASAKI KENGO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・寄附

講座教員 研究者番号：40401351

秋月達也 (IWASAKI KENGO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40401351

(3) 連携研究者

()

研究者番号：