

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22日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592372

研究課題名（和文）歯周病原菌が産生するタンパク質分解酵素ジンジパインによる骨吸収メカニズムの解明

研究課題名（英文）A study on the mechanism of bone resorption by gingipains, the major proteases produced by *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

宮本 洋一 (Miyamoto Yoichi)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：20295132

研究成果の概要（和文）：*Porphyromonas gingivalis* は、破骨細胞による歯槽骨破壊を特徴とする歯周病の主要な病原細菌である。本菌が産生するシステインプロテアーゼであるジンジパインは、その切断部位から、Lys 特異的ジンジパイン（Kgp）と Arg 特異的ジンジパイン（Rgps）に分類される。本研究では、破骨細胞分化に対するジンジパインの効果を解析した。マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養での活性型ビタミン D による破骨細胞分化を Kgp は促進した。すなわち、Kgp 存在下では、生理的濃度（0.1 nM）の活性型ビタミン D によって、薬理的濃度（10 nM）の活性型ビタミン D に匹敵する破骨細胞分化が誘導された。一方、RgpB にはその作用は認められなかった。Kgp は、LPS をはじめとする種々の TLR リガンドによる破骨細胞分化も強く促進した。Kgp 存在下に形成された破骨細胞は骨吸収活性を有していた。血清存在下に、Kgp は OPG を分解したが、RgpB は OPG 分解活性を示さなかった。Kgp による破骨細胞分化促進効果は、OPG の分解と相関しており、Kgp のプロテアーゼ活性を阻害することで消失した。Kgp による破骨細胞分化促進作用は、過剰の OPG 添加により減弱した。さらに、OPG 欠損マウス由来骨芽細胞を用いた共存培養系では、Kgp による破骨細胞分化促進は認められなかった。以上より、Kgp は、破骨細胞分化の抑制因子である OPG を分解することで、破骨細胞分化を促進することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Porphyromonas gingivalis* is one of the major pathogens of periodontitis, a condition characterized by excessive alveolar bone resorption by osteoclasts. The bacterium produces cysteine proteases called gingipains, which are classified according to their cleavage-site specificity into lysine-specific (Kgp) and arginine-specific gingipains (Rgps). In this study, we examined the effects of gingipains on osteoclast differentiation. In co-cultures of mouse bone marrow cells and osteoblasts, formation of multinucleated osteoclasts induced by $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ [$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] was augmented by Kgp but not by RgpB. A physiological concentration (0.1 nM) of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induced the osteoclast formation in the presence of 100 nM Kgp to the extent comparable to that induced by 10 nM $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Kgp also enhanced osteoclastogenesis induced by various microbial components including lipopolysaccharide. Combined use of Kgp and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or lipopolysaccharide also increased the number of resorption pits developed on dentin slices, indicating the osteoclasts formed in the presence of Kgp possess bone-resorbing activity. The enhanced osteoclastogenesis by Kgp was correlated with a depletion of osteoprotegerin in co-culture media and proteolytic activity-dependent, since benzoyloxycarbonyl-phenylalanyl-lysyl-acetyloxycetone, an inhibitor of Kgp, completely abolished osteoclastogenesis induced by Kgp. Kgp digested osteoprotegerin, since its recombinant protein was susceptible to degradation by Kgp in the presence of serum. As a result, Kgp did not augment osteoclastogenesis in co-cultures of osteoprotegerin-deficient osteoblasts and bone marrow cells. In addition, enhanced osteoclastogenesis by Kgp was abolished by excess amount of recombinant osteoprotegerin. These findings suggest that degradation of osteoprotegerin is one of the mechanisms underlying promotion of osteoclastogenesis by Kgp.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯周病・ジンジパイン・破骨細胞・分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は、*Porphyromonas gingivalis*等の感染によって起こる慢性炎症性疾患である。*P. gingivalis*が産生するプロテアーゼ群であるジンジパインは歯周病の主要な病原因子と認められているが、歯槽骨破壊におけるジンジパインの役割は不明だった。

(2) 我々は、骨芽細胞・骨髄細胞共存培養系における活性型ビタミンDによる破骨細胞分化をLys 特異的ジンジパイン (Kgp) が強く促進することを発見した。

2. 研究の目的

(1) 感染による骨吸収を想定し、各種微生物成分 (TLR リガンド) による破骨細胞分化に対する Kgp および Arg 特異的ジンジパイン (Rgps) の影響を上記共存培養系で解析した。

(2) 骨髄細胞単独培養系における RANKL 依存的な破骨細胞分化に対する Kgp および Rgps の影響を解析した。

(3) 破骨細胞分化を促進する RANKL および RANK、抑制因子である OPG の Kgp および Rgps による分解を比較した。

(4) Kgp による OPG の分解が明らかとなったので、OPG 欠損マウス骨芽細胞を用いて、OPG 分解の重要性を確認した。

3. 研究の方法

(1) マウス骨芽細胞・骨髄細胞共存培養系における破骨細胞分化を酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 活性染色で定量的に評価した。必要に応じて、OPG 欠損マウスの骨芽細胞を用いた。直前に活性化した Kgp あるいは Rgps を骨吸収因子と同時に添加した。

(2) マウス骨髄細胞培養系に RANKL および

M-CSF を添加し、(1)と同様に破骨細胞分化を評価した。

(3) 破骨細胞の骨吸収活性を、象牙切片を用いて評価した。

(4) 試験管内における可溶性 RANKL、RANK-Fc、OPG の Kgp および Rgps による分解を、それぞれの特異抗体を用いた western blotting により評価した。

(5) 骨芽細胞・骨髄細胞共存培養系における RANKL、RANK の分解を western blotting で、OPG の分解を ELISA で評価した。

4. 研究成果

(1) Kgp は、マウス骨芽細胞・骨髄細胞共存培養系における破骨細胞分化を促進したが、RgpB にその作用はなかった。すなわち、Kgp (100 nM) は、単独では破骨細胞分化を誘導できない 0.1 nM の活性型ビタミン D および 1 ng/ml の大腸菌 LPS 存在下に、破骨細胞分化を誘導した (図 1)。同様に、Kgp は *P. gingivalis* LPS、CpG DNA、ペプチドグリカン

、Poly(I:C)RNA による破骨細胞分化を促進した。Kgp 存在下に形成された破骨細胞は、象牙質吸収能を有していた。

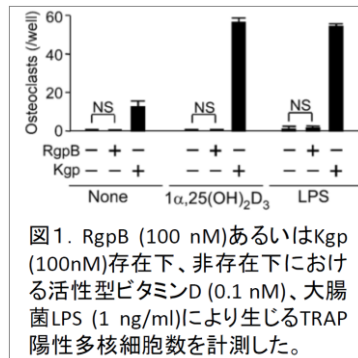


図1. RgpB (100 nM)あるいはKgp (100nM)存在下、非存在下における活性型ビタミンD (0.1 nM)、大腸菌LPS (1 ng/ml)により生じるTRAP陽性多核細胞数を計測した。

(2) マウス骨芽細胞・骨髄細胞共存培養系における活性型ビタミン D、大腸菌 LPS による破骨細胞分化の Kgp による促進作用は、Kgp のプロテアーゼ活性阻害剤 Z-FK-ck により完

全に消失した(図2)。一方、Z-FK-ckは、骨芽細胞の増殖あるいは骨髄細胞単独培養におけるRANKL依存性の破骨細胞分化に影響を与えなかった。

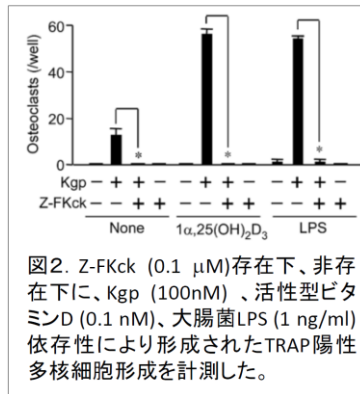


図2. Z-FKck (0.1 μM)存在下、非存在下に、Kgp (100nM)、活性型ビタミンD (0.1 nM)、大腸菌LPS (1 ng/ml)依存性により形成されたTRAP陽性多核細胞形成を計測した。

(3) Kgpは、血清存在下にOPGを分解したが、RgpBはOPGを分解できなかった(図3)。骨芽細胞・骨髄細胞共存培養系においても、KgpはOPGを分解した。共存培養系での細胞膜結合型のRANKLおよびRANKのKgpによる分解はわずかだった。一方、可溶性RANKL、RANK-FcはOPG同様、Kgpにより分解された。

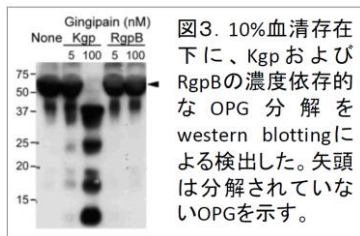


図3. 10%血清存在下に、KgpおよびRgpBの濃度依存的なOPG分解をwestern blottingによる検出した。矢頭は分解されていないOPGを示す。

(4) 骨髄細胞単独培養系における可溶性RANKL依存性の破骨細胞分化は、Kgpにより促進されず、むしろ抑制された。これは、Kgpにより、可溶性RANKLが分解されたためと考えられる。

(5) 共存培養系におけるKgpによる破骨細胞分化促進作用は、OPGの添加により用量依存的に抑制された。さらに、OPG遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞を用いた共存培養系における破骨細胞分化に対して、Kgpは促進作用を示さなかった(図4)。

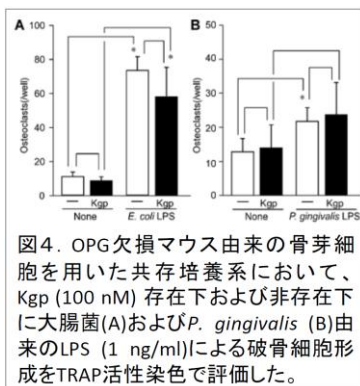


図4. OPG欠損マウス由来の骨芽細胞を用いた共存培養系において、Kgp (100 nM)存在下および非存在下に大腸菌(A)およびP. gingivalis (B)由来のLPS (1 ng/ml)による破骨細胞形成をTRAP活性染色で評価した。

(6) 以上より、Kgpは、OPGを効率よく分解することで、生理的骨吸収因子である活性型ビタミンDおよび種々のTLRリガンド依存性の破骨細胞分化を促進したと考えられる。

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 12 件)

- 1 Tsukasaki M, Yamada A, Suzuki D, Aizawa R, Miyazono A, Miyamoto Y, Suzawa T, Takami M, Yoshimura K, Morimura N, Yamamoto M, Kamijo R: Expression of POEM, a positive regulator of osteoblast differentiation, is suppressed by TNF-α. **Biochem Biophys Res Commun** 410: 766-770, 2011
- 2 Ono M, Suzawa T, Takami M, Miyauchi T, Ogasawara A, Yamada A, Hosono T, Arata S, Miyamoto Y, Baba K, Nakamura M, Osumi N, Maki K, Kamijo R: Identification and Isolation of Neural Crest Derived Cells in Nasal Concha. **Jpn J Tissue Cult Dent Res** 20: 29-35, 2011
- 3 Yasuhara R, Miyamoto Y: Roles of gingipains in periodontal bone loss. **J Oral Biosci** 53: 197-205, 2011
- 4 Yoshimura K, Miyamoto Y, Yasuhara R, Maruyama T, Akiyama T, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Tsunawaki S, Tachikawa T, Baba K, Kamijo R: Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1β via activation of nuclear factor-κB and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase. **J Biol Chem** 286: 14744-14752, 2011
- 5 Tachi K, Takami M, Sato H, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, Tsukasaki H, Inoue T, Shintani S, Koike T, Honda Y, Suzuki O, Baba K, Kamijo R: Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor-β1. **Tissue Engineering** 17: 597-606, 2010
- 6 Tachi K, Takami M, Zhao B, Mochizuki A, Yamada A, Miyamoto Y, Inoue T, Baba K, Kamijo R: Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF-κB ligand expression in osteoblasts. **Cell Tissue Res** 342: 213-220, 2010
- 7 Wang X, Suzawa T, Ohtsuka H, Zhao B, Miyamoto Y, Miyauchi T, Nishimura R, Inoue T, Nakamura M, Baba K, Kamijo R: Caebonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via

- intracellular pH-dependent JNK signaling pathway. *J Cell Physiol* 225: 709-719, 2010
- 8 Miyamoto Y, Kamijo R: Overview: Molecular regulation of mineralization and its failure - From disclosure of mechanisms to clinical implications. *J Oral Biosci* 52: 1-5, 2010
 - 9 Jimi E, Takami M, Hiraga T, Nakamura I, Urade M, Miyamoto Y: The light and dark side of bisphosphonates. *J Oral Biosci* 51: 177-187, 2009
 - 10 Okano A, Miyamoto Y, Asari J, Kamijo R, Inoue M: Change in salivary levels of chromogranin A in children by hearing dental air turbine noise. *Pediat Dent J* 19: 220-227, 2009
 - 11 Takami M, Mochizuki A, Yamada A, Tachi K, Zhao B, Miyamoto Y, Anada T, Honda Y, Inoue T, Nakamura M, Suzuki O, Kamijo R: Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts. *Tissue Engineering* 15: 3991-4000, 2009
 - 12 Yasuhara R, Miyamoto Y, Takami M, Imamura T, Yamada A, Suzawa T, Potempa J, Yoshimura K, Kamijo R: Lysine-specific gingipain promotes lipopolysaccharide- and active vitamin D₃-induced osteoclast differentiation by degrading osteoprotegerin. *Biochem J* 419: 159-166, 2009
- [学会発表] (計 25 件)
- 1 増田宜子, 他: 血管内皮細胞がラット歯髄細胞へ与える影響について. 日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会 (第 135 回), 2011 年 10 月 20~21 日, 大阪
 - 2 Akiyama T, *et al.*: Enhancement of inflammatory osteoclastogenesis by lysine-specific gingipain. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) Annual Scientific Meeting with the Japanese Society for Bone and Mineral Society (JSBMR), September 4-8, 2011, Gold Coast, Australia
 - 3 Miyamoto A, *et al.*: Double stranded RNA increases bone mass in osteoporosis model mice by inhibiting osteoclastogenesis via interferon- β /STAT1 pathway. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) Annual Scientific Meeting with the Japanese Society for Bone and Mineral Society (JSBMR), September 4-8, 2011, Gold Coast, Australia
 - 4 吉村健太郎, 他: Monocarboxylate transporter-1 は骨芽細胞分化を正に制御する. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28~30 日, 大阪
 - 5 秋山智人, 他: リシン特異的ジンジパインによる炎症性骨破壊促進機構の解析. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28~30 日, 大阪
 - 6 宮本阿礼, 他: 二本鎖 RNA アナログはインターフェロン β /STAT1 経路を介して破骨細胞分化を抑制し骨粗鬆症モデル動物の骨量を増加させる. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28~30 日, 大阪
 - 7 塚崎雅之, 他: TNF- α は細胞接着分子 POEM の発現を抑制し、骨芽細胞分化を制御している. 第 31 回昭和歯学会総会, 2011 年 7 月 2 日, 東京
 - 8 Yoshimura K, *et al.*: Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocyte-like ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β via late phase activation of NF- κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase. The Joint International Meeting Sponsored by The Japanese Society for Interferon and Cytokine Research, The Japanese Society for Macrophage Molecular and Cell Biology, Cytokine/Chemokine, Immunity, and Diseases, May 25-27, 2011, Osaka, Japan
 - 9 Akiyama T, *et al.*: Dual effects of lysine-specific gingipain on inflammatory osteoclastogenesis. The Joint International Meeting Sponsored by The Japanese Society for Interferon and Cytokine Research, The Japanese Society for Macrophage Molecular and Cell Biology, Cytokine/Chemokine, Immunity, and Diseases, May 25-27, 2011, Osaka, Japan
 - 10 宮本洋一: (講演) 活性窒素・酸素種による軟骨細胞変性. 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター・セミナー, 2011 年 5 月 27 日, 埼玉
 - 11 Maruyama T, *et al.*: Carbonic anhydrase IX suppresses hypertrophic

- differentiation of chondrocytes. The 32nd Annual Meeting of American Society of Bone and Mineral Research, October 15-19, 2010, Toronto, Canada
- 12 吉村健太郎, 他: Monocarboxylate transporter-1 は、IL-1 β 刺激後の軟骨細胞で後期 NF- κ B 活性化を起し、NOX-2 発現とそれに依存した細胞死を誘導する. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月 20 日~22 日, 東京
 - 13 吉村健太郎, 他: Monocarboxylate transporter-1 は、IL-1 β 刺激後の軟骨細胞で後期 NF- κ B 活性化を起し、NOX-2 発現とそれに依存した細胞死を誘導する. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, 2010 年 7 月 21 日~23 日, 東京
 - 14 Yoshimura K, *et al.*: Monocarboxylate transporter-1 is involved in activation of nuclear factor- κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β . The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide, June 14-18, 2010, Kyoto, Japan
 - 15 Miyamoto Y, *et al.*: Nitric oxide promotes odontoblastic differentiation. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide, June 14-18, 2010, Kyoto, Japan
 - 16 宮本洋一:(講演) 骨軟骨疾患のレドックス病態と抗酸化治療. 日本学術振興会産学協力研究委員会レドックス生命科学第 170 委員会第 21 回研究会, 2009 年 7 月 16 日, 熊本
 - 17 Maruyama T, *et al.*: Carbonic anhydrase IX suppresses hypertrophic differentiation of chondrocytes. 第 29 回昭和歯学会例会, 2009 年 7 月 16 日, 東京
 - 18 Maruyama T, *et al.*: Role of carbonic anhydrase IX in chondrocyte differentiation. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日~12 日, 横浜
 - 19 吉村健太郎, 他: Monocarboxylate transporter-1 は軟骨細胞における食細胞型 NADPH-oxidase の発現を制御する. 第 9 回日本 NO 学会学術集会, 2009 年 5 月 8~9 日, 静岡
 - 20 丸山敏史, 他: 軟骨細胞分化における炭酸脱水酵素 IX 型の役割. 第 27 回日本骨代謝学会学術集会, 2009 年 7 月 23 日~25 日, 大阪
 - 21 吉村健太郎, 他: Monocarboxylate transporter-1 は軟骨細胞における IL-1 β 誘導性の食細胞型 NADPH-oxidase の発現と細胞死を制御する. 第 27 回日本骨代謝学会学術集会, 2009 年 7 月 23 日~25 日, 大阪
 - 22 丸山敏史, 他: 炭酸脱水酵素 IX 型は軟骨細胞分化に関与する. 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 2009 年 6 月 26 日, 京都
 - 23 吉村健太郎, 他: Monocarboxylate transporter-1 は軟骨細胞において IL-1 β よって誘導される食細胞型 NADPH-oxidase の発現と細胞死を制御する. 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 2009 年 6 月 26 日, 京都
 - 24 Yoshimura K, *et al.*: Monocarboxylate transporter-1 is involved in the activation of NF- κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase in mouse chondrocytes exposed to interleukin-1 β . 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 11-15, 2011, Denver, Colorado, U.S.A.
 - 25 Maruyama T, *et al.*: Role of carbonic anhydrase IX in chondrocyte differentiation. Yokosuka Science Festa 2009, June 4-7, 2009, Yokosuka, 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

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 洋一 (Miyamoto Yoichi)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：20295132

(2) 研究分担者

高見 正道 (Takami Masamichi)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：80307058

(3) 連携研究者

今村 隆寿 (Imamura Takahisa)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：20176499