

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792112

研究課題名 (和文) 歯周病原細菌による免疫回避戦略の解明

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 (和文) : *P. gingivalis* のマクロファージへの作用により miR-146a 発現は上昇した。サイトカイン産生に及ぼす影響として、miR-146a をノックダウンしても変化はみられなかったが、強制発現によりサイトカイン産生は低下した。本研究により、歯周病原細菌がわずかながらも miR-146a を介してサイトカイン産生を制御している可能性が示唆されたが、歯周炎病態形成における実際の関与については今後さらなる検討が必要である。

研究成果の概要 (英文) : *P. gingivalis* stimulation up-regulated the expression of miR-146a in macrophages. Over expression of miR-146a in macrophages attenuated the release of *P. gingivalis*-induced inflammatory cytokines. Further studies are required to elucidate the exact role of microRNA in periodontal pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：Porphyromonas gingivalis, LPS, microRNA, miR-146a

1. 研究開始当初の背景

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は、宿主の免疫応答を制御しその排除機構から逃れ、歯周炎という慢性病態の成立に関与すると考えられる。我々は以前、*P. gingivalis* がマクロファージに対して TLR シグナル伝達系における負の制御因子 IRAK-M を増強し、免疫応答が抑制されることを報告した (Domon H, Honda T *et al.*, J Leukoc Biol., 2008)。*P. gingivalis* が最初に直面する歯肉上皮においても同様の免

疫制御機構が関与していることを報告した。(Takahashi N, Honda T *et al.*, J Periodont Res., 2010)。未だ不明の IRAK-M 制御因子、あるいは新たな TLR シグナル制御因子について DNA マイクロアレイ、さらには microRNA アレイを駆使して網羅的解析を行うことで *P. gingivalis* のもつ免疫回避戦略を明確にして歯周炎の病態解明を図る。

2. 研究の目的

本研究においては特に、新たな遺伝子発現

制御因子として知られる microRNA (標的遺伝子に対して翻訳抑制・mRNA 分解を介して負に制御) に着目し, *P. gingivalis* の関与をマクロファージにおいて検討する.

3. 研究の方法

(1) 網羅的 microRNA 発現解析

ヒト単球系細胞株 THP-1 を 1×10^6 cells/well (24 穴プレート) にて播種後, *P. gingivalis* LPS, *E. coli* LPS (TLR4 リガンド) および Pam₃CSK4 (TLR2 リガンド) を各々 $1 \mu\text{g/mL}$ の濃度で刺激し, 8 時間後に通法に従い total RNA を抽出した. 同細胞の未刺激サンプルをコントロールとして, Human miRNA マイクロアレイ (アジレント・テクノロジー社, Release 12.0, 851 種のヒト microRNA を検出可能) を用いて刺激による microRNA の発現変化を網羅的に検索した (各 N=4). 発現変動のみられた microRNA に関してはこれに特異的なプライマーを用いた Real-time PCR 法にてさらに検証した (刺激濃度: $0.001\text{--}10 \mu\text{g/mL}$, 刺激時間: 4–12h).

(2) microRNA 機能解析

THP-1 を 5×10^5 cells/well (24 穴プレート) にて播種し, 10ng/mL 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 (以下, マクロファージとする). その後, microRNA に特異的な inhibitor (50nM , 4h) または precursor (50nM , 24h) をマクロファージにトランスフェクトし, 注目する microRNA に関してノックダウンまたは強制発現を図った. その上で, *P. gingivalis* LPS, *E. coli* LPS および Pam₃CSK4 を各々 $1 \mu\text{g/mL}$ の濃度で刺激し, 8 時間後に培養上清を回収するとともに細胞より total RNA またはタンパクを抽出した. そして, microRNA のターゲット分子の発現変化を検討するため, 遺伝子発現を Real-time PCR 法にて, タンパク発現を Western Blot 法にて確認した. さらに, 刺激後のサイトカイン産生 (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12) について microRNA の影響を検討するため, サイトカイン遺伝子発現を Real-time PCR 法にて, 産生レベルを ELISA 法にて確認した.

4. 研究成果

(1) 網羅的 microRNA 発現解析

マイクロアレイ解析の結果, THP-1 において *P. gingivalis* LPS 刺激により未刺激に比較して 2 倍以上の発現変動を認めた microRNA は 10 種類検出され (上昇: 8 種類, 減少: 2 種類), その中で miR-146a のみ有意な上昇が認められた ($P=0.00137$, unpaired *t*-test) [図 1].

miR-146a 発現について, *P. gingivalis* LPS, に加えて, すでに報告 (Taganov KD *et al.*, PNAS, 2006) のある *E. coli* LPS, Pam₃CSK4 刺

激においても上昇することを Real-time PCR 法にて確認した. *P. gingivalis* LPS 刺激では, 同濃度の *E. coli* LPS 刺激に比較して miR-146a 発現はより高い傾向が認められたが, 両刺激間に有意差は認められなかった [図 2].

P. gingivalis LPS 刺激の刺激濃度 ($0.001\text{--}10 \mu\text{g/mL}$) および刺激時間 (4–12h) 依存的に miR-146a 発現が上昇することをさらに確認した.

図 1.

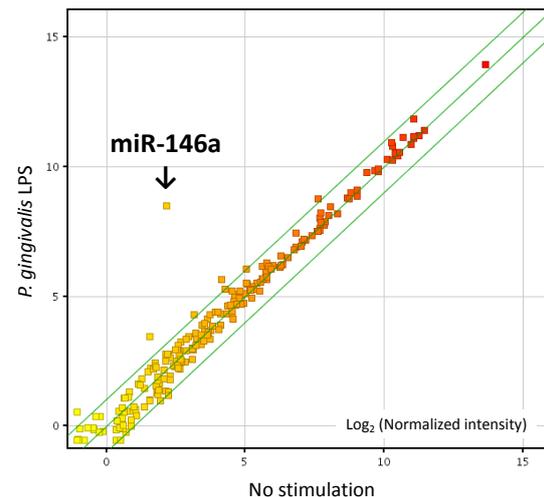
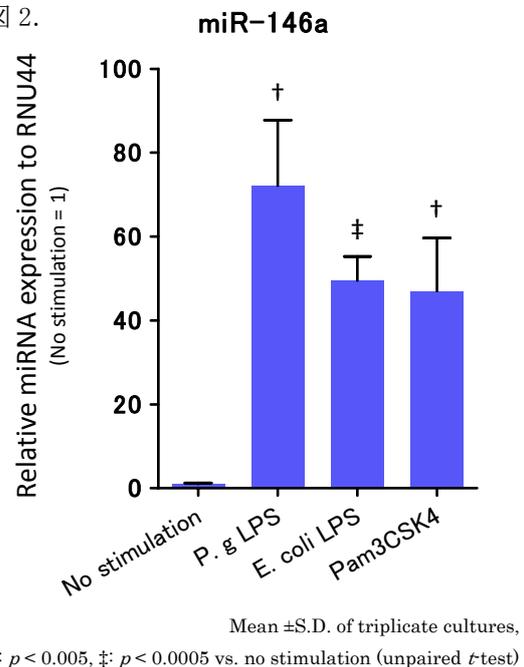


図 2.

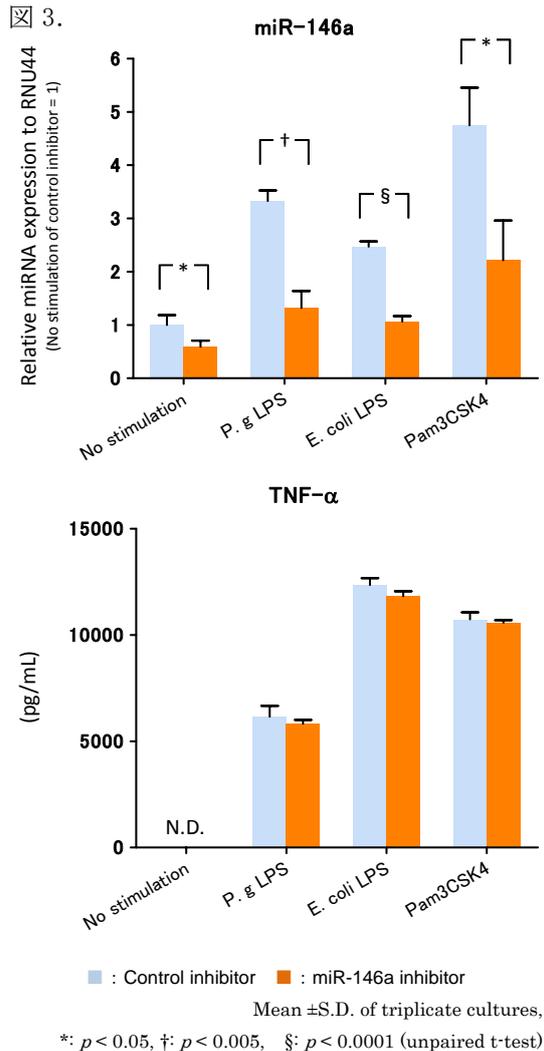


(2) miR-146a 機能解析

miR-146a に関しては, TLR シグナル伝達系のシグナル分子である IRAK-1 および TRAF6 が候補ターゲットとして報告されている (Taganov KD *et al.*, PNAS, 2006). *P. gingivalis* LPS はじめ各刺激により変化する

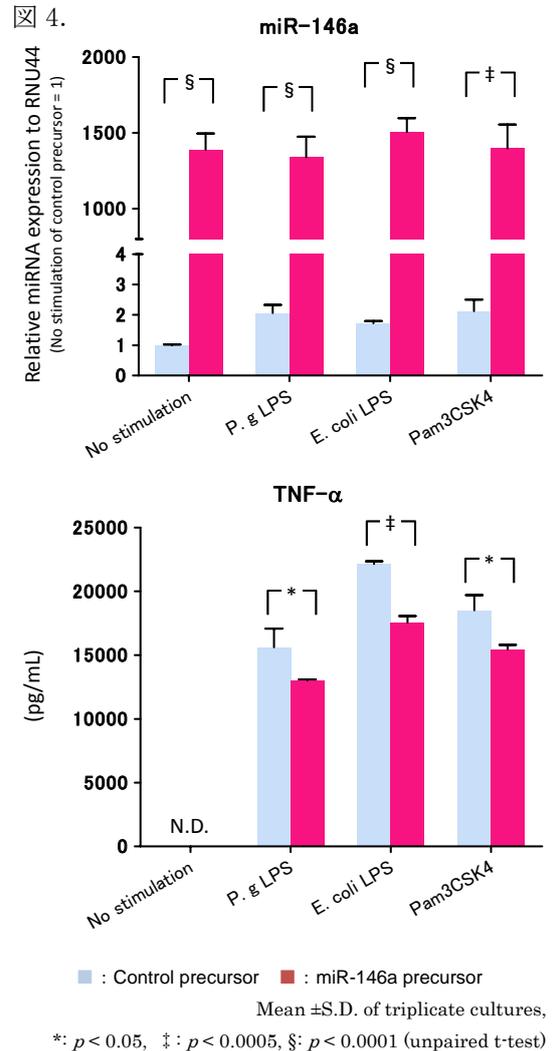
IRAK-1, TRAF6, そして炎症性サイトカイン産生について, miR-146a の影響を検討した. 具体的には, 刺激に先立ち細胞内の miR-146a 発現のノックダウンあるいは強制発現を図り, 刺激後の IRAK-1, TRAF6, 炎症性サイトカインの変化を確認した.

その結果, miR-146a に対する inhibitor の作用により 約 60% のノックダウン効率が得られたが, IRAK-1, TRAF6 発現, サイトカイン産生に関して mRNA レベル, タンパクレベルいずれにおいてもノックダウンによる変化は認められなかった [図 3].



一方, miR-146a に対する precursor の作用により細胞内の恒常発現レベルの約 1500 倍の強制発現効果が得られたが, やはり IRAK-1, TRAF6 発現に関しては mRNA レベル, タンパクレベルいずれにおいても強制発現による変化は認められなかった. しかしながら, 炎症性サイトカインに関しては強制発現により変化が認められた [図 4]. 具体的には, TNF- α , IL-6 産生 (タンパクレベル) が有意に低下し, IL-1 β , IL-12 についても低下したが,

変化量としてはわずかであった. この 4 つのサイトカインに関して mRNA レベルで有意な低下が認められたのは IL-6 のみであった.



(3) 結果のまとめ・考察

本研究において, *P. gingivalis* LPS 刺激により大きな発現変動を示す microRNA は miR-146a のみであることをマイクロアレイ解析により明らかにすることができた. この miR-146a は, 強制発現により刺激後のサイトカイン産生を抑制することを証明できたが, あくまでも非生理的レベルにまで強制発現させて得られる機能であることから, これまでに知られるシグナル制御分子 (タンパク質) と同等に位置付けができるものではないかもしれない. miR-146a のサイトカイン産生に及ぼす影響はわずかであると考えられる. miR-146a の直接のターゲットとして報告のある IRAK-1, TRAF6 については本研究においてはターゲットして証明することができなかった. この点に関してはさらに解析が必要であるが, これまでにほとんど知られていない歯周病原細菌に関連した microRNA の関与

について *in vitro* における成果として報告できる。今後は microRNA の歯周炎病態形成における関与を見据えた *in vivo* での詳細な検討もさらに必要である。

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 3 件)

- ① Takahashi N, Honda T, Domon H, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K. IL-1 receptor-associated kinase-M in gingival epithelial cells attenuates the inflammatory response elicited by *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res. 45(4): 512-519, 2010. (査読あり)
- ② Maekawa T, Takahashi N, Honda T, Yonezawa D, Miyashita H, Okui T, Tabeta K, Yamazaki K. *Porphyromonas gingivalis* antigens and interleukin-6 stimulate the production of monocyte chemoattractant protein-1 via the up-regulation of early growth response-1 transcription in human coronary artery endothelial cells. J Vasc Res. 47(4): 346-354, 2010. (査読あり)
- ③ Nakajima T, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Ito H, Takahashi N, Maekawa T, Tabeta K, Yamazaki K. Periodontitis associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. J Periodont Res. 45(1): 116-122, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Nakajima T, Honda T, Okui T, Kajita K, Domon H, Takahashi N, Maekawa T, Tabeta K, Yamazaki K. Periodontal treatment improves arterial stiffness. AAP 2010 Annual Meeting in Honolulu, 2010-11-1.
- ② 奥井桂子, 本田朋之, 奥井隆文, 高橋直紀, 土門久哲, 宮内小百合, 山崎和久. bFGF がヒト歯根膜細胞の microRNA 発現に及ぼす影響. 第 133 回日本歯科保存学会 2010 年度秋季学術大会, 岐阜市, 2010 年 10 月 29 日.
- ③ 本田朋之, 高橋直樹, 奥井桂子, 奥井隆文, 中島貴子, 多部田康一, 山崎和久. *Porphyromonas gingivalis* LPS が microRNA 発現に及ぼす影響. 第 53 回秋季日本歯周病学会学術大会, 高松市, 2010 年 9 月 19 日.
- ④ 高橋直紀, 前川知樹, 奥井隆文, 本田朋之, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久. ヒト歯

肉上皮細胞のケモカイン産生における interleukin (IL)-17 の関与—IL-17 受容体の発現とその機能解析—. 第 53 回春季日本歯周病学会学術大会, 盛岡市, 2010 年 5 月 14 日.

- ⑤ 前川知樹, 高橋直紀, 本田朋之, 宮下博孝, 米澤大輔, 奥井隆文, 多部田康一, 山崎和久. *Porphyromonas gingivalis* 抗原および IL-6 刺激は血管内皮細胞において転写因子 Egr-1 を介して MCP-1 の産生を増強する. 第 131 回日本歯科保存学会 2009 年度秋季学術大会, 仙台市, 2009 年 10 月 29 日.
- ⑥ 宮下博孝, 米澤大輔, 本田朋之, 奥井隆文, 梶田桂子, 前川知樹, 高橋直紀, 伊藤晴江, 中島貴子, 多部田康一, 山崎和久. 歯周炎患者における *Porphyromonas gingivalis* に対する抗体価と高感度 CRP の関連性. 第 52 回秋季日本歯周病学会学術大会, 宮崎, 2009 年 10 月 11 日.
- ⑦ Miyashita H, Honda T, Okui T, Kajita-Okui K, Maekawa T, Takahashi N, Ito H, Nakajima T, Tabeta K, Yamazaki K. Antibody levels to *Porphyromonas gingivalis* and CRP in periodontitis patients. 2nd Meeting of the IADR Pan Asian Pacific Federation. Wuhan, 2009-9-23.
- ⑧ Takahashi N, Honda T, Tabeta K, Yamazaki K. *Porphyromonas gingivalis* modulates chemokine expression in gingival epithelial cells. 87th General session of the IADR, Miami, 2009-4-2.

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

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

高橋 直紀 (TAKAHASHI NAOKI)
新潟大学大学院医歯学総合研究科
梶田 桂子 (Kajita Keiko)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
奥井 隆文 (Okui Takafumi)
新潟大学・医歯学系・特任助教