

## 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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2010 ～ 2012  
 課題番号：22390342  
 研究課題名（和文） 歯周病原細菌の細胞内寄生と病態との関連性における分子メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Study on the survival strategies for periodontal bacteria in host cells and their role in the pathogenesis of periodontal diseases  
 研究代表者  
 大原 直也 (OHARA NAOYA)  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号：70223930

研究成果の概要（和文）：歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の病原性を明らかにするために、本菌が宿主の細胞内で生存するために必要な遺伝子を探索し、宿主細胞内での生存に関わる複数の遺伝子を新たに明らかにした。また、本菌が宿主細胞表面上の分子を破壊することで、細胞内シグナル伝達経路のひとつ PI3K/Akt の活性化は抑制することが明らかになった。その結果、宿主細胞の生理機能を始めとする種々の機能を攪乱していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Porphyromonas gingivalis* is the major periodontal pathogens. 1) We identified *P. gingivalis* genes required for survival in the host cells using newly constructed transposon mutagenesis library of *P. gingivalis*. 2) We found the novel cellular events in host epithelial cells by challenging of *P. gingivalis*. Akt and its substrates were dephosphorylated by *P. gingivalis* infection. These results indicated that *P. gingivalis*-infection may affect cellular functions including apoptosis, glucose metabolism and cell development in host cells by inactivating the PI3K/Akt pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2010 年度 | 7,200,000  | 2,160,000 | 9,360,000  |
| 2011 年度 | 3,900,000  | 1,170,000 | 5,070,000  |
| 2012 年度 | 3,900,000  | 1,170,000 | 5,070,000  |
| 総計      | 15,000,000 | 4,500,000 | 19,500,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯周病原細菌、細胞内寄生、*Porphyromonas*、嫌気性菌、感染

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は口腔慢性疾患であり、その病原体は歯周局所の炎症病態を惹起する。しかし、同時に生活習慣病の範疇に入る異所性疾患をも引き起こす可能性のあることを示すデータが蓄積されてきた。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* に

対する抗体価と冠動脈疾患に相関関係が成立すること、高脂肪食を与えている ApoE 欠損マウスの口腔に *P. gingivalis* を投与すると大動脈にアテローム性動脈硬化病変が増加し、動脈内壁中に *P. gingivalis* DNA を検出とともに VCAM-1, TLR2, TLR4 の発現レベルが増加すること、歯周病と非肥満性 2 型糖尿病患者の関係など、歯周病と生活習慣病の

関連性を示唆する報告が増加している。

教科書的に *P. gingivalis* や *A. actinomycetemcomitans* は、宿主の組織において細胞外に存在する細菌に分類される。しかし、歯周病原細菌が歯周組織の上皮細胞に侵入することで組織の恒常性が失われ、組織破壊が生じ、細胞内ではアクチンの再構成が生じたり、細胞周期が停止するなど、歯周病原細菌が細胞内にも存在することで病態の形成に大きく関与していることが示されてきている。

本研究以前の研究で、歯周病原細菌が歯周局所から血管内壁に侵入し心血管疾患の病態を悪化させるメカニズムにおいては、「細菌を貪食しマクロファージ化した PBMC に取り込まれた状態、すなわち宿主マクロファージ内に生存したまま血管内を移動し、大動脈のアテローム性病変部に到達すると血管内壁に侵入する」という可能性が示唆された。他の種類の細胞への侵入に関しては *P. gingivalis* が骨芽細胞に効率よく取り込まれ、感染骨芽細胞は種々の炎症性の分子を産生すること、産生された分子は破骨細胞に影響しその分化を負に制御することを明らかにしたまた *P. gingivalis* が破骨細胞前駆細胞に侵入した際に破骨細胞への分化が抑制されることを明らかにしている。

以上のことから歯周病原細菌の宿主細胞への侵入、細胞内における生存は病態の形成と大きく関わっていることが示唆され、歯周病原細菌の細胞内生存機構の解明は、歯周病原細菌の病原性を明らかにするうえで大きな位置を占めると考えられた。さらに得られた結果は局所および全身性疾患の病態の形成機構を明らかにする有力な手段になると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) *P. gingivalis* の宿主細胞感染および細胞内生存に関わる遺伝子を新規の包括的な方法を用いて広くスクリーニングする。

(2) 個々の遺伝子の働きについて、遺伝子破壊株の作製および遺伝子破壊相補株の作製を行い、*P. gingivalis* の細胞感染および細胞内生存等への関わりを検証する。

(3) 特に、*P. gingivalis* の細胞内生存に関わることが明らかとなった遺伝子については、細胞感染後のどの過程に関わるのかについて検討する。

(4) *P. gingivalis* は主要病原因子であるプロテアーゼ“ジンジパイン(Gp)”が3種類存在する。そのうちの一つ Arg-Gp A(RgpA)は、*RgpA* 遺伝子上にプロテアーゼ活性ドメインとアドヘジンドメインが存在し、それらは自身の酵素で切断される。アドヘジンドメインの一つである HbR は *P. gingivalis* から優位に産生され、ヘモグロビンとの結合活性を有

しており、*P. gingivalis* の鉄吸収のために働くタンパク質として見出された。このことは本菌の細胞内生存と深く関係することを示唆する。ここでは、*P. gingivalis* の産生する HbR の宿主上皮細胞への作用について調べ、歯周病態との関連性を調べる。

(5) 歯槽骨の喪失は破骨細胞の形成促進や骨吸収能の活性化によることが明らかとなっているが、これらの作用は、歯周組織中の炎症性サイトカイン (IL-1b, IL-6, TNF-alpha) の影響によることが知られている。歯周炎の進行に伴い、破骨前駆細胞と細菌および細菌由来物質による作用も重要である。破骨細胞の前駆細胞である破骨前駆細胞はマクロファージ系由来の細胞である。そのため、マクロファージとしての働きを持つ破骨前駆細胞への *P. gingivalis* 感染における破骨細胞分化に対する影響とその機構を調べる。

(6) 歯周病原細菌が感染する歯肉組織の恒常性の破綻は、細菌の持続感染によって惹起される。しかし、感染局所における細菌と宿主細胞、特に上皮細胞との間の感染現象の全容は未だ明らかになっていない。そこで、歯周病態へと繋がる細菌による作用機構を、*P. gingivalis* と宿主上皮細胞を用いた生化学・分子生物学的実験により明らかにする。*P. gingivalis* による宿主上皮細胞応答 PI3K/Akt 伝達経路における影響を調べる。PI3K/Akt 経路は、細胞増殖・分化、細胞生存・細胞死、細胞内代謝経路(糖、タンパク質)といった細胞機能に関わる重要な経路である。*P. gingivalis* 感染による PI3K/Akt 経路への影響と歯肉組織の破壊との関連性を調べ、*P. gingivalis* による感染現象を生化学・分子生物学的に明らかにし、歯周病態の分子病態制御の基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* の宿主細胞感染および細胞内生存に関わる遺伝子をより包括的にスクリーニングするための手法として、結核菌等に応用されて成果を上げている TraSH 法を用いる。最初に *P. gingivalis* のトランスポゾン変異株ライブラリーを構築する。このライブラリーを歯肉上皮細胞に感染させる。前および感染後に感染細胞から菌を回収し、ゲノム DNA を調整する。一方、感染前のライブラリーからもゲノム DNA を調整する。両者のゲノム DNA からそれぞれおトランスポゾン挿入隣接部位を PCR 増幅し、マイクロアレイにハイブリダイズさせることにより、感染前と感染後の変異株ポピュレーションの違いを明らかにする。感染後に減少した遺伝子変異株は、細胞感染もしくは細胞内生存に必要な遺伝子をコードしていたことを示唆するものと考えられる。

(2) (1)で明らかにされた細胞感染および細胞内生存に必要な候補遺伝子について、個々に遺伝子変異株を作製し、それらの相補株を作製したのち、野生株、遺伝子変異株、相補株の3株を用いて感染実験を行い、候補遺伝子の変異株における細胞内生存率の低下と相補株における細胞内生存率の復帰を確認する。これにより、*P. gingivalis*側の細胞内生存に関わる遺伝子が判明する。

(3) 大腸菌で作製したHbRを歯肉上皮株化細胞Ca9-22に作用させ、Ca9-22細胞から産生される炎症性サイトカインについて、抗体アレイによる広範な解析を行なう。サイトカインの産生が認められた場合は、さらにHbRによる細胞内シグナル伝達機構をタンパク質解析により調べ、そのサイトカイン産生との関連性を検討する。

(4) 破骨前駆細胞は、C57/BL6マウス骨髄由来マクロファージ(BMM)とマウスマクロファージ様株化細胞RAW264.7を用いる。破骨細胞への分化は、BMMはM-CSF/RANKLの添加、RAW264.7細胞はRANKL単独添加を行ない、また*P. gingivalis*感染と*P. gingivalis*非感染の比較実験系にて5日間の10%FCS含有細胞培養液中で行なう。破骨細胞分化の評価は、TRAP陽性多核化(三核以上)形成細胞を破骨細胞とする。さらにマクロファージ様細胞でもある破骨前駆細胞における*P. gingivalis*感染実験であることから、自然免疫応答も考慮して、TLR2, TLR4, TLR9とそのアダプタータンパク質MyD88, TRIFの遺伝子欠損されたC57/BL6マウス由来BMMも用いて破骨細胞分化制御における重要な因子を検討する。

(5) 歯肉上皮株化細胞Ca9-22および肺上皮株化細胞A549、ヒト正常歯肉上皮細胞HGEPを用いて、*P. gingivalis*感染におけるPI3K/Akt経路への影響を調べる。*P. gingivalis*を宿主細胞へ感染させ、Aktの活性化についてWestern blot法により調べる。さらにAkt下流の基質タンパク質への影響やその上流因子の活性化等についても検討し、*Pg*が如何にしてPI3K/Akt経路に関与しているか分子機序を解析する。一方で、*P. gingivalis*によるPI3K/Akt経路への影響が認められれば、PI3K/Akt経路を攪乱する*P. gingivalis*由来物質を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* ATCC 33277株にトランスポゾンTn4400'を用いて変異導入を行い、約3万4千個からなるトランスポゾン変異株ライブラリーを作製した。これと並行し、*P. gingivalis*を歯肉上皮株化細胞Ca9-22に感染させ、その後細胞内に生存している細菌を回収するための実験手法を確立した。トランスポゾン変異株ライブラリーをCa9-22細胞感染前もしくは感染後に回収し、それらの菌

体からDNAを調製し、TraSH法を実施した。*P. gingivalis*の全ゲノム領域を含むマイクロタイリングアレイを用いることにより、細胞への感染および細胞内生存に関わる候補遺伝子を見出した。これらの中には、これまで*P. gingivalis*の細胞内生存との関わりが報告されたことのない遺伝子も含まれていた。なお、アレイデータについては引き続いて、より詳細な分析を行っている。*P. gingivalis*における遺伝子破壊系を確立し、個々の候補遺伝子について遺伝子破壊株の作製を行なった。複数の遺伝子について細胞内生存に関わることを再確認できた。なお、この実験を行なうため、新たなベクターの作製を行なった。上記とは別に、*P. gingivalis*に存在するマルチコンポーネント型薬剤排出ポンプが細胞内生存に関わることを示唆する結果を得たため、それらの遺伝子破壊株作製を行い、これら遺伝子の細胞感染および細胞内生存への関与を検討している。今度の課題として考えられることとして、細胞内生存に関わることを確認された遺伝子について、その働きを調べるため、野生株と遺伝子破壊株の細胞侵入後の挙動・局在等について詳細な検討を行なう。このことにより細胞内生存関与遺伝子が、エンドサイトーシス後のどのプロセスに抑制的に関わるのかを明らかにすることができると期待される。

(2) HbRをCa9-22に作用させ、炎症性サイトカインについて、抗体アレイにて解析を行なった。その結果、IL-8の顕著な産生が認められた。さらにHbRによるCa9-22細胞への作用によって、細胞内のMAPKs(p38, Erk1/2)の活性化が認められた。それは各種MAPK阻害剤を用いた実験によってもHbRがMAPKsを活性化していることを示し、これらの経路がIL-8産生へと繋がるために重要な因子であることが明らかとなった。またIL-8遺伝子発現における転写因子はこれらMAPKsの下流にあるATF-2, CREB, NF-kB p65が重要であることが示唆された。詳細な分子機構では、[p38/CREB], [Erk1/2/ATF-2, NF-kB p65]の経路を介して、HbRはIL-8の発現を誘導していることが考えられた。本研究は、HbRの機能が*Pg*において鉄獲得のために働くと考えられていたこと以外に、宿主細胞へ作用することで炎症性サイトカインIL-8の誘導能を示し、炎症に関与する因子であることを明らかにした。

(3) BMMとRAW264.7を用いて、RANKLの添加および*P. gingivalis*感染と*P. gingivalis*非感染による破骨細胞誘導を行なった。その結果、両細胞ともに*P. gingivalis*感染系において*P. gingivalis*非感染系に比べて顕著に破骨細胞への分化が抑制された。次に、マクロファージ様細胞の性質を考慮して、TLR2, TLR4, TLR9の欠損したBMMおよびアダプター

タンパク質 MyD88, TRIF の欠損した BMM を用いて *P. gingivalis* 感染による破骨細胞分化抑制への影響を調べた。TLR4, TLR9, TRIF が欠損した BMM は *P. gingivalis* による破骨細胞分化の抑制が起こったのに対し、TLR2, MyD88 欠損した BMM は破骨細胞への分化が認められた。以上の結果により、*P. gingivalis* によって破骨細胞の分化は抑制され、その経路には TLR2/MyD88 経路の役割が重要であることが示された。従って、破骨前駆細胞において *P. gingivalis* の感染は、TLR2/MyD88 経路を介した自然免疫応答によって阻害されていると考えられた。しかしながら、病態を鑑みると細菌による炎症によって破骨細胞の形成促進や活性化が認められており、今回の結果はその病態を真逆に反映したものであった。この結果は、歯周病態において如何なる意味を持っているのか、さらなる研究の余地とその必要性があることを示していると思われる。

(3) 宿主細胞 Ca9-22, A549, HGEP を用いて、*P. gingivalis* 感染における PI3K/Akt 経路への影響を調べた。その結果、*P. gingivalis* を宿主細胞へ感染させた Akt の活性化は顕著に抑制された。本来予想されたことは、細菌感染によって菌体成分、特にグラム陰性菌である *P. gingivalis* は、Akt の活性化が期待されていたが、予想を反する結果が得られた。Akt 抑制効果について、Akt 抑制因子 PP1, PP2, CTMP などの関与を PP 阻害剤や遺伝子発現系を用いて調べたが、関与が認められなかった。そこで、その上流について検討したが、PDK1 や PTEN の活性化状態を示すリン酸化レベルの変化は認められなかった、この件に関しては、現在も研究継続中である。また Akt の下流因子 GSK3a/b, mTOR, BAD などの因子についてリン酸化を調べたところ、Akt のリン酸化減少に並行して下流因子のリン酸化は減少した。従って、*P. gingivalis* の感染によって Akt はリン酸化活性の減少を引き起こされ、また Akt の活性も基質因子の減少によって抑制されていることが明らかとなった。これらの現象に関わる *P. gingivalis* 側の因子の検討も調べた。主要病原因子であるジンジパインの関与を調べるために、ジンジパインの阻害剤を用いて *P. gingivalis* 感染における Akt 活性化減少への影響を調べた。その結果、ジンジパイン阻害剤によって Akt のリン酸化活性の減少が阻害された。その下流因子もそれに伴ってリン酸化レベルの低下が認められなかった。以上のことから、*P. gingivalis* ジンジパインは宿主上皮細胞へ作用し、PI3K/Akt 経路に関与していることが明らかとなった。この研究結果は、今後の *P. gingivalis* 感染による歯周病態形成への関連だけでなく、歯周病が関与する全身的な疾患にも影響を与える可能性を示した結果で

あると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Inoue T, Kuroda T, Ohara N, 12-Methyltetradecanoic acid, a branched-chain fatty acid, represses the extracellular production of surfactants required for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, 査読有, Vol. 65, 2012, 126-131
- ② 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*, Microbiology and Immunology, 査読有, Vol. 55, 2011, 141-153
- ③ Kondo Y, Ohara N, Sato K, Yoshimura M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T, Nakayama K, Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to the virulence of *Porphyromonas gingivalis*, Infection and Immunity, 査読有, Vol. 78, 2010, 2846-2856

[学会発表] (計 17 件)

- ① 中山真彰、井上哲圭、大原直也、*P. gingivalis* ジンジパインによる PI3K/Akt 経路の抑制機序、第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 日-20 日、千葉市
- ② 菊池有一郎、柴山和子、国分栄二、大原直也、中山浩次、石原和幸、*P. gingivalis* の ECF シグマ因子 PG1318 変異株はミューター形質を示す、第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 日-20 日、千葉市
- ③ 中山真彰、井上哲圭、大原直也 *Porphyromonas gingivalis* による Akt/GSK3 beta pathway の制御、第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012 年 9 月 16 日、郡山市
- ④ 大原直也、New aspect of signaling events in *Porphyromonas gingivalis* pathogenesis First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and related Bacterial Species、2012 年 8 月 27 日、長崎市
- ⑤ 大原直也、歯周病原細菌およびその病原性因子の全身疾患への影響、第 60 回日本化学療法学会学術集会、2012 年 4 月 26 日、長崎市
- ⑥ Nakayama M, Nakayama K, Kobayashi K, Ohara N, Inhibition of RANK ligand-induced osteoclast differentiation by *Porphyromonas gingivalis*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International

- Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo
- ⑦ Kikuchi Y, Onozawa S, Kiso A, Miyashita M, Ueda O, Hirai K, Shibata Y, Ohara N, Nakayama K, Fujimura S, Roles of the extracytoplasmic function sigma factors in *Porphyromonas gingivalis*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 6-10 September, 2011, Sapporo
- ⑧ 大原直也. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の新たな病原性に関する研究. 特別講演. 第 31 回岡山歯学会総会・学術集会、2010 年 9 月 26 日、岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大原 直也 (OHARA NAOYA)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号 : 70223930

### (2) 研究分担者

中山 真彰 (NAKAYAMA MASA AKI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号 : 10579105

大原 直子 (OHARA NAO KO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号 : 80301365