

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4月25日現在

機関番号:17102

研究種目:基盤研究(B)

研究期間:2010~2012

課題番号:22390350

研究課題名(和文) 歯周病と全身疾患の連関の分子機構の解明と分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Relationship between periodontal disease and systemic diseases: molecular mechanisms and novel therapy discovery

研究代表者

山本 健二(YAMAMOTO KENJI)

九州大学・薬学研究院・特命教授

研究者番号:40091326

研究成果の概要（和文）：

歯周病と動脈硬化性心疾患、肥満・糖尿病および早期低体重児出産などの全身疾患との連関の分子機構を宿主側および病原体側の両方のプロテアーゼの視点に立って包括的な解明を行った。具体的には、宿主側プロテアーゼとして免疫応答との関連が明らかにされているカテプシンE (CatE)を、病原体側プロテアーゼとして主要な歯周病原性細菌のジンジバリス菌が産生するジンジパイン(GP)を標的酵素として取り上げ、種々のモデル動物ならびにそれらに由来する各種細胞を用いて分子生物学的な解析を行った。また、歯周病および関連する全身疾患の予防・治療に向けた有効な方法論を確立するために、「cDNAディスプレイ法」を基盤とする蛋白質高速分子進化技術等を使って、これらの酵素を特異的に認識するCatE活性化ペプチドアプタマーおよびGP阻害性ペプチド性化合物を創出し、これらを臨床応用するための基礎的研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

To establish the molecular basis of the possible linkage between periodontal diseases and a variety of systemic diseases such as atherosclerosis, obesity, diabetes, and preterm birth and fetal death, we used various animal models and different cell types and manipulated the endolysosomal aspartic proteinase cathepsin E (CatE) as a host-derived protease and gingipains (GP) as a periodontopathogen-derived protease. In this study, we first found that CatE plays a crucial role in host defense against infection with *Porphyromonas gingivalis*, a major etiological bacterium of adult periodontal disease through proper trafficking and cell surface expression of Toll-like receptors such as TLR4 in macrophages. Second, GP mediates atherosclerosis progression accelerated by *P. gingivalis* infection through selective proteolysis of apolipoprotein B-100 in LDL cholesterol. Third, GP acts as a strong virulence factor to induce preterm birth and low birth weight through the enhancement of immune responses to pregnant mice infected with *P. gingivalis*. Fourth, CatE plays a crucial role in normal development of adipose tissues through biochemical analysis of *CatE*^{-/-} mice that were fed a high-fat diet as an obesity mouse model. Forth, using techniques of cDNA display, selection-by-function, γ -ligation-based block shuffling and others, we generated peptide inhibitors for CatE and GP. The newly developed inhibitors for each enzyme showed an IC50 of nM order and high selectivity. This method is thus expected to be widely applicable for the development of peptide inhibitors of various proteases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：感染症、酵素、細菌、歯学、薬学

1. 研究開始当初の背景

ヒトの免疫システムは、細菌などの病原微生物やアレルゲンを迅速に排除する自然免疫系と、全身性の免疫記憶により、予想される異物の再侵入への準備と迅速な対応を可能とする獲得免疫系が有機的に相互作用する効率的な生体防御機構である。最近、エンドソーム性蛋白質分解システムと免疫システムの密接な関係が明らかになり、世界中の研究者が免疫システムに関与するエンドリソソーム性プロテアーゼの同定と生理作用および作用機序の解明に激しい競争を展開している。一方、口腔細菌による感染症として歯科領域で最重要視されている歯周病は、成人における歯牙喪失の最大原因とされ、その罹患率の高さから国民病とみなされている重要疾患である。さらに近年の疫学的研究から、歯周病が動脈硬化性心疾患、糖尿病、早期低体重児出産などといった様々な全身疾患の発症・進展に密接に関連していることが明らかにされて、人々の健康と福祉を考える上で、その克服が喫緊の課題となっている。

申請者らはエンドリソソーム性蛋白質分解システムを担うカテプシン E (CatE) の遺伝子改変マウスを作製し、それらの解析を通じて、CatE が免疫システムに密接に関係してい

ることを明らかにしている。一方、歯周病の主要な原因菌 *P. gingivalis* (ジンジバリス菌) は主要な病原性プロテアーゼとしてジンジパイン (Gingipains, GP) を菌体表面および菌体外へ産生分泌している。GP は基質切断特異性から Rgp と Kgp の 2 群に分けられており、それらは互いに協調しながら、宿主に対しては強力な病原性を、菌自身には生存・増殖に必須の生理機能を発揮していることが明らかにされている。

今日、病原微生物感染と宿主免疫システムの相互作用、とくにこのプロセスに関与する蛋白質分解システムの重要性が強く指摘されているが、歯周病感染にける宿主側ならびに病原菌側のプロテアーゼの生理作用や作用機序、および病原菌の局所免疫応答回避機構におけるそれらの機能の詳細については殆ど解明されていない。したがって、歯周病と全身疾患、とくに動脈硬化性心疾患、肥満・糖尿病および早期低体重児出産との関連の分子機構の解明、および歯周病ならびに関連する全身疾患の予防・治療に向けた新たな方法論の確立が喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病と全身疾患、とくに動

脈硬化性心疾患、肥満・糖尿病および早期低体重児出産との連関の分子機構を宿主側および病原体側の両方の蛋白質分解システムの視点に立って包括的に解明するものであり、研究で明らかにされた知見を基盤として、歯周病ならびに連関する全身疾患の予防・治療に向けた新たな方法論を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

歯周病と全身疾患の連関の分子機構を宿主側および病原体側の両方のプロテアーゼの視点に立って包括的に解明するために、宿主側プロテアーゼとしては近年免疫応答との関連が明らかにされている **CatE** を、歯周病原菌側プロテアーゼとしては多面的な機能を有する **GP** を取り上げ、種々のモデル動物ならびにそれらに由来する各種細胞を用いて、ジンジバリス菌感染と全身疾患の連関の分子機構を分子細胞生物学的に解析する。さらに、歯周病および関連する全身疾患の予防・治療に向けた有効な方法論を確立するために、「cDNA ディスプレイ法」を基盤とする蛋白質高速分子進化技術を使って、これらの酵素をターゲットとする新たな分子標的予防・治療薬を開発する。

4. 研究成果

平成 22 年度は、歯周病原菌のジンジバリス菌感染に伴う宿主自然免疫応答システムの分子機構と歯周病原性酵素ジンジパインの特異的阻害ペプチドの取得について研究を行った。具体的には、①細菌感染に伴う TLR を介する自然免疫シグナルが、エンドリソソーム系蛋白質分解システムの機能にどのような影響をもたらすのかを個体レベルでは **CatE** 欠損マウスや **CatE** 過剰発現マウスを用いて、細胞レベルでは、それぞれのマウス由来のマクロファージを用いて解析した。

さらに、野生型ならびに **CatE** 欠損マウス由来の血管内皮細胞にジンジバリス菌を感染させ、その後のエンドリソソーム系における菌の局在と生存率を解析し、細菌感染におけるエンドリソソーム系蛋白質分解システムおよび **CatE** の役割を解析した。その結果、**CatE** 欠損マウスはジンジバリス菌感染に対して最も感受性が高く、菌感染 2 日後にすべてのマウスは死亡した。それに対し、**CatE** 過剰発現マウスは本菌感染に対し最も高い抵抗性を示し、菌感染 7 日後でも殆どのマウスは生存していた。それぞれの動物由来の腹腔マクロファージを用いた実験では、LPS（宿主 TLR4 に対する本菌のリガンド）に対する応答が **CatE** 過剰発現マクロファージで最も高く、**CatE** 欠損マクロファージで最も低かった。これは、TLR4 の細胞表面発現量が **CatE** 欠損マクロファージで著しく低下していることによることが分かった。血管内皮細胞に感染したジンジバリス菌の生存は、**CatE** 欠損マウス由来細胞では野生型細胞に比べて有意に延長されることが分かった。これらの結果から、**CatE** はエンドリソソーム系蛋白質分解システムを介して生体防御機構に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。②新規ディスプレイ法を用いてジンジパインに結合する複数の阻害性ペプチドを取得した。このうちの 1 つは、2 種類の **GP** (**Rgp** と **Kgp**) を同時に阻害する Dual 阻害剤であることがわかった。

平成 23 年度は、①歯周病原菌のジンジバリス菌感染に対する生体防御システムとしての **CatE** の役割、②歯周病と動脈硬化性心疾患の連関に関する分子機構の解明、および③GP に対する二元的阻害剤の開発の 3 つの課題について追究を行った。その結果、①については免疫機能と関係が深いとされる **CatE** がジンジバリス菌感染に対する生体防

御システムで極めて重要な働きをしていることが明らかにされた。具体的には、**CatE**の発現量を異にする3種類の同系マウス（**CatE**欠損、野生型、**CatE**過剰発現マウス）とそれぞれに由来する抗原提示細胞を用いてジンジバリス菌感染に伴う生体機能変化を個体ならびに細胞レベルで解析した。その結果、本菌感染による個体死やマクロファージのアポトーシスは**CatE**の発現量と正の相関をすることが分かった。また、マクロファージの抗原提示能や殺菌能も**CatE**の発現量と正の相関をしていることが分かった。さらに、**CatE**欠損マクロファージでは、野生型や**CatE**過剰発現マクロファージに比べて過度の酸化ストレス負荷やオートファジー機能の不全が生じていることが明らかにされ、ジンジバリス菌感染に対してエンドソーム系蛋白質分解システムが**CatE**を介して生体防御システムに重要な役割を果たしていることが明らかにされた。②については、ジンジバリス菌感染がどのような機序で動脈硬化性心疾患の発症を促進するのかを、動脈硬化性心疾患のモデル動物であるApoE欠損マウスを使って解析した。その結果、本菌感染が動脈硬化性心疾患の発症を著明に亢進すること、それが**Rgp**と**Kgp**を同時に阻害することによって強く抑制されることが明らかにされた。ジンジパインの阻害がどのようなメカニズムで動脈硬化性心疾患の発症を抑制するかを検討した結果、**Rgp**によるLDLコレステロールのApoB-100蛋白質の分解がこれらの阻害剤によって強く阻害されることによって動脈硬化性心疾患の発症が抑制されることがわかった。③については、cDNAディスプレイ法を基盤とする高速分子進化技術によって取得されたGP阻害性ペプチドの中から**Rgp**と**Kgp**を同時に阻害する二元的阻害剤が数種類を選別した。選別されたそれぞれのペプチ

ドに対してアミノ酸置換や側鎖付加等の修飾を施し、より高品質のペプチド性化合物の取得を行った。

平成24年度は、①歯周病の主要原因菌であるジンジバリス菌を感染させた**CatE**欠損マウスは菌感染後の生存率が同系野生型マウスに比べて著しく低く、それぞれのマクロファージを使った培養系においても前者は後者に比べて菌体排除能や細胞応答が有意に低かった。また前者は、メラノーマ細胞を移植した後の腫瘍の増殖能や転移能および個体死数がいずれも後者より有意に高かった。②歯周病と早期低体重児出産の連関に関する研究では、ジンジバリス菌を感染させたマウスは菌量依存的に出生仔数および出生体重、分娩数を減少させ、死産数も増加したが、**GP**欠損株や**GP**阻害剤を投与したマウスはこうした変化を示さなかった。ジンジバリス菌を投与した時の各臓器の菌濃度は胎盤と胎膜で高く、胎盤では投与後経時的に正常組織の破壊像が認められ、菌は胎児と母体の境界に局在していることが示された。③歯周病と肥満および糖尿病の連関についての研究では、高脂肪食で飼育した**CatE**欠損マウスが、体重減少や肝腫、胆嚢肥大などを特徴とする異常な脂肪蓄積が非脂肪性肝胆系に観察され、白色脂肪組織や赤色脂肪組織の発育不全が示された。また、高脂肪食飼育の**CatE**欠損マウスの白色脂肪組織の脂肪細胞中のPPAR γ やC/EBP α 、マクロファージ中のTNF- α やiNOSの発現量が高脂肪食で飼育した野生型マウスのそれらより有意に低いことも示された。以上の結果から、**CatE**は正常な免疫反応を介して生体恒常性の維持に強く貢献するとともに、**GP**が歯周病菌感染に連関する早期低体重児出産や糖尿病発症において重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

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 9 件)

1. Yasukouchi A, Kawakubo T, Nakamura S, Yamamoto K. Cathepsin E enhances anticancer activity of doxorubicin on human prostate cancer cells showing resistance to TRAIL-mediated apoptosis. *Biol. Chem.* 391, 947-958, 2010、査読有
2. Kawakubo T, Yasukochi A, Okamoto K, Okamoto Y, Nakamura S, Yamamoto K. The role of cathepsin E in terminal differentiation of keratinocytes. *Biol. Chem.* 392, 571-583, 2011、査読有
3. Kawakubo T, Yasukochi A, Nakamura S, Yamamoto K. Cathepsin E as a potent anticancer protease. *J. Oral Biosci.* 53 (2), 126-136, 2011、査読有
4. Kitamura K, Biyani M, Futakami M, Ueno-Tsuji S, Suzuki M, Kawakubo T, Yamamoto K, Nishigaki K. Peptide aptamer-based ELISA-like system for detection of cathepsin E in tissues and plasma. *J. Mol. Biomark. Diagn.* 2, 104, doi:10.4172/2155-9929, 2011、査読有
5. Biyani M, Futakami M, Kitamura K, Kawakubo T, Suzuki M, Yamamoto K, Nishigaki K. In vitro selection of cathepsin E-activity-enhancing peptide aptamers at neutral pH. *Int. J. Pep.* 2011, Article ID 834525, Doi:10.1155/2011/834525, 2011、査読有
6. Tsukuba T, Okamoto K, Yamamoto K. Cathepsin E is critical for the proper trafficking of both intracellular membrane and cell surface proteins. *J. Oral Biosci.* 54 (1), 48-53, 2012、査読有
7. 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(3), 263-272, 2012、査読有
8. Abe K, Ichinomiya R, Kanai T, Yamamoto K. Effect of a Japanese energy healing method known as Johrei on viability and proliferation of cultured cancer cells in vitro. *J Alternat. Complement. Med.* 18(3), 221-228, 2012、査読有
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、査読有

[学会発表] (計 17 件)

1. Yamamoto K. Novel functions of cathepsin E in epidermal differentiation and aging. 12th International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control. Portoroz, Slovenia, Sep. 25-29, 2010 (as an invited speaker)
2. Kawakubo T, Yasukochi A, Yamamoto K. Cathepsin E is essential for proper mammogenesis. 12th Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control. September 25, 2010, Portoroz (Slovenia)
3. Yasukochi A, Kawakubo T, Yamamoto K. Analysis of cathepsin E function in epidermal differentiation using a model of DMBA/TPA- induced skin papillomas. 12th Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control. September 25, 2010, Portoroz (Slovenia)
4. Yamamoto K, Kawakubo T, Yasukochi A,

- Okamoto K, Tsukuba T: Cathepsin E: related signaling systems, functions and implication in diseases. 13th International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control. Portoroz, Slovenia, Sep. 22-26, 2012 (as an invited speaker)
5. Yamamoto K, Kawakubo T, Yasukochi A, Tsukuba T.: Cathepsin E-induced growth arrest and apoptosis of cancer cells and the related signaling. The 85th Annual Meeting of Pharmacological Society, Kyoto, March 14, 2012 (as an invited speaker)
 6. Yamamoto K, Kawakubo T, Yasukochi A, Okamoto K, Tsukuba T. Cathepsin E: related signaling systems, functions and implication in diseases. 13th International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control. Sep. 24, 2010. Portoroz, Slovenis, (as an invited speaker)
 7. Tsukuba T, Kadowaki T, Okamoto K, Yamamoto K. Accumulation of NADPH oxidase (NOX2) and increased oxidative stress in cathepsin E-deficient macrophages. The 85th Annual Meeting of Pharmacological Society. March 16, 2012, Kyoto
 8. Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Yamamoto K, Tsukuba T. Identification of two transcripts and in vivo promoter analysis for cathepsin E. The 85th Annual Meeting of Pharmacological Society. March 16, 2012, Kyoto
 9. 小松将之、北村幸一郎、Sunita Gautam, Madhu Biyani, 山本健二、西垣功一. Selection-by-Function 法によるプロテアーゼアクチベーターの開発. 第17回日本病態プロテアーゼ学会、2012年8月10日、浜松
 10. 後藤志信、尾崎康彦、都筑佳苗、安河内

篤、川久保友世、国松己歳、山本健二、杉浦真弓. 反復流産病態における妊娠初期脱落膜中マクロファージの cathepsin E の役割. 第17回日本病態プロテアーゼ学会、2012年8月10日、浜松

11. 岡元邦彰、岩田淳一、坂井詠子、西下一久、山本健二、筑波隆幸. p53 はカテプシンE 遺伝子の発現を制御する. 第85回日本生化学会年会、2012年12月15日、福岡

他 6 編

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: カテプシンE の腫瘍マーカーとしての用途およびカテプシンE ならびにカテプシンD の腫瘍血管新生阻害療法としての用途

発明者: 山本健二、岩田淳一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 4452791 号

取得年月日: 平成 22 年 2 月 12 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 健二 (YAMAMOTO KENJI)

九州大学・大学院薬学研究院・特命教授

研究者番号: 40091326

(2) 研究分担者

川久保 知世 (KAWAKUBO TOMOYO)

九州大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号: 70507813

(3) 研究分担者

山竹 久美子 (YAMAATAAKE KUMIKO)

九州大学・大学院薬学研究院・学術研究員

研究者番号: 50622114