

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23日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659378

研究課題名（和文）メンブレントラフィックから見た歯周病の早産誘発機構の分子基盤研究

研究課題名（英文）Molecular dissection of membrane traffic machinery regulating preterm delivery induced by marginal periodontitis

研究代表者

天野 敦雄（AMANO ATSUO）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50193024

研究成果の概要(和文)：

歯周病は早産・低体重出生児の危険因子であると考えられており、動物実験により歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の血行性感染が原因の1つと考えられている。しかしながら、その発症機序は不明であった。我々は *P. gingivalis* に侵入されたトロホブラスト細胞では細胞周期G1アレストやDNA傷害が誘発されることを報告した。本研究では、本菌が細胞侵入後、細胞傷害性を発揮するシグナル経路を探索した結果、本菌のジンジパインが細胞周期 G1 アレストやアポトーシスを誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Epidemiological and interventional studies of humans have revealed a close association between periodontal diseases and preterm delivery of low birth weight infants. *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogen, can translocate to gestational tissues following oral-hematogenous spread. We previously showed that *P. gingivalis* invades extravillous trophoblast cells (HTR-8) derived from the human placenta, and inhibits proliferation through induction of arrest in the G1 phase of the cell cycle. The purpose of the present study was to identify signaling pathways mediating cellular impairment caused by *P. gingivalis*. The obtained results suggest that *P. gingivalis* activates cellular DNA damage signaling pathways that lead to G1 arrest and apoptosis in trophoblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

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：歯学、感染症、シグナル伝達、歯周病菌、細胞・組織、トロホブラスト、早産

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌は宿主組織の細胞内に棲息し、感

染症の慢性化と進行を図っている。一方、宿主細胞は侵入してきた細菌を殺し分解する自然免

疫能を有する。この機能は、メンブレントラフィック(エンドサイトーシス経路やオートファジー経路)と呼ばれる細胞内物質輸送ネットワークに依存している。歯周細胞などの非貪食細胞でも、メンブレントラフィックを利用して細菌の分解を行い、対細菌戦の最前線バリエードとして細胞自然免疫に貢献していると考えられている(Amano, Front Biosci, 2007)。

1990年代後半より、疫学的調査、*P. gingivalis* 感染マウス妊娠モデルでの低体重出生の報告(Lin *et al.*, 2003)、ヒト胎盤細胞や羊水からの *P. gingivalis* の検出(Belanger *et al.*, 2008)により、口腔から血行性に羊水に移行した *P. gingivalis* が早産(低体重出生)を誘発している可能性が示された。しかし、早産を誘発する分子基盤の解明にはほど遠く、研究標的とすべき宿主細胞分子群すら不明確であるため、歯周病と早産(低体重出生)の関連が科学的に認知されるには至っていない。

2. 研究の目的

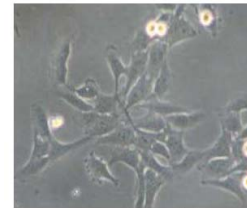
歯周病は早産(低体重出生)の危険因子であると考えられており、*Porphyromonas gingivalis* などの歯周病菌の口腔から子宮への血行性感染が原因とされている。しかし、子宮感染から早産へと至る発症機序は、推論すら曖昧なのが現状である。我々は *P. gingivalis* が胎盤栄養膜細胞(トロホプラスト細胞)に侵入することを見出した。面白いことに、*P. gingivalis* の細胞侵入に対してトロホプラスト細胞は、歯肉上皮細胞などとは全く異なる独特の細胞応答を示し、深刻な細胞障害に陥る。我々は、この細胞障害は、トロホプラスト細胞内での細菌の捕捉・分解(細胞自然免疫)を制御するメンブレントラフィック機構の機能異常に因るとの新規着想により、本機構の分子解剖を行い *P. gingivalis* による早産誘発の分子基盤の全貌解明に挑む。本研究の結果、歯周病と早産の科学的因果関係を示すことができれば、早産予防にお

ける歯科医学の大きな成果となる。

3. 研究の方法

(1)トロホプラスト細胞のアポトーシス解析
①変異株の感染

P. gingivalis 線毛遺伝子型の代表菌株、線毛遺伝子入替え株、ジンジパイン欠損株、線毛遺伝子欠損株および線毛保有ジンジパイン欠損株を不死化トロホプラスト細胞(下図)に感染した。



不死化トロホプラスト細胞
(HTR-8/SV40neo cells)

②初期アポトーシスの検出

変異株感染細胞にアネキシンVとヨウ化プロピジウム(PI)による二重染色を行った。染色後、フローサイトメリー(FACS)を用いてアポトーシス解析を行った。

(2)トロホプラスト細胞の細胞周期解析

(1)と同様に変異株の感染を行った。感染トロホプラスト細胞はPIによるDNA染色を行い、FACSを用いて細胞周期の解析を行った。

3)トロホプラスト細胞のシグナル伝達機構の解析

①変異株の感染

(1)と同様に変異株の感染を行った。ウェスタンブロット法を用いて、DNA損傷シグナル関連分子および p53、MDM2、Ets1 の発現を解析した。

②siRNA の導入と阻害剤処理

①で解析した特定の遺伝子に対して siRNA による遺伝子ノックダウンを行い、シグナル伝達経路に対する阻害剤を用いて効果を確認した。

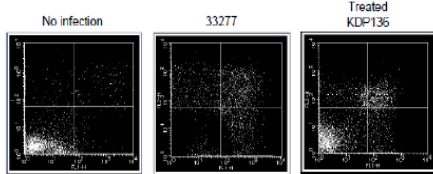
③アポトーシスと細胞周期解析

遺伝子ノックダウンまたはシグナル伝達阻害後、(1)と同様に変異株の感染を行った。アポトーシス・細胞周期解析は(1)と(2)と同様に行った。

4. 研究成果

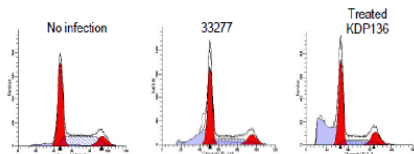
(1)トロホプラスト細胞のアポトーシス解析

P. gingivalis ATCC33277 感染はアポトーシスを誘発する。しかしながら、線毛保有ジンジパイン欠損株(Treated KDP136)感染は、アポトーシスの誘導を認めなかった(下図)。



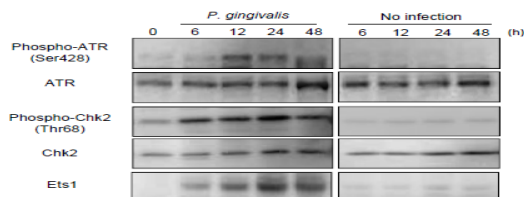
(2)トロホプラスト細胞の細胞周期解析

P. gingivalis ATCC33277 感染は細胞周期 G1 アレストを誘発したが、線毛保有ジンジパイン欠損株の感染では細胞周期 G1 アレストの誘発を認めなかった(下図)。



(3)トロホプラスト細胞シグナル伝達機構の解析

P. gingivalis ATCC33277 のトロホプラスト細胞への侵入によって、ATR- Chk2 経路および Ras- ERK1/2-Ets1 経路が活性化が認められた(下図)。



またATR-Chk2経路の活性化とMDM2の分解により、p53の蓄積が生じ、細胞周期G1アレストを誘発していることが示唆された。さらに、感染48時間後Fasの発現が認められたことから、*P. gingivalis*によるアポトーシス誘導が分子レベルでも明らかになった。

①変異株の感染

線毛保有ジンジパイン欠損株ではATR-Chk2経路およびRas-ERK1/2-Ets1経路の活性が認められた。しかしながら、MDM2が活性化しp53の蓄積が認められなかった。このことから、ジンジパインはMDM2を特異的に分解し、細胞周期G1アレストを誘発していることが示唆された。またアポトーシスはp53-Fas経路およびRas-ERK1/2-Ets1経路の関与が示唆された。

②siRNAによるアポトーシスと細胞周期の解析

p53(ATR-Chk2経路下流)およびEts1(Ras-ERK1/2経路下流)をsiRNAによりノックダウンした。p53のノックダウンにより、細胞周期G1アレストならびにアポトーシスが抑制された。

Ets1のノックダウンにおいてもG1アレストならびにアポトーシスが抑制された。

これらの知見により、*P. gingivalis*感染はATR-Chk2-p53経路およびRas-ERK1/2-Ets1双方による活性化により、細胞周期G1アレストとアポトーシスが誘発されていることが示唆された。

③阻害剤を用いたアポトーシスと細胞周期の解析

本課題では、ATR阻害剤を使用した。ATR活性化阻害は、*P. gingivalis*感染による細胞周期G1アレストを抑制した。同時に、アポトーシスの抑制も認められた。これらの知見により、ATR-Chk2-p53経路は、細胞周期およびアポトーシスの双方に影響を及ぼすことが示唆された。

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 29 件)

原著

- ① Inaba H*, Kuboniwa M, Sugita H, Lamont RJ, Amano A (2012): Identification of signaling pathways mediating cell cycle arrest and apoptosis induced by *Porphyromonas gingivalis* in human trophoblasts. **Infect Immun**, in press. (査読有)
- ② Kawai S*, Amano A (2012): BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. **J Cell Biol**, 197(2): 201-208. (査読有)
- ③ Inaba H*, Tagashira M, Kanda T, Amano A (2011): Proliferation of smooth muscle cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* is inhibited by apple polyphenol. **J Periodontol**, 82(11):1616-1622. (査読有)
- ④ Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T* (2011): Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter *Pit-1* is critical to chondrogenesis. **J Biol Chem**, 286(4): 3094-3103. (査読有)
- ⑤ Takeuchi H, Furuta N, Morisaki I, Amano A* (2011): Exit of intracellular *Porphyromonas gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. **Cell Microbiol**, 13(5):677-691. (査読有)
- ⑥ Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K*, Kudo C, Nomura R, Kojima A, Naka S, Muranaka Y, Thura M, Nakajima A, Masuda K, Nakagawa I, Speziale P, Shimada N, Amano A, Kamisaki Y, Tanaka T, Umemura K, Ooshima T (2011): The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in hemorrhagic stroke. **Nature Commun** 2:485. (査読有)

総説

- ⑦ Klionsky DJ*, Amano A, and 1268 others (2012): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, 8(4):1-100. (査読有)
- ⑧ Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M (2012): Insights into the pathogenesis of dental plaque: discoveries from proteomics. **Expert Review of Proteomics**, in press. (査読有)
- ⑨ Amano A*, Furuta N (2012): Cell entry and

exit by periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **J Oral Biosci**, 54:54-57. (査読有)

- ⑩ Takeuchi H, Furuta N, Amano A* (2011): Cell entry and exit by periodontal pathogen via recycling pathway. **Commun Integr Biol**, 4(5): 587-589. (査読有)
- ⑪ Amano A* (2010): Host-parasite interactions in periodontitis: Subgingival infection and host sensing. **Periodontol 2000**, 52: 7-11. (査読有)
- ⑫ Amano A* (2010): Bacterial adhesins to host components in periodontitis. **Periodontol 2000**, 52: 12-37. (査読有)
- ⑬ Amano A*, Furuta N, Tsuda K (2010): Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oral pathogens. **Periodontol 2000**, 52: 84-93. (査読有)
- ⑭ Furuta N, Yoshimori T, Amano A* (2010): Mediator molecules that fuse autophagosomes and lysosomes. **Autophagy**, 6(3): 417-418. (査読有)
- ⑮ Inaba H, Amano A* (2010): Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases - From molecular mechanisms to clinical cases: Implication of periodontal diseases in development of systemic diseases. **J Pharmacol Sci**, 113(2), 103-109. (査読有)
- ⑯ Amano A* (2010): Host-parasite interactions in periodontitis: Microbial pathogenicity and innate immunity. **Periodontol 2000**, 54: 9-14. (査読有)
- ⑰ Kuboniwa M, Inaba H, Amano A* (2010): Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. **Periodontol 2000**, 54: 136-159. (査読有)
- ⑱ Amano A*, Takeuchi H, Furuta N (2010): Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. **Microbe Infect**, 12(11):791-798. (査読有)
- ⑲ 天野敦雄 (2012): 病因論から再考する歯周治療 障害者歯科, 32(1): 1-7. (査読無)

[学会発表] (計 31 件)

特別講演

- ① **Amano A**
Strategy of periodontal bacteria for periodontal destruction.
The 2nd International Joint Symposium on Oral and Dental Sciences - Featuring Next Generation of Regenerative Therapies in Dentistry-, 2012/3/2 (Yogyakarta, Indonesia).

- ② **天野敦雄**
口腔領域の遺伝子診断「病因論から予測する歯周病発症リスク」
大阪府病院診療所歯科部長会・研修会,
2011年12月3日, 大阪.

- ③ **天野敦雄**
病因論から再考する歯周治療
障害者歯科学会教育講座、第28回日本障害者歯科学会学術大会、平成23年11月5日(福岡)

シンポジウム

- ④ **Amano A**
Outer membrane vesicles function as offensive weapons of *Porphyromonas gingivalis*.
The Second Osaka Mahidol Chulalongkorn Joint Symposium. 2011/10/25 (Bangkok).

- ⑤ **Amano A**
Outer membrane vesicles function as offensive weapons of *Porphyromonas gingivalis*
13rd International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011/9/3 (Sapporo)

- ⑥ **Amano A**
Strategy of periodontal bacteria for periodontal destruction.
Periodontik Terkini, Universitas Gadjah Mada, 2011/7/4 (Yogyakarta, Indonesia).

- ⑦ **天野敦雄**、久保庭雅恵、古田信道
細菌感染症の転帰を決める細胞ロジスティクス機構の分子基盤解析
新学術領域「細胞内ロジスティクス」班会議 2011年6月1日, 鳥羽市

- ⑧ **天野敦雄**、稲葉裕明
歯周病菌と4つの全身疾患
シンポジウム「ここまでわかった口腔細菌による全身疾患：最新の研究と臨床知見」
第31回日本臨床薬理学会年会, 2010年12月3日, 京都市

- ⑨ **天野敦雄**、竹内洋輝、古田信道
上皮細胞への細菌侵入とメンブレントラフィック
サテライトシンポジウム「歯学領域におけるメンブレントラフィック研究」
第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月20日, 江戸川区.

- ⑩ **Amano A**
Systemic diseases and periodontal pathogen.
Leeds & Osaka Universities International Symposium in Dentistry, 2010/7/5, Leeds, England.

- ⑪ **天野敦雄**、竹内洋輝、古田信道
細胞内ロジスティクス機構による細菌感染症の制御
新学術領域「細胞内ロジスティクス」班会議 2010年6月30日, 札幌市

一般演題

- ⑫ Hashino E, Kuboniwa M, **Amano A**
Metabolome profiles in *Porphyromonas gingivalis* under erythritol stress.
JADR, 2011/10/8 (広島)

- ⑬ **Inaba H**, Kuboniwa M, Sugita H, **Amano A**
Multiple signalling pathways are involved in apoptosis and cell cycle arrest induced by periodontal pathogen in human trophoblast.
EMBO meeting, 2011/9/11 (Wien, Austria)

- ⑭ Kuboniwa M, Kuroda Y, Hashino E, Alghamdi S, Hackett M, Lamont RJ, **Amano A**
Metabolome profiles in *Streptococcus gordonii* co-cultured with *Porphyromonas gingivalis*
13rd International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011/9/3 (Sapporo)

- ⑮ Kuboniwa M, Alghamdi S, Hashino E, Lamont RJ, **Amano A**
Metabolome profiles in *Porphyromonas gingivalis* stimulated with exogenous para-aminobenzoate.
7th International Conference of the Metabolomics Society, 2011/06/29 (Cairns, Australia)

- ⑯ **Inaba H**, **Amano A**

Proteolytic action of *P. gingivalis* induces proliferation of vascular smooth muscle cells: A relationship with arteriosclerosis.

9th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2010/11/10, Kuala Lumpur, Malaysia

〔図書〕（計3件）

- ① **天野敦雄**, 村上伸也, 岡 賢二(編) (2012): 歯周病を科学する クインテッセンス出版, 東京.
- ② **天野敦雄**, 中川一路, 浜田茂幸 (2011): 「カラアトラス 口腔嫌気性グラム陰性桿菌 [歯周病菌] 」 病原菌の今日的意味 (4版 松本慶蔵編) 医薬ジャーナル, 大阪, 106-109.
- ③ **天野敦雄**, 中川一路, 浜田茂幸 (2011): 「口腔嫌気性グラム陰性桿菌:歯周病菌」 病原菌の今日的意味 (4版 松本慶蔵編) 医薬ジャーナル, 大阪, 594-612.

〔その他〕

ホームページ:

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~prevent/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 敦雄 (AMANO ATSUO)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 50193024

(2) 研究分担者

稲葉 裕明 (INABA HIROAKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 70359850

古田 信道 (FURUTA NOBUMICHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 50452446