

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31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：22659381

研究課題名（和文） 歯周病と特定臓器癌化リスク亢進との関連性についてのエピジェネティクス解析

研究課題名（英文） *In vitro* study on comparison of epigenetic alteration patterns between periodontitis and a particular type of cancer models

研究代表者

久保庭 雅恵 (KUBONIWA MASAE)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00303983

研究成果の概要（和文）：歯肉上皮細胞における癌抑制遺伝子 p53 の発現、および P53 のユビキチン依存性分解に関わる E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 の消長に及ぼす *Porphyromonas gingivalis* 感染の影響を検討したところ、P53 の減少に先立ち、MDM2 の発現量増加とリン酸化が認められた。また、感染細胞において解糖系代謝経路の亢進がみられことから、同菌の感染によって MDM2 が活性化し、p53 分解が亢進することで、解糖系の賦活化が引き起こされていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To assess influences of *Porphyromonas gingivalis* infection on p53 and MDM2 (p53 E3 ubiquitin protein ligase) expression, western blot analyses were performed. The results indicated that *P. gingivalis* mild infection activated MDM2, and that resulted in p53 reduction. Furthermore, impaired p53 accelerated the glycolysis pathway in infected gingival epithelial cells in the same manner as in cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯肉上皮細胞, *Porphyromonas gingivalis*, 癌抑制遺伝子, p53, MDM2, 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

(1)最も有力な歯周病原性菌と考えられている *P. gingivalis* を低い MOI (multiplicity of infection; 感染効率) の比較的マイルドな条件下で初代歯肉上皮細胞に感染させた場合、同菌が細胞内に侵入して抗アポトーシス反応を誘発し、長期間細胞内で生存すること [Yilmaz, O. (2008) *Microbiology* 154:2897-2903], また歯肉上皮細胞の細胞周期調節および癌化に関与する分子の遺伝子

発現状態に大きな変化が生じることが報告されている [Handfield, M. *et al.* (2006) *Cell Microbiol* 7:811-823].

(2)申請者らの研究により、*P. gingivalis* は低 MOI 長時間感染モデルにおいて初代歯肉上皮細胞の細胞増殖を促進することが明らかとなり、そのメカニズム解明のため抗体アレイ法を用いたプロテーム解析を実施した結果、同菌による感染を受けた初代歯肉上皮細胞中では p53, PI3K などの癌関連分子や細

胞周期関連分子の発現量やリン酸化状態に顕著な変動を生じていることが確認された [Kuboniwa, M. *et al.* (2008) *Microbes Infect* 10:122-128].

2. 研究の目的

本研究においては、いくつかの大規模疫学研究による報告で注目され始めた、歯周病有病状態もしくは歯の喪失状態と特定臓器の発癌リスク亢進の関連性に着目し、そのメカニズムの解明への端緒となる分子細胞学的研究を実施することを目的とする。特に、これまでの申請者らの研究などから、発癌への関与の可能性が示唆される歯周病原性菌 *Porphyromonas gingivalis* に焦点をあて、同菌の持続的感染によって歯肉上皮細胞に生じる変化と発癌リスク亢進との関連性について詳細に検討することとする。

3. 研究の方法

(1) 低 MOI 条件下での *P. gingivalis* 感染が癌抑制遺伝子 p53 および MDM2 の消長に及ぼす影響についての検討

MOI=10 の条件にて *P. gingivalis* I 型線毛保有株である ATCC33277 もしくは II 型線毛保有株である OMZ314 を感染させ、経時的な p53 タンパク質発現量および MDM2 タンパク質発現量の変化をウエスタンブロット法を用いて観察した。

(2) 低 MOI 条件下での *P. gingivalis* 感染が癌抑制遺伝子 p53 Ser15 部位のリン酸化に及ぼす影響についての検討

MOI=10 の条件にて *P. gingivalis* ATCC33277 もしくは OMZ314 を感染させ、経時的な p53 Ser15 部位のリン酸化の程度をウエスタンブロット法を用いて観察した。

(3) 低 MOI 条件下での *P. gingivalis* 感染が MDM2 Ser166 部位のリン酸化に及ぼす影響についての検討

MOI=10 の条件にて *P. gingivalis* ATCC33277 もしくは OMZ314 を感染させ、経時的な MDM2 Ser166 部位のリン酸化の程度をウエスタンブロット法を用いて観察した。

(4) 低 MOI 条件下での *P. gingivalis* 感染が歯肉上皮細胞の代謝に及ぼす影響についての検討

MOI=10 の条件にて *P. gingivalis* OMZ314 を感染させ、不死化歯肉上皮細胞の代謝プロファイルの経時的な変化について、観察をおこなった。研究手法としては、細胞の代謝プロファイルを包括的に解析することが可能な、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計によるメタボローム解析を実施した。

4. 研究成果

(1) ウエスタンブロット法によって、低 MOI

条件下での *P. gingivalis* 感染が癌抑制遺伝子 p53 およびその分解を担う MDM2 の消長に及ぼす影響について検討を行ったところ、I 型線毛保有株である ATCC33277 感染細胞と II 型線毛保有株である OMZ314 感染細胞とで、両分子の消長パターンが異なり、OMZ314 感染細胞においてより顕著に MDM2 の発現誘導と Ser166 部位のリン酸化による活性化、またそれによって引き起こされる p53 の発現抑制がみられた。

(2) ウエスタンブロットの結果より、低 MOI 条件下での *P. gingivalis* OMZ314 感染が歯肉上皮細胞の p53 を顕著に抑制することが明らかとなったため、次に多機能分子 p53 が有するもうひとつの重要な役割である、代謝に及ぼす影響についての検討を行った。

得られたメタボロームデータについて、主成分分析および階層化クラスタリング (HCA) 解析を実施したところ、MOI=10 の条件にて *P. gingivalis* OMZ314 株に感染させた歯肉上皮細胞において、感染後 1 2-4 時間の時点で解糖系の顕著な亢進が認められた。p53 の機能不全に陥っている癌細胞においても、ワールブルク効果と呼ばれる同様の現象がみられることから、*P. gingivalis* 感染細胞における癌化リスク亢進の可能性が示された。

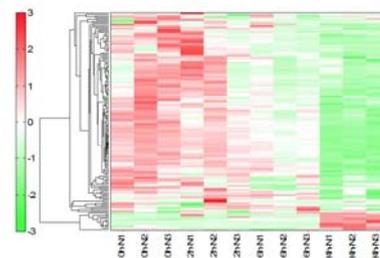
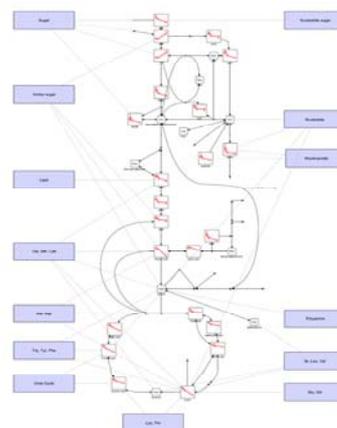


図 2 HCA 結果 (HeatMap 表示)

縦軸はサンプル名、横軸はヒートマップ。ヒートマップに対して HCA を実施し、ヒートマップの縦軸は図中の縦軸で表している。色が濃いほど平均よりも小さいことを示し、色が薄いほど平均よりも大きいことを示す。



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4件)

- ① Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S, Tohnai I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, Amano A, Okanoue T, Ooshima T, Nakajima A. (2012) Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. BMC Gastroenterol 12: 16.(査読有)
- ② Kuboniwa M, Inaba H, Amano A. (2010) Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. Periodontol 2000 54: 136-59. (査読有)
- ③ Kuboniwa M, Lamont RJ. (2010) Subgingival biofilm formation. Periodontology 2000 52:38-52. (査読有)
- ④ Tanaka M, Toe M, Nagata H, Ojima M, Kuboniwa M, Shimizu K, Osawa K, Shizukuishi S. (2010) Effect of eucalyptus-extract chewing gum on oral malodor: a double-masked, randomized trial. Journal of Periodontology 81:1564-1571. (査読有)

[学会発表] (計20件)

- ① 久保庭雅恵, 橋野恵衣, Alghamdi Samar, 長洋, 天野敦雄, エリスリトールが *Porphyromonas gingivalis* のメタボロームに及ぼす影響、日本農芸化学会大会2012、2012.3.23、京都女子大学、京都
- ② 久保庭雅恵、口腔感染症研究への“マルチオミクス”の応用～現状と可能性～、口の難病プロジェクトアニュアルシンポジウム、2012.3.9、大阪大学歯学研究科弓倉記念ホール、大阪
- ③ 久保庭雅恵、天野敦雄、マルチオミクスによる口腔感染症の分子基盤解析、学術フロンティア推進事業シンポジウム 歯周病による動脈硬化、糖尿病、低体重児出産の誘発機序の解明とその制御、2012.2.18、日本大学松戸歯学部、千葉

- ④ 久保庭雅恵、予測医歯学への“マルチオミクス”の応用～現状と可能性～、大阪府病院診療所歯科部長会第3回研修会、2011.12.3、ホテルモントレ大阪、大阪
- ⑤ 橋野恵衣、久保庭雅恵、黒田裕美子、前田和彦、小島美樹、永田英樹、天野敦雄メタボロミクス解析によるエリスリトール存在下での *Porphyromonas gingivalis* 代謝プロファイルの検討、第60回日本口腔衛生学会・総会、2011.10.10、日本大学松戸歯学部、千葉
- ⑥ 前田和彦、久保庭雅恵、小島美樹、黒田裕美子、橋野恵衣、東江正裕、永田英樹 *Porphyromonas gingivalis* GAPDH は *Streptococcus oralis* GAPDH に特異的に結合する、第60回日本口腔衛生学会・総会、2011.10.9、日本大学松戸歯学部、千葉
- ⑦ Hashino E, Kuboniwa M, Amano A., Metabolome profiles in *Porphyromonas gingivalis* under erythritol stress., The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2011.10.8, Hiroshima
- ⑧ 久保庭雅恵、Alghamdi Samar、橋野恵衣、天野敦雄、パラアミノ安息香酸による *Porphyromonas gingivalis* の菌体内メタボロームプロファイルの変化、第53回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2011.10.2、長良川国際会議場、岐阜
- ⑨ 前田和彦、永田英樹、小島美樹、久保庭雅恵、天野敦雄 *Porphyromonas gingivalis* のリンゴ酸デヒドロゲナーゼはバイオフィルム形成に関与する、第22回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、2011.10.2、徳島。
- ⑩ 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, Vienna (Austria).
- ⑪ Kuboniwa M, Kuroda Y, Hashino E, Alghamdi S, Hackett M, Lamont RJ, Amano A., Metabolome profiles in *Streptococcus gordonii* co-cultured with *Porphyromonas gingivalis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.10, Sapporo,

Japan

- ⑫ Maeda K, Nagata H, Kuboniwa M, Ojima M, *Porphyromonas gingivalis* NAD-dependent glutamate dehydrogenase binds to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis*., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.10, Sapporo, Japan
- ⑬ Yamaguchi M, Noiri Y, Kuboniwa M, Maezono H, Yamamoto R, Asahi Y, Kuremoto K, Ebisu S., Remnant matrix of *Porphyromonas gingivalis* biofilms treated with chlorhexidine., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.9, Sapporo, Japan
- ⑭ 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, 2011.7.29, Caines, Australia
- ⑮ 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」第3回班会議、2011.6.1、鳥羽シーサイドホテル、三重
- ⑯ Kuboniwa M, Chawla A, Hashino E, Nagata H, Amano A, Hackett M, Lamont RJ, Shizukuishi S. Role of 4-aminobenzoate in interspecies communication. 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2010.7.15, Barcelona, Spain
- ⑰ Hashino E, Kuboniwa M, Iwasaki M, Yamamoto Y, Suematsu K, Cho H, Shizukuishi S., Effect of erythritol on periodontopathic biofilm development., 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2010.7.15, Barcelona, Spain
- ⑱ Yamaguchi M, Noiri Y, Kuboniwa M, Maezono H, Yamamoto R, Asahi Y, Ebisu S., Exopolysaccharide accumulation and antimicrobial effect in *Porphyromonas gingivalis* biofilm., 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2010.7.15, Barcelona, Spain

- ⑲ Lamont RJ, Verma R, Bainbridge B, Demuth D, Kuboniwa M, Yehia B, Eastman C, Rivera M, Bhattacharyya I, Kesavalu L., In vivo Interaction of *P. gingivalis* with *S. gordonii* in Periodontal Disease., 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2010.7.14, Barcelona, Spain
- ⑳ Hackett M, Lamont RJ, Kuboniwa M, Hendrickson E, Xia Q, Wang T, Beck DAC., Proteomics of a Model Oral Microbial Community., 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2010.7.14, Barcelona, Spain

[その他]
ホームページ等
<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~prevent/research04.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保庭 雅恵 (KUBONIWA MASAE)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：00303983

(2) 研究分担者

小島 美樹 (OJIMA MIKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：20263303

(3) 連携研究者

関根 伸一 (SEKINE SHINICHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：70506344