

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592764

研究課題名(和文) 歯周病の慢性化につながる歯周病菌の細胞外脱出の解明

研究課題名(英文) Exit of intracellular Porphyromonas gingivalis from gingival epithelial cells is associated with chronic periodontal disease

研究代表者

森崎 市治郎 (Morisaki, Ichijiro)

大阪大学・歯学部附属病院・教授

研究者番号：30116115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原因菌のPorphyromonas gingivalis(以下P.g.)は歯周病の主要な病原因子として報告されている。P.g.はエンドサイトーシスを介して細胞内に侵入し、多様な細胞機能傷害を引き起こす。しかし、P.g.の細胞内動態については未解明な部分が多い。近年我々は、P.g.が細胞内殺菌機構から逃れるためにリサイクリング経路と呼ばれる細胞内輸送経路を利用し、細胞外脱出と細胞への再侵入を繰り返すことで歯周病の慢性化を引き起こす可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis has been reported to be a main factor for periodontitis. P. gingivalis enters cells by the endocytosis and damages to various cell functions. Nevertheless, intracellular traffic of P. gingivalis is largely unknown. Recently, We found that P. gingivalis utilizes endocytic recycling pathway for their survival from intracellular mechanism of killing bacteria, and the organisms exit from infected cells and re-enter neighbouring cells, which may cause persistent infection.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：Porphyromonas gingivalis エンドサイトーシス オートファジー 歯周病

1. 研究開始当初の背景

Porphyromonas gingivalis の臨床的重要性と研究課題

申請者らは2010年に、歯肉上皮細胞に侵入した *Pg* が宿主細胞の殺菌機構を逃れ細胞外へ脱出し、別細胞へ再感染することを明らかにした (Takeuchi *et al.*, submitted to *Cell Microbiol*).

申請者の研究室による分子免疫学的調査で、健康者成人、ダウン症候群患者、知的障害者、糖尿病患者のいずれにおいても、歯周炎患者から *Pg* が最高頻度で検出された (Amano *et al.*, *J Clin Microbiol*, 1999, 他5編)。また、抗てんかん薬誘発性歯肉肥大と *Pg* との関連も認められた (Akiyama *et al.*, *Oral Dis*, 2006)。

この *Pg* が発見された 1979 年から 2010 年までの間に 3300 件以上の *Pg* 研究論文が発表されており、世界中で活発に研究が行われている。しかし、基礎研究において未解明のことが多く残されており、また歯周病治療への寄与に関しても検討することが多い。

2. 研究の目的

上記より、*Pg* はオートファジーを中心とした細胞内防御機構を回避し、感染の拡大・歯周病の慢性化を図ると申請者は推測している。細胞内に侵入した *Pg* を細胞内消化器官へ運ぶのか、または細胞外へ運ぶのか、を選別する機構が存在し、*Pg* がこの選別機構を利用し細胞外脱出を図っている可能性がある。

そこで細胞内小胞輸送における膜の融合に関与するとされる SNARE タンパク質群に焦点を当てる (Hong W., *Biochim Biophys Acta*, 2005)。同定したタンパク質について、*Pg* を含む小胞が細胞内消化器官と融合するのか、もしくはリサイクリングを担う器官と融合するのか、これらの関連を生化学的・細胞生物学的・細菌学的見地から解析し、*Pg* の細胞内動態・宿主細胞応答を調べる予定であ

る。

3. 研究の方法

本研究計画では *Pg* の細胞外脱出過程や、脱出を選別する機能分子解析などの未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、さらに得られた知見を歯周病治療へと役立てるための研究基盤を確立する。

(1) *Pg* の初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへの移動に係わる宿主細胞の機能分子の同定

(2) リサイクリング経路に関わる *Pg* と結合する宿主細胞の受容体の探索

(1)

Pg が宿主細胞の殺菌機構を逃れ、どのように初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへ移動するのか、を解明する。方法としては、宿主細胞内の輸送小胞の融合に係わるとされる SNARE タンパク質に焦点を当て、RNAi 法によるノックダウン法を用い、宿主細胞因子のスクリーニングを行う。細胞外に脱出した *Pg* は、コロニー・フォーメーション・アッセイにより算出する。これにより、細胞外に脱出した *Pg* に多寡が認められる候補因子を明らかにする。

上記により同定した宿主細胞の候補因子について、蛍光蛋白質との融合タンパク質を作製し形質転換した歯肉上皮細胞に *Pg* を感染させ共焦点顕微鏡により *Pg* の宿主細胞内動態を観察する。侵入した *Pg* との共局在を示す因子があれば、その宿主細胞因子の変異体を作成し歯肉上皮細胞に形質転換する。野生型と変異型を比較し、*Pg* とリサイクリングエンドソームとの共局在率の減少がみられる因子を同定する。

(2)

インテグリンを含む宿主細胞の受容体について抗体を用いて免疫染色を行い、リサイクリングエンドソームに存在する *Pg* と染色

像が重なるかどうかを共焦点顕微鏡で調べる。共局在が認められた受容体について、歯肉上皮細胞で RNAi 法を使い受容体の発現を阻害することによって、宿主細胞内から細胞外へ脱出した *Pg* 生菌数をコロニー・フォーメーション・アッセイで定量する。これにより、リサイクリング経路に關与する *Pg* 結合受容体を同定する。

4. 研究成果

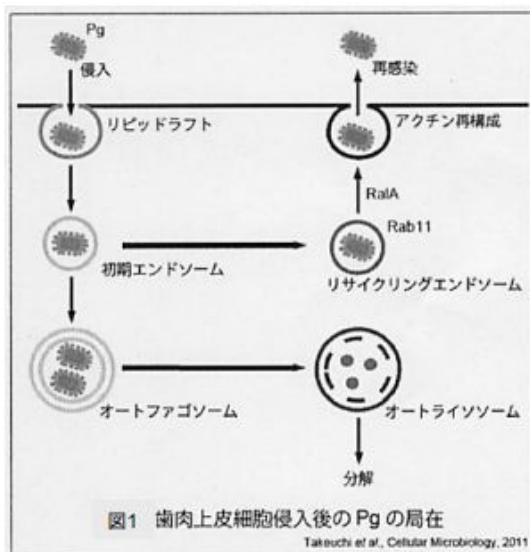
(1)

歯肉上皮細胞に侵入した *Pg* が、リサイクリングエンドソームのマーカである Rab11、およびリサイクリングに必要なアクチン再構成に關わる RaIA と共局在を示すことを明らかにした。

(2)

オートファゴソームのマーカである LC3 と *Pg* が共局在を示すこと、またライソソームのマーカである Lysosome-associated membrane protein 1(LAMP1)、LC3 と *Pg* が共局在を示すことを見出した。

これらの結果より *Pg* の細胞内動態を、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム、オートファゴソーム、およびライソソーム/オートライソソームの4つのパターンに分類した。(図1)



(3)

Pg 歯肉上皮細胞のサイトカインの一種である Interleukin-8(IL-8)産生を抑制する機構の一端を明らかにした。IL-8 は炎症性サイトカインの刺激により白血球を含む多くの細胞から産生される白血球遊走因子の1つである。*Pg* は歯肉上皮細胞に侵入後 IL-8 の産生を抑制することで *Pg* が局所に留まり、好中球の遊走を阻害している可能性がある。

また *Pg* が産生するセリンフォスファターゼ SerB が、歯肉上皮細胞による IL-8 産生阻害において重要な役割を果たすことを見出した。

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5件)

2013

Inaba H, Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, Morisaki I, Lamont RJ, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. Cell Microbiol. (査読あり) Sep 2. 2013

Takeuchi H, Hirano T, Whitmore SE, Morisaki I, Amano A, Lamont RJ. The serine phosphatase SerB of *Porphyromonas gingivalis* suppresses IL-8 production by dephosphorylation of NF- κ B RelA/p65. *PLoS Pathog.* (査読あり) 9(4), 2013

2012

Murakami J, Terao Y, Morisaki I, Hamada S, Kawabata S. Group A Streptococcus Adheres to Pharyngeal Epithelial Cells with Salivary Proline-rich Proteins via GrpE

Chaperone Protein. *J Biol Chem.* (査読あり)287: 22266-75, 2012.

森崎市治郎. (総説)【日中障害者歯科医療の現状】日本における障害者の歯科医療. *日中医学* 27巻1号, 5-10, 27-31. 2012

2011

Takeuchi H, Furuta N, Morisaki I, Amano A. Exit of intracellular *Porphyromonas gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. *Cell Microbiol.* (査読あり)13: 677-691, 2011.

〔学会発表〕(計7件)

藤川 順司, 転写因子 Klf4 の骨格発生における役割解析, 第 30 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2013/10/12-13, 神戸, 障害者歯科 34 巻 3 号: 330.

齋藤 知子, ヒト歯肉由来線維芽細胞における ATP および炎症性サイトカイン発現に対するニフェジピン添加の影響, 第 30 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2013/10/12-13, 神戸, 障害者歯科 34 巻 3 号: 326.

堤 香奈子, *Porphyromonas gingivalis* に対する太陽電池を付与した音波振動式 TiO₂(酸化チタン)光触媒の殺菌効果, 第 30 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2013/10/12-13, 神戸, 障害者歯科 34 巻 3 号: 319.

杉田 英之, *Streptococcus mutans* に対する太陽電池を付与した音波振動式 TiO₂(酸化チタン)光触媒の殺菌効果, 第 29 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2012/9/30, 札幌, 障害者歯科 33 巻 3 号: 571.

村上 旬平, 歯肉線維芽細胞への *Porphyromonas gingivalis* 付着・侵入におけるニフェジピン添加の影響, 第 29 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2012/9/29, 札幌, 障害者歯科 33 巻 3 号: 295.

田中 健司, ダウン症候群患者の歯周疾患に対する Er:YAG レーザーの臨床的および細菌学的検討, 第 29 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2012/9/29, 札幌, 障害者歯科 33 巻 3 号: 294.

杉田英之, 歯肉上皮細胞 p53 タンパクへの *Porphyromonas gingivalis* 感染の影響, 第 28 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2011/11/6, 福岡, 障害者歯科 32 巻 3 号: 458

〔図書〕(計5件)

森崎市治郎, クインテッセンス出版.: 乳歯における亜脱臼. 乳歯列期における外傷歯の診断と治療. 第2版. P2-3. 2013.

森崎市治郎, 朝倉書店. 東京.: 障害を有する患者の歯科治療. 障害者歯科の包括的診療. P25-30. 2. 障害者歯科の行動管理と治療. P30-33. 口腔科学. 戸塚靖則, 高戸毅監修, 2013.

森崎 市治郎. 一般財団法人 口腔保健協会. 東京. 骨形成不全症. 口から診える症候群・病気. pp.58-59. 総 244 ページ. 2012 年 10 月.

森崎市治郎. デンタルダイヤモンド社. 東京. 小児の歯科治療で注意すべき全身疾患と問題点. 小児歯科は成育医療へ 今を知られば未来がわかる. pp.116. 総 224 ページ.. 2011 年 3 月.

Morisaki I, Quintessence Publishing Co.,Ltd. Oral care for patients with flexion and turn disorders of the neck. Manual for oral care The Japanese Society of Oral Care. pp.163-165.348 pages. October 1, 2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

森崎 市治郎 (MORISAKI, Ichijiro)
大阪大学歯学部附属病院・教授
研究者番号: 30116115

(2)研究分担者

秋山 茂久 (AKIYAMA, Shigehisa)
大阪大学歯学部附属病院・准教授
研究者番号: 00283797

村上 旬平 (MURAKAMI, Jumpei)
大阪大学歯学部附属病院・助教
研究者番号: 70362689