

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792149

研究課題名（和文） 心血管系疾患に影響を及ぼす歯周病原性細菌のクオラムセンシング機構解析

研究課題名（英文） Investigate of the quorum sensing by which cardiovascular disease are influenced by periodontopathic bacterium infection

研究代表者

沖永 敏則 (OKINAGA TOSHINORI)

九州歯科大学・歯学科・感染分子生物学分野・助教

研究者番号：60582773

研究成果の概要（和文）：歯周病原性細菌が心筋梗塞の病変部位から検出され、その発症に深く関与していると報告されていることから、歯周病原性細菌による心筋梗塞の発症メカニズムについて、様々な報告がなされている。SOCS（サイトカインシグナル抑制因子）は、炎症の制御機構に大きな役割を果たしていることが報告されている。歯周病は、歯周病原性細菌感染により誘導される炎症反応であることから、SOCS 分子に注目した。我々は、歯周病原性細菌感染マクロファージにおいて、細胞周期停止が誘導されることを解明している。そこで、我々が開発した感染実験系において、SOCS の炎症応答に対する反応について検証を行ったところ、SOCS 強発現細胞において、歯周病原性細菌が誘導する細胞周期停止が解除された。さらに、分子生物学的および遺伝工学的な手法を用いて詳細な解析を加えた。

研究成果の概要（英文）：Atherosclerosis shows a chronic inflammatory process initiated by the recruitment of monocyte-derived macrophage into the sub-endothelial arterial space. Chronic bacterial infections, including periodontitis, are associated with an increased risk of coronary heart diseases. Periodontitis is a chronic inflammatory disease infected with a gram-negative periodontopathic bacterium, such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. We previously reported that infection of murine macrophages in vitro with the periodontopathic bacterium *A. actinomycetemcomitans* induced cell cycle arrest during phase G1. In the present study, we investigated the role of suppressor of cytokine signaling (SOCS) in induction of the cell cycle in *A. actinomycetemcomitans*-infected macrophages. Our results indicate that intrinsic SOCS-3 normally activates the expression of cell cycle associated protein, while overexpression of SOCS-3 down-regulates p21 expression in infected RAW 264.7 cells, suggesting that SOCS-3 has dexterous effects to regulate the cell cycle in macrophages infected with periodontopathic bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学

キーワード：免疫・感染・炎症

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

近年の介入研究におけるシステマチックレビューの結果から、歯周治療は全身的な炎症症状と血管内皮への障害を軽減することが示唆されていた。また、高脂質食を与えた ApoE^{+/+} マウスに *Porphyromonas gingivalis* を感染させると細胞侵入や TLR2 および TLR4 を介した刺激を契機に、血管内皮に粥状斑が形成されることが報告されており、歯周病原性細菌が血管内皮局所に感染することで粥状斑の形成が誘導することが明らかになりつつある。しかし、歯周病原性細菌の感染により誘導される宿主応答が、どのように粥状斑の形成と結びつくのか、その詳細な分子メカニズムは未だ不明な点が多かった。

近年、細菌と宿主との相互作用をクオラムセンシングという視点で解析しようという研究が展開されるようになり、真核細胞が産生するペプチドやサイトカインが細菌の病原因子を担う遺伝子を制御していることが明らかになってきた。しかし、これまでのところ、歯周病原性細菌の全身疾患への関与についての研究は見られない。

SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) は JAK に会合し STAT 分子のリン酸化を阻害することで JAK/STAT シグナル伝達経路を遮断する分子として知られ、サイトカインや LPS などの受容体から送られる刺激により発現が誘導され、当該刺激を抑制するネガティブフィードバック因子として働く。さらに、その作用で、免疫反応の過剰な亢進をコントロールしていると考えられている。近年、粥状斑が形成される局所において SOCS1、SOCS3 の発現が誘導され、粥状斑形成の抑制に関与している可能性が示唆されており、SOCS の新しい機能として注目されていた。

2. 研究の目的

近年我々が開発した微小流路チップを用いた細胞環流培養システムで、血管内環境を *in vitro* で再現し、粥状斑形成に関与する因子をリアルタイムで評価する実験系を構築していく中で、我々は、SOCS 因子過剰発現細胞にて、歯周病原性細菌感染細胞に誘導される細胞周期停止が抑制されることを見出すことができた。そこで、細菌と宿主細胞の相互関係に注目し、これらのメカニズム解析を併せて行うことにした。今回の研究は、これまでのバイオフィーム感染症における細菌間のクオラムセンシングと全く異なる視点に立ち、歯周病原性細菌と宿主細胞間のク

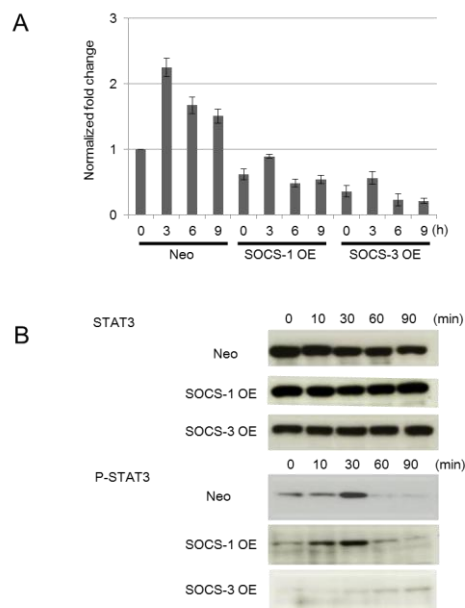
オラムセンシングという斬新的な概念で解析する方法を見据えた研究を目指す。

3. 研究の方法

歯周病原性細菌は、*A. actinomycetemcomitans* Y4 株を使用した。JAK に対する選択的チロシンキナーゼ阻害剤として AG490 を使用した。RAW 細胞と、*A. actinomycetemcomitans* Y4 株の感染実験では、細菌と細胞の比率を 500:1 に調整した菌液を添加し、遠心後、抗生剤含有メディウムで Wash し、インキュベートした。感染細胞の細胞周期は、PI 染色を使用したフローサイトメータにて解析を行った。タンパクの発現についてはウエスタンブロッティング解析と ELISA、遺伝子発現の解析はリアルタイム RT-PCR 解析を行いました。

4. 研究成果

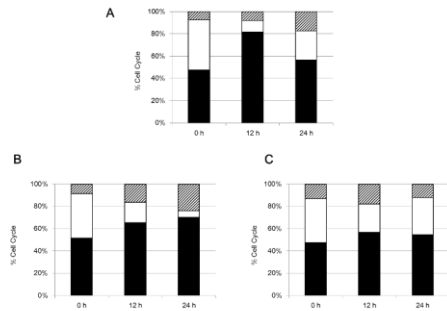
まず、SOCS 過剰発現細胞を作成した。SOCS の遺伝子およびタンパクレベルでの発現を確認したのち、標的因子 *jak2* について検証を加えた。歯周病原性細菌感染にて 3 時間で



jak2 遺伝子発現の上昇を確認した。一方で、SOCS 過剰発現細胞では、発現は抑制されていた。さらに、JAK-STAT シグナル経路に関与する転写因子 STAT について WB 解析を行った。感染後 30 分で、コントロール細胞並びに SOCS-1 強発現細胞株においてリン酸化の著明な上昇を認めたが、SOCS-3 強発現細胞株においては、リン酸化は検出されなかった。このようなキャラクターをもつ細胞株にて *A. actinomycetemcomitans* 感染がどのようにア

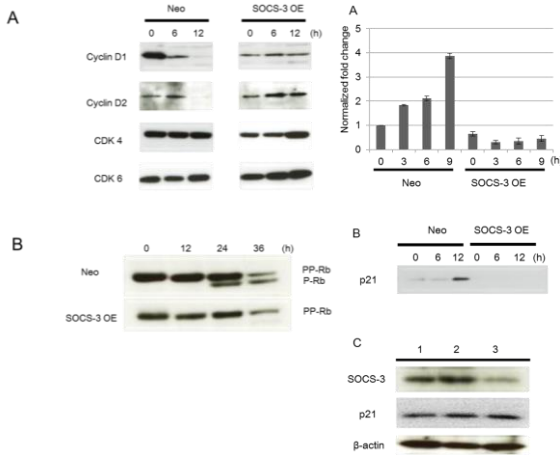
ポトーシスを誘導するかについて検証しました。

次に細胞周期について FACS 解析 (下図) を行った。歯周病原性細菌感染細胞では、感



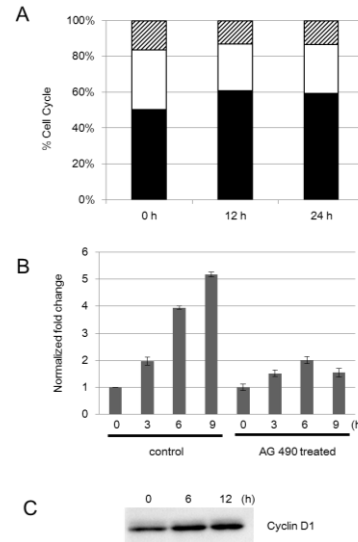
染後 12 時間で G1 期停止が認められるが、SOCS3 過剰発現細胞株においては、誘導されないことが明らかになった。

次に、細胞周期停止に関与するタンパクの発現について解析を加えたところ、SOCS3 過剰発現細胞株において、感染細胞ではタンパク発現が認められなかった。



以上のように、SOCS3 過剰発現は、歯周病原性細菌感染が誘導する細胞周期停止を抑制し、さらに関連因子の発現を抑制することが明らかになった。このことから、SOCS が何らかの抑制メカニズムを持っていることが示唆された。しかし、我々の研究では、SOCS は、歯周病感染によって発現がそれほど強く促されていないことが明らかになっているため、SOCS の抑制ターゲットである Jak2 に注目した。まず、Jak2 インヒビターである AG490 を前処理した、歯周病原性細菌にて感染実験を行ったところ、細胞周期に著明な動きを認めなかった。さらに、細胞周期関連因子である p21 発現の抑制、cyclinD の分解抑制が認められた (下図)。以上より、歯周病原性感染細胞にて誘導される細胞周期停止に、JAK-STAT シグナル経路が、関与していることが示唆された。

歯周病原性細菌感染による歯周病の発症メカニズムに関して、さらに分子生物学的観



点から解析を加え、細菌側のクオラムセンシング機構の解析も進めていくことで、全身疾患にも影響する歯周病原性細菌の感染に対する予防策について新たな知見が得られると確信している。

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 2 件)

- 1) Morishita M, Ariyoshi W, Okinaga T, Usui M, Nakashima K, Nishihara T. A. actinomycetemcomitans LPS Enhances Foam Cell Formation Induced by LDL. J Dent Res. 2013 Mar; 92(3): 241-6.
- 2) Okinaga T, Ariyoshi W, Akifusa S, Nishihara T. Essential role of JAK/STAT pathway in the induction of cell cycle arrest in macrophages infected with periodontopathic bacterium Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Med Microbiol Immunol. 2013;202(2):167-74

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 沖永敏則、有吉渉、秋房住郎、西原達次 歯周病細菌感染アポトーシス誘導モデルにおける SOCS の調節メカニズム 第 53 回歯科基礎医学会 10 月 岐阜 2011 年
- 2) 守下昌輝、中島啓介、沖永敏則、有吉渉、西原達次 LPS で刺激した RAW264.7 細胞の凝集形成におけるリポタンパク質の影響について 第 53 回歯科基礎医学会 10 月 岐阜 2011 年
- 3) Morishita M., Nakashima K., Okinaga T., Ariyoshi W., Nishihara T. Effects of Lipopolysaccharide and lipoprotein on the plaque formation of murine

macrophages. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, JAPAN.

4) 守下昌輝、沖永敏則、有吉渉、西原達次 Streptococcus sanguinis のマクロファージへの付着に関わる分子について 第65回日本細菌学会九州支部総会 8月 沖縄 2012年

5) 沖永敏則、有吉渉、西原達次 歯周病原性細菌はマクロファージにおける pyroptosis を誘導する 第54回歯科基礎医学会 9月 郡山 2012

6) T Okinaga, W Ariyoshi, T Nishihara. The involvement of inflammasome in mouse macrophage infected with Aggregatibacter actinomycetemcomitans Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2013 International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu Kyushu Dental University, Kitakyushu, Japan 26th “2013

7) 沖永敏則、有吉渉、西原達次 歯周病原性細菌マクロファージのピロトーシス誘導におけるインフラマソームの役割 第86回日本細菌学会総会 3月 幕張 2013年

[図書] (計1件)

沖永敏則、西原達次著 文献と臨床の橋わたし 歯周炎におけるマクロファージの機能の多様性 「第2回 マクロファージにおける炎症応答でのインフラマソームの役割」日本歯科評論 ヒョーロン出版 2012年

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖永 敏則 (OKINAGA TOSHINORI)
九州歯科大学・歯学科・
感染分子生物学分野・助教

研究者番号：60582773

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし