

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659840

研究課題名(和文) ライブイメージングによる歯周病細菌の心血管系組織定着機構の解明

研究課題名(英文) Mechanistic analysis of periodontal bacteria attached on cardiovascular tissues by live-imaging

研究代表者

筑波 隆幸 (Tsukuba, Takayuki)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30264055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病細菌である*P.gingivalis*のライブイメージングについて、ヒト大動脈内皮細胞を用いて観察を行った。同菌は細胞内で6～8時間観察できたが、18時間から24時間後には蛍光が検出できなくなった。この間にリソソームへ輸送され分解されたと考えられる。

次に、マウスを用いてライブイメージングを行った。動脈分岐部や細い血管では、*P.gingivalis*が付着する様子が観察できた。さらに動脈硬化モデルであるApoE欠損マウスでは、*P.gingivalis*の血管への付着が増大したことから、血液中のコレステロールが細胞内への取り込みの際に、*P.gingivalis*と相互作用する可能性が推察された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed a fate of *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogen, with human aortic endothelial cells by live-imaging. We detected the bacteria within the cells for 6-8 hs, but failed to find them for 18-24 hs, indicating that the bacteria is probably transported to the lysosomes. Furthermore, we performed live-imaging of *P.gingivalis* using mice. We found that the bacteria attached on blood vessels of bifurcation area and thin vessels. In ApoE-deficient mice, which is a model for arterial sclerosis, the attachment rate of the bacteria was increased. These results indicate that cholesterol in the blood probably interacts with *P.gingivalis* during endocytosis.

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：ライブイメージング 歯周病細菌

1. 研究開始当初の背景

歯周病が感染性心内膜炎、アテローム性動脈硬化症などの心血管系疾患の増悪に関与していることは多くの研究がある。我々の研究グループは、歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* を用いて、アテローム性動脈硬化症モデルである ApoE 欠損マウスに関して、動脈管索の組織化学的解析と血清蛋白質の変化について報告した (Hashimoto et al. J Biochem. 2006.) さらに、ヒト大動脈内皮細胞を用いて、同菌が貪食された後、リソソームでの分解から逃れ、オートファジーシステムを利用して細胞内に寄生する新しいメカニズムを世界に先駆けて報告した (Yamatake et al. Infect. Immun. 2007)。

2. 研究の目的

本研究では、共焦点蛍光顕微鏡ならびに多光子励起顕微鏡を用いたライブイメージング解析により、蛍光タンパクを発現した歯周病菌がどのように血管内に侵入し、どのような影響を及ぼすのかに関して解析を行うことを目標にした。具体的にはヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells) HAOEC を用いた *in vitro* 解析で多光子励起顕微鏡観察を行う。次にマウス個体を用いたバイオイメージング解析として、血管あるいは心臓への歯周病菌の付着に関してバイオイメージング解析を行うことを目標にした。

3. 研究の方法

(1) HAOEC を用いた培養細胞系を用いてリポーター実験を行った。具体的方法としては、緑色発色する GFP を発現させた *P.gingivalis* の作製を試みた。次に、*P.gingivalis* を蛍光染色できる BacteriSense™ (パーキンエルマー社) を用いて蛍光染色を行った。

(2) マウス個体を用いたバイオイメージング解析として、動脈硬化モデル ApoE 欠損マウスによる多光子励起顕微鏡観察により、血管あるいは心臓への歯周病菌の付着に関してバイオイメージング解析を行なった。

4. 研究成果

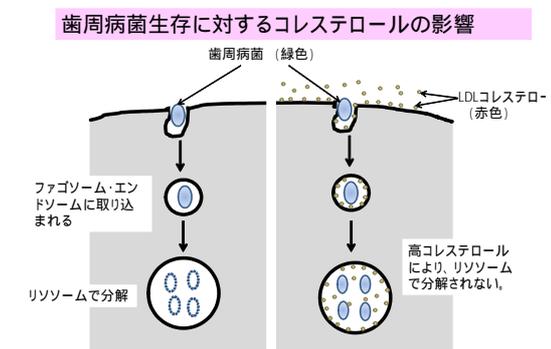
(1) *P.gingivalis* に GFP タンパク質を発現させたところ、十分な蛍光強度が得られなかった。これは菌体内の還元状態が強いために、GFP の蛍光ができなかったためと考えられる。また GFP よりも蛍光強度が強いとされる EGFP なども用いたが、実験に使える蛍光強度を発現した *P.gingivalis* を得ることができなかった。当初、菌体内で発光する *P.gingivalis* の構築ができると考えていたが変更せざる

を得なくなった。

次に、菌体内ではなく細胞表面での発光する実験系を構築した。具体的には、*P.gingivalis* の細胞壁を蛍光染色できる BacteriSense™ (パーキンエルマー社) を用いて蛍光染色を行ったところ、適度な強度が得られ解析を行った。HAEC に関して細胞数 1×10^5 個に対して *P.gingivalis* (1×10^9 個) を 20 分間インキュベーションを行い、取り込まれた細菌の蛍光強度が観察できた。細胞内の局在は最初の 2 時間はエンドゾームに局在したがその後はリソソームに局在することが分かった。18 時間から 24 時間後には蛍光が検出できなくなったことから、この時間経過で、*P.gingivalis* の分解が進んだと考えられる。

(2) マウスを用いたバイオイメージング解析として、正常マウスと動脈硬化モデル ApoE 欠損マウスを用いて、多光子励起顕微鏡観察を行った。BacteriSense™ 染色を行った *P.gingivalis* (1×10^8 個) を尾静脈から投与して、30 分から 2 時間の間、動脈に付着する *P.gingivalis* の様子を観察した。血流量が多い動脈には付着はできないが、分岐部や細い血管では、*P.gingivalis* が付着する様子が観察できた。

さらに、正常マウスに比べて、動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスでは、*P.gingivalis* の血管への付着が有意に増大した。これらの結果から、ApoE 欠損マウスの血液コレステロールが細胞内への取り込みの際に、*P.gingivalis* と相互作用して、細胞表面への接着やその後の細胞内へエンドサイトーシスされる割合が増大した可能性、あるいはリソソーム内での分解が減少する可能性が推察される (下図参照)。現在のところ、画像の解像度が充分とは言えないために、論文報告するには、今後さらに最適な条件を決定する必要がある。



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 13 件)

Kadowaki T, Kido MA, Hatakeyama J, Okamoto K, Tsukuba T, Yamamoto K. : Defective adipose tissue development associated with hepatomegaly in cathepsin E-deficient mice fed a high-fat diet. **Biochem Biophys Res Commun.** 446, 212-217 2014 査読有

Kawakubo T, Yasukochi A, Toyama T, Takahashi S, Okamoto K, Tsukuba T, Nakamura S, Ozaki Y, Nishigaki K, Yamashita H, Yamamoto K. Repression of cathepsin E expression increases the risk of mammary carcinogenesis and links to poor prognosis in breast cancer. **Carcinogenesis.** 35(3):714-726. 2014 査読有

Yamaguchi Y, Sakai E, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T. : Inhibitory effects of tert-butylhydroquinone on osteoclast differentiation via up-regulation of heme oxygenase-1 and down-regulation of HMGB1 release and NFATc1 expression. **J Appl Toxicol.** 34(1):49-56. 2014 査読有

Sakai E, Shimada-Sugawara M, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Fisetin Inhibits Osteoclastogenesis Through Prevention of RANKL-Induced ROS Production by Nrf2-Mediated Upregulation of Phase II Antioxidant Enzymes. **J Pharmacol Sci.** 121(4): 288-298, 2013 査読有

Nishishita K, Sakai E, Okamoto K, Tsukuba T: Structural and phylogenetic comparison of napsin genes: The duplication, loss of function and human-specific pseudogenization of napsin B. **Gene** 517(2): 147-157, 2013 査読有

Tsukuba T, Yanagawa M, Kadowaki T, Takii R, Okamoto Y, Sakai E, Okamoto K, Yamamoto K: Cathepsin E deficiency impairs autophagic proteolysis in macrophages. **PLoS One** 8(12): e82415, 2013 査読有

Yamamoto K, Kawakubo T, Yasukochi A, Tsukuba T.: Emerging roles of cathepsin E

in host defense mechanisms. **Biochim Biophys Acta.** 1824 (1), 105-112, 2012 査読有

Tsukuba T, Okamoto K, and Yamamoto K.: Cathepsin E is critical for proper trafficking of cell surface proteins. **J Oral Biosci.** 54, 48-53, 2012. 査読有

Sakamoto H, Sakai E, Fumimoto R, Yamaguchi Y, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Deltamethrin inhibits osteoclast differentiation via regulation of heme oxygenase-1 and NFATc1. **Toxicol. in Vitro**, 26, 817-822, 2012 査読有

Fumimoto R, Sakai E, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: The Coffee Diterpene Kahweol Prevents Osteoclastogenesis via Impairment of NFATc1 Expression and Blocking of Erk Phosphorylation. **J. Pharmacol. Sci.** 118(4): 479-486, 2012 査読有

Narahara S, Matsushima H, Sakai E, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Genetic backgrounds and redox conditions influence morphological characteristics and cell differentiation of osteoclasts in mice. **Cell. Tissue Res.** 348(1): 81-94, 2012. 査読有

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

Sakai E, Shimada-Sugawara M, Nishishita K, Fukuma Y, Naito M, Okamoto K, Nakayama K, Tsukuba T: Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. **J. Cell. Biochem.** 113(2):486-98, 2012 査読有

[学会発表](計 18 件)

Yashima Y, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K. and Tsukuba T. :Cobalt protoporphyrin prevents osteoclastogenesis via blocking of I B phosphorylation 第 87 回日本薬理学会年会 仙台 2014 年 3 月

Sakai E., Iwatake M., Fukuma Y., Nishishita K. Okamoto K., Tanaka T., and

Tsukuba T.: Chemical constituents from *sanguisorba officinalis* inhibits osteoclastogenesis 第 87 回日本薬理学会年会 仙台 2014 年 3 月

西下一久, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: アスパラギン酸プロテアーゼナプシンの系統樹解析と生化学的解析 - 遺伝子重複、偽遺伝子化と機能喪失, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013 年 12 月
福間裕, 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: カフェストールによる破骨細胞分化抑制作用, 第 66 回日本薬理学会西南部会, 福岡, 2013 年 11 月

米嶋枝里香, 岡元邦彰, 坂井詠子, 岩竹真弓, 筑波隆幸, 吉田教明: 骨芽細胞の分化成熟におけるリソソーム性タンパク質の役割, 第 72 回日本矯正歯科学会大会, 松本, 2013 年 10 月

岩竹真弓, 坂井詠子, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞の分化抑制に関するザクロポリフェノールの作用メカニズムの解明, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013 年 9 月

坂井詠子, 岩竹真弓, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: *Sanguisorba officinalis* 由来化学成分の破骨細胞分化に対する影響, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013 年 9 月

内野加穂, 岡元邦彰, 坂井詠子, 福間裕, 岩竹真弓, 西下一久, 筑波隆幸: リクイリチゲニンの破骨細胞形成への効果 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013 年 9 月

Sakai E, Fukuma Y, Sugawara M, Nishishita K, Okamoto K., and Tsukuba T: Deficiency of Nrf2 accelerates osteoclastogenesis. 第 86 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 2013 年 9 月

Iwatake M, Sakai E, Okamoto K, Yoneshima E, Zaitu Y, Tanaka T, Tsukuba T: Suppressive effects of an oak extract on osteoclast formation and bone resorption. 第 86 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 2013 年 9 月

Fukuma Y, Sakai E, Sugawara Megumi, Yoneshima E, Nishishita K, Okamoto K, and Tsukuba T: Cafestol prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation. 第 86 回日本薬理学会, 福岡, 2013 年 3 月

Yoneshima E, Okamoto K, Sakai E, Yoshida N, and Tsukuba T: Up-regulation mechanisms of endosomal/lysosomal proteins during osteoblast differentiation. 第 86 回日本薬理学会, 福岡, 2013 年 3 月

Sakai E, Iwatake M, Tanaka T, Tsukuba T: Chemical constituents from *sanguisorba officinalis* inhibits osteoclastogenesis. 2nd International Conference on Pharma-Nutrition 2013, Singapore, 2013 年 4 月

Iwatake M, Sakai E, Tanaka T, Tsukuba T: Inhibitory effects of a polyphenol from oak on bone diseases. 2nd International Conference on Pharma-Nutrition 2013, Singapore, 2013 年 4 月

坂井詠子, 菅原めぐみ, 福間裕, 西下一久, 岩竹真弓, 米嶋枝里香, 岡元邦彰, 筑波隆幸: フィセチンは RANKL を介した ROS の産生と NFATc1 の発現を抑制することで破骨細胞分化を阻害する, 第 85 回日本生化学会大会合同大会, 福岡, 2012 年 12 月

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 回日本生化学会大会合同大会, 福岡, 2012 年 12 月

坂井詠子, 菅原めぐみ, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Fisetin の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 福島, 2012 年 9 月 14-16 日

福間裕, 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Cafestol の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 福島, 2012 年 9 月 14-16 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筑波 隆幸 (TSUKUBA Takayuki)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30264055

(2) 研究分担者

岡元 邦彰 (OKAMOTO Kuniaki)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10311846

坂井 詠子 (SAKAI Eiko)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10176612

(3) 連携研究者

なし