

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890066

研究課題名(和文) 歯周病原細菌刺激による細胞内クロストークがWnt5a発現に及ぼす影響

研究課題名(英文) Intracellular crosstalk in Wnt5a expression by periodontopathic bacteria

研究代表者

南原 弘美 (Nanbara, Hiromi)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：00632168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：Wntは組織の分化・発生と深く関わっているタンパクとして知られている。近年、Wntは炎症の組織破壊において重要な役割を果たすことが報告された。そこで我々は、歯周炎の発症過程を解明する為にWnt5aに焦点をおき、P.gingivalis LPS誘導のWnt5a遺伝子の発現メカニズムを検討した。

単球系細胞を用いてPI3K阻害剤にて前処理後、P.gingivalis LPSによる刺激を行ったところ、Wnt5a mRNA発現、I κ Bタンパク分解、NF κ Bの転写活性が有意に上昇し、PI3KはP.gingivalis LPS誘導のNF κ B活性およびWnt5a発現の負の調節因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling molecules play important roles in various disorders including cardiovascular diseases, rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Recent studies have suggested that Wnt5a signaling is essential for the general inflammatory response of human macrophages. However, little is known about the expression and modulation of Wnt homologs in periodontitis. Periodontopathic bacteria including P. gingivalis produce many virulence factors, such as lipopolysaccharide (LPS), and induce host responses.

In this study, we investigated the intracellular crosstalk in Wnt5a expression by P. gingivalis LPS. We used a pharmacological approach to examine PI3K involvement in Wnt5a induction. The results indicated that PI3K may be a negative regulator in P. gingivalis LPS-mediated NF κ B activation and Wnt5a expression.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：Wnt5a P. gingivalis 単球

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周炎は歯周病原細菌による慢性の炎症性疾患である。疾患の進行に伴い、歯肉の炎症・歯周組織の崩壊・歯槽骨吸収を引き起こし、抜歯の一番の原因となっている。歯周病原細菌はリポ多糖(LPS)やペプチドグリカンなど多くの毒性因子をもち、炎症性サイトカイン産生を含む宿主免疫反応を誘発する。進行性した歯周炎患者の歯周組織および歯肉溝滲出液からは、高レベルの IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、TNF- α などの炎症性サイトカインが検出される。これらの炎症性サイトカインは前破骨細胞表面のRANKに結合するRANKL産生を上昇させることが知られており、この結合により、破骨前駆細胞の分化を促進し、成熟破骨細胞が活性化され、歯槽骨吸収に至る。

(2) Wnt は組織の分化・発生と深く関わっている糖タンパクとして基礎研究が発展してきた。canonical Wnt シグナルは間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進し、そのシグナルを阻害する Dickkopf (DKK)は骨芽細胞形成を抑制することが報告されている。一方、non-canonical Wnt シグナルは、炎症反応におけるマクロファージの活性化に必要不可欠であることが報告され、さらに炎症性の組織破壊において重要な役割を果たすことが報告された。

(3) Wnt5a はマウスにおいて初めて同定され、活性化抗原提示細胞および関節リウマチの炎症性滑膜細胞より分泌されることが知られている。Wnt5a シグナルは敗血症におけるマクロファージの全身的な炎症性反応に不可欠であり、ヒト抗原提示細胞の Toll-like 受容体 (TLR) シグナル、および炎症性調節因子 NF- κ B に依存的である。さらに、慢性炎症および関節リウマチにおいて、IL-6 ファミリーが gp130-STAT3 シグナルカスケードを活性化し Wnt5a 転写を上昇させることも報告されている。

2. 研究の目的

歯周病原細菌感染から歯槽骨吸収に至るまでの分子メカニズムはほとんど明らかとなっていない。歯周炎の疾患進行においても、Wnt5a が重要な役割を果たしている可能性があるが、その役割については不明な点が多い。そこで組織破壊に関わる Wnt5a シグナルの歯周炎進行に与える影響を解明することを大きな目的とし、本研究では、歯周病原細菌 *P.*

gingivalis による Wnt5a 遺伝子の発現調節分子メカニズムを詳細に検討し、さらに発現された Wnt5a が他の歯周組織細胞にどのような影響を与えているのかを検討することにより、歯周炎疾患進行における新たな炎症メカニズムの解析を目指す。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* LPS による Wnt5a 発現における細胞内シグナル伝達の解析。これまでに申請者は単球系細胞における *P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a 発現は、TLR/NF- κ B を介す他、STAT1 によりその発現が増強することを報告した。これらの転写因子は細胞内でクロストークを行い、転写の活性あるいは抑制に作用することが報告されている。本研究では、STAT1 が NF- κ B 経路に及ぼす影響を調べるだけでなく、TLR 下流の他のシグナル経路についても検討を行う。

単球系細胞 THP-1 を用いて研究を行う。PI3K/Akt/mTOR(Wortmannin・LY294002・Rapamycin)、MAPK(JNK inhibitor II・U0126・SB203580)および STAT(Fludarabine・STA21)の各種阻害剤を用いてシグナル伝達を抑制し、歯周病原細菌刺激因子 *P. gingivalis* LPS にて刺激を行い、Wnt5a mRNA 発現変化を Real time RT-PCR 法にて解析する。

単球系細胞 THP-1 を用いて研究を行う。各阻害剤によりシグナル伝達を抑制し、*P. gingivalis* LPS にて刺激培養後、細胞内タンパク質を抽出する。ウエスタンブロッティングにより MyD88・TRAF6・IKK α/β ・I κ B α の細胞内タンパク量を測定、ソフトウェアを用いて定量し、その変化量を解析することにより、各シグナルが NF- κ B 経路に及ぼす影響を検討する。

ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、NF- κ B の転写活性の変化を検討する。

(2) Wnt5a の周囲歯周組織構成細胞へ及ぼす影響の解析。近年、Wnt5a は抗原提示細胞から発現し、Th1 細胞を活性化させ、獲得免疫系への移行に関与することが報告されている。また、Wnt5a は non-canonical 経路を介して炎症性サイトカインの発現を上昇させることも知られている。本研究では、単球/マクロファージから産生された Wnt5a が歯周病原細菌刺激によって、歯周組織構成細胞にどのように影響し、炎症反応を制御するのかを検討する。前年度に Wnt5a 発現に関与しているシグナル経路を解明しているため、その経路を遮断することによって、どのように免

疫炎症反応に影響を及ぼすのかを解析する。また、単球が自身の産生する Wnt5a にオートクラインに反応し、炎症反応を亢進しているかどうかを検討する。単球系細胞を用い、Wnt5a リコンビナント蛋白・*P. gingivalis* LPS により刺激を行い、サイトカイン産生の変化を検討する。また、Wnt5a siRNA にて Wnt5a のノックダウンを行い、*P. gingivalis* LPS 刺激を行い、オートクライン/パラクラインによる炎症性サイトカイン産生の変化を検討する。

T 細胞(Jurket 細胞)と単球系細胞(THP-1)を共培養し、Wnt5a siRNA 遺伝子導入および、前年度にみつけた Wnt5a 発現を抑制する経路の阻害剤を用いる。歯周病原細菌刺激には *P. gingivails* LPS を用いる。各種刺激後、上清を回収し、上清中の分泌蛋白質を ELISA 法にて測定する。測定項目は、Th1 サイトカインとして、IFN- γ および IL-12p40 を、Th2 サイトカインとして IL-10 を、Th17 サイトカインとして、IL-17A を、また炎症性サイトカインとして、IL-1 β 、IL-6、TNF- α を測定する。同様に Wnt5a のレセプターをブロックする抗 Fz5 抗体、抗 ROR2 抗体存在下にて、Wnt5a 発現を抑制する経路の阻害剤添加、*P. gingivalis* LPS 刺激を行い、IFN- γ 、IL-12p40、IL-10、IL-17、IL-23、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 産生量を ELISA 法にて測定する。

単球系細胞 THP-1 を用い、Wnt5a siRNA 遺伝子導入により Wnt5a をノックダウンし、*P. gingivalis* LPS 刺激を行う。培養後に上清を回収し、また細胞から mRNA の抽出を行う。上清中の IL-6・IL-1 β ・IL-8・TNF- α 産生量を ELISA 法にて測定し、Real time RT-PCR 法にて、同様の mRNA 発現の解析を行う。前年度に解析した Wnt5a 発現に影響を及ぼす阻害剤を添加し、サイトカイン産生に与える影響を、ELISA 法及び Realtime RT-PCR 法にて解析する。

4 . 研究成果

(1)THP-1 細胞を用いて、*P. gingivalis* LPS、刺激を行ったところ、RT-PCR 法にて Wnt5a mRNA 発現、ウエスタンブロット法にて I κ B α タンパクの分解が認められた。

(2)THP-1 細胞を用いて、PI3K インヒビター-Wortmannin および LY294002、mTOR インヒビター-Rapamycin、STAT3 インヒビター-STA21 にて 1 時間前処理後、*P. gingivalis* LPS および *E. coli* LPS にて刺激を行ったところ、Wortmannin により、*P. gingivalis* LPS 誘導の I κ B α 分解が促進、STA21 により、*E. coli* LPS

誘導の I κ B α 分解および *P. gingivalis* LPS 誘導の分解が促進した。

(3)THP-1 細胞を用いて、PI3K インヒビター-Wortmannin および LY294002、mTOR インヒビター-Rapamycin、STAT3 インヒビター-STA21 にて 1 時間前処理後、*P. gingivalis* LPS および *E. coli* LPS にて刺激を行ったところ、Wortmannin により、*P. gingivalis* LPS 誘導の Wnt5a mRNA 発現が上昇、*E. coli* LPS 誘導の Wnt5a mRNA 発現は Rapamycin により上昇し、STA21 により減少した。

(4)NF- κ B ルシフェラーゼレポータープラスミドを THP-1 細胞に遺伝子導入。18 時間後、PI3K インヒビター-Wortmannin および mTOR インヒビター-Rapamycin にて 1 時間前処理した後、*E. coli* LPS および *P. gingivalis* LPS にて 4 時間刺激、NF- κ B 転写活性を測定したところ、Wortmannin により、*P. gingivalis* LPS 誘導の NF- κ B 転写活性が上昇した。

(5) Wnt5a は non-canonical シグナルを介し、IL-6、IL-8、IL-1 β 、MIP-1 β のような炎症性サイトカイン産生を増強する。T リンパ球および単球/マクロファージ細胞表面上には Wnt5a 受容体である Fz5 および ROR2 が発現していることが報告されており、歯周炎局所で、細菌刺激により産生された Wnt5a は、T 細胞を含む単核球に作用すると考えられる。(図 1)

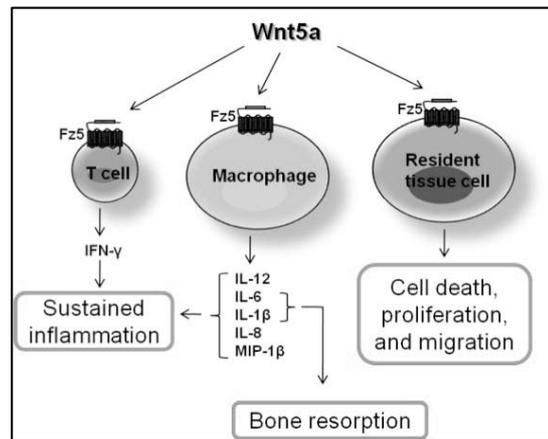
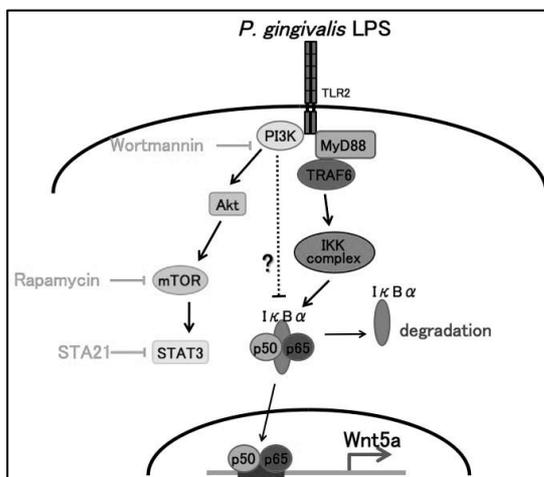


図 1

本研究では、*P. gingivalis* LPS 刺激による細胞内クロストークにより Wnt5a 遺伝子が発現することが明らかとなり、PI3K は *P. gingivalis* LPS 誘導の NF- κ B 活性および Wnt5a 遺伝子発現の負の調節因子であることが示唆された。(図 2)

図 2



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)

[学会発表](計3件)

南原弘美、*P. gingivalis* LPS 刺激による細胞内クロストークを介する Wnt5a 遺伝子発現、第 57 回春季日本歯周病学会学術大会、2014 年 5 月 23-24 日、岐阜

南原弘美、Intracellular crosstalk in Wnt5a expression by LPS、15th International Congress of Immunology、2013 年 8 月 22-27 日、ミラノ

南原弘美、Wnt5a expression by *Porphyromonas gingivalis* LPS via NF-kappaB and STAT1、EuroPerio7、2012 年 6 月 6-9 日、ウィーン

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

南原 弘美 (NANBARA, Hiromi)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号: 00632168