

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462918

研究課題名(和文)PKRはインフラマソームを介して歯周病の進行を制御するか？

研究課題名(英文)The effects of PKR and NLRP3 inflammasome on periodontal diseases

研究代表者

吉田 賀弥 (YOSHIDA, Kaya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号：60363157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫や代謝、炎症の共通制御因子であるPKRとインフラマソームNLRP3が、骨芽細胞において歯槽骨吸収を制御し歯周病の進行に關与するかを検討した。歯周病原菌*P. gingivalis*は、骨芽細胞においてPKRを活性化しインフラマソームNLRP3発現及び活性化を誘導した。*P. gingivalis*は骨芽細胞や破骨細胞の分化に必須である数種類の遺伝子発現を、PKR依存的に調節していた。以上の結果より、歯周病における骨芽細胞で、PKRがNLRP3や骨関連遺伝子の発現を調節し、骨代謝を制御する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the roles of PKR and NLRP3 inflammasome on the progress of periodontal diseases, we examine whether PKR affect NLRP3 and bone metabolisms in *P. gingivalis*-infected osteoblasts. *P. gingivalis* increased the expression and phosphorylation of PKR in mouse osteoblasts, MC3T3-E1. *P. gingivalis* also induced and activated NLRP3, resulting in the increase of caspase-1 cleavage and interleukin (IL)-1b release. PKR was necessary to the up-regulation of NLRP3. Moreover, *P. gingivalis* affects the expression of several bone-related genes through by PKR-dependent pathway. These results showed that PKR mediates bone metabolisms by affecting NLRP3 and bone-related genes in periodontal diseases.

研究分野：口腔組織学

キーワード：PKR インフラマソーム 歯周病 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周病は自己免疫疾患などの免疫システムの不均衡や、糖尿病などの代謝性疾患の併発により増悪すると言われている。歯周病の進行を効率的に防ぐには、炎症に加えて免疫や代謝の異常がある場合の骨吸収機構を解明する必要がある。しかし、全身的な免疫性、代謝性疾患と歯周病進行の関連性についての詳細な分子機構は明らかになっていない。

Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)はウイルスや細菌の感染により誘導され、免疫や代謝、炎症に与する蛋白質リン酸化酵素である。これまでに我々は、骨芽細胞におけるPKRの役割について研究を進めてきた。その結果PKRが骨芽細胞分化や機能に重要な因子であることを明らかにした。これらの成果により、骨芽細胞でのPKRの生理的な機能が解明されたが、炎症や免疫、代謝の異常を背景とした病理的な骨代謝におけるPKRの役割は依然不明である。

インフラマソームは nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLRP) ファミリーと、アダプター蛋白である adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein (ASC)、pro-caspase-1 から構成される複合体で、細菌感染や ATP などにより活性化され、自然免疫及び炎症に与する。また、インフラマソームの活性化は歯周病を進行させると報告されている。しかし、骨芽細胞におけるインフラマソームについての報告は無く、インフラマソームの活性化と、歯周病の進行に伴う歯槽骨吸収との関連性は不明である。

2. 研究の目的

免疫や代謝、炎症の制御因子であるPKRとインフラマソームに着目し、骨芽細胞における両者の相互作用が歯槽骨吸収を制御し、歯周病の進行に与するかを検討する。

3. 研究の方法

(1). SNAP26b 蛋白質を発現させた *Porphyromonas gingivalis* ATCC:3327 の形質変換株(SNAP-*P.g.*)を樹立して嫌気培養し、100 MOI に調整した後、5日間培養したマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の培養上清中に各作用時間添加した。

(2). 細胞から経時的に蛋白質を回収し、PKR やリン酸化 PKR、NLRP3 の発現変化をウエスタンブロット法により検出した。

(3). NLRP3 や各種炎症性サイトカイン、骨関連因子の mRNA 発現を、リアルタイム PCR により測定した。

(4). shRNA により PKR 発現を抑制した MC3T3-E1 細胞を樹立し、得られた結果を、野生型 MC3T3-E1 細胞での結果と比較した。

(5). 骨芽細胞の分化能を、骨関連遺伝子発現や ALP 活性測定により判断した。破骨細胞形成能を、RANKL や OPG の mRNA 発現量や、*P.g.* 菌を作用させた骨芽細胞の培養上清を、RAW 細胞に添加し、破骨細胞への分化により判定した。

4. 研究成果

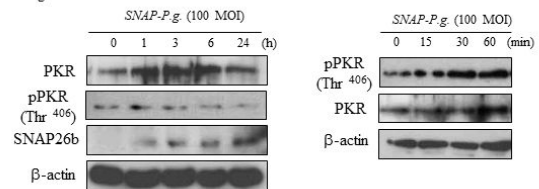
(1). PKR が *P.g.* 菌により誘導されるか？

SNAP-*P.g.* 添加 1 時間から 6 時間後に PKR 蛋白質の亢進が見られた。また PKR リン酸化は SNAP-*P.g.* 添加 1 時間以内に亢進した (Fig. 1)。PKR はリン酸化により酵素活性が亢進するので、以上の結果より SNAP-*P.g.* が骨芽細胞において PKR を誘導、活性化すると判断した。

(2). *P.g.* 菌により誘導された PKR がインフラマソームを活性化するか？

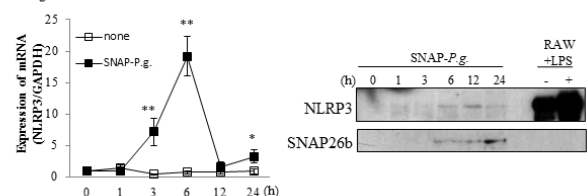
NLRP3 の発現

Fig. 1



インフラマソーム複合体を形成する NLRP3 に着目し、その動態を解析した。SNAP-*P.g.* を添加して 3 時間後から NLRP3 mRNA の発現量は上昇し、6 時間後にはピークとなった。この NLRP3 mRNA 発現上昇の程度は SNAP-*P.g.* 添加 24 時間後には減少していた。mRNA 発現上昇に対応するように NLRP3 蛋白質の発現は、SNAP-*P.g.* 添加 6 時間及び 12 時間後に亢進し、24 時間後には発現亢進の程度は低下した (Fig. 2A)。

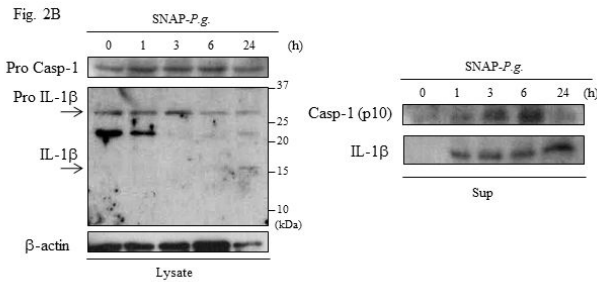
Fig. 2A



インフラマソームの活性化

次に、SNAP-*P.g.* により発現が誘導された NLRP3 が、インフラマソームの活性化につながるかを検討した。活性化したインフラマソームは pro caspase-1 を切断して活性型

caspace-1 とする。活性型 caspace-1 により pro IL-1 β は切断され、mature IL-1 β となり細胞外へ分泌する。SNAP-*P.g.*により細胞内の pro caspace-1 の発現に変化は見られなかった。一方で、SNAP-*P.g.*添加後6時間までに切断された caspace-1 の細胞外への分泌が増加した。SNAP-*P.g.*添加後6時間以降に、細胞内での pro IL-1 β の切断に伴う mature IL-1 β が増加した。mature IL-1 β の細胞外への分泌は、SNAP-*P.g.*添加後1時間から24時間後に増加した (Fig. 2B)。



*P.g.*が、単球や歯肉上皮細胞において、NLRP3 発現を亢進させ、炎症性サイトカインの分泌を上昇させる報告がある。そこで、活性化したインフラマソームにより産生が亢進し、骨代謝に影響を与え得る炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- α 、High Mobility Group Box 1(HMGB1)) の mRNA 発現を、リアルタイム PCR により測定した。その結果、SNAP-*P.g.*は、添加後24時間において IL-6、TNF- α mRNA の発現を有意に増加させる一方で、HMGB1 mRNA 発現を抑制することが判った (data not shown)。

以上の結果より、SNAP-*P.g.*が骨芽細胞においてインフラマソームを誘導、活性化すると判定した。

PKR の関与

shRNA により PKR 発現を抑制した MC3T3-E1 細胞 (sh PKR 株) において、SNAP-*P.g.*が誘導するインフラマソーム活性化の変化を検討した。野生型株である MC3T3-E1 細胞において、SNAP-*P.g.*は添加3時間後に NLRP3 mRNA 発現を亢進した。このような NLRP3 mRNA 発現亢進は、2クローンの sh PKR 株 (#1, #2) において全く観察されなかった。SNAP-*P.g.*添加後6時間における NLRP3 蛋白質の発現亢進も、sh PKR 株では認められなかった (data not shown)。以上の結果より、SNAP-*P.g.*が PKR 依存的に NLRP3 の発現を亢進することがわかった。

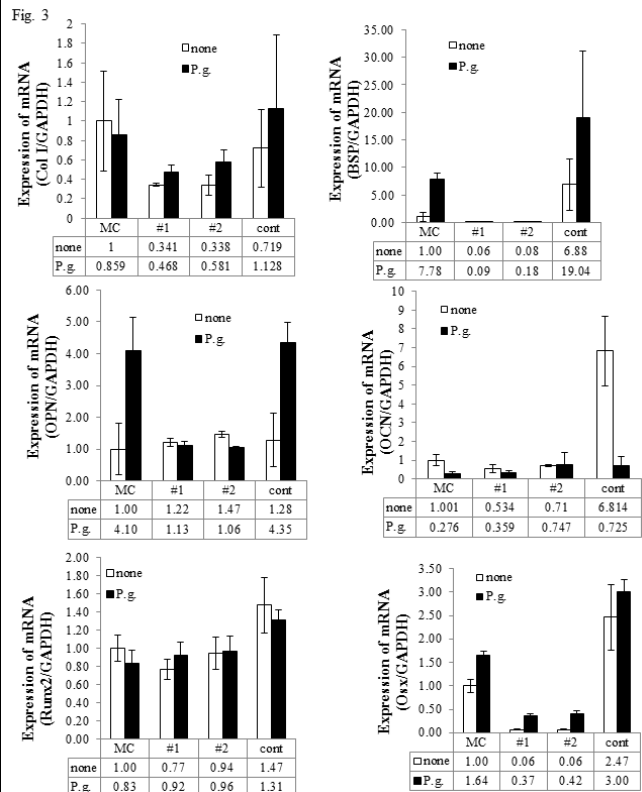
(3). PKR はインフラマソームを活性化し、骨吸収を制御するか？

骨芽細胞分化への影響

MC3T3-E1 細胞に SNAP-*P.g.*を添加し、24時間後に骨関連遺伝子 (typeI collagen (ColI), BSP, osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), Runx2, osterix (Osx)) の mRNA 発現

量を解析した。SNAP-*P.g.*添加により発現が増加した遺伝子は BSP と OPN、Osx で、減少した遺伝子は OCN であった。SNAP-*P.g.*添加は ColI と Runx2 遺伝子の発現に影響を与えなかった。以上の遺伝子の中で、BSP は、shPKR 株においてその発現量が有意に抑制されており、SNAP-*P.g.*添加によっても発現が増加しなかった。また、Runx2 も shPKR 株において発現量が有意に減少していた。shPKR 株に SNAP-*P.g.*添加すると、Runx2 発現は上昇するが、野生型株における程度に比べて、その上昇率はわずかであった (Fig. 3)。また ALP 活性は SNAP-*P.g.*添加により変化しなかった (data not shown)。

今回、SNAP-*P.g.*添加により骨芽細胞の分化は抑制されると予想していたが、実験結果からは明確な結論が得られなかった。SNAP-*P.g.*添加の期間を長期にするなどの追加実験が必要である。また、PKR がその発現に関与している可能性がある BSP と Osx については、NLRP3 の関与も含めて今後さらに検討しなければならない。



破骨細胞分化への影響

骨芽細胞は OPG や RANKL などを分泌し、破骨細胞の形成及び活性を制御する。そこで、MC3T3-E1 細胞に SNAP-*P.g.*を添加し、24時間後に OPG と RANKL の mRNA 発現を測定した。SNAP-*P.g.*の添加により、OPG と RANKL mRNA 発現はともに上昇した。特に、RANKL mRNA の発現は顕著に増加した。shRNA により PKR を抑制する

と、無刺激な状態では OPG の発現に変化はないが、SNAP-*P.g.* 添加により増加していた OPG の発現はさらに上昇した (data not shown)。このことより、SNAP-*P.g.* により OPG 発現が上昇する経路を、PKR が抑制すると考えられた。一方で、shPKR 株において RANKL mRNA の発現は有意に抑制されていた。shPKR 株に SNAP-*P.g.* 添加しても、RANKL mRNA 発現は変化しなかった (data not shown)。以上の結果より、PKR が SNAP-*P.g.* 添加による OPG 及び RANKL 誘導を制御して、破骨細胞分化に影響を与える可能性が示唆された。そこで、SNAP-*P.g.* を作用させた骨芽細胞の培養上清を、RAW 細胞に添加し、実際の破骨細胞分化能を判定した。しかし、実験結果の再現性が得られず、明確な結論に至らなかった。培養上清の添加だけではなく、骨芽細胞と破骨細胞の共培養系や、骨髄由来細胞を用いた系など、実験系の再検討が必要である。

本研究により、歯周病原菌 *P. gingivalis* が骨芽細胞において、PKR を活性化することや、PKR 活性化によりインフラマソーム NLRP3 発現及び活性が亢進することが明らかになった。また、*P. gingivalis* は骨芽細胞や破骨細胞の分化に必須の遺伝子発現に影響を及ぼした。その中の数種類の遺伝子に関しては、PKR が発現調節を行っていた。これらの結果より、PKR が *P. gingivalis* が感染している歯周病の歯周組織において、NLRP3 や骨関連遺伝子の発現を調節し、骨代謝を制御する可能性が示された。

一方で、*P. gingivalis* により誘導・活性化された PKR や NLRP3 が、実際に破骨細胞分化を誘導するかについては、明確な実験結果が得られなかった。今後は、本研究で得られた知見を細胞の共培養系や in vivo で証明する必要がある。

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 4 件)

Yoshida K, Yoshioka M, Okamura H, Moriyama S, Kawazoe K, Grenier D, Hinode D. Preventive effect of Daiokanzoto (TJ-84) on 5-fluorouracil-induced human gingival cell death through the inhibition of reactive oxygen species production. PLoS One, 9 (11), e112689, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone0112689 (査読有り)

Okamura H, Yang D, Yoshida K, Teramachi J, Haneji T. Reduction of PP2AC stimulates adipogenesis by regulating the Wnt/GSK-3b/b-catenin pathway and PPAR expression. Biochim Biophys Acta, 1843 (11), 2376-2384, 2014. DOI:

10.1016/j.bbamcr (査読有り)

Okamura H, Yoshida K, Yang D, Haneji T. Protein phosphatase 2A Cα is regulates osteoblast differentiation and the expression of bone sialoprotein and osteocalcin via osterix transcription factor. J Cell Physiol. 228 (5), 1031-1037, 2013. DOI: 10.1002/jcp.24250 (査読有り)

Ishikawa M, Yoshida K, Okamura H, Ochiai K, Takamura H, Fujiwara N, Ozaki K. Oral porphyromonas gingivalis translocates to liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3β signaling pathway. Biochim Biophys Acta. 1832 (12), 2035-2043, 2013. DOI: 10.1016/j.bbadis (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

The effects of PKR and NLRP3 on the bone-related gene expression in *P. gingivalis*-treated osteoblasts.

Yoshida K, Okamura H, Ozaki K

第 5 7 回歯科基礎医学会学術大会・総会
2015 年 9 月 13 日、新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)

大黃甘草湯は活性酸素やインフラマソームを介して 5-fluorouracil が誘導する細胞死を改善させる

吉田賀弥、吉岡昌美、岡村裕彦、日野出大輔
第 5 6 回歯科基礎医学会学術大会・総会
2014 年 9 月 26 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

Oral *Porphyromonas gingivalis* translocates to liver and regulates glycogen metabolism by attenuating insulin signaling.

Yoshida K, Takamura H, Okamura H, Fujiwara N, Ozaki K.

10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting. 2013 年 9 月 3 日、Nara Prefectural New Public Hall (Nara city, Nara, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 賀弥 (YOSHIDA, Kaya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号：60363157

(2) 研究分担者

岡村 裕彦 (OKAMURA, Hirohiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：20380024