

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463225

研究課題名(和文) アレルギー誘導性サイトカインIL-33を基軸とした歯周炎増悪メカニズムの解明

研究課題名(英文) Roles of allergic cytokine IL-33 in the exacerbation of chronic periodontitis

研究代表者

多田 浩之(Tada, Hiroyuki)

東北大学・歯学研究科・講師

研究者番号：70431632

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)：慢性歯周炎は、歯周病原細菌Porphyromonas gingivalisによる感染症である。上皮細胞は細菌やアレルギーに対してinterleukin (IL)-33を放出することで慢性アレルギー炎症が誘導される。慢性歯周炎患者の歯周組織におけるIL-33発現について検討した結果、慢性歯周炎患者の歯肉上皮には著明にIL-33発現が発現することが明らかとなった。ヒト歯肉上皮細胞にP. gingivalisを感染させると、ジンジパイン依存的にprotease-activated receptor (PAR)-2を介してIL-33 mRNA発現が亢進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The cytokine IL-33 is constitutively expressed in epithelial cells and it augments Th2 cytokine-mediated inflammatory responses. We aimed to determine the role of the periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis, in the enhanced expression of IL-33 in human gingival epithelial cells. We detected IL-33 in inflamed gingival epithelium from patients with chronic periodontitis, and found that P. gingivalis increased IL-33 expression in the cytoplasm of human gingival epithelial cells in vitro. P. gingivalis gingipain-null mutant KDP136 did not induce IL-33 expression. A small interfering RNA for protease-activated receptor-2 (PAR-2) as well as inhibitors of phospholipase C, p38 and NF- $\kappa$ B inhibited the expression of IL-33 induced by P. gingivalis. These results indicate that the PAR-2/IL-33 axis is promoted by P. gingivalis infection in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism.

研究分野：口腔微生物学・免疫学

キーワード：慢性歯周炎 Porphyromonas gingivalis Interleukin-33 歯肉上皮細胞 歯肉上皮バリア破綻

## 1. 研究開始当初の背景

慢性歯周炎の病態を形成する直接の原因は歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* を主とする感染症であるが、歯周組織破壊の主体となるのは歯周組織に誘導される慢性炎症である。*P. gingivalis* の排除には IL-12p70 の産生が必要であることが動物を用いた研究成果から示されているが、*P. gingivalis* による樹状細胞からの IL-12p70 産生能は低く、歯周炎における Th1/Th2 バランスは Th2 応答が優勢との研究成果が多いことから、効率的な Th1 応答誘導の欠如が歯周炎の増悪・慢性化に至ると推測される。また、ジンジパインは IL-2 を分解することで T 細胞増殖を抑制させることから、*P. gingivalis* による Th2 細胞の分化誘導能は低いことが予測され、Th2 サイトカイン誘導を担う他の因子の存在が示唆されている。アレルギー誘導性サイトカインである IL-33 は、Th2 サイトカイン産生を誘導することによりアレルギー性炎症の誘導を司るマスターサイトカインとして注目されている。そこで申請者は、IL-33 を介するアレルギー性炎症の誘導が、歯周炎の増悪・慢性化に至るという新規の概念を着想した。

## 2. 研究の目的

*P. gingivalis* 感染によるヒト歯肉上皮細胞の IL-33 発現誘導機構について、ジンジパインによる歯肉上皮細胞由来 IL-33 の誘導機序ならびに IL-33 の生理機能を解析することで、歯周炎における IL-33 によるアレルギー性炎症の役割について検討した。

始めに、ジンジパインによる歯肉上皮細胞の IL-33 発現誘導に関わるシグナル伝達機構について、protease-activated receptor-2 (PAR-2)、MAP キナーゼ p38 および NF- $\kappa$ B の関与について検討した。

他方、IL-33 はサイトカインとしてアレルギー性炎症を誘導する反面、核内因子と

して炎症性シグナルを抑制させる働きが示唆されている。そこで、ジンジパインにより歯肉上皮細胞に誘導された IL-33 が、同細胞のバリア機能を抑制させる可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株である Ca9-22、ヒト初代歯肉上皮細胞、ヒト肥満細胞株である HMC-1 を供試した。*P. gingivalis* は生菌ならびに凍結乾燥処理後の全菌体にて細胞に添加した。野生型株として W83 株ならびに ATCC33277 株、ジンジパイン欠損株として KDP136 株等 (*rgpA rgpB kgp* 変異) を供試した。菌体成分として、*P. gingivalis* 精製 fimbriae、*P. gingivalis* 合成リポペプチドおよび *P. gingivalis* 由来 LPS を供試した。歯肉上皮細胞を *P. gingivalis* で刺激した際の IL-33 mRNA 発現 (定量性 RT-PCR 法)、リン酸化 p38 の検出 (Western blot 法) および NF- $\kappa$ B プロモーター活性 (ルシフェラーゼアッセイ) を測定した。ジンジパインにより歯肉上皮細胞内に誘導された IL-33 が能動的に細胞外への分泌について、刺激後の培養上清に含まれる IL-33 タンパク量を ELISA 法にて測定した。同時に、同サンプルの培養上清中に含まれる乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することで、同細胞からの IL-33 産生がネクローシスによる受動的な細胞外放出である可能性を併せて検討した。IL-33 は核内因子として、NF- $\kappa$ B を介した炎症性シグナルを抑制させる機能を示す。*P. gingivalis* により誘導された細胞内 IL-33 による、歯肉上皮細胞の免疫学的バリア機能抑制について、IL-33 siRNA 及び PAR-2 siRNA 導入細胞を用いて、*P. gingivalis* で感染した際の抗菌ペプチド発現について定量性 PCR 法および ELISA 法にて検討した。

## 4. 研究成果

慢性歯周炎は、歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* による感染症であり、歯周組織破壊の原因となる慢性炎症の病態解明は歯周炎予防における喫緊の課題である。粘膜組織において、上皮細胞は細菌やアレルゲンに対して物理的バリアとして機能するだけでなく、これらの刺激に応答して interleukin (IL)-33, IL-25 および thymic stromal lymphopoietin (TSLP) などの上皮性サイトカインを放出することで慢性アレルギー炎症が誘導される。そこで我々は、慢性歯周炎患者の歯周組織における IL-33 発現について検討した結果、健常な歯周組織にはほとんど IL-33 発現が認められないのに対して、慢性歯周炎患者の歯肉上皮には著明に IL-33 発現が発現することを明らかにした。次に、ヒト歯肉上皮細胞を *P. gingivalis* 全菌体で刺激すると、IL-33 mRNA 発現が亢進され、同作用は本菌が発現するプロテアーゼであるジンジパインを介して担われることが明らかとなった。そこで、IL-33 誘導に関わるレセプター系について検討した結果、protease-activated receptor (PAR)-2 がジンジパインによる IL-33 誘導を担うことが示された。また、PAR-2 下流のシグナル伝達機構について検討した結果、*P. gingivalis* による IL-33 発現誘導は phospholipase C (PLC), MAP kinase p38 ならびに NF- $\kappa$ B 経路を介することを見出した。さらに *P. gingivalis* によるヒト歯肉上皮細胞における IL-33 タンパク産生機序について検討した結果、同細胞を *P. gingivalis* で刺激すると、細胞質における IL-33 タンパク発現が著明に増強された。

次に、*P. gingivalis* によりヒト歯肉上皮細胞に誘導された細胞内 IL-33 の免疫学的機能について、IL-33 が同細胞からの抗菌ペプチド産生に及ぼす影響を検討した。ヒト歯肉上皮細胞は、抗菌ペプチドである

human  $\beta$ -defensin-2 (hBD-2), hBD-3 や LL-37/hCAP-18 を構成的に発現しており、歯周病原細菌の感染に対して免疫学的バリアを担う。*P. gingivalis* 感染による同細胞からのジンジパイン依存的 IL-33 発現誘導は、LL-37/hCAP-18 産生を抑制することを明らかにした。これらの研究成果から、*P. gingivalis* 感染による歯肉上皮細胞の IL-33 誘導は自然免疫応答における免疫学的バリアを破綻させ、慢性炎症を引き起こすことが明らかにした。

#### 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9件)

Hiroyuki Tada, Risako Suzuki, Eiji Nemoto, Hidetoshi Shimauchi, Kenji Matsushita, Haruhiko Takada. Increases in IL-33 production by fimbriae and lipopeptide from *Porphyromonas gingivalis* in mouse bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 2. Biomed. Res. 査読有, 38(3), in press, 2017年.

Hiroyuki Tada, Takamitsu Shimizu, Kenji Matsushita, Haruhiko Takada. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis*-induced IL-33 down-regulate hCAP-18/LL-37 production in human gingival epithelial cells. Biomed. Res. 査読有, 38(3), in press, 2017年.

Hiroyuki Tada, Takamitsu Shimizu, Isao Nagaoka, Haruhiko Takada. Vitamin D<sub>3</sub> analog maxacalcitol (OCT) induces hCAP-18/LL-37 production in human oral epithelial cells. Biomed. Res. 査読有, 37(3): 199-205, 2016年. DOI: 10.2220/biomedres.37.199.

Hiroyuki Tada, Takashi Matsuyama, Takashi Nishioka, Makoto Hagiwara, Yusuke Kiyoura, Hidetoshi Shimauchi, Kenji Matsushita. *Porphyromonas gingivalis* gingipain-dependently enhances IL-33 production in human gingival epithelial cells. PLoS One 査読有, 11(4): e0152794, 2016年. DOI: 10.1371/journal.pone.0152794.

Hiroyuki Tada, Hidetoshi Shimauchi, Haruhiko Takada, Kenji Matsushita. Possible roles of IL-33 in periodontal diseases: *Porphyromonas gingivalis* induced IL-33 in human gingival epithelial cells. Interface Oral Health Science 2014 査読無, 1: 293-303, 2014年. DOI: 10.1007/978-4-431-55192-8.

Naoyuki Ishida, Yuichi Ishihara, Kazuto Ishida, Hiroyuki Tada, Yoshiko Kato, Ryutaro Isoda, Makoto Hagiwara, Makoto Michikawa, Toshihide Noguchi, Kenji Matsushita. Periodontal disease as a possible risk factor for Alzheimer's disease. Interface Oral Health Science 2014 査読無, 1: 237-243, 2014年. DOI: 10.1007/978-4-431-55192-8.

Makoto Hagiwara, Eitoyo Kokubu, Shinsuke Sugiura, Toshinori Komatsu, Hiroyuki Tada, Ryutaro Isoda, Naomi Tanigawa, Yoshiko Kato, Naoyuki Ishida, Kaory Kobayashi, Misako Nakashima, Kazuyuki Ishihara, Kenji Matsushita. Vinculin and Rab5 complex is required for uptake of *Staphylococcus aureus* and interleukin-6 expression. PLoS One 査読有, 9(1):

e87373-e87385, 2014年. doi:10.1371/journal.pone.0087373

Makoto Hagiwara, Toshinori Komatsu, Shinsuke Sugiura, Ryutaro Isoda, Hiroyuki Tada, Naomi Tanigawa, Yoshiko Kato, Naoyuki Ishida, Kaoru Kobayashi, Kenji Matsushita. POT1b regulates phagocytosis and NO production by modulating activity of the small GTPase Rab5. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有, 439: 413-417, 2013年. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.018

Naomi Tanigawa, Makoto Hagiwara, Hiroyuki Tada, Toshinori Komatsu, Shinsuke Sugiura, Kaoru Kobayashi, Yoshiko Kato, Naoyuki Ishida, Kyohei Nishida, Masayuki Ninomiya, Mamoru Koketsu, Kenji Matsushita. Acacetin inhibits expression of E-selectin on endothelial cells through regulation of the MAP kinase signaling pathway and activation of NF- $\kappa$ B. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 査読有, 35(4): 471-477, 2013年. DOI: 10.3109/08923973.2013.811596

〔学会発表〕(計19件)

Hiroyuki Tada, *Fusobacterium nucleatum* induces the production of NETs-associated MIF by human neutrophils, 第90回日本細菌学会総会、2017年3月19日、仙台国際センター(仙台)

Hiroyuki Tada, Takashi Nishioka, Periodontal bacteria induce the production of MIF-associated neutrophil extracellular traps by

human neutrophils, The 2017 Japan-NIH Joint Symposium, 2017年2月15日、東北大学(仙台)

多田浩之、沼崎研人、西岡貴志、松下健二、高田春比古、*Porphyromonas gingivalis*による好中球のneutrophil extracellular traps産生を介した炎症反応の誘導、第22回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2016年12月2日、鹿児島大学(鹿児島)

沼崎研人、西岡貴志、松下健二、多田浩之、*Fusobacterium nucleatum*によるヒト好中球からのneutrophil extracellular traps誘導、第58回歯科基礎医学会学術大会・総会、2016年8月24日、札幌コンベンションセンター(札幌)

多田浩之、松下健二、高田春比古、*Porphyromonas gingivalis*によるヒト肥満細胞のIL-31誘導は歯肉上皮細胞のバリア機能を低下させる、第59回春季日本歯周病学会学術大会、2016年5月19日、かごしま県民交流センター(鹿児島)

多田浩之、川原一芳、高田春比古、*Lactobacillus* ペプチドグリカンの可溶性フラグメントによるオートファジー誘導、第89回日本細菌学会総会、2016年3月22日、大阪国際交流センター(大阪)

Hiroyuki Tada, Aya Takase, Takashi Nishioka, Kenji Matsushita, Haruhiko Takada, *Porphyromonas gingivalis*-induced production of IL-31 by human mast cells resulting in dysfunction of gingival epithelial barrier, 第6回インターフェイス口腔健康科学国際シンポジウム、2016年1月18日、民陵会館(仙台)

多田浩之、高瀬彩、松下健二、高田春比古、*Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによるヒトマスト細胞からのIL-31産生誘導、第21回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2015年12月4日、がん研有明病院(東京)

多田浩之、松下健二、高田春比古、*Porphyromonas gingivalis*による樹状細胞のクロスプレゼンテーション誘導、第57回歯科基礎医学会学術大会・総会、2015年9月11日、朱鷺メッセ(新潟)

高瀬彩、多田浩之、西岡貴志、松下健二、高田春比古、*Porphyromonas gingivalis* はヒトマスト細胞からIL-31を誘導する、第57回歯科基礎医学会学術大会・総会、2015年9月11日、朱鷺メッセ(新潟)

多田浩之、高瀬彩、清水崇光、長岡功、松下健二、高田春比古、*Porphyromonas gingivalis* によるIL-33を介したLL-37/CAP-18ダウレギュレーション作用、第69回日本細菌学会東北支部総会、2015年8月21日、郡山ビッグアイ(福島)

多田浩之、高瀬彩、西岡貴志、島内英俊、松下健二、高田春比古、*Porphyromonas gingivalis* によるヒトマスト細胞からのinterleukin-31産生誘導、2015年度春季日本歯科保存学会、2015年6月24日、北九州国際会議場(福岡)

多田浩之、松下健二、高田春比古、*Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによるIL-33誘導はヒト歯肉上皮細胞のCAP-18/LL-37産生を抑制する、第58回春季日本歯周病学会学術大会、2015年5月14日、幕張メッセ(千葉)

多田浩之、松下健二、長岡功、高田春

比古、*Porphyromonas gingivalis* シンジパインは IL-33 誘導を介してヒト歯肉上皮細胞の CAP18/LL-37 産生をダウンレギュレーションする、第 20 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2014 年 12 月 5 日、順天堂大学（東京）

多田浩之、松下健二、高田春比古、*Porphyromonas gingivalis* によるヒト歯肉上皮細胞の LL-37 発現誘導は IL-33 による下方制御される、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014 年 9 月 25 日、福岡国際会議場（福岡）

Hiroyuki Tada, Hidetoshi Shimauchi, Kenji Matsushita, Increasing expression of interleukin-33 by *Porphyromonas gingivalis* gingipains in human gingival epithelial cells, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium, 2014 年 1 月 20 日、東北大学（仙台）  
多田浩之、松山孝司、清浦有祐、島内英俊、松下健二、*Porphyromonas gingivalis* はヒト歯肉上皮細胞における IL-33 発現を誘導する、第 67 回日本細菌学会東北支部総会、2013 年 8 月 30 日、東北大学（仙台）

Hiroyuki Tada, Takashi Matsuyama, Yusuke Kiyoura, Hidetoshi Shimauchi, Kenji Matsushita, Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* enhance interleukin-33 expression in human gingival epithelial cells, NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, 2013 年 5 月 9 日、民理会館（仙台）

多田浩之、松下健二、島内英俊、玉井

利代子、清浦有祐、*Porphyromonas gingivalis* 由来 fimbriae およびリポペプチドによる樹状細胞からの IL-33 発現誘導、第 56 回春季日本歯周病学会学術大会、2013 年 5 月 31 日、タワーホール船堀（東京）

〔図書〕(計 2 件)

多田浩之、松下健二、松山孝司、長岡功、高田春比古、医学図書出版株式会社、「エンドトキシン・自然免疫研究 18 自然免疫における生体防御ペプチドの多様性」、2015、93-97 ページ

多田浩之、高瀬彩、松下健二、高田春比古、医学図書出版株式会社、「エンドトキシン・自然免疫研究 19 新たな基礎と臨床の架け橋」、2016、38-41 ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多田 浩之 (TADA, HIROYUKI)  
東北大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：70431632

### (2) 研究分担者

清浦 有祐 (KIYOURA, YUSUKE)  
奥羽大学・歯学部・教授  
研究者番号：90194951

### (3) 連携研究者

松下 健二 (MATSUSHITA, KENJI)  
国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・部長  
研究者番号：90253898

### (4) 研究協力者

松山 孝司 (MATSUYAMA, TAKASHI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：40253900  
島内 英俊 (SHIMAUCHI, HIDETOSHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授  
研究者番号：70187425