

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893241

研究課題名(和文) 歯周病性歯槽骨吸収に対する新規予防・治療法の開発を目指した基礎研究

研究課題名(英文) A basic research aimed to develop novel preventive and therapeutic measures for alveolar bone loss in periodontitis

研究代表者

秋山 智人 (Akiyama, Tomohito)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90710319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は破骨細胞による歯槽骨の吸収を伴う炎症性の疾患である。主要な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* は一群のタンパク質分解酵素ジンジパインを産生する。ジンジパインは基質分解部位から Rgp および Kgp に分類される。研究代表者らは、Kgp が破骨細胞抑制因子であるオステオプロテゲリン(OPG) (56kDa) を N 末 37kDa の断片に分解し、破骨細胞分化を促進することを発見した。本研究では、詳細な分解部位の同定と、分解部位に変異させた組換え OPG を調製し、Kgp に対する耐性化を目指したが、目的の変異 OPG はこれまでのところ得られていない。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a chronic inflammatory disease accompanied by alveolar bone resorption by osteoclasts. *Porphyromonas gingivalis*, one of the major pathogens of periodontitis, produces cysteine proteases called gingipains, that are classified into Rgp and Kgp based on their cleavage site specificities. We previously found that Kgp degrades osteoprotegerin (OPG; 56kDa), an osteoclastogenesis-inhibitory factor, into an N-terminal fragment (37kDa) and inactivates OPG. In this study, The principal investigator tried to determine the specific cleavage sites in OPG cleaved by Kgp and prepare mutant OPG proteins resistant to the cleavage by Kgp. Unfortunately, a mutant OPG protein resistant to Kgp has not been obtained.

研究分野：口腔生化学

キーワード： *Porphyromonas gingivalis* periodontitis protease

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯槽骨に炎症性骨吸収が起こる代表的な口腔感染症である。*Porphyromonas gingivalis*をはじめとする様々な細菌が歯周ポケットに感染することで、慢性の炎症が惹起され、セメント質、歯根膜、歯槽骨の破壊が進行する。歯槽骨の破壊は、歯の動揺や歯の喪失をもたらす。社会の高齢化が進む現在、歯周病性歯槽骨破壊の予防・治療法の開発は、国民の生活の質の維持・向上にとって極めて重要な課題である。

グラム陰性嫌気性桿菌の *P. gingivalis* は、菌と歯周病の病態との関連を示すピラミッドの頂点に位置するレッド・コンプレックスのひとつに分類される。*P. gingivalis* は、糖質をまったく利用しない。同菌は、生存に必要なエネルギーをもっぱら環境のタンパク質を分化して得られるアミノ酸の分解によって得ている。そのため、大量のタンパク質分解酵素を産生、分泌している。なかでも、システイン・プロテアーゼに分類されるジンジパインは、*P. gingivalis* が産生するプロテアーゼ活性の80%を占める。ジンジパインは *rgpA*、*rgpB* および *kgp* の3種類の遺伝子から作られる一群のエンド・ペプチダーゼである。*rgpA* の産物である RgpA および *rgpB* の産物である RgpB は、アルギニン特異的ジンジパインで、基質タンパク質の Arg 残基の C 末端側を加水分解する。一方、*kgp* の産物である Kgp はリシン特異的ジンジパインで、基質タンパク質の Lys 残基の C 末端側を加水分解する。ジンジパインは歯周病の病原因子のひとつとして、様々な研究がなされて来た。軟組織の破壊や出血を引き起こす他、種々の宿主タンパク質を分解する。例えば、抗体やサイトカイン類、免疫担当細胞の細胞膜タンパク質の分解をすることで、宿主の感染防御システムを攪乱したり、逆に炎症を促進するなど、その作用は極めて複雑である。しかし、ジンジパインの歯槽骨破壊への関与については、あまり研究が進んでいない状況にある。

歯周病性歯槽骨破壊等の炎症性骨破壊や通常の生理的骨リモデリングにおいて、骨吸収を担うのは破骨細胞である。活性型ビタミンDや副甲状腺ホルモンなどの生理的骨吸収因子や細菌由来のリポポリサッカライド (LPS) をはじめとする Toll 様受容体リガンド、プロスタグランジン、腫瘍

壊死因子- (TNF-)、インターロイキン (IL) -1、IL-6、IL-17 などの炎症性サイトカインは、骨芽細胞に作用し、骨芽細胞で膜タンパク質 RANKL の発現を誘導する。一方、単球・マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞は細胞膜上に RANKL の受容体である RANK を発現している。RANKL と RANK の結合により、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が開始される。また、破骨細胞の骨吸収活性も RANKL と RANK の相互作用によって維持される。骨芽細胞は、RANKL の他に、単球・マクロファージ系細胞の生存に必要なサイトカインである M-CSF も分泌している。さらに興味深いことに、骨芽細胞は、RANKL のおとり受容体として機能するオステオプロテゲリン (OPG) を分泌している。したがって、骨芽細胞は破骨細胞分化に必要な RANKL および M-CSF を発現するとともに、破骨細胞分化抑制因子である OPG を産生・分泌していることになる。

研究代表者らの研究グループは、Kgp が破骨細胞分化抑制因子である OPG を分解することで、破骨細胞形成を促進することを見出した。すなわち、マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養システムにおいて、活性型ビタミンDあるいは大腸菌由来の LPS、*P. gingivalis* 由来の LPS などの Toll 様受容体リガンドによって誘導される破骨細胞分化を Kgp が促進することを見出し、その機序を解析した。その結果、Kgp は極めて効率よく OPG を分解した。OPG 遺伝子欠損マウスから分離した骨芽細胞および骨髄細胞の共存培養システムでは、Kgp による破骨細胞分化促進作用は認められなかった。興味深いことに、HRgpA あるいは RgpB には、同じ実験系で破骨細胞分化促進作用はなかった。これらの Rgp は OPG を分解出来なかったことから、Kgp による破骨細胞分化促進作用のメカニズムは、OPG の分解・不活性化であると考えられた (Yasuhara R, et al., Lysine-specific gingipain promotes lipopolysaccharide- and active-vitamin D3-induced osteoclast differentiation by degrading osteoprotegerin. *Biochem J* 419: 159-166, 2009)。

歯周病性骨破壊において主要な骨吸収因子として機能するものには、LPS の他に、TNF- や IL-1 などの炎症性サイトカインがある。すでに、ジンジパインはこれらの炎症性サイトカインを分解することが知られている。そこで研究代表者らは、これらのサイトカインによる破骨細胞分化に対するジンジパインの作用を解析した。その結果、Kgp が、タンパク性の

骨吸収因子であるTNF- α およびIL-1による破骨細胞分化を促進し、IL-17Aによるそれを抑制することを見出した。さらに、KgpによるTNF- α 、IL-1、IL-17A およびOPGの分解を比較した実験結果から、KgpがTNF- α およびIL-1の分化誘導作用を増強し、IL-17Aのそれを抑制した現象は、各サイトカインとOPGのKgpによる分解効率の違いで説明できると考えられた(研究業績：論文)。

研究代表者は、KgpがOPG(56kDa)を37kDaの断片に分解し、OPGのRANKL阻害能を消失させることを明らかにした。OPGをKgpと反応させ、生じたOPG断片の37kDaのOPG断片のN末端アミノ酸配列を解析した結果、OPGのN末端と一致したことから、Kgpは、OPGのRANKL結合部位ではなく、デスドメイン類似領域内を優先的に切断することが判明した。Kgpによりデスドメイン類似領域が切断されたOPGは、RANKLとの会合に必要な二量体形成ができず、RANKL阻害能を失ったと考えられた。

2. 研究の目的

KgpによるOPGの分解部位がRANKL結合部位ではなく、デスドメイン類似領域内にあることから、研究代表者は、KgpによるOPGの分解部位のLysをAlaに置換することで、破骨細胞分化抑制活性を保持したまま、Kgpによる分解に耐性を持つOPGを調製することが可能であると考えた。また、Kgp耐性OPG変異タンパク質の投与により歯周病性骨破壊の予防あるいは治療効果を発揮する可能性があると考えた。

そこで、歯周病性骨破壊の新規予防・治療法の開発を目指して、本研究では、以下の3点を集中的に研究することとした。

- 1) KgpによるOPGの切断部位を同定する。
- 2) 同定されたKgpによるOPGの切断部位のLys残基を遺伝子組換えにより、Alaに置換した組換えOPGを調製する。
- 3) 調製した組換えOPGのKgpによる分解に対する耐性を確認し、耐性が確認された変異OPGをin vitro破骨細胞分化系に添加し、破骨細胞分化抑制作用を解析する。

3. 研究の方法

1) KgpによるOPGの切断部位の同定：OPG分子中のKgpによる分解位置のLysを特定する。Kgpとの反応で生じる37kDaの主要なOPG断片のカウンターパートと考えられる20kDa付近の断片を電気泳動により分離し、そのN末端アミノ酸配列をエドマン法で解析した。

2) 同定された切断部位にあたるLys残基をAlaに置換した変異OPGの調製：37kDaの主要なOPG断片のカウンターパートと予想される20kDa付近の断片のN末端アミノ酸配列の解析か

ら、Lys-258およびLys-262がKgpによるOPGの切断部位と予想された。そこで、ヒトOPG遺伝子の全長cDNAを哺乳類遺伝子発現ベクター(pCAGGS)に組み込み、得られたpCAGGS-OPGを鋳型にして、KOD DNA polymeraseを用いて、PCRにより変異を導入した。使用したプライマーの配列は、OPG(K256A)用：5'-GCACATCAAAAACAAAGACCAAGATA-3'および5'-CCATAACTTCAGCAGCTGGAAAGTC-3'、OPG(K262A)用：5'-GCAGACCAAGATATAGTCAAGAAGA-3'および5'-GTTTGTATGTTTCCATAACTTCAGC-3'、OPG(K256A/K262A)用：5'-GCACATCAAAAACGCAGACCAAGATA-3'および5'-CCATAACTTCAGCAGCTGGAAAGTC-3'である。これによりLys-256、Lys-262のいずれか、あるいは両方をAlaに置換した組換え変異OPGの発現ベクターを調製した。野生型OPGおよび3種類の変異OPG発現ベクターをCHO-K1細胞に導入し、培養上清を回収した。上清中のOPGあるいは変異OPGの確認は抗OPG抗体を用いたWestern blottingにより行った。

3) 変異OPGのKgpによる分解に対する抵抗性：2)で得られた培養上清とKgpを混合し、経時的に反応液を回収した。反応産物をSDS-PAGEにより分離後、抗OPG抗体を用いたWestern blottingにより残存するOPGあるいは変異OPGの減少を定量的に評価した。

4. 研究成果

1) KgpによるOPGの切断部位の同定：主要なN末断片のカウンターパートと考えられる20kDaフラグメント付近のバンドに含まれるペプチドのN末アミノ酸配列を解析したところ、N末アミノ酸配列の同定ができなかった。このバンドには複数のペプチドが含まれていることが示唆され、得られたデータからOPGのHis-259以降のペプチドおよびAsp-263以降のペプチドを含む混合物可能性が高いと考えた。OPGの主要なN末断片が37kDa付近であることとこれらのC末側断片の分子量は矛盾がなかった。

2) KgpによるOPGの分解で生じた20kDa付近のペプチド断片のN末アミノ酸配列の解析の結果、KgpはOPGのLys-258およびLys-262のC末側を加水分解する可能性が示唆された。そこで、これらのLysをAlaに置換する変異をOPG遺伝子に導入し、哺乳動物細胞でそれらを発現・分泌させるため、変異OPG遺伝子をpCAGGSベクターに組み込み、野生型OPG、OPG(K288A)、OPG(K262A)およびOPG(K258A/K262A)を産生させるべく、CHO-K1細胞に導入した。Western blot法にて、培養液中にOPGタンパク質が分泌されていることを確認した。

3) 野生型OPG、OPG(K288A)、OPG(K262A)ある

いは OPG(K258A/K262A)を含む CHO-K1 細胞の培養上清に再活性化した Kgp (50 nmol/L)を添加し、経時的に未分解 OPG あるいは未分解変異 OPG の量を Western blotting により解析したところ、予想に反して、いずれの変異体も野生型 OPG とほぼ同程度の減少が観察された。したがって、Lys-258、Lys-262 あるいはその両者を Ala に代えても、Kgp によって分解されることが分かった。Kgp による OPG の切断部位の選択性が低いことが考えられる。Kgp は、野生型 OPG の場合は研究代表者が見出した Lys 残基の C 末端側を優先的に加水分解するが、その位置のアミノ酸残基が Lys から Ala に置換されたことで、Kgp はその近傍の Lys 残基の位置で OPG を加水分解した可能性が考えられる。

これらの結果は、雑誌論文として発表するとともに、学会で発表した(業績:雑誌論文および学会発表)。

また、今回の研究から OPG が極めて分解され易いタンパク質であることが示唆された。これまで、破骨細胞分化は、骨芽細胞における RANKL/OPG の遺伝子発現比で制御されると認識されているが、研究代表者らが得た知見は、OPG の分化による破骨細胞分化制御機構の存在を示すもので、破骨細胞研究に新たな視点をあたえるものと考えられる。

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1件)

Akiyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Hoshino M, Imamura T, Akiyama C, Yasuhara R, Mishima K, Maruyama T, Kohda C, Tanaka K, Potempa J, Yasuda H, Baba K, Kamijo R. *Porphyromonas gingivalis*-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor- and interleukin-1 but suppresses that by interleukin-17A. Importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain. *J Biol Chem* 289:15621-15630, 2014 (査読有) doi: 10.1074/jbc.M113.520510.

[学会発表](計1件)

秋山智人, 安原理佳, 宮本洋一, 今村隆寿, 馬場一美, 美島健二, 上條竜太郎: 歯周病原菌の毒素による破骨細胞分化の促進(第14回東京骨関節フォーラム, 東京, 2014年7月19日)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

<http://prostho.showa-u.ac.jp/modules/topic/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山 智人 (AKIYAMA Tomohito)

昭和大学 歯学部 助教

研究者番号: 90710319