

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293401

研究課題名(和文) 歯周病細菌による歯周病発症機序および全身性疾患発症増悪の分子基盤解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of periodontal diseases and systematic diseases associated with periodontal diseases by periodontal pathogens

研究代表者

大原 直也 (OHARA, Naoya)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70223930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は歯周病原細菌による慢性感染によって歯周組織が破壊される感染症である。本研究では、Porphyromonas gingivalisが産生するプロテアーゼ「ジンジパイン」が、歯肉上皮細胞の生理機能に重要なPI3K/Akt経路に対する作用を調べた。ジンジパインによりPI3K/Aktは抑制され、その抑制はジンジパインの細胞外作用とジンジパインの酵素活性を必要とすることが示唆された。さらには、Akt下流タンパク質であるGSK3, mTOR, Bad, PRAS40, MDM2のリン酸化レベルの変化を示し、それらの活性への影響が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Periodontal diseases are chronic oral bacterial infectious diseases. In our study, Porphyromonas gingivalis, which is one of major oral pathogens, produces cysteine proteases called as gingipains. Gingipains attenuate PI3K/Akt signaling pathway, and which is associated with their protease activity from extracellular interaction without invasion of this organisms. Moreover, several downstream proteins of Akt, which are GSK3, mTOR, Bad, PRAS40, and MDM2, are also changed the their phosphorylation level by gingipains in gingival epithelial cells. On the basis of the results, their physiological activity might be dysregulated by gingipains in parallel with inactivation of PI3K/Akt in the cells.

研究分野：細菌学、感染症学

キーワード：歯周病原細菌 歯周病 ジンジパイン PI3K/Akt

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、*Porphyromonas gingivalis* (以下、*Pg*) をはじめとする歯周病原細菌の長期感染により起こり、歯周組織の炎症や歯槽骨の破壊をともなう特徴を示す。また歯周病は糖尿病や血管疾患など全身性疾患との関与が指摘されており、口腔内疾患という枠組みを越えた疾患として確立されつつある。一方で、歯周病の詳細な発症機序に関しての見解は、未だに統一されていない。

その理由として、単一の細菌による外因性感染ではなく、混合感染による内因性感染として考えられている点である。またその発症の要因には感染している細菌種だけでなく、宿主の免疫力や口腔内環境などの多様なバランスが重要である。そこで、歯周病の病態発症および形成について宿主と細菌の感染現象を分子レベルで明らかにすることが、歯周病を理解する上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

歯周病の発症機序の分子基盤構築を進める上で、我々は歯周病原細菌と宿主の歯肉上皮細胞との相互作用によって起こる現象を明らかにすることを目的とした。歯周病原細菌の感染局所および周縁部では、歯肉上皮細胞の破壊に引き続き、歯根膜や歯槽骨の破壊・吸収が生じ、歯周炎が惹起される。本研究では、*Pg* が産生する主要病原因子であるシステインプロテアーゼ「ジンジパイン」に着目し、宿主細胞の細胞機能制御に重要なシグナル伝達経路 PI3K/Akt 経路に与える影響を調べた。実験方法では、歯肉上皮細胞を用いた細菌感染実験により、ジンジパインによる PI3K/Akt 経路における細胞・分子生物学的アプローチにより分子解析を行ない、歯周病の発症機序における関連性を調べた。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞と *Pg* の培養

培養細胞は、ヒト歯肉上皮細胞 Ca9-22 および正常歯肉上皮細胞 HGEP (CellnTech) を用いた。培養法はそれぞれ 10%ウシ血清含有 MEM およびメーカー指定培地 CnT-24 を用いて培養を行なった。*Pg* は野生株 ATCC33277 (*Pg*WT 株) とジンジパイン完全欠損株 (*Pg*MT 株) を用いて multiplicity of infection (MOI) 100 になるように感染実験を行った。

(2) *Pg*WT 株と *Pg*MT 株の感染実験

24 well プレートに 1×10^5 個の Ca9-22 細胞と HGEP 細胞に対して MOI of 100 で *Pg*WT 株と *Pg*MT 株を感染 (0, 1, 2, 4 時間) させ、その後細胞溶解液を作製し、Western blotting を行った。それぞれ各種リン酸化特異的抗体にてリン酸化レベルの変化を調べた。

(3) ジンジパインの特異的阻害剤を用いた感染実験

1×10^5 個の細胞に対する *Pg*WT 株と *Pg*MT 株の細菌数 (MOI of 100) を調製し、終濃度 10 μ M になるようにジンジパイン特異的阻害剤 (KYT-1/36) でインキュベート 10 分間行った。その後、Ca9-22 細胞と HGEP 細胞に対して MOI of 100 でジンジパイン阻害剤処理および未処理の *Pg*WT 株を 4 時間まで感染させ、細胞溶解液を作製し、Western blot 法を行った。

(4) Western blot 法

*Pg*WT 株および *Pg*MT 株の感染、およびジンジパイン阻害剤処理、未処理の *Pg*WT 株感染を行ない、可溶化した細胞溶解液を SDS-PAGE にてタンパク質を分離した。分離後、PVDF 膜に転写し、Akt 下流タンパク質 GSK3, mTOR, Bad, MDM2, 4EBP, RPS6, p70S6 に対する各種リン酸化特異的抗体にて各タンパク質の活性化状態を示すリン酸化レベルの変化を調べた。

4 . 研究成果

PgWT 株の感染では GSK3 , mTOR, Bad, MDM2, 4EBP のリン酸化の低下が認められたが ,PgMT 株の感染ではそれらは認められなかった。p70S6K のリン酸化レベルはいずれの株の感染でも変化しなかった。一方 ,RPS6 のリン酸化レベルは ,WT 株の感染でのみ上昇し ,Akt 以外の経路が活性化していることが示唆された。さらにジンジパイン阻害剤 KYT1/36(各終濃度 10uM) 処理した PgWT 株の感染においても PgMT 株の感染と同様に各種タンパク質のリン酸化レベルに変化を示さなかった。従って ,ジンジパインの酵素活性の重要性が示唆された。以上の結果から ,Pg が産生するジンジパインは PI3K や Akt の活性抑制によって脱リン酸化された Akt 下流タンパク質の活性化状態を変化させていることが考えられた。一方で ,ジンジパインの作用は PI3K/Akt 経路の攪乱だけでなく ,RPS6 のように Akt 経路以外の別経路を活性化するなど多様な作用が示された。

今後、各タンパク質の生理的機能への影響とその意義を明らかにしていく。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Nakayama M, Ohara N, The novel function of *Porphyromonas gingivalis* gingipains on the PI3K/Akt signaling pathway, Journal of Oral Biosciences, 査読有, 印刷中 .

Taguchi Y, Sato K, Yukitake H, Inoue T, Nakayama M, Naito M, Kondo Y, Kano K, Hoshino T, Nakayama K, Takashiba S, Ohara N, Involvement of a Skp-like protein, PGN_0300, in the type IX secretion system of *Porphyromonas gingivalis*, Infection and Immunity, 査読有, Vol. 84, No. 1, 2015, pp. 230

- 240.

DOI: 10.1128/IAI.01308-15.

Nakayama M, Inoue T, Naito M, Nakayama K, Ohara N, Attenuation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp, The Journal of Biological Chemistry, 査読有, Vol. 290, No. 8, 2015, pp. 5190 - 5202.

DOI: 10.1074/jbc.M114.591610.

Inoue T, Nakayama M, Taguchi Y, Kano K, Ono M, Shimizu Y, Kuroda T, Ohara N, Characterization of the tripartite drug efflux pumps of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, New Microbiologica, 査読有, Vol. 38, No. 1, 2015, pp. 101 - 108.

Tagawa J, Inoue T, Naito M, Sato K, Kuwahara T, Nakayama M, Nakayama K, Yamashiro T, Ohara N, Development of a novel plasmid vector pTI0-1 adapted for electrotransformation of *Porphyromonas gingivalis*, Journal of Microbiological Methods, 査読有, Vol. 105, 2014, pp. 174 - 179.

DOI: 10.1016/j.mimet.2014.07.032.

[学会発表] (計 1 7 件)

Nakayama M, Naito M, Nakayama K, Ohara N, *Porphyromonas gingivalis* gingipains disturb Akt signaling pathway via inactivation of PI3K, IUMS 2017: International Union of Microbiological Societies, 2017 年 7 月 17 日 ~ 7 月 21 日 , Singapore, Singapore.

Nakayama M, Naito M, Nakayama K, Ohara N, *Porphyromonas gingivalis* gingipains induce PGE2 production via COX-2 expression by activation of MEK1/2 and NF- κ B, PgMelbourne2017: The 3rd International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Species in Oral and Systemic Diseases, 2017年5月14日~5月16日 Melbourne, Australia.

中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, 歯周病における *P. gingivalis* ジンジパインの重要性, 第 90 回日本細菌学会総会 2017年3月19日~3月21日, 仙台国際センター展示棟, 宮城県・仙台市.

中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによる PGE2 産生の分子機序, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017年3月19日~3月21日, 仙台国際センター展示棟, 宮城県・仙台市.

中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, *P. gingivalis* ジンジパインの宿主細胞応答を介した病原性機能解析, 第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2016年10月15日~10月16日, かがわ国際会議場, 香川県・高松市.

中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, PI3K/Akt 経路に対する *P. gingivalis* ジンジパインの役割, 第 58 回歯科基礎医学会学術集会・総会, 2016年8月24日~8月26日, 札幌コンベンションセンター, 北海道・札幌市.

中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, *P. gingivalis* ジンジパインによる PI3K/Akt 経路攪乱の分子解析, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016年3月23日~3月25日, 大阪国際交流センター, 大阪府・大阪市.

加野小奈美, 井上哲圭, 田口裕子, 中山真彰, 内藤真理子, 田川淳平, 中山浩次, 上岡寛, 大原直也, *Porphyromonas gingivalis* における sigma-54 の機能, 第 68 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2015年10月03日~10月04日, 地域医療人育成センターおかやま, 岡山県・岡山市.

中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, *P. gingivalis* ジンジパインによる PI3K/Akt 経路攪乱の分子解析, 第 68 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2015年10月03日~10月04日, 地域医療人育成センターおかやま, 岡山県・岡山市.

中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによる PI3K/Akt 経路の抑制効果とその意義, 第 57 回歯科基礎医学会学術集会・総会, 2015年9月11日~9月13日, 朱鷺メッセ, 新潟県・新潟市.
加野小奈美, 井上哲圭, 田口裕子, 田川淳平, 中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株 *rpoN* 低発現株の性状解析, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015年3月26日~3月28日, 長良川国際会議場, 岐阜県・岐阜市.

田口裕子, 佐藤啓子, 雪竹英治, 井上哲圭, 中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, *Porphyromonas gingivalis* の表層蛋白質の修飾と機能に関する分子の解析, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015年3月26日~3月28日, 長良川国際会議場, 岐阜県・岐阜市.

中山真彰, 中山浩次, 大原直也, 細菌感染による破骨細胞分化への自然免疫応答の重要性, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015年3月26日~3月28日, 長良川国際会議場, 岐阜県・岐阜市.

中山真彰, 中山浩次, 大原直也, 歯周病原細菌の感染による免疫応答と破骨細胞分化制御の相関性, 第 88 回日本細菌学会総会 2015 年 3 月 26 日 ~ 3 月 28 日, 長良川国際会議場, 岐阜県・岐阜市.

中山真彰, 井上哲圭, 中山浩次, 大原直也, 細菌感染による TLR-2 を介した破骨細胞分化制御とその意義, 第 67 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2014 年 10 月 4 日 ~ 10 月 5 日, 徳島文理大学, 徳島県・徳島市.

田口裕子, 井上哲圭, 佐藤啓子, 加野小奈美, 中山真彰, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也, *Porphyromonas gingivalis* における菌体外ジンジバインの酵素活性に関わる新規遺伝子について, 第 56 回歯科基礎医学会学術集会・総会, 2014 年 9 月 25 日 ~ 9 月 27 日, 福岡国際会議場, 福岡県・福岡市.

中山真彰, 井上哲圭, 中山浩次, 大原直也, 細菌感染による免疫応答が破骨細胞分化に与える影響, 第 56 回歯科基礎医学会学術集会・総会, 2014 年 9 月 25 日 ~ 9 月 27 日, 福岡国際会議場, 福岡県・福岡市.

〔その他〕

ホームページ

http://www.cc.okayama-u.ac.jp/oral_microbiology

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大原 直也 (OHARA, Naoya)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 7 0 2 2 3 9 3 0

(2) 研究分担者

中山 真彰 (NAKAYAMA, Masaaki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 1 0 5 7 9 1 0 5

井上 哲圭 (INOUE, Tetsuyoshi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 2 0 2 2 3 2 5 8

大原 直子 (OHARA, Naoko)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 8 0 3 0 1 3 6 5

(3) 研究協力者

田口 裕子 (TAGUCHI, Yuko)

加野 小奈美 (KANO, Konami)