

令和元年6月8日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11053

研究課題名(和文) 歯周病原菌プロテアーゼ毒素と宿主因子の相互作用に基づく歯周病性骨破壊の理解

研究課題名(英文) Understanding of periodontal bone loss based on the interaction of bacterial protease toxins and host factors

研究代表者

宮本 洋一 (Miyamoto, Yoichi)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：20295132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病性歯槽骨破壊の要因は、炎症サイトカインによる骨芽細胞におけるRANKLの発現誘導と考えられている。一方、骨芽細胞は破骨細胞分化の抑制因子OPGを分泌する。本研究では、炎症局所に集積する好中球および好中球が放出する主要なプロテアーゼであるエラスターゼがOPGのC末death domainを加水分解すること、好中球および好中球エラスターゼは、骨芽細胞・骨髄細胞共存培養系における破骨細胞分化を促進すること、 α 1アンチトリプシンは好中球によるOPG分解を阻害することを見出した。以上から、歯周病性歯槽骨破壊に好中球エラスターゼが関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病性骨破壊を含め骨吸収を担う破骨細胞分化は、RANKL/OPGの発現比の変化によって制御されると考えられている。一方、我々は世界で初めて、細菌性プロテアーゼによるOPGの分解によるRANKL/OPG比の上昇が破骨細胞分化の調節に重要な役割を持つことを提唱した。本研究は、この概念を発展させるもので、我々自身の持つプロテアーゼが破骨細胞分化調節において同様の役割を持つことを明らかにしたものである。この成果は、歯周病性骨破壊にとどまらず、骨粗鬆症や関節リウマチなど全身性の骨疾患の病態形成の理解に大きく寄与する可能性を持つものであり、それらの疾患の治療法の開発にも重要な示唆を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Bone loss in periodontitis is caused by enhanced production of bone resorbing factors such as pro-inflammatory cytokines that induce the expression of RANKL, a major osteoclast differentiation-inducing factor, in osteoblasts. On the other hand, osteoblasts secrete OPG, an inhibitor of osteoclast differentiation. In this study, we found that human neutrophils and neutrophil elastase degraded OPG, which was suppressed by addition of α 1-protease inhibitor, a major elastase inhibitor in the blood circulation. Amino acid sequence analyses of OPG fragments obtained after treatment of OPG with human neutrophil elastase indicated that elastase cleaves OPG in its death domain. Finally, human neutrophils enhanced osteoclast differentiation in cocultures of bone marrow cells and osteoblasts. These results suggest that neutrophil elastase is involved in enhanced osteoclastogenesis under an inflammatory conditions via degradation of OPG.

研究分野：生化学

キーワード：破骨細胞 歯周病 骨吸収 プロテアーゼ オステオプロテゲリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、*Porphyromonas gingivalis*をはじめとする種々の歯周病原菌の感染によって発症する慢性炎症性疾患である。罹患者の数が多くことから、世界最大の感染症と言われる。歯周病では、破骨細胞による歯槽骨吸収が進行することで歯の脱落が起こるなど、患者のQOLの著しい低下が起こる。破骨細胞の分化は骨芽細胞や骨細胞が細胞膜上に発現する破骨細胞分化誘導因子RANKLが破骨細胞前駆細胞の膜上に存在するRANKLの受容体RANKに結合することで開始される。一方、骨芽細胞はRANKLの阻受容体であるOPGを分泌していることから、RANKL/OPGの発現比の上昇は破骨細胞分化に重要である。歯周病などの炎症環境下で産生が亢進する炎症性サイトカイン類はRANKL/OPG発現比を上昇させることで破骨細胞分化を促進することが知られている。

我々は、代表的歯周病原菌である*P. gingivalis*が産生するシステインプロテアーゼの一種であるリシン特異的ジンジパイン(Kgp)が、骨芽細胞・骨髄細胞共存培養系で骨芽細胞が産生するOPGを分解することで、活性型ビタミンD、LPSなどの微生物由来産物、TNF- α やIL-1などの炎症性サイトカインにより誘導される破骨細胞分化を強く促進することを報告してきた(Biochem J 419:159-66, 2009; J Biol Chem 289:15621-30, 2014; J Oral Biosci 56:120-4, 2014)。これは、破骨細胞分化におけるRANKL/OPG発現比の重要性に加え、OPGタンパク量をプロテアーゼが制御するという新しい概念を提出するものであった。

病原菌のみならず、我々自身も様々なプロテアーゼやプロテアーゼインヒビターを有している。我々自身のプロテアーゼおよびプロテアーゼインヒビターがOPG量を調節しているか否かは、歯周病性骨破壊に限らず、全身性の骨疾患の理解の観点からも興味深い問題である。

2. 研究の目的

歯周病性骨破壊におけるホストのプロテアーゼの関与を明らかにすることを研究の目的とした。まず、歯周病の発症に関わりの深いプロテアーゼと考えられる、好中球エラスターゼ、MMP-9、破骨細胞が分泌するカテプシンKによるOPGの分解を解析することとした。さらに、OPGを分解する活性が認められたプロテアーゼが破骨細胞分化に影響を及ぼすかを検討した。

3. 研究の方法

好中球は、ヒト末梢血から比重遠心分離により分離した。好中球の活性化は、フォルボールエステル(PMA)刺激により行った。好中球エラスターゼの活性は、合成基質Suc-AAA-pNAの分解で評価した。好中球をハンクス緩衝液に懸濁し、種々の濃度の1プロテアーゼインヒビター存在下にヒト・リコンビナントOPGと37℃で1時間反応させ、反応物をSDS-PAGEで分離し、抗OPG抗体を用いたウェスタンブロッティングでOPGの分解を定量的に評価した。ヒト・リコンビナント好中球エラスターゼ、ヒト・リコンビナントカテプシンK、ヒト・リコンビナント活性型MMP-9によるOPGの分解も同様に解析した。OPGの分解産物のN末アミノ酸配列の解析は、ヒト・リコンビナントOPGとヒト・リコンビナント好中球エラスターゼを反応させた後、SDS-PAGEを行い、メンブレンに転写し、クマシー染色後、主要な分解断片(37K)を切り出し、エドマン法によりアミノ酸配列を解析した。

4. 研究成果

ヒト・リコンビナントOPGをヒト好中球懸濁液に添加したところ、好中球数に依存してOPGの分解が起こった。好中球をあらかじめPMAで刺激すると分解が促進された。また、超音波で破壊した好中球もOPGを分解した。好中球によるOPGの分解は、好中球エラスターゼの内因性阻害タンパク質であるヒト1-プロテアーゼインヒビターによって部分的に阻害された。これらの結果から、OPGは好中球エラスターゼにより分解されることが示唆された。そこで、ヒト・リコンビナント好中球エラスターゼとOPGを反応させたところ、OPGの分解が観察された。この時得られた約37KのOPGの分解断片のN末アミノ酸配列の解析を行ったところ、分解前のOPG(約50K)のN末アミノ酸配列と完全に一致したことから、エラスターゼはOPGのRANKL結合ドメインではなく、さらにC末のデスドメイン類似領域内を加水分解することが明らかとなった。さらに、マウス骨髄細胞・骨芽細胞の共存培養系に活性型ビタミンDを加え、破骨細胞分化を誘導する培養系にヒト好中球を加えたところ、破骨細胞分化が促進された。以上より、炎症局所に集積する好中球から放出されるエラスターゼは、OPGを分解することで破骨細胞分化を促進すると考えられた。

ヒト・リコンビナント・カテプシンKもヒトOPGを分解したことから、破骨細胞から分泌されるカテプシンKがOPGの分解を介して、さらに破骨細胞分化を促進する可能性が考えられた。一方、同様に破骨細胞から分泌されるMMP-9にはOPG分解活性が観察されなかった。

以上の結果から、ヒトのプロテアーゼによるOPGの分解が新たな破骨細胞分化制御システムとして機能する可能性が考えられる。特に、歯周病などの炎症性骨吸収では、好中球エラスターゼなどのプロテアーゼが骨吸収に関わる可能性が高い。さらに、破骨細胞由来のカテプシンKが破骨細胞分化を促進するポジティブ・フィードバック制御が働いている可能性がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Sasa K, Yoshimura K, Yamada A, Suzuki D, Miyamoto Y, Imai H, Nagayama K, Maki K, Yamamoto M, Kamiyo R: Monocarboxylate transporter-1 promotes osteoblast differentiation via suppression of p53, a negative regulator of osteoblast differentiation. *Sc Rep* 8:10579, 2018, 査読有

Kaneko K, Miyamoto Y, Tsukuura R, Sasa K, Akaike T, Fujii S, Yoshimura K, Nagayama K, Hoshino M, Inoue K, Maki K, Baba K, Chikazu D, Kamiyo R: 8-Nitro-cGMP is a promoter of osteoclast differentiation induced by RANKL. *Nitric Oxide* 72:46-51, 2018, 査読有
Rodriguez R, Yoshimura K, Shibata Y, Miyamoto Y, Tanaka R, Uyama R, Sasa K, Suzuki D, Miyazaki T, Kamiyo R: Nanoindentation time-dependent deformation/recovery suggestive of methylglyoxal induced glycation in calcified nodules. *Nanomedicine* 13:2545-2553, 2017, 査読有

Hoshino M, Kaneko K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Suzuki D, Akaike T, Sawa T, Ida T, Fujii S, Ihara H, Tanaka J, Tsukuura R, Chikazu D, Mishima K, Baba K, Kamiyo R: 8-Nitro-cGMP promotes bone growth through expansion of growth plate cartilage. *Free Rad Biol Med* 110:63-71, 2017, 査読有

Funato S, Yasuhara R, Yoshimura K, Miyamoto Y, Kaneko K, Suzawa T, Chikazu D, Mishima K, Baba K, Kamiyo R: Extracellular matrix loss in chondrocytes after exposure to interleukin-1 in NADPH oxidase-dependent manner. *Cell Tissue Res*, 368:135-144, 2017, 査読有

金子児太郎, 宮本洋一, 近津大地, 上條竜太郎: 一酸化窒素の新規シグナル分子 8-Nitro-cGMP: その骨伸長における役割. *日本口腔組織培養学会誌* 26:1-8, 2017, 査読無

Miyamoto Y, Akaike T, Kawabata S, Akuta T, Taruki C, Yoshitake J, Hamada S, Ota F, Igarashi H, Yoshimura K, Kamiyo R, Maeda H: Degradation of bradykinin by a metalloendopeptidase from *Streptococcus pyogenes*. *J Oral Biosci* 58:167-172, 2016, 査読有

[学会発表](計 24 件)

今井裕子, 吉村健太郎, 宮本洋一, 茶谷昌宏, 高見正道, 上條竜太郎, 山本松男: 破骨細胞におけるモノカルボン酸トランスポーター(MCT)の役割について. 第 65 回昭和大学学士会総会, 2018

瀧本玲子, 宮本洋一, 山田 篤, 須澤徹夫, 笹 清人, 上條竜太郎, 代田達夫: ビスホスホネートのヒト末梢血単核球に対する作用. 第 65 回昭和大学学士会総会, 2018

Takimoto R, Miyamoto Y, Yamada A, Suzawa T, Sasa K, Shirota T, Kamiyo R: Zoledronate promoted the expression of inflammatory cytokines in CD14+ cells in human peripheral blood mononuclear cells and inhibited their differentiation into osteoclasts. The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2018

Imai H, Yoshimura K, Miyamoto Y, Chatani M, Takami M, Kaijo R, Yamamoto M: -Cyano-4-hydroxycinnamic acid suppresses bone resorption. *American Academy of Periodontology* 104th Annual Meeting, 2018

今井裕子, 吉村健太郎, 宮本洋一, 茶谷昌宏, 高見正道, 山本松男, 上條竜太郎: モノカルボン酸トランスポーター阻害剤 -Cyano-4- hydroxycinnamic acid は破骨細胞の骨吸収を抑制する. 第 60 回歯科基礎医学会, 2018

十九浦リサ, 宮本洋一, 近津大地, 上條竜太郎: 好中球エラストラーゼによるオステオプロテゲリンの分解と破骨細胞分化. 第 36 回日本ヒト細胞学会学術集会, 2018

吉村健太郎, 笹 清人, 今井裕子, 宮本洋一, 山本松男, 上條竜太郎: モノカルボン酸トランスポーターを介した骨代謝調節. 第 18 回東京骨関節フォーラム, 2018

今井裕子, 吉村健太郎, 宮本洋一, 山田 篤, 笹 清人, 茶谷昌宏, 高見正道, 山本松男, 上條竜太郎: -cyano-4-hydroxycinnamic acid は破骨細胞の骨吸収を抑制する. 第 4 回日本骨免疫学会, 2018

宮本洋一, 船登咲映, 安原理佳, 吉村健太郎, 金子児太郎, 近津大地, 美島健二, 馬場一美, 上條竜太郎: NADPH オキシダーゼ-2 に依存した軟骨基質の減少. 第 3 回日本骨免疫学会, 2017

Kaneko K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Akaike T, Ida T, Chikazu D, Kamiyo R: 8-Nitro-cGMP, a downstream signaling molecule of nitric oxide, is a novel regulator of bone metabolism that suppresses mineralization by osteoblasts and enhances differentiation of osteoclasts. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2017

Tsukuura R, Miyamoto Y, Kaneko K, Oshio A, Iezumi Y, Takenaka M, Shirakura K, Chikazu D, Kamiyo R: Persulfides promote osteoclast differentiation in vitro. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2017

Nagayama K, Yasuhara R, Miyamoto Y, Yoshimura K, Mishima K, Maki K, Kamijo R: Fragmented hyaluronan plays important roles in loss of extracellular matrix and cell death in chondrocytes in vitro. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2017

笹 清人, 吉村健太郎, 宮本洋一, 上條竜太郎: モノカルボン酸トランスポーター1は骨芽細胞分化の新規制御因子である. 第59回歯科基礎医学会学術大会, 2017

十九浦リサ, 宮本洋一, 金子児太郎, 近津大地, 上條竜太郎: 活性イオウ分子種は破骨細胞分化を促進する. 第54回日本口腔組織培養学会, 2017

Hoshino M, Kaneko K, Miyamoto Y, Akaike T, Yoshimura K, Suzuki D, Nagayama K, Maki K, Chikazu D, Baba K, Kamijo R: 8-Nitro-cGMP promotes elongation of long bones mice. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide, 2016

Kaneko K, Hoshino M, Miyamoto Y, Yoshimura K, Suzuki D, Tsukiura R, Akaike T, Chikazu D, Baba K, Kamijo R: Reactive sulfur species promotes bone elongation. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide, 2016

Yoshimura K, Miyamoto Y, Yamada A, Suzawa T, Kamijo R: Immediate expression of NOS2 and monocarboxylate transporter-1-dependent delayed expression of NOX2 are required for interleukin-1 β -induced cell death in mouse chondrocytes. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide, 2016

Izumida E, Miyamoto Y, Yamaguchi T, Kamijo R, Maki K: Functional analysis of parathyroid hormone 1 receptor mutants found in primary failure of tooth eruption. 92nd Congress of the European Orthodontic Society, 2016

鈴木啓明, 望月文子, 吉村健太郎, 宮本洋一, 金子児太郎, 近津大地, 高見正道, 上條竜太郎: Bropirimineはinterferon- γ の産生を介して破骨細胞分化を抑制する. 第34回日本骨代謝学会学術集会, 2016

Rodriguez R, Yoshimura K, Miyamoto Y, Shibata Y, Miyazaki T, Kamijo R: Methylglyoxal promotes formation of calcified nodules by mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. 第3回アジア太平洋骨代謝会議, 2016

- 21 宮本洋一: 8-ニトロ-cGMPは新しい骨伸長因子である. 第58回歯科基礎医学会学術集会サテライトシンポジウム, 2016
- 22 金子児太郎, 星野真理江, 宮本洋一, 赤池孝章, 井田智章, 藤井重元, 近津大地, 馬場一美, 上條竜太郎: 8-NO₂-cGMPは骨の身長を促進する内因性シグナル分子である. 第69回日本酸化ストレス学会学術集会, 2016
- 23 宮本洋一, 金子児太郎, 星野真理恵, 赤池孝章, 井田智章, 藤井重元, 馬場一美, 近津大地, 上條竜太郎: 8-nitro-cGMPは成長板軟骨で産生される骨伸長因子である. 第69回日本酸化ストレス学会学術集会, 2016
- 24 泉田恵理, 宮本洋一, 山口徹太郎, 須澤徹夫, 上條竜太郎, 榎 宏太郎: 疾患特異的iPS細胞を用いた原発性萌出不全発症機序の解析. 第75回日本矯正歯科学会大会, 2016

〔図書〕(計 1 件)

宮本洋一, 金子児太郎, 上條竜太郎: 骨粗鬆症の酸化ストレス病態. (赤池孝章, 本橋ほづみ, 内田浩二, 末松 誠 編 実験医学 増刊「レドックス疾患学」) 実験医学, 36 (5) [増刊]: 205-210, 2018

〔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:
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

6．研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉村健太郎
ローマ字氏名：Yoshimura, Kentaro

研究協力者氏名：船登咲映
ローマ字氏名：Sakie, Funato

研究協力者氏名：泉田理恵
ローマ字氏名：Izumida, Eri

研究協力者氏名：金子児太郎
ローマ字氏名：Kaneko, Kotaro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。