

令和元年6月14日現在

機関番号：37502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20415

研究課題名(和文) 重度侵襲性歯周炎原因細菌による新規病原機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel pathogenic mechanism of aggressive periodontitis by oral bacteria

研究代表者

塩屋 幸樹 (SHIOYA, KOKI)

別府大学・公私立大学の部局等・講師

研究者番号：40727632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性歯周炎にはグラム陰性桿菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) が関与していることが示唆されており、特にロイコトキシン (Ltx) 高生産株 Aa JP2 株が分離されている。本研究では、LtxA が骨吸収に影響する破骨細胞への分化に影響することを明らかにした。しかしながら、単独での分化能は弱く、LPS などの他の因子と協調的に働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵襲性歯周炎の有効な治療法はなく、新たな治療薬の開発は急務であった。本実験で LtxA が骨吸収に影響することが示唆されたため、LtxA をターゲットにした創薬に繋がることが期待される。また、この知見は通常の歯周炎の発症メカニズム解明にも役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Gram-negative bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) are involved in aggressive periodontitis in adolescents of African descent, and in particular leucotoxin (Ltx) highly producing strain Aa JP2 strain has been isolated. In this study, LtxA affects osteoclast differentiation that affects bone resorption. However, the ability to differentiate was very weak, suggesting that LtxA co-work with other pathogen factor such as LPS.

研究分野：微生物学

キーワード：侵襲性歯周炎 ロイコトキシン 骨吸収 病原因子

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

1. 研究開始当初の背景

侵襲性歯周炎は、思春期前後の若年者に発症し、前歯および第一大臼歯に局限した歯槽骨吸収を示すこと、歯周組織の破壊や歯槽骨吸収が急速であること、罹患者がアフリカ系人種に限られている特徴がある。多くの侵襲性歯周炎罹患者からはグラム陰性桿菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) が高頻度で分離されており、本菌種と侵襲性歯周炎との関連が強く示唆されていた。特に西アフリカや北アフリカ地域の侵襲性歯周炎患者からはロイコトキシン (Ltx) 高生産株 Aa JP2 株が分離されている。しかし、JP2 株が重篤な侵襲性歯周炎を発症する理由および急速な歯槽骨吸収を引き起こす機構は不明のままであった。このように侵襲性歯周炎の歯槽骨吸収機構解明には、JP2 株由来の LtxA の特徴を明らかにすることは非常に重要であった。

2. 研究の目的

侵襲性歯周炎には Aa の感染の関与が示唆されているが、その発症機構は依然不明のままであった。しかし、本疾患の重篤度に LtxA 高生産株 JP2 の関与が示唆されていることより、LtxA が歯槽骨吸収に関与することが推測された。そこで本研究では、JP2 株由来の LtxA に着目し、歯槽骨吸収およびその構造を明らかにすることで、侵襲性歯周炎の発症機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LtxA の精製

Aa JP2 株を GAM 培地で嫌氣的に培養後、遠心分離にて上精を回収した。上精を硫酸沈殿法にて濃縮後、ゲルろ過クロマトグラフィーに供した。各フラクションを SDS-PAGE に供し、CBB 染色あるいは抗 LtxA 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、精製を確認した。

(2) マウス由来の骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞の共存培養への LtxA 添加実験

BALB/c マウスあるいは TLR4 欠損マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞の共存培養に各種濃度の LtxA を添加し、破骨細胞への分化を評価した。また、ネガティブコントロールとして熱変性した LtxA を、ポジティブコントロールとして VD、PEG₂、RANKL を添加した。

(3) マウス由来の骨髄細胞系への LtxA 添加実験

BALB/c マウスあるいは TLR4 欠損マウス由来の骨髄細胞に M-CSF、RANKL および各種濃度の LtxA を添加し、破骨細胞への分化を評価した。また、ネガティブコントロールとして熱変性した LtxA を添加した。

4. 研究成果

(1) マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いた共存培養系を用いた LtxA による骨吸収活性解析

骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系に LtxA を添加し、LtxA による破骨細胞の分化・活性化を評価した。JP2 株由来の LtxA を共存培養に添加することで、破骨細胞への分化が濃度依存的に促進した (図 1)。しかし、その誘導活性は、ポジティブコントロールと比較し約 1/5 と弱い活性であった。さらに、100 ng/ml の LPS 添加と同程度の誘導能であったため、LPS が分化に影響することが示唆された。そこで、次に LPS の影響が少ない TLR4 欠損マウスを用いた同様な実験を行った。

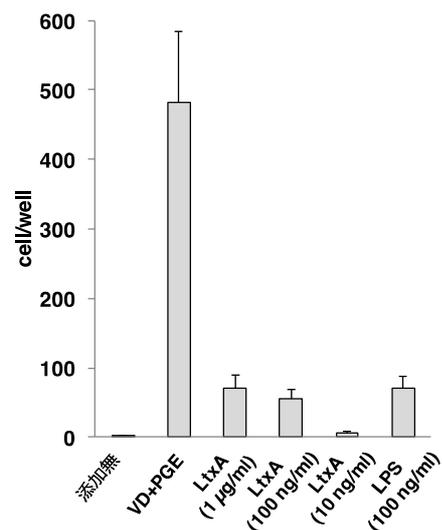


図1 LtxAによる破骨細胞分化実験

(2) TLR4 欠損マウス由来の骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いた LtxA による骨吸収活性解析

LPS の影響を低減するため TLR4 欠損マウス由来の骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いた添加実験を行った。精製 LtxA を添加した結果、濃度依存的に破骨細胞の分化が確認された (図 2)。また、LPS の影響も見られず、LtxA による分化が示唆された。さらに、熱処理した精製 LtxA を用いた際には、破骨細胞への分化が確認されなかったことより、LtxA が分化に影響することが示唆された。しかし、その分化能はポジティブコントロールよりも低く、LPS などの LtxA 以外の因子が分化に影響し、LtxA と協調して作用することが示唆された。

(3) マウス由来の骨髄細胞系への LtxA 添加実験

共存培養系で LtxA の作用が確認されたので、次に単球から破骨細胞への分化における LtxA の影響を評価した。様々な濃度の精製 LtxA を添加したが、濃度間で破骨細胞の数に影響が見

られなかった。ポジティブコントロールと比較した結果、破骨細胞の数がわずかに減少しており、LtxA 単独では単球から破骨細胞への分化能がなく、逆に阻害していることが示唆された。

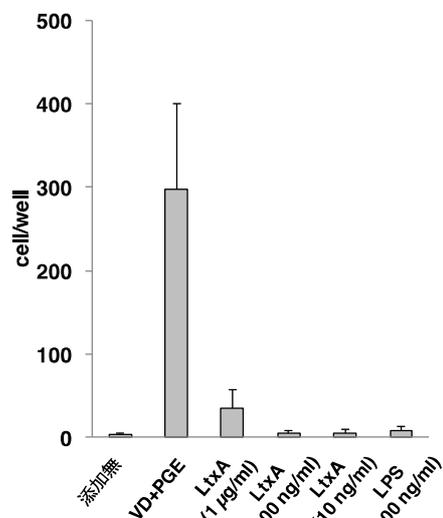


図2 LtxAによる破骨細胞分化実験



図3 LtxAの保存実験

(4) LtxA の構造解析

LtxA の 3 次元構造を明らかにするで、その作用機序を詳細に解明することができる。そこで、LtxA を精製し、結晶化、X 線解析を試みた。まず、LtxA の精製に関しては、JP2 株が LtxA 高生産株であるため培養液上清より精製を行った。培養液 1L より約 10mg の LtxA を精製できた。しかし、安定性が悪く、低温で保存すると自己分解が起こることが判明した(図3)。そこで、様々な金属イオンを添加し、安定性の向上を試みた結果、カルシウム存在下で比較的安定して存在することが判明した。結晶化の条件のスクリーニングを行なったが、結晶を得ることが出来なかった。LtxA は 3 つのドメインからなるタンパク質である。そこで、全体での構造解析ではなく、部分的な構造を明らかにするために、各ドメインの発現ベクターを構築し、精製を行った。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakamura S, Shioya K, Hiraoka BY, Suzuki N, Hoshino T, Fujiwara T, Yoshinari N, Ansai T, Yoshida A. Porphyromonas gingivalis hydrogen sulfide enhances methyl mercaptan-induced pathogenicity in mouse abscess formation. Microbiology. 164:529-539. (2018) (査読有)(DOI: 10.1099/mic.0.000640)

〔学会発表〕(計 8 件)

中村 卓、塩屋 幸樹 他 Porphyromonas gingivalis の硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応の解析、第 85 回 松本歯科大学学科、2017 年

中村 卓、塩屋 幸樹 他 Porphyromonas gingivalis の硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応の解析、第 12 回 JSP-JACP 合同研究会、2017 年

中村 卓、塩屋 幸樹 他 Porphyromonas gingivalis の硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応の解析、第 100 回 日本細菌学会関東支部総会、2017 年

塩屋 幸樹 他 Porphyromonas gingivalis の硫化水素産生によるマウス生体反応の解析、第 59 回 歯科基礎医学会学術大会、2017 年

塩屋 幸樹 他 Porphyromonas gingivalis の産生する硫化水素によるマウス生体反応の解析、第 11 回 細菌学若手コロッセウム、2017 年

Koki Shioya 他 The role of Porphyromonas gingivalis hydrogen sulfide in mouse inflammation. 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会、2016 年

塩屋 幸樹 他 マウスにおける *Porphyromonas gingivalis* の硫化水素産生酵素による生体反応解析 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会、2016 年

塩屋 幸樹 他 *Porphyromonas gingivalis* の硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応の解析 第 10 回 細菌学若手コロッセウム、2016 年

〔その他〕

大学ホームページ

<https://www.mdu.ac.jp/faculty/course/expert-basis/saikin.html>

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。