

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592394

研究課題名（和文） 歯周病原菌ゲノム解析に基づく免疫療法用標的分子の探索

研究課題名（英文） Search for target molecule for immunotherapy based on *Porphyromonas gingivalis* genome analysis

研究代表者

柴田 恭子 (SHIBATA YASUKO)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：90133438

研究成果の概要（和文）：日本人の進行性歯周炎患者に高頻度に *Porphyromonas gingivalis* が存在しており、その70%が線毛FimA II型であることが報告されている。本研究では、FimA線毛II型 *P. gingivalis* のゲノムプロジェクトを進め、日本人の歯周病患者に特異的に働く病原因子の探索として、比較ゲノム的に、或は、網羅的タンパク質発現比較から、新たな特異的な病原遺伝子を解析し、受動免疫用抗体の作成を行った。

研究成果の概要（英文）：*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), an important periodontal pathogen in periodontitis, possesses a variety of virulent factors, and are classified into six genotypes (types I-V and Ib) based on the genotype of fimbriae A (*fimA*). The epidemiological studies shown that *fimA* II strains is harbored in most of the aggressive periodontal patients, and are thought to be strongest related to aggressive periodontitis, furthermore, *fimA* II is most frequently detected in patients with cardiovascular disease. In this report, to develop passive immunotherapy, we tried to search the new pathogen of this type II *P. gingivalis* using the genomic and proteomic techniques, and then mouse monoclonal antibody (MAb), which neutralizes virulent factor activity, is constructed.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：感染症、ゲノム、細菌、歯学、免疫学

1. 研究開始当初の背景

歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* は、絨毛 (FimA) の型により I-V 型に分類されている。日本人の進行性歯周炎患者のほとんどに *P. gingivalis* が存在しており、その70%が II 型であること、さらに、健常者においても *P. gingivalis* が存在し、その80%は I 型であるこ

とが報告されている。しかしながら日本国内外を問わず、I 型 *P. gingivalis* 研究が主流であり、このことが *P. gingivalis* 研究が多くなされながらも、今まで歯周病撲滅に至らなかった原因の一つではないかと想像できる。

病原因子の機能ドメインや主要エピトープを利用したコンポーネントワクチン、抗血清

や精製抗体を利用した病原因子を中和する受動免疫は安全性が高いといわれている。申請者は、歯周病の免疫療法を目指し、本研究を始めるまでに、次の研究を進めてきた。

- *P. gingivalis*の定着に関与する 40-kDa OMP、130-kDa赤血球凝集因子の抗原エpitep部位/機能部位の特定に関する研究
- これら病原因子活性を中和できる安全な受動免疫抗体作製を目指した組換え単鎖Fv抗体の開発
- ヒトB細胞を不死化するEpstein-Barr Virus (EBV)感染法によるヒト型抗体作製
- ヒト抗体遺伝子をもつトランスジェニックマウスを応用したヒト型抗体の作製

一方、ゲノム情報を基盤とするゲノミクス・プロテオミクス情報を構築し統合的に相互利用するバイオインフォマティクス研究はあらゆる疾患の分子標的医療の実現の効果的な戦略として期待されている。TIGR/Forsyth Dental Center によって *P. gingivalis* W83株のゲノム計画が終了しているが、W83株は *fimA*遺伝子多型分類でIV型に属し、一方、日本人の進行性歯周炎患者から分離されるのは圧倒的にII型が多い。また、細胞定着因子として重要視されている *hagA* 遺伝子や繊毛遺伝子がW83株に存在しないことも明らかになっている。このように、明らかに病原性の異なるIV型、II型 *P. gingivalis* のゲノム比較することによって解明される違いが歯周病の発症/悪化の過程に重大な意味をもつと考えられる。このような背景から、II型菌のゲノム計画完成後、日本研究者にゲノム情報を提供することは日本人の歯周炎の治療戦略として意義が深い。ゲノム計画を基盤とする本研究の遂行は、細菌学的な比較ゲノム科学に貢献するだけでなく、歯周病のパラサイト研究に新しい展開を産みだし、標的分子治療の実現に大きな貢献が期待出来る。

2. 研究の目的

日本人のための歯周病治療/予防を目的とした免疫療法の開発を目指し、日本人の進行性歯周炎患者に多く分離されるII型 *P. gingivalis* について、その病原性を明らかにし、日本人歯周病撲滅へ向けて免疫療法開発のための新規標的分子の探索を目的とした。

始めに、II型 *P. gingivalis* のゲノムプロジェクト終了後に得られるゲノム情報と、米国TIGRでゲノムプロジェクトの終了しているW83 *P. gingivalis* (IV型) のゲノム情報を比較することによって、II型 *P. gingivalis* の病原性因子を探索する。ドラフトシーケンスから得られる予測ORF情報を基に独自のTDC60の

fasta databaseを作成し、MALDI TOF-MSを応用した網羅的なプロテオーム解析を行なうことによって発現遺伝子をタンパク質レベルから効果的に同定することが可能と考えている。日本人患者のための日本人歯周病の原因とされる菌株に病原因子を想定した新規抗原の探索を行い、日本人歯周病患者に有用な抗体療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

Bioinformatic analysis

P. gingivalis TDC60の予測ORFを、blast検索し、各遺伝子の機能予測を行う。W83との各遺伝子の相同性を比較し、W83に存在しているTDC60に存在しない遺伝子、或は、TDC60にのみ存在する遺伝子、また、W83と大きく変異している遺伝子、といったカテゴリーをもうけ、各遺伝子について比較検討する。

P. gingivalis TDC60 発現遺伝子の解析

P. gingivalis TDC60株の予測ORFを基盤に、Fastaデータベースを構築する。二次元電気泳動によって展開されたタンパク質スポットについて、TOF-MSにて同定解析を行なう。*P. gingivalis* TDC60のORF databasesを用いて同定を試みる。

P. gingivalis TDC60 (II型) の病原因子のクローニング

P. gingivalis TDC60を用いて、本菌株特異的な分子のクローニングを行う。TDC60においてのみ存在する遺伝子、W83と比べた時に変異の大きい遺伝子については優先的にクローニングを開始する。

網羅的モノクローナル抗体の作製

FimA線毛II型 *P. gingivalis* TDC60株の菌体成分、さらに培養液中への分泌成分をそれぞれ3匹ずつのマウスに免疫し、網羅的モノクローナル抗体作製を行う。ゲノム上2000ほど存在する遺伝子のそれぞれの産物に対する抗体がすべて作製される訳ではないが、重複して作製された抗体は、抗原性の高い分子と考えられる。

4. 研究成果

線毛II型 *P. gingivalis* genome project

2004年より着手していたFimA線毛II型 *P. gingivalis* TDC60株のゲノムプロジェクトにより、TDC60 (II型) 株の染色体マップ (図1) の作製に成功した。全長が2,340,032bpからなる環状DNAで、プラスミドの存在は認められなかった。I, IV型 *P. gingivalis* の染色体の複

製開始点でのゲノム配列は保存されていたが、その他の部位では非常にランダムにゲノム構造が入れ替わっていることが判明した。図2にTDC60株とATCC33277株、W83株との比較を示す。W83株とATCC33277株との間にも、違いが認められるが、それ以上にTDC60株との違いは大きい。

現在、60 amino acid 以上で構成されているORFとして、1,874 ORF の確定を終了した。I型ATCC33277では、20 amino acid 以上のものが約2,000と報告されていることから、最終的にはORF数としては同じくらいになると想定している。また、Conjugative transposonを介して、ATCC33277、W83とは異なる遺伝子群が入り込んでいることから、新規病原因子の存在が示唆される。また、ゲノム構造の変化が非常に大きく、同じISが数十カ所に散在している。

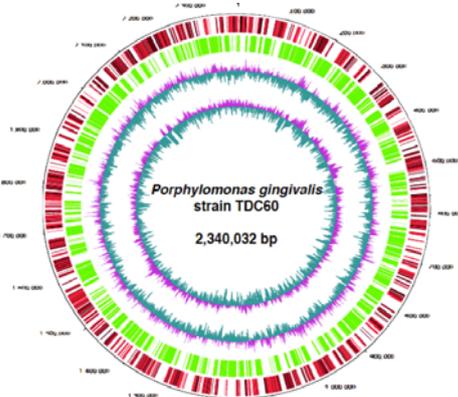


図1. *P. gingivalis* TDC60 genome map

一番外側の円は+鎖方向のORF、2番目は-鎖方向のORF、3番目はGC skew、4番目はAT skewを示す。



図2. Genome structures of *P. gingivalis*

P. gingivalis TDC60株のゲノム配列を元に、W83株およびATCC33277株との比較ゲノム解析を行った。

線毛II型 *P. gingivalis* の特異遺伝子の探索

TDC60株のORF検索を行った結果、300近くの遺伝子について、W83株に存在しない新規遺伝子の可能性があることが判明した。それらをblast searchした結果、他の細菌遺伝子と同一性のある遺伝子の存在することが判明した。表1にその結果を示す。特に、同一性の高い

遺伝子が多かった *Bacteroides thetaiotaomicron* (23遺伝子)、*Bacteroides fragilis* (19遺伝子) については、もともと *Porphyromonas gingivalis* が、*Bacteroides* 属に分類され、*Bacteroides gingivalis* と呼ばれていたことから、これらの細菌に相同性の高い遺伝子を保有していることは、*Porphyromonas* 属としてのルーツと考え合わせると興味深い結果といえる。今後、ゲノムプロジェクトの完成と共に、さらに解析を進める計画である。表2には、おそらく完全な遺伝子として存在している可能性のある遺伝子としてサイズの大きいものから10遺伝子を示した。特徴的にあげられる AcrB、cation/multidrug efflux pump 遺伝子、ペプチダーゼなどは、*P. gingivalis* が口腔内で生き残るために保持されている遺伝子の可能性が考えられる。

表1. Possible ORF numbers with a homology of other bacteria (total 309)

| Genes | |
|-------|--|
| 23 | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482 |
| 19 | <i>Bacteroides fragilis</i> |
| 13 | <i>P. gingivalis</i> , <i>P. gingivalis</i> W83, 381, W50, |
| 6 | <i>Flavobacterium johnsoniae</i> |
| 5 | <i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i> |
| 4 | <i>Escherichia coli</i> |
| 4 | <i>Microscilla marina</i> |
| 4 | <i>Psychococcus furiosus</i> |
| 4 | <i>Shewanella sp</i> |
| 3 | <i>Chlorobium chlorochromatii</i> |
| 3 | <i>Gramella forsetii</i> |
| 3 | <i>Methanopyrus kandleri</i> |

P. gingivalis 特異病原因子の研究

P. gingivalis の増殖は hemin に強く依存することから、hemin 欠乏下での培養にて発現変動する遺伝子を探索し解析した。さらに、*P. gingivalis* の hemin 結合タンパク質については、長い間不明であったが、当教室で、HBP35 分子として始めて同定し他 (Biochem Biophys Res Commun, 2003)。歯周病原細菌の口腔内への定着に関わり、さらに増殖に関わる *P. gingivalis* の外膜タンパク質分子 40-kDa OMP (hemin binding protein: HBP35) の機能について構造と合わせたメカニズム解析をおこなっている。特に、本分子内の thioredoxin domain の機能に関わる HBP35 分子の機能解明 (Microb Pathog, 2008; Biosci Biotechnol Biochem, 2008; Microb Pathog, 2010) に取り組んでいる。HBP35 については、その立体構造解明を行い、hemin 結合部位と本分子内の cys 残基との関わりについて研究

を進めている。図3に明らかとなった立体構造を示す。

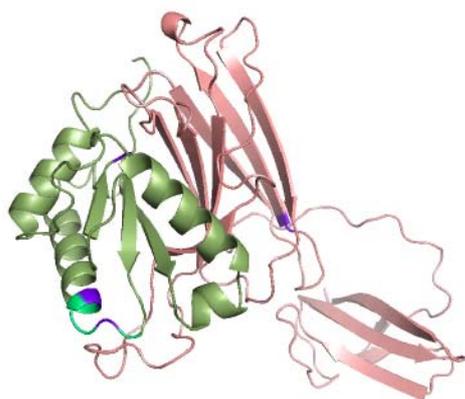


図3. Hemin Binding Protein 35

一方、*P. gingivalis* の酸素抵抗性で変動するリン酸化タンパク質のプロテオーム解析を行った結果、2-oxoglutarate oxidoreductase のリン酸化が増大していることが判明し、*P. gingivalis* の酸化ストレス早期抵抗性がエネルギー産生に影響を及ぼしている事を示唆した(87th General Session & Exhibition of the IADR, 2009)。プロテオームを用いて、マウス皮下砲に投与した *P. gingivalis* の病原因子発現変動を探索した(Oral Microbiol Immunol, 2008)。

MALDI TOF-MSによる発現タンパク質比較

ゲノム上、日本人歯周病患者口腔内に多く認められるFimA線毛II型TDC60株にのみ存在する遺伝子数として現在300遺伝子があげられているが、実際に機能遺伝子としてタンパク質発現しているかは別の問題である。そこで、*P. gingivalis* 各株のタンパク質分子を二次元電気泳動で展開し、網羅的に比較検討した。TDC60株の特異病原因子の探索のため、FimA線毛IV型W83株とTDC60株との発現タンパク質分子について、それぞれの菌体培養液を10% TCA で処理した後、二次元電気泳動を行い、それぞれのゲルをCBBにて染色し、網羅的に比較した。図4Aには、それぞれの泳動ゲル3枚の平均画像を示した。W83株と比べて、3倍以上発現が上昇しているタンパク質スポットは20、減少している分子は10であった。TDC60株のゲルにのみ存在するタンパク質スポットは167存在した。このうち、25スポットについては、W83株のデータベースでは同定出来なかったことから、これらがTDC60株の特異的発現分子である可能性は高い。図4Bに示すように、明らかにW83株の二次元電気泳動ゲルとは異なって認められるスポットa, b, cが認められ、これらのスポット分子は、Contig155-50と同定された。

特異的発現分子Contig155-50について、ホモロジー検索を行った結果、ATCC33277株の

PGN_0287 (mfal fimbrilin, 67-kDa major outer membrane protein) と、アミノ酸で86% 相同性があった。この分子は、*P. gingivalis* の線毛FimAを「メジャー線毛」と呼ぶのに対して「マイナー線毛」と呼ばれる分子であること、或は、FimAを「longer 線毛」と呼ぶのに対して、「short 線毛」と呼ばれるモノマーの時の分子量70 kDaの分子であることが判明した(第51回歯科基礎医学会学術大会, 2009)。

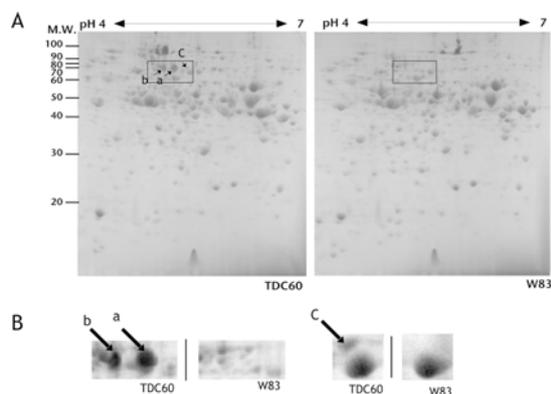


図4. *P. gingivalis* TDC60株とW83株でのタンパク質スポットの比較

TDC60株で特異的に認められたタンパク質スポット、Fig. 1A□内のspot a, spot b, spot cについて、MALDI TOF-MSを用いて同定した。

Spot a: Contig155_50

Spot b: Contig155_50

Spot c: Contig155_50, PG0178 cell surface protein

P. gingivalis TDC60株の特異的病原因子のクローニングおよび受動免疫治療用各種抗体の作成

診断・治療を目指した、能動免疫法の開発と共に、受動免疫療法に有用な抗体の作製を行っている。抗体として、ヒト型モノクローナル抗体を作製した。日本人の歯周病患者から極めて多く分離されるII型 *P. gingivalis* TDC60の病原性を明らかにし、歯周病治療、予防のための免疫療法の新規標的分子の探索を目的として、TDC60に特異的にみられる分子のクローニングを行った。予測ORF情報を基に独自のTDC60のdatabaseを作成し、既にゲノム計画が終了しているIV型 *P. gingivalis* W83株のゲノム情報と比較した結果、II型 *P. gingivalis* TDC60に存在し、IV型W83に存在が認められないものとして候補が上がった分子、または、TOF-MASを用いたプロテオーム解析により、TDC60にのみ特異的に発現が確認された分子に注目し、PCRでゲノム中の遺伝子の存在を確認後、その中からタンパク質発現分子についてクローニングを行った。

本研究では、将来的にヒトへの投与を鑑み、抗体遺伝子をヒト型としたトランスジェニックマウスを用いた、ヒト型モノクローナル抗体の作製を行った。*P. gingivalis* hemagglutinin分子に対する抗体 (Vaccine, 2005)、HBP35分子に対する抗体を作成し抗体の治療効果をあわせて検討し報告した (J Periodontol. 2007; J Periodontal Res, 2008; Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2009)。TDC60株では、特に抗原性の高い内毒素(LPS)に対する抗原認識の異なった数種のモノクローナル抗体を作製し、治療への応用と共に、抗原エピトープ研究につながる抗体の作製を行った (Hybridoma (Larchmt). 2009)。

新たな治療法の開発

抗体療法以外の新規治療法としてレーザー照射による炎症の抑制効果を見だし、この炎症抑制メカニズムを考察した (Lasers Surg Med, 2007; J Photochem Photobiol B, 2009; Mol Med Reports, 2009)。ゲノムにもとづいた治療法の確立を目指す上で、創薬はもちろんであるが、真薬に頼らない治療手段の開発も重要と考える。レーザー照射の炎症抑制メカニズムの解析も合わせて行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Monoclonal antibodies produced against lipopolysaccharide from fimA Type II *Porphyromonas gingivalis*. Maruyama M, Hayakawa M, Zhang L, **Shibata Y**, Abiko Y. Hybridoma (Larchmt). 2009 Dec;28(6): 431-434. 査読有
- ② IL-1 \cdot stimulates IL-8 production, including prostaglandin E₂ receptor EP₄-triggered pathways, in synovial cells. **Shibata Y**, Kasai H, Shimada M, Koitabashi T, Arai T, Sai R, Terao H, Horikiri M, Negishi H, Miyazawa K, Abiko Y. Mol Med Reports, 2009 May 2(3): 359-363. 査読有
- ③ Effects of linear polarized infrared light irradiation on the transcriptional regulation of IL-8 expression in IL-1 \cdot -stimulated human rheumatoid synovial cells involves phosphorylation of the NF- κ B RelA subunit. **Shibata Y**, Araki H, Oshitani T, Imaoka A, Matsui M, Miyazawa K, Abiko Y. J Photochem Photobiol B. 2009 Mar 3;94(3):164-170. 査読有
- ④ Functional analysis of the thioredoxin

domain in *Porphyromonas gingivalis* HBP35. Shiroza T, Okano S, **Shibata Y**, Hayakawa M, Fujita K, Yamaguchi K, Abiko Y. Biosci Biotechnol Biochem. 2008 Jul;72(7):1826-1835. 査読有

- ⑤ Proteomic analysis of apoptosis induced by xanthoangelol, a major constituent of *Angelica keiskei*, in neuroblastoma. Motani K, Tabata K, Kimura Y, Okano S, **Shibata Y**, Abiko Y, Nagai H, Akihisa T, Suzuki T. Biol Pharm Bull. 2008 Apr;31(4):618-626. 査読有
- ⑥ *Porphyromonas gingivalis* gingipains cause G(1) arrest in osteoblastic/stromal cells. Kato T, Tsuda T, Inaba H, Kawai S, Okahashi N, **Shibata Y**, Abiko Y, Amano A. Oral Microbiol Immunol. 2008 Apr;23(2):158-164. 査読有
- ⑦ Gene expression of MC3T3-E1 cells on fibronectin-immobilized titanium using tetracycline activation technique. Pugde K, **Shibata Y**, Yamamichi N, Tsutsumi H, Yoshinari M, Abiko Y, Hayakawa T. Dent Mater J. 2007 Sep;26(5):647-655. 査読有
- ⑧ The r40-kDa outer membrane protein human monoclonal antibody protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss in rats. Hamada N, Watanabe K, Tahara T, Nakazawa K, Ishida I, **Shibata Y**, Kobayashi T, Yoshie H, Abiko Y, Umemoto T. J Periodontol. 2007 May;78(5):933-939. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① レーザによる炎症性シグナル伝達系の抑制効果、**柴田恭子**、日本レーザー医学会、2009/12/3 (東京)
- ② *P. gingivalis*におけるATP transporterのリン酸化とLPS産生への酸素刺激の影響、**豊田隆雄**、**岡野総一郎**、**柴田恭子**、**安孫子宜光**、第52回秋季日本歯周病学会学術大会、2009/10/11 (宮崎)
- ③ Mitochondrial Apoptotic signaling pathway in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS challenged Human Trophoblast, Li Y, **Shibata Y**, Abiko Y, 2nd Meeting of the IADR PAPF/ 1st Meeting of the IADR APR、2009/9/24 (Wuhan, China)
- ④ II型*P. gingivalis* (TDC60) に特異発現している70 kDaタンパク質分子について、**青木暁宣**、**柴田恭子**、**岡野総一郎**、**中川一路**、**天野敦夫**、**安孫子宜光**、第51回歯

- 科基礎医学会学術大会・総会、2009/9/11 (新潟)
- ⑤ *P. gingivalis* 赤血球凝集活性抑制抗体のインフルエンザに対する交叉反応性、柴田恭子、岡野総一郎、細木弓子、安孫子宜光、口腔科学会、2009/9/6 (松戸)
- ⑥ ヒト血清を用いた脂肪組織由来間葉系幹細胞の硬組織分化能の解析、岩山智明、橋川智子、島袋善夫、菱川祥郎、小笹匡雄、柴田恭子、安孫子宜光、村上伸也、第52回日本歯周病学会春季学術大会、2009/5/16 (岡山)
- ⑦ Proteomic analysis of a *Porphyromonas gingivalis* mutant lacking HBP35、Okano S, **Shibata Y**, Shiroza T, Shoji M, Nakayama K, Abiko Y, 87th General Session & Exhibition of the IADR、2009/4/3 (マイアミ)
- ⑧ 歯科医学へのバイオインフォーマティクスの応用、安孫子宜光、柴田恭子、平塚浩一、岡野総一郎、第21回日本歯科医学会総会、2008/11/16 (横浜)
- ⑨ インフルエンザ および *P. gingivalis* へマグルチニン活性に対する機能抑制抗体の交叉反応性、柴田恭子、細木由弓子、安孫子宜光、第50回歯科基礎医学会、2008/9/25 (東京)
- ⑩ Effect of O₂-stress on phosphoproteome and LPS biosynthesis in *P. gingivalis*、Okano S, **Shibata Y**, Abiko Y, 86th General Session & Exhibition of the IADR、2008/7/5 (Toronto)
- ⑪ Mechanisms of the photodynamic therapy for rheumatic inflammation: Transcriptional regulation of IL-8 expression in IL-1 β stimulated in synoviocytes by irradiation involves phosphorylation of the NF- κ B RelA subunit、**Shibata Y**, Araki H, Oshitani T, Imaoka A, Matsui M, Miyazawa K, Abiko Y, 第80回日本生化学会、2007/12/13 (横浜)
- ⑫ *Porphyromonas gingivalis* FimA genotype type II型、IV型における histidin dipeptidase のプロテオミクス研究、岡野総一郎、柴田恭子、安孫子宜光、第50回日本歯周病学会、2007/9/21 (東京)
- ⑬ *Porphyromonas gingivalis* FimA type II型、IV型における比較プロテオミクス解析、岡野総一郎、柴田恭子、安孫子宜光、第49回歯科基礎医学会、2007/8/31 (札幌)
- ⑭ *P. gingivalis* 接種ラット歯周炎モデルにおける抗-40-kDaOMPヒト型抗体による歯槽骨吸収の抑制、浜田信城、渡辺清

子、柴田恭子、小林哲夫、田原知幸、吉江弘正、安孫子宜光、梅本俊夫、第49回日本歯周病学会春季学術大会、2007/5/18 (横須賀)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 恭子 (SHIBATA YASUKO)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号：90133438