

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18507

研究課題名(和文) 歯周病原性細菌による宿主免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of host immunosuppression by periodontal pathogenic bacteria

研究代表者

大嶋 淳 (Ohshima, Jun)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：30755450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：主要な歯周病原性細菌である*P. gingivalis*がインターフェロンシグナルを制御する機構について検討を行った。*P. gingivalis*感染マクロファージの網羅的遺伝子発現を解析した結果、本菌は多くのインターフェロン誘導性遺伝子の発現を抑制し、マクロファージの活性化を阻害していた。同様の現象は他の歯周病原性細菌では認められず、*P. gingivalis*感染時に特異的であることが示唆された。また、トランスウェルを用いた解析とパラホルムアルデヒドによる変性処理を行った細菌の感染実験から、本菌によるインターフェロンシグナルの負の制御には菌体膜上タンパク質が重要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*P. gingivalis*によるインターフェロンシグナルの抑制は、自身の細胞内での生存の促進につながるだけでなく、他の病原性細菌の排除にも抑制的に働いている可能性がある。したがってその作用機序の解明は、*P. gingivalis*がもつ歯周病における「キーストーン病原体」としての病原性発現機序の新たな側面を明らかにする、先駆的な研究につながる可能性がある。また、マクロファージは歯周組織だけでなく、アテローム性動脈硬化など全身性慢性炎症疾患の病変部でも*P. gingivalis*と相互作用することが示唆されており、歯周疾患にとどまらず多様な慢性炎症の病態解明につながる潜在性を有している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanisms by which *P. gingivalis*, a major periodontopathogenic bacterium, regulates interferon signaling. Comprehensive gene expression analysis of *P. gingivalis*-infected macrophages revealed that *P. gingivalis* suppresses the expression of interferon-inducible genes and inhibits macrophage activation. The same phenomenon was not observed in infections with *Fusobacterium nucleatum* or *Prevotella intermedia*, which are other typical periodontopathogenic bacteria, suggesting that suppression of interferon-signaling is specific to *P. gingivalis*. Transwell analysis and infection experiments with bacteria denatured by paraformaldehyde revealed that proteins on the bacterial membrane play an important role in the regulation of interferon signaling by *P. gingivalis*.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯学 微生物学 口腔細菌学 インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、口腔内の清掃が行き届かない局所で定着・増殖した細菌と、それに対する生体側の免疫応答によって引き起こされる感染性疾患であり、歯周組織に炎症が生じて組織傷害をきたします。歯周病の罹患率は世界的にも極めて高く、我が国における抜歯理由の40%を占めるとされています。

口腔内には多種多様な微生物が生息し複雑な微生物叢を形成していますが、そのなかでも特に、グラム陰性の偏性嫌気性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* は歯周病の発症や進行に大きく関わっていることが知られています。また近年、これまでは細胞外でのみ増殖すると考えられていた *P. gingivalis* が細胞内に侵入することで宿主の免疫系を回避し、病態を進行・遷延化させている可能性が示唆され、本細菌の宿主細胞内での動態の解明が急務となりつつあります。

一方、細胞内に侵入した病原体に対する宿主側の感染防御には、インターフェロンによって誘導される免疫機構がきわめて重要であることが知られています。インターフェロンが受容体に作用すると、細胞内で速やかにシグナルが伝達され、JAK-STAT 経路を活性化し、その結果、細胞内侵入病原体に対する生体防御に関わる種々の遺伝子 (IRFs、GBPs、iNOS など) の発現が誘導されます。

我々が行ったリアルタイム定量 PCR の結果、*P. gingivalis* がマクロファージにおいてインターフェロンシグナルに関連する遺伝子群の発現を抑制していることが明らかとなりました。興味深いことに、*P. gingivalis* はこのシグナルに極めて重要な転写因子である STAT1 の発現をも mRNA レベルで強く阻害していました。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、*P. gingivalis* によるインターフェロンシグナル制御機構を解明し、*P. gingivalis* による宿主免疫の抑制が具体的にどのように疾患の進展や遷延性に寄与するのかという問いを究明することで、*P. gingivalis* が歯周疾患の病態形成を促進させる新規メカニズムの解明を目指しました。

## 3. 研究の方法

研究計画では、*P. gingivalis* によるインターフェロンシグナルの抑制をシグナルのマスター転写因子の1つである STAT1 の発現抑制を指標として多角的に検討しました。

### (1) RNA-seq 法による *P. gingivalis* 感染マクロファージの遺伝子発現の網羅的解析

*P. gingivalis* を感染させた宿主細胞における遺伝子発現プロファイルを解析した報告もまだそれほど多くない現状をふまえ、本菌の感染が引き起こす転写発現挙動を包括的に把握することを目的とした RNA-seq 解析を行いました。

### (2) インターフェロンシグナルの抑制に関わる細菌コンパートメントの同定

トランスウェルを利用した非接触共培養法を用いて、STAT1 の発現抑制が細菌 - 宿主細胞間の直接接触を必要とするのか、あるいは細菌由来の分泌性分子によるものなのかを確認しました。

### (3) *P. gingivalis* と他種細菌との混合感染による相互作用についての検討

実際の口腔粘膜においては、*P. gingivalis* は単独ではなく他種細菌と複雑に相互作用しながら共同体を形成し定着している。このことを考慮して、マクロファージを *P. gingivalis* と他の口腔内常在細菌とで同時に刺激した場合の STAT1 の発現についてもリアルタイム定量 PCR を用いて検討しました。

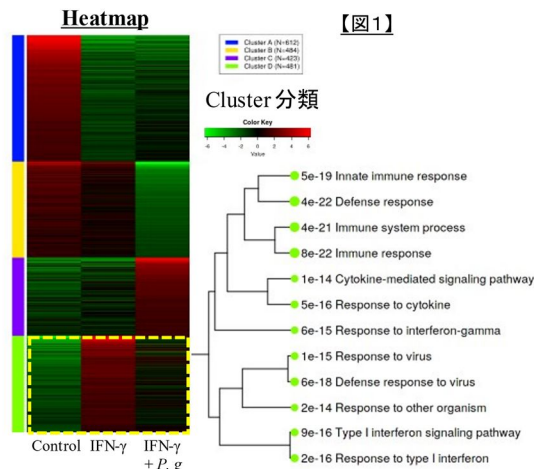
### (4) *P. gingivalis* 感染が STAT1 の発現を抑制する分子メカニズムの解明

A20、SOCS、PIAS ファミリータンパクなど、宿主がもつインターフェロンシグナルのネガティブレギュレーターがいくつか報告されており、*P. gingivalis* もこれら既知分子のいずれかを利用してシグナル抑制効果を発揮している可能性があります。そこでまずは、それぞれの分子の阻害剤を利用して、*P. gingivalis* 依存的な STAT1 の発現抑制に影響があるかどうかをリアルタイム定量 PCR にて検討しました。また、STAT1 の発現抑制に関わる細菌側の候補病原遺伝子を抽出し、遺伝子欠損株を作製することにより *P. gingivalis* の新規病原因子の同定を試みました。

## 4. 研究成果

### (1) RNA-seq 法による *P. gingivalis* 感染マクロファージの遺伝子発現の網羅的解析

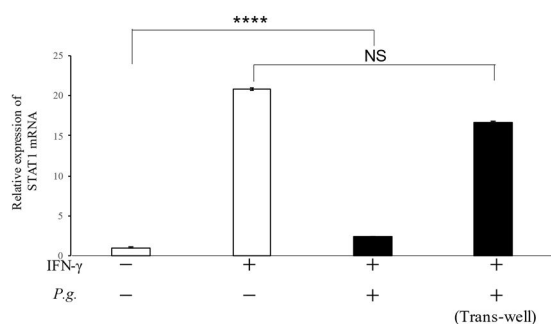
インターフェロンで刺激したマクロファージに *P. gingivalis* を感染させ RNA シークエンス解析を行ったところ、*P. gingivalis* はインターフェロンによって発現が誘導される多くの遺伝子の発現を制御しており、マクロファージの活性化を阻害することが示唆されました【図1】。



【図1】

### (2) インターフェロンシグナルの抑制に関わる細菌コンパートメントの同定

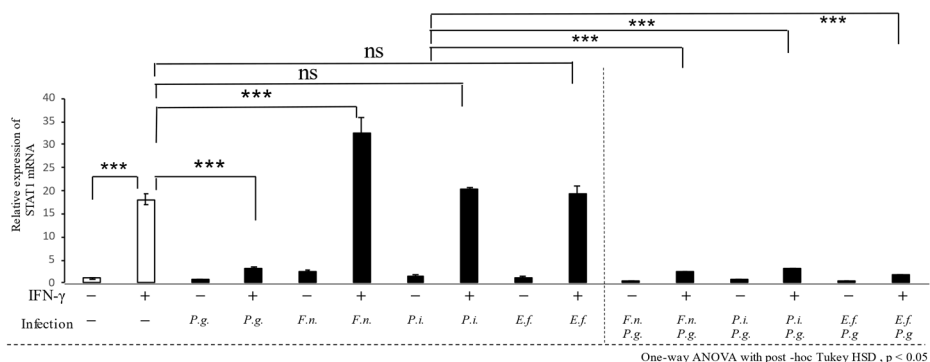
*P. gingivalis* による STAT1 の発現抑制を指標としてトランスウェルを利用した非接触共培養法を用いて検討を行い、STAT1 の発現抑制が細菌 - 宿主細胞間の直接接触を必要とすることを確認しました【図2】。



【図2】 *P. gingivalis* がSTAT1を抑制するためには細胞と接触する必要がある

### (3) *P. gingivalis* と他種細菌との混合感染による相互作用についての検討

マクロファージを *P. gingivalis* と他の口腔内細菌とを同時に刺激した場合の STAT1 の発現についてもリアルタイム定量PCRを用いて検討したところ、他の口腔内細菌である *Fusobacterium nucleatum* や *Prevotella intermedia*、*Enterococcus faecalis* の感染では STAT1 の発現抑制が認められなかったものの、これらの細菌を *P. gingivalis* と共感染させた場合には STAT1 の発現の有意な阻害効果が認められました【図3】。



【図3】 STAT1抑制作用は *P. gingivalis* に特異的であり、他菌種と共感染した場合でも *P. gingivalis* はIFN- $\gamma$ 抑制作用を示す。

### (4) *P. gingivalis* 感染が STAT1 の発現を抑制する分子メカニズムの解明

A20、SOCS、PIAS ファミリータンパクなど、宿主がもつ既知のインターフェロンシグナルのネガティブレギュレーター阻害剤を用いた検証では、*P. gingivalis* によるシグナル抑制効果を阻害することはできませんでした。

一方、細菌側因子としては、パラホルムアルデヒドを用いて変性処理を行った *P. gingivalis* でも STAT1 の抑制効果が失われなかったことから、本菌の菌体膜上にあるタンパク質が STAT1 の抑制に関係していることが考えられました。

現在、阻害剤ライブラリーを用いた *P. gingivalis* によるインターフェロンシグナル抑制作用に関わるシグナル因子の同定と、*P. gingivalis* の膜上タンパク質の遺伝子変異株を順次作成し、機能発現に関わる遺伝子の同定を試みています。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun Ohshima
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis induces mesenchymal-like transition through beta-catenin signaling.
3. 学会等名 Joint Research Symposium of Osaka University and Newcastle University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大嶋 淳
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisは -カテニンシグナルを介して歯肉上皮細胞に上皮間葉転換を誘導する
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 細菌学若手コロッセウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------