

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：83903

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2009～2011

課題番号：21659436

研究課題名（和文） 機能性バイオナノ粒子を応用したエキソサイトーシス制御による歯周病治療の戦略

研究課題名（英文） Strategy for treatment of periodontitis with regulating exocytosis using functional bionano particle

研究代表者

松下 健二（MATSUSHITA KENJI）

独立行政法人 国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・部長

研究者番号：90253898

研究成果の概要（和文）：歯肉上皮細胞における細胞内輸送関連因子を探索するとともに、その制御の可能性について検討した。その結果、同細胞における物質輸送に重要なタンパク質として Rab5 を同定するとともに、同分子に結合する分子として Vinculin を同定した。歯肉上皮細胞への *Porphyromonas gingivalis* の侵入に Rab5 と ICAM-1 が関わっていることが明らかになった。さらに、*P. gingivalis* による血管内皮細胞からのエキソサイトーシス制御に E-selectin が重要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We explored factors for intracellular vesicle trafficking in gingival epithelial cells and examined a possibility of the regulation. A small G-protein Rab5 and the associated protein vinculin were identified as important factors for vesicle trafficking in the cells. Rab5 and ICAM-1 were associated with uptake of *Porphyromonas gingivalis* by the cells. Furthermore, we clarified that E-selectin is important for regulating endothelial exocytosis by stimulation with *P. gingivalis*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	0	700,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫・感染・炎症・歯周病学・生体分子設計・低分子Gタンパク質・上皮機能・細胞骨格タンパク質・エンドサイトーシス・細胞内輸送

## 1. 研究開始当初の背景

生体が外的刺激により活性分子を放出する分泌現象(エクソサイトーシス)は、多細胞生物が細胞間連絡により個体としての統合機能を果たすための重要な機能である。エクソサイトーシスの異常は動脈硬化などの炎症性疾患、血栓症、精神・神経疾患、自己免疫疾患、ガンの浸潤・転移など様々な疾患の発症とも深く関わっている。したがって、エクソサイトーシスのメカニズムを解明することは、疾病の発症機序を理解する上できわめて重要である。さらに、エクソサイトーシスの制御は疾病の予防と治療の新しい戦略となりえる。

動脈硬化と同様に、歯周病もまた慢性進行性の炎症性疾患であり、その発症・進展にエクソサイトーシスが深く関わっている。エクソサイトーシスは口腔環境の維持にも極めて重要である。唾液腺からエクソサイトーシスされる種々の液性成分は、歯周病をはじめとした口腔感染症やその他の口腔を介した細菌・ウイルスの感染を防御している。また、歯肉上皮細胞による種々の抗菌ペプチドのエクソサイトーシスは、口腔細菌叢の平衡を維持するとともに、外界からのウイルスや病原微生物の感染を阻止している

(Miyasaki KT and Lehrer RI. Int J Antimicrob Agents 1998 9:269-280)。さらに、創傷治癒過程における上皮細胞の過剰なエクソサイトーシスは細胞の極性変化を促し、細胞運動を活性化する(Kodama A et al. Oncogene 1999 8:3996-4006, Mammoto A et al. J Biol Chem 1999 274:25517-25524.)。その結果、上皮のポケット底部へのdown growthが起こり、深いポケットが形成される。

したがって、上皮細胞のエクソサイトーシス制御は健全な接合上皮の再生に不可欠である。

このように、歯周組織におけるエクソサイトーシス機序の解明は、歯周病の発症病理と創傷治癒過程を理解する上で極めて重要である。さらに、その制御は歯周病の予防と治療の新しい戦略として極めて有用であると考ええる。

## 2. 研究の目的

**本研究では、口腔粘膜におけるエクソサイトーシスの役割、特に歯肉上皮細胞のエクソサイトーシスについてその詳細を明らかにするとともに、機能性ナノバイオカプセルを用いたエクソサイトーシス制御を基盤とした新しい歯周病予防、治療法の可能性について検討することを目的とする。** 具体的には、**①歯肉上皮細胞におけるエクソサイトーシス機序の解明、②プロテオーム解析による歯肉上皮細胞特異的なエクソサイトーシス制御因子の探索とその機能解析、③機能性ナノバイオ粒子を用いた細胞特異的ドラッグデリバリーシステムの構築、④有効性の検討**を行う。以上の結果を総合的に吟味して、臨床応用のための基盤の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) Rab5 結合タンパク質の探索

エクソサイトーシスおよびエンドサイトーシスの際に重要な低分子Gタンパク質の一種であるRab5に着目し、同タンパク質と結合するタンパク質を質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて同定した。

### (2) 細胞内におけるRab5とVinculinの局在の検討

Vinculinを選定し、Rab5分子とともにHEK293

細胞に遺伝子導入し、両分子の局在を蛍光顕微鏡で確認した。

(3) Vinculin のエンドサイトーシスにおける役割の解析

Vinculin の過剰発現系と欠失細胞系を作製し、細菌等の取り込みに対する作用を解析した。

(4) 口腔粘膜上皮への細菌侵入における

Rab5 およびその関連因子の機能解析

培養歯肉上皮細胞 (Ca9-22 細胞) を TNF- $\alpha$  で刺激した後、*Porphyromonas gingivalis* を同細胞に添加した。その後、同細菌の細胞内侵入の程度を塗抹法で解析した。ついで、同侵入機構における Rab5 と ICAM-1 の役割を解析した。

(5) *P. gingivalis* による血管内皮エキソサイトーシス誘導における E-selectin 関与の検討

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) *P. gingivalis* 菌体とともに抗 E-selectin 中和抗体を添加した。その後、培養上清を回収し上肢中のインターロイキン-8、フォンビルブランド因子、および一酸化窒素の濃度を測定した。

#### 4. 研究成果

Rab5 と結合するタンパク質を質量分析系を用いて解析した結果、複数の細胞内タンパク質と GST-Rab5 との結合が明らかになった。その中から Vinculin を選定し、Rab5 との関連性を検討した結果、Rab5 は細胞内においても vinculin と共局在することが明らかになった。また、Vinculin の過剰発現系と欠失細胞系を作製し、その機能を解析した結果、同分子は細胞内への細菌等の取り込み (エンドサイトーシス) に関与していることが明らかになった。

次に、Rab5 とその結合タンパク質の歯肉

上皮細胞における役割を検討した。歯周病の炎症病態を再現するため、培養歯肉上皮細胞 (Ca9-22 細胞) を炎症性サイトカインの一種である TNF- $\alpha$  で刺激した。その後、*Porphyromonas gingivalis* 生菌を添加し、その細胞内侵入の程度を検討した。その結果、Ca9-22 細胞への *P. gingivalis* の侵入は、TNF- $\alpha$  刺激によって有意に増加した。また、Ca9-22 細胞は TNF- $\alpha$  刺激した際、ICAM-1 発現の増加を認め、Rab5、ICAM-1、及び *P. gingivalis* の共局在を認めた。さらに、活性化型 Rab5 を強制発現させた Ca9-22 細胞では、*P. gingivalis* の細胞内侵入が有意に増加することが明らかになった。歯周病において TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインの産生により、歯肉上皮細胞が活性化され、ICAM-1 の発現が促進される。発現した ICAM-1 に *P. gingivalis* が結合した後、Rab5 が関連する細胞内輸送機構を介して侵入されることが示唆される。加えて、同機構から何らかの過程で逃れた *P. gingivalis* は歯肉上皮細胞内に留まることで持続感染し、歯周病の難治化を引き起こす可能性が推測された。

さらに、我々は、E-selectin 制御による血管内皮のエキソサイトーシス制御の可能性を検討した。その結果、活性化血管内皮細胞における *P. gingivalis* の付着には、同細胞上に発現誘導された E-selectin が関与すること、また E-selectin と同菌との相互作用を阻害することによって同細胞からのエキソサイトーシスが有意に抑制されることが明らかになった。

*P. gingivalis* の上皮細胞への付着・侵入に Rab5 と ICAM-1 が重要であることが明らかになった。また、血管内皮細胞と同菌の相互作用によるエキソサイトーシスには、E-selectin が重要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Kato Y, Mizutani H, Kawahara K, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K, Valproic acid increases susceptibility to endotoxin shock through enhanced release of HMGB1. *Shock*, 査読有、36巻、2011、494-500  
DOI : 10.1097/SHK.0b013e31822f7e58
2. Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M、Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with SDF-1. *Tissue Eng Part A*, 査読有、17巻、2011、1911-1920  
DOI : 10.1089/ten.tea.2010.0615
3. Sugiyama M, Iohara K, Wakita H, Hattori H, Ueda M, Matsushita K, Nakashima M、Dental Pulp Derived CD31-/CD146- Side Population Stem/Progenitor Cells Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Tissue Eng Part A*, 査読有、17巻、2011、1303-1311  
DOI : 10.1089/ten.tea.2010.0306
4. Kanno Y, Ishisaki A, Nakajima K, Nishihara T, Toyoshima T, Okada K, Ueshima S, Matsushita K, Matsuo O, Matsuno H、Plasminogen/plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function. *J Biol Chem*, 査読有、286巻、2011、8952-8960  
DOI: 10.1074/jbc.M110.152181
5. Takeda Y, Tanigawa N, Sunghwa F, Ninomiya M, Hagiwara M, Matsushita K, Koketsu M、orroniside cinnamic acid conjugate as an anti-inflammatory agent. *J Biol Chem*, 査読有、20巻、2011、4855-4857  
DOI:10.1016/j.bmcl.2010.06.095
6. 今井剛、西永正典、中村知子、奥宮清人、松林公蔵、土居義典、松下健二、高齢者住民における保有歯数と認知機能、*愛院大歯誌*、査読有、48巻、2010、59-66
7. Inomata M, Into T, Nakashima M, Noguchi T, Matsushita K、IL-4 alters expression patterns of storage components of vascular endothelial cell-specific granules through STAT6-and SOCS-1-dependent mechanisms. *Mol Immunol*, 査読有、46巻、2009、2080-2089  
DOI : 10.1016/j.molimm.2009.02.015
8. Inomata M, Ishihara Y, Matsuyama T, Imamura T, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K、Degradation of vascular endothelial thrombomodulin by arginine and lysine-specific cysteine proteases from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*, 査読有、80巻、2009、1511-1517  
[http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2009.090114?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2009.090114?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
9. Jeong Y, Chaupin DF, Matsushita K, Yamakuchi M, Cameron S, Morell CN, Lowenstein CJ、Aldosterone activates endothelial exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有、106巻、2009、3782-3787  
<http://www.pnas.org/content/106/10/3782.long>
10. Iohara K, Zheng L, Ito M, Ishizaka R, Nakamura H, Into T, Matsushita K, and Nakashima M、Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31-/CD146- side population cells from a canine tooth. *Regen Med*, 査読有、4巻、2009、377-385  
DOI 10.2217/rme.09.5
11. Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, Matsushita K, Nakamura H, and Nakashima M、Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. *Am J Pathol*, 査読有、175巻、2009、1905-1914  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010607018>
12. 今井剛、西永正典、松下健二、高齢者の残存歯数と認知機能の関連性、*鹿児島大学医学雑誌*、査読有、61巻、2009、47-51

〔学会発表〕計 ( 29 ) 件

1. 多田浩之、島内英俊、松下健二、*Porphyromonas gingivalis* ジンジバインによるヒト歯肉上皮細胞のアレルギー誘導性サイトカインの発現機構、第17回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2011/12/10、西宮
2. 萩原真、杉浦進介、小松寿明、加藤佳子、多田浩之、磯田竜太郎、石田直之、小林かおる、谷川順美、松下健二、Rab5 と vinculin 依存的なエンドサイトーシスの解析、第34回日本分子生物学会年会、2011/12/10、横浜
3. 松下健二、老年期、衰退期を想定した歯科医学・医療と QOL、第12回抗加齢歯科医学研究会、2011/7/18、東京
4. 加藤佳子、杉浦進介、小松寿明、石原 裕一、

- 野口 俊英, 松下 健二、歯周病関連細菌 *orphyromonas gingivalis* の歯肉上皮細胞への侵入機構の解明、第54回春季日本歯周病学会学術大会、2011/5/27、福岡
5. 萩原真, 小松寿明, 杉浦進介, 加藤佳子, 谷川順美, 松下健二、エンドサイトーシスが関与する誤嚥性肺炎の発症機序に関する研究、第65回 日本栄養・食糧学会大会、2011/5/14、東京
6. Tanigawa N, Takeda Y, Sunghwa F, Ninomiya M, Hagiwara M, Koketsu M, Matsushita K, Morroniside derivative regulates E-selectin expression in human endothelial cells. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, Mar 7, 2011, Sendai, Miyagi, Japan
7. Sakashita R, Watanabe K, Hamada M, Matsushita K, Nishitani M, Nishihira T, A MULTIDISCIPLINARY COMMUNITY CARE PROGRAM FOCUSING ON ORAL HEALTH. The International Council of Nurses (ICN) 2011, May 5, 2011, Malta
8. 杉浦進介, 石原裕一, 小松寿明, 萩原真, 谷川順美, 水谷大樹, 加藤佳子, 江口傑徳, 野口俊英, 松下健二、バルプロ酸は HMGB1 の能動放出を誘導して、エンドトキシンショックに対する感受性を高める、第16回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2010年11月13日、奈良
9. Komatsu T, Nagano K, Sugiura S, Hagiwara M, Tanigawa N, Eguchi T, Yoshimura F, Furuichi Y, Matsushita K, E-selectin mediates *Porphyromonas gingivalis* adherence to endothelial cells. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology. Oct 31, 2010, Honolulu, HI, USA
10. Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Eguchi T, Mizutani H, Matsushita K, Noguchi T, Valproic acid enhances innate immune response to LPS by HMGB1 release. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology, Oct 31, 2010, Honolulu, HI, USA
11. 松下健二、オーラルヘルスプロモーションのこれから-口腔健康行動におけるコミュニティチーム医療-、日本健康心理学会、2010年9月11日、千葉
12. Komatsu T, Nagano K, Sugiura S, Hagiwara M, Tanigawa N, Eguchi T, Yoshimura F, Furuichi Y and Matsushita K、E-selectin mediates *Porphyromonas gingivalis* adherence to endothelial cells. 第8回血液・血管オルビス、2010年8月21日、東京
13. Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Mizutani H, Eguchi T, Kawahara K, Maruyama I, Noguchi T and Matsushita K、Valproic acid enhanced innate immune response induced by LPS through stimulating active release of HMGB1. 第8回血液・血管オルビス、2010年8月21日、東京
14. 今林貴代美、庵原耕一郎、石坂亮、江波久哲、松下健二、中村洋、中島美砂子、歯髓幹細胞を用いた抜髄後歯髓再生のタンパク化学的解析による証明、第132回日本歯科保存学会春季学術大会、2010年6月5日、熊本
15. 庵原耕一郎、石坂亮、今林貴代美、江波久哲、松下健二、中村洋、中島美砂子、歯髓CD105 陽性細胞を用いた抜髄後歯髓再生法の確立、第132回日本歯科保存学会春季学術大会、2010年6月5日、熊本
16. 江場久哲、中島美砂子、庵原耕一郎、松下健二、中田和彦、中村洋、MMP-3 はイヌ一部 性歯髓炎モデルにおいて歯髓治癒を促進する、第132回日本歯科保存学会春季学術大会、2010年6月5日、熊本
17. 杉浦進介、江口傑徳、萩原真、小松寿明、谷川順美、野口俊英、松下健二、バルプロ酸 (VPA) は ERK 1/2 の活性化を介してHigh Mobility Group Box 1 (HMGB1) の産生を誘導する、第33回日本血栓止血学会学術集会、2010年4月24日、鹿児島
18. Matsushita K, Morrell CN, Mason, EL O' Rourke B, Champion HC, And Lowenstein CJ, Angiotensin II Activates Endothelial Exocytosis By Stimulating Superoxide Production、第33回日本血栓止血学会学術集会、2010年4月24日、鹿児島
19. 松下健二、凝固第 Xa 因子の病態への関与とその制御-基礎研究者の立場から-、第3回 Bayer Thrombosis Seminar、2010年4月22日、鹿児島
20. 江口傑徳、河田かずみ、久保田聡、萩原真、小松寿明、杉浦進介、中島美砂子、滝川正春、松下健二、MMP3はクロマチンに局在し、CCNファミリー遺伝子を制御する、第32回日本分子生物学会、2009年12月9日、横浜
21. 松下健二、高齢化社会における歯学の使命と課題-老年期、衰退期を想定した歯科医療・医学とQOL-、DENTISTRY, QUO VADIS? - フロネシスに基づいて-、2009年12月5日、東京
22. 松下健二、血管の詰りを予防する食品有用成分の探索-特に岐阜県特産イチゴに関

- して、ぎふEBBF フォーラム 2009、2009年12月2日、各務原
23. 坂下玲子, 桑原未代子, 松下健二, 佐藤拓一, 安彦友希, 三重幸恵, 井上昌一、高齢者の様々な口腔保健行動が口腔状態に及ぼす影響、第58回日本口腔衛生学会・総会、2009年10月10日、岐阜
  24. 松下健二、エキソサイトーシス制御を応用した新しい血管病治療の戦略、日本杜仲研究会第4回定期大会、2009年8月1日、大阪
  25. 小松寿明, 江口傑徳, 杉浦進介, 猪俣恵, 古市保志, 松下健二、E-selectinの新機能：感染の制御、日本歯科保存学会2009年度春季学術大会、2009年6月11日、札幌
  26. 杉浦進介, 江口傑徳, 猪俣恵, 小松寿明, 野口俊英, 松下健二、新規炎症性サイトカインHMGB1のアセチル化制御薬による放出制御、第52回日本歯周病学会春季学術大会、2009年5月15日、岡山
  27. 猪俣恵, 引頭毅, 石原裕一, 松下健二, 野口俊英、Th2由来サイトカインはSTAT6を介して血管内皮細胞特異的な分泌顆粒の構成因子の発現量を変化させる、第52回日本歯周病学会春季学術大会、2009年5月15日、岡山
  28. Jeong Y, Chaupin DF, Matsushita K, Yamakuchi M, Cameron S, Morell CN, Lowenstein CJ、Aldosterone activates endothelial exocytosis. The ATVB 2009 Annual Conference, April 29, 2009, Washington DC, USA
  29. Abiko Y, Sato T, Matsushita K, Sakashita R, Takahashi N、*Porphyromonas gingivalis* is widely distributed in subgingival plaque biofilm of elderly people. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science, Jan 15, 2009, Sendai, Miyagi

[図書] 計(7)件

1. Tanigawa N, Takeda Y, Sunghwa F, Ninomiya M, Hagiwara M, Koketsu M, Matsushita K、Springer Japan, Oral Health Science 2011: Morroniside derivative regulates E-selectin expression in human endothelial cells. 2012、4  
DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0\_42
2. Nishihira T, Nishitani M, Sato T, Abiko Y, Matsushita K, Hamada M, Sakashita R、Springer Japan, Oral Health Science 2011: Community Oral Health promotion program fostering self-management for elderly

- people. 2012、4  
<http://www.springerlink.com/content/h4u461758g711k16/>
3. 松下健二、メディカルレビュー社、歯周病と炎症、2011、6
  4. 杉浦進介, 石原裕一, 小松寿明, 萩原真, 水谷大樹, 加藤佳子, 野口俊英, 松下健二、日本エンドトキシン・自然免疫研究会、エンドトキシン研究14：バルプロ酸はHMGB1の能動放出を誘導して、エンドトキシンショックに対する感受性を高める、2011、4
  5. Tanigawa N, Takeda Y, Sunghwa F, Ninomiya M, Hagiwara M, Koketsu M, Matsushita K、Morroniside derivative regulates E-selectin expression in human endothelial cells, Oral Health Science, 2011、161-163  
DOI:10.1007/978-4-431-54070\_42
  6. 杉浦進介, 石原裕一, 小松寿明, 萩原真, 水谷大樹, 加藤佳子, 野口俊英, 松下健二、バルプロ酸はHMGB1の能動放出を誘導して、エンドトキシンショックに対する感受性を高める、エンドトキシン研究14、2011、57-60
  7. 松下健二、歯周病と炎症、The Bone、2011、25：415-420

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.ncgg.go.jp/department/odr/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松下 健二 (MATSUSHITA KENJI)  
独立行政法人 国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・部長  
研究者番号：90253898

##### (2) 研究分担者

江口 傑徳 (EGUCHI TAKANORI)  
独立行政法人 国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・室長  
研究者番号：20457229

(H21のみ)

##### (3) 連携研究者

なし