

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25年5月15日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390354

研究課題名（和文） エンドサイトーシス制御を基盤とした新しい感染制御法の開発

研究課題名（英文） Development of infectious control by regulating endocytosis

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）：

細菌の細胞内侵入(エンドサイトーシス)の際に、低分子Gタンパク質Rab5とともに Vinculin および ICAM-1 といった分子が重要であることが明らかになった。また、vinculin は Rab5 の活性を制御することにより、エンドサイトーシスを調節することが明らかになった。さらに、一酸化窒素 (NO) は Rab 5 を s-ニトロシル化することにより細菌の細胞内侵入を制御することが明らかになった。本研究から、これらの分子を標的あるいは応用することによって、細菌の細胞内侵入が制御できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We clarified that Vinculin and ICAM-1 as well as a small G-protein Rab5 are important molecules to bacterial endocytosis in human cells. Vinculin regulated bacterial endocytosis via controlling activity of Rab5. Nitric oxide (NO) also regulated bacterial endocytosis by s-nitrosylation of Rab5. These molecules may be useful for regulating bacterial endocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
総 計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：一酸化窒素・エンドサイトーシス・細菌感染・歯周病・低分子Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

歯周病関連細菌が細胞内へ侵入することにより、同菌の持続感染が成立したり、感染細胞の機能障害等が引き起こされる可能性が考えられるが、侵入の機序の詳細は不明な点が多い。加えて、侵入を制御する術は確立されていない。細菌の侵入経路としてはエンドサイトーシスがあり、その早期経路において低分子Gタンパク質のRab5は重要な制御

因子として知られている。Rab5には活性型と不活性型が存在し、この活性変化により高度にエンドサイトーシスが制御されている。

2. 研究の目的

本研究では、Rab5に着目し、宿主細胞内への細菌侵入機構を検討した。ついで、同分子を標的とした新しい感染制御の可能性についても検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) 歯肉上皮細胞への *Porphyromonas gingivalis* 侵入機構の解析

ヒト歯肉上皮癌細胞 (Ca9-22 細胞) を TNF- α にて刺激し、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株と共培養した。その後、塗抹法により細胞内へ侵入した *P.g.* の菌数を定量した。また、GFP-Rab5 を発現させた Ca9-22 細胞を TNF- α 刺激し、上記共培養後、Rab5, ICAM-1 及び *P.g.* の細胞内局在を蛍光顕微鏡にて観察した。

(2) Rab5 制御因子としての vinculin の解析

vinculin と Rab5 が結合することを免疫沈降法や GST プルダウンで明らかにし、過剰発現とノックダウンの実験系において、vinculin は *S. aureus* の細胞内への移行を検討した。次に、vinculin と Rab5 の活性との関連性について明らかにするために GST-R5BD プルダウンを行った。*S. aureus* の細胞内への移行と MAPK 活性化との関連性について、リン酸化 MAPK 得意的抗体を用いたウェスタンブロット法で解析した。さらに、*S. aureus* の生体内への感染に対する vinculin の役割を検討するために、マウス肺炎モデルにおける vinculin siRNA の効果を検討した。

(3) 細菌の細胞内侵入における一酸化窒素の役割とそれを抑制する食品成分の探索

細菌が細胞内に侵入する時に宿主細胞側で食食に関わる因子である低分子量 G タンパク質 Rab5 と一酸化窒素との関連性を明らかにするために、NO ドナー (一酸化窒素を発生させる薬剤) である GSNO を用いて、Rab5 に対する一酸化窒素の影響について GST プルダウン、免疫沈降法、ビオチンスイッチ法などで検討した。また、一酸化窒素の産生を調節する食品由来因子について検討するために、LPS を用いて誘導型一酸化窒素合成酵素である iNOS を発現させ、様々な食品由来因子をマクロファージ様細胞である Raw264 に添加し、一酸化窒素測定試薬である DAF-2 を用いて解析した。さらに、それらの因子と MAPK(p38, Erk, JNK) との関連性についてウェスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

(1) 歯肉上皮細胞への *Porphyromonas gingivalis* 侵入機構の解析

塗抹法により、細胞内に侵入した *P.g.* の菌数を比較したところ、TNF- α 刺激した Ca9-22 細胞では、無刺激の細胞に比べ、細胞内に侵入した菌数は有意に増加しており、同細胞内で Rab5, ICAM-1 及び *P.g.* の共局在を認めた。活性型 Rab5 を発現させた Ca9-22 細胞では、*P.gingivalis* と Rab5 の共局在を認めた。一方、不活性型 Rab5 を発現させた Ca9-22 細胞では

Rab5 と *P.gingivalis* の共局在は認められなかった。また、塗抹法により細胞内に侵入した菌数を比較したところ、活性型 Rab5 を発現させた細胞では、不活性型 Rab5 を発現させた細胞に比べ菌数が多かった。以上の結果から、TNF- α 刺激による *P.g.* の細胞内侵入の増加には、ICAM-1 と Rab5 を介したエンドサイトーシスが関与していることが示唆された。

(2) Rab5 制御因子としての vinculin の解析

まず始めに、vinculin と Rab5 が結合することを免疫沈降法や GST プルダウンで明らかにし、過剰発現とノックダウンの実験系において、vinculin は *S. aureus* の細胞内への移行に関与することが明らかとなった。次に、vinculin と Rab5 の活性との関連性について明らかにするために GST-R5BD プルダウンで解析を行ったところ、*S. aureus* の細胞内への移行時に vinculin は Rab5 の活性化に関与した。そして、活性型 vinculin 変異体を用いて解析を行い、vinculin の活性化が *S. aureus* の細胞内への移行に重要であることが明らかとなった。また、*S. aureus* の細胞内への移行と、MAPK との関連性について検討したところ、vinculin をノックダウンした細胞では、*S. aureus* による MAPK(JNK, p38, ERK) のリン酸化が低下し、炎症性サイトカイン IL-6 の発現が低下していた。さらに、*S. aureus* の細胞内への移行と vinculin の関連性を *in vivo* で解析を行ったところ、vinculin siRNA をマウスの肺に導入すると、肺において *S. aureus* の細胞内への移行が低下し、MAPK のリン酸化や IL-6 の発現が抑制されていたことが明らかとなった。

以上のことより、vinculin は細胞接着だけではなく、Rab5 と相互作用し、エンドサイトーシスによる *S. aureus* の細胞内への移行に関与し、MAPK のリン酸化や IL-6 の発現に関与することが新たに明らかとなった。

(3) 細菌の細胞内侵入における一酸化窒素の役割とそれを抑制する食品成分の探索

GSNO を添加した細胞では Rab5 の活性が上昇し、宿主細胞における細菌の食食が促進すること、またその際 Rab5 が S-ニトロシル化されていることが明らかとなった。また、オリーブの葉やオリーブオイルに含まれる、オレウロペインとヒドロキシチロソールは LPS による MAPK のリン酸化を抑制し、iNOS 誘導型の一酸化窒素の産生を抑制することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- ① Miyamoto Y, Noguchi H, Yukawa H, Oishi K, Matsushita K, Iwata H, Hayashi S: Cryopreservation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Med* 3:89-95, 2012.
 - ② Komatsu T, Nagano K, Sugiura S, Hagiwara M, Tanigawa N, Abiko Y, Yoshimura F, Furuichi Y, and Matsushita K: E-selectin Mediates *Porphyromonas gingivalis* Adherence to Human Endothelial Cells. *Infect Immun* 80:2570-2576 2012.
 - ③ 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
 - ④ 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
 - ⑤ 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
 - ⑥ 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
 - ⑦ 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.bmc.2010.06.095
 - ⑧ 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
- 〔学会発表〕(計 30 件)
- ① 多田浩之、松下健二、松山孝司、野口和行、島内英俊、清浦有祐：「ジンジバインによるアレルギー性サイトカイン誘導をターゲットとしたアレルギー疾患の制御」第 29 回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い 2013/1/12 東京
 - ② 萩原真、国分栄仁、杉浦進介、小松寿明、多田浩之、磯田竜太郎、谷川順美、加藤佳子、小林かおる、石原和幸、松下健二：「vinculin は宿主細胞において Rab5 の活性を調節し、*Staphylococcus aureus* の細胞内移行に関与する」第 35 回日本分子生物学会 2012/12/14 福岡
 - ③ Yamada K and Matsushita K: High concentration of glucose activates migration and proliferation of human skin keratinocytes through inducing active release of HMGB1. The Clinical Symposium on Advances in Skin & Wound Care. Oct 23, 2012, Las Vegas, USA.
 - ④ 萩原真、磯田竜太郎、加藤佳子、石田直之、小林かおる、松下健二：「一酸化窒素を制御する食品由来因子の探索」第 45 回日本食生活学会大会 2012/10/13 北九州
 - ⑤ 多田浩之、島内英俊、松下健二：「*Porphyromonas gingivalis* ジンジバインはヒト歯肉上皮細胞から IL-33 を誘導する」第 55 回秋季日本歯周病学会学術大会 2012/9/23 つくば
 - ⑥ 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 interleukin-33 発現誘導」第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2012/9/16 郡山
 - ⑦ Tada H, Shimauchi H, Matsushita K: Expression of interleukin-33 induced by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival epithelial cells. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species. Aug 28, 2012, Nagasaki.
 - ⑧ 多田浩之、島内英俊、松下健二：「*Porphyromonas gingivalis* によるヒト歯肉上皮細胞からの interleukin-33

- 発現誘導」第136回日本歯科保存学会
春季学術大会 2012/6/29, 沖縄
- ⑨ Yamada K and Matsushita K: 「High glucose concentration induces active release of HMGB1 in human skin keratinocytes」 9th International Conference on Innate Immunity, June 23, Rhodes, Greece.
- ⑩ Nakatsuka Y, Nagasawa T, Yumoto Y, Nakazawa F, Matsushita K, Furuichi Y: 「Effects of sword bean extract on the oral bacteria and progression of rat experimental periodontitis by *Porphyromonas gingivalis*.」 7th Conference of the European Federation of Periodontology June 6, 2012, Vienna, Austria.
- ⑪ 加藤佳子, 杉浦進介, 石田直之, 石原裕一, 野口俊英, 松下健二: 「歯肉上皮細胞への *Porphyromonas gingivalis* 侵入機構における ICAM-1 及び Rab5 の関与」 第55回日本歯周病学会春季学術大会 2012/5/18, 札幌
- ⑫ 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
- ⑬ 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
- ⑭ 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
- ⑮ 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
- ⑯ 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
- ⑰ 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
- ⑱ 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
- ⑲ 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
- ⑳ 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
- 21 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
- 22 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ケーションチーム医療-、日本健康心理学会、2010年9月11日、千葉
- 23 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
- 24 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
- 25 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
- 26 庵原耕一郎、石坂亮、今林貴代美、江場久

- 哲、松下健二、中村洋、中島美砂子、歯髄 CD105 陽性細胞を用いた抜髄後歯髄再生法の確立、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
- 27 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 性歯髄炎モデルにおいて歯髄治癒を促進する、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
- 28 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
- 29 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
- 30 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

〔図書〕(計 11 件)

- ① 松下健二: 第 2 章 3 「慢性炎症－慢性炎症の分子の共通基盤」慢性炎症としての歯周病へのアプローチ生涯を通して患者さんの QOL に貢献するために. 野口俊英 (編) 医歯薬出版 印刷中
- ② 松下健二: 第 2 章 4 自然炎症としての歯周病」慢性炎症としての歯周病へのアプローチ生涯を通して患者さんの QOL に貢献するために. 野口俊英 (編) 医歯薬出版 印刷中
- ③ 松下健二: 第 2 章 5 血管の炎症からみる歯周病 慢性炎症としての歯周病へのアプローチ生涯を通して患者さんの QOL に貢献するために. 野口俊英 (編) 医歯薬出版 印刷中
- ④ 多田浩之、島内英俊、松下健二: Porphyromonas gingivalis ジンジパインによるヒト歯肉上皮細胞における IL-33 発現誘導エンドトキシン・自然免疫研究 15:45-48, 2012.
- ⑤ Tanigawa N, Takeda Y, Sunghwa F, Ninomiya M, Hagiwara M, Koketsu M, Matsushita K:Morrisoniside derivative regulates E-selectin expression in human endothelial cells. In Interface Oral Health Science 2011, Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N (Eds). Springer,

New York, pp161-163, 2012. DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0_42

- ⑥ Nishihira T, Nishitani M, Sato T, Abiko Y, Matsushita K, Hamada M, Sakashita R:Community Oral Health promotion program fostering self-management for elderly people. In Interface Oral Health Science 2011,, Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N (Eds), Springer, New York, pp317-319, 2012.
- ⑦ Isoda R and Matsushita K:The role of protein oxidative modification in periodontal diseases. Studies on Gingivitis and Periodontal Diseases. Armstrong D (Ed), Springer, New York, in press.
- ⑧ 松下健二、メディカルレビュー社、歯周病と炎症、2011、6
- ⑨ 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
- ⑩ 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
- ⑪ 松下健二、歯周病と炎症、The Bone、2011、25: 415-420

〔その他〕

ホームページ等

<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

なし

(3) 連携研究者

なし