

## 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 5月 21日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890115

研究課題名（和文） 歯周病原細菌による破骨細胞の分化制御と骨破壊の分子基盤

研究課題名（英文） Inhibition of RANK ligand-induced osteoclast differentiation  
by *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

中山 真彰 (NAKAYAMA MASAOKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10579105

研究成果の概要（和文）：歯周病の原因菌となる *Porphyromonas gingivalis*（以下、*P. gingivalis*）は歯周病で認められる歯槽骨の喪失にどのように関与しているのかを検討した。骨代謝バランスを司る主要な細胞である破骨細胞に対して *P. gingivalis* を感染させて、破骨細胞の分化に対する影響を調べた。その結果、感染された破骨前駆細胞は破骨細胞への分化を抑制し、当初の予想における破骨細胞の分化促進や活性化は認められなかった。またその分化抑制経路には、自然免疫系で重要とされる TLR2/MyD88 の伝達経路が重要であることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated whether *P. gingivalis* affects osteoclastogenesis induced by RANK/RANKL signaling. Osteoclastic precursor cells were challenged by *P. gingivalis* with RANKL at the same time, analyzed its differentiation for matured osteoclasts. Interestingly, the osteoclastic precursors were inhibited RANK/RANKL-induced osteoclastogenesis by infection of *P. gingivalis*. It was, however, contrary to my expectation that osteoclasts were promoted to form the large number of matured cells and activated bone resorption by *P. gingivalis* infection. According to investigate this inhibition by using precursor cells from knockout mice of TLRs and adaptor factors, MyD88 and TRIF, it revealed that innate immune response through TLR2/MyD88 signaling pathway were related with this inhibition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯周病原細菌、*Porphyromonas gingivalis*、破骨細胞分化、自然免疫

#### 1. 研究開始当初の背景

歯周病原細菌による歯槽骨の喪失は、主たる特徴の一つである。歯槽骨は骨代謝バランスで重要とされている破骨細胞と骨芽細胞が主に機能して、恒常性を維持していると考えられている。歯周病態における歯槽骨の喪失には破骨細胞の活性化が見られ、細菌感染による炎症反応がさらにそれを促進していることも考えられる。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的では、破骨前駆細胞はマクロファージ様細胞でもあるため、細菌を貪食し排除する機能もある。その点に着目して破骨細胞の分化と免疫応答のどちらが優先的に働いているものなのか明らかにする。

#### 3. 研究の方法

(1) 破骨細胞分化における自然免疫応答に重要なToll-like receptors (TLRs)の関与  
*P. gingivalis* の感染においてTLR2, 4, 9が関わるかどうかをそれぞれの遺伝子を欠損させたマウスから破骨前駆細胞を調製して、破骨細胞分化能を調べた。条件は、*P. gingivalis* の感染・非感染にて対照をとり、さらに破骨細胞分化方法であるRANKL/M-CSFを同時に添加して5日間培養した。

(2) 破骨細胞分化におけるTLRsのアダプター分子MyD88, TRIFの関与

(1)の実験と同様にTLRsのアダプター分子であるMyD88, TRIFの関与を調べるためにそれぞれの遺伝子欠損マウスから破骨前駆細胞を調製して、破骨細胞分化能を調べた。条件は、*P. gingivalis* の感染・非感染にて対照をとり、さらに破骨細胞分化方法である

RANKL/M-CSFを同時に添加して5日間培養した。

破骨細胞の分化方法は(1), (2)共にTRAP陽性の三核以上の多核細胞にて評価した。

#### 4. 研究成果

破骨前駆細胞は、マクロファージ様細胞でもあり、細菌を貪食する機能も持ち合わせている。その点に着目し、RANKL 刺激による破骨細胞への分化と細菌感染による自然免疫応答とのクロストークについて検討した。TLR2, 4, 9 遺伝子欠損マウス由来の細胞を用いて *P. gingivalis* 感染による破骨細胞の分化抑制を検討したところ、TLR2 欠損マウス由来細胞において破骨細胞分化抑制は認められなかった。TLR4, 9 欠損マウス由来の細胞では、破骨細胞の分化は *P. gingivalis* の感染によって顕著に抑制された。さらに、MyD88, TRIF の欠損細胞においては、MyD88 欠損細胞において *P. gingivalis* 感染による破骨細胞分化抑制が認められなかった。従って、*P. gingivalis* の感染によって起こる破骨細胞の分化抑制には、TLR2 と MyD88 が重要な役割を果たしているものと考えられた。以上のことから、マクロファージ様細胞でもある破骨前駆細胞は、*P. gingivalis* の感染によって、TLR2/MyD88 経路を介した免疫応答を起こすことで、RANKL 刺激による破骨細胞分化シグナルを干渉および抑制的に制御して、破骨細胞の分化を阻害しているものと考えられた。本研究と同じく、*P. gingivalis* の感染における TLR2 の役割は数多く報告されており、また MyD88 を介した免疫応答や炎症反応に繋

がる因子の発現誘導などの報告もあり、本研究の発展上、一致した見解を得られたものと思われる。しかしながら、免疫応答シグナルとRANKLによる分化シグナルの競合する理由や関わる因子の解明など分化抑制の詳細な機序については不明なところであるため、抑制のメカニズムを明らかにすることが重要な課題であると思われる。

## 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3件)

① Yujiro Nakashima, Hajime Isomoto, Kayoko Matsushima, Akira Yoshida, Toshiyuki Nakayama, Masaaki Nakayama, Junzo Hisatsune, Tatsuki Ichikawa, Fuminao Takeshima, Tomayoshi Hayashi, Kazuhiko Nakao, Toshiya Hirayama, and Shigeru Kohno  
Enhanced Expression of CXCL13 in Human *Helicobacter pylori*-Associated Gastritis  
*Digestive Diseases and Sciences*. 査読有, 2011; 56(10): pp. 2887-2894.

② Ayako Matsumoto, Hajime Isomoto, Masaaki Nakayama, Junzo Hisatsune, Yoshito Nishi, Yujiro Nakashima, Kayoko Matsushima, Hisao Kurazono, Kazuhiko Nakao, Toshiya Hirayama, and Shigeru Kohno  
*Helicobacter pylori* VacA reduces the cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-XL, leading to apoptosis in gastric epithelial cells  
*Digestive Diseases and Sciences*. 査読有, 2011; 56(4): pp. 999-1006.

③ Kayoko Matsushima, Hajime Isomoto, Naoki Inoue, Toshiyuki Nakayama, Tomayoshi Hayashi, Masaaki Nakayama, Kazuhiko Nakao, Toshiya Hirayama, and Shigeru Kohno

MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa  
*International journal of cancer*. 査読有, 2011; 128(2): pp. 361-70.

[学会発表] (計10件)

① 中山真彰、藤田佑貴、井上哲圭、大原直也  
題名: The mechanism and the role of Akt dephosphorylation induced by

*Porphyromonas gingivalis* infection

学会名: 第85回日本細菌学会総会 ポスター発表

場所: 長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール

年月: 平成24年3月27-29日

② 藤田 佑貴, 中山 真彰, 内藤 真理子, 山近 英樹, 中山 浩次, 大原 直也

題名: Hemoglobin Receptor Protein increases interleukin-8 in human gingival epithelial cell line Ca9-22

学会名: 第85回日本細菌学会 ポスター発表

場所: 長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール

年月: 平成24年3月27-29日

③ 中山真彰

題名: 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* による宿主細胞応答の分子基盤

学会名: 第1回ブレインストーミング in 直島

「研究コラボレーションの創生」口頭発表  
場所: 香川・直島 ベネッセアートサイト直島ベネッセハウス

年月: 平成23年11月19-20日

④ 藤田 佑貴, 中山 真彰, 内藤 真理子, 山近 英樹, 飯田 征二, 中山 浩次, 大原 直也

題名: *Porphyromonas gingivalis* HbR による歯肉上皮細胞のIL-8産生機序

学会名: 第64回日本細菌学会中国・四国支部総会 口頭発表

場所：岡山大学大学院自然科学研究科棟 2 階  
(岡山大学津島キャンパス)

年月：平成 23 年 10 月 22, 23 日

⑤佐藤法仁, 阿戸 学, 松村隆之, 山崎利雄,  
関塚剛史, 黒田 誠, 中山真彰, 井上哲圭,  
本田尚子, 土田耕三, 小林和夫, 大原直也  
題名: Streptomycin 依存性結核菌における遺  
伝子変異の解明と Streptomycin 耐性を誘導  
する新たな遺伝子変異

学会名：第 64 回日本細菌学会中国・四国支  
部総会 口頭発表

場所：岡山大学大学院自然科学研究科棟 2 階  
(岡山大学津島キャンパス)

年月：平成 23 年 10 月 22, 23 日

⑥Masaaki Nakayama, Koji Nakayama, Kazuo  
Kobayashi and Naoya Ohara

題名：Inhibition of RANK ligand-induced  
osteoclast differentiation by  
*Porphyromonas gingivalis*

学会名：International Union of  
Microbiological Societies (IUMS) Congress  
2011&第 84 回日本細菌学会総会 (ポスター  
発表)

場所：北海道・札幌 札幌コンベンションセ  
ンター

年月：平成 23 年 9 月 7-10 日

⑦ Naoya Ohara, Norito Satoh, Masaaki  
Nakayama, Mayuko Okabe, Kazuo Kobayashi

題名：GENE EXPRESSION PROFILE IN A  
THYMIDINE SYNTHASE THYX-DELETION MUTANT OF  
*MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG

学会名：International Union of  
Microbiological Societies (IUMS) Congress  
2011&第 84 回日本細菌学会総会 (ポスター  
発表)

場所：北海道・札幌 札幌コンベンションセ  
ンター

年月：平成 23 年 9 月 7-10 日

⑧Norito Satoh, Manabu Ato, Takayuki  
Matsumura, Toshio Yamazaki, Tsuyoshi  
Sekizuka, Makoto Kuroda, Naoko Honda,

Masaaki Nakayama, Kozo Tsuchida,

Kazuo Kobayashi, Naoya Ohara

題名：IDENTIFICATION OF THE NOVEL  
MUTATIONS IN 16S RRNA GENE OF THE  
SUBSTRAINS OF A STREPTOMYCINDEPENDENT  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAIN18B  
WHICH CONFER STREPTOMYCIN RESISTANCE IN  
*MYCOBACTERIUM*

学会名：International Union of  
Microbiological Societies (IUMS) Congress  
2011&第 84 回日本細菌学会総会 (ポスター  
発表)

場所：北海道・札幌 札幌コンベンションセ  
ンター

年月：平成 23 年 9 月 7-10 日

⑨中山真彰

題名：歯周病原細菌 *Porphyromonas  
gingivalis* の病原性発現に関する新しい分  
子伝達システム

学会名：第 3 回第 3 回社会制御病態シンポジ  
ウム 口頭発表

場所：岡山大学鹿田キャンパス大学院セミナ  
ー室 (医学科基礎研究棟 1 階)

年月：平成 22 年 11 月 12 日

⑩中山真彰、小林和夫、大原直也

題名：*Porphyromonas gingivalis* による破骨  
細胞分化抑制の分子基盤

学会名：第 63 回細菌学会中国四国支部総会  
口頭発表

場所：松山大学文京キャンパスカルフル・  
ホール3 階

年月：平成 22 年 10 月 16-17 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 真彰 (NAKAYAMA MASA AKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10579105

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者