

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592714

研究課題名(和文) 歯周病原菌代謝産物のエピジェネティック制御遺伝子への作用と難治性全身疾患への影響

研究課題名(英文) Effects of butyric acid producing bacteria on epigenetic gene regulation and systemic diseases

研究代表者

落合 邦康(OCHIAI, Kuniyasu)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：50095444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barrウイルス(EBV)再活性化や感染細胞の異常増殖がおこり伝染性単核球症や上咽頭がんなどが発症する。われわれは、歯周病原細菌の代謝産物である酪酸がEBVの再活性化に必須である最早期遺伝子ZEBRAの発現を転写レベルで誘導する事を見出した。ZEBRAは他のウイルス蛋白やRNAの発現を誘導しEBV関連疾患を引き起こすことから、歯周病がEBVを再活性化し口腔毛様白板症やがんおよび重度の歯周病の進展に深く関与している可能性を示唆している。また、ラットを用いた実験により、歯肉に接種した酪酸が長時間組織に停滞し、ミトコンドリアに強い酸化ストレスを誘導することが判明した。

研究成果の概要(英文)：The EBV BZLF1 gene product ZEBRA is a master regulator of the transition from latency to the lytic replication cycle. We found that *P. gingivalis* induced expression of ZEBRA. This activity was associated with supernatant from bacterial culture. We demonstrated that culture supernatant from *P. gingivalis*, which contained high concentrations of butyric acid, inhibited HDACs, thus increasing histone acetylation and the transcriptional activity of the BZLF1 gene. These findings suggest that periodontal disease is a risk factor for EBV reactivation in infected individuals. In addition, we determined the effects of butyric acid retention in the gingival tissues on oxidative stress induction in the jugular blood mitochondria. We found that BA injected in the rat gingival tissue has prolonged retention in gingival tissues and H2O2 and CAT levels all increased after BA injection. This would insinuate that mitochondrial oxidative stress was induced ascribable to BA.

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：酪酸 エピジェネティクス EBV 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

歯周病を誘因とする全身疾患発症機序研究は、精力的な研究により多くの状況証拠が積み重ねられるものの、未だに明確な解明がなされていない。われわれは1995年から一連の研究発表により、低分子で組織浸透性が高く、エピジェネティック制御作用を持つ歯周病原菌の代謝産物・酪酸が、組織細胞や病原微生物の遺伝子に様々な影響を及ぼすことを報告してきた。これまでに、酪酸が潜伏感染 HIV を再活性化する事を報告し、感染症が HIV 再活性化の原因となるとの考えが世界的に注目されている。同様に、潜伏感染後何らかの理由により再活性化し、しばしば、伝染性単核症、リンパ腫、上咽頭ガン等口腔や全身に重篤な疾患を起こすヘルペスウイルスも HIV と同様の機序で再活性化する可能性が極めて高い。一方で、酪酸が口腔組織に直接及ぼす影響に関してはよくわかっていない。そこで、酪酸をラットの歯肉に接種し、酪酸の組織内浸潤と局所免疫応答に及ぼす影響を検討する。医学及びウイルス学の最先端の知見を歯周病と連結した研究は皆無で、本研究の推進が口腔領域の研究に留まらず医学をはじめとする幅広い分野での応用研究に貢献する可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 歯周病原細菌が EB ウイルス活性化に及ぼす影響：ヘルペスウイルスや HTLV1 などの潜伏感染成立にもエピジェネティック制御が深く関わっていることが報告されており、歯周病原細菌の酪酸が他の潜伏感染ウイルスにも影響を及ぼしている可能性がある。そこで、EBV 再活性化に対する酪酸の影響を調べる。

(2) 酪酸の組織内浸潤と局所免疫応答に及ぼす影響：酪酸が組織に直接及ぼす影響に関してはよくわかっていない。そこで、動物実験を行うことで、酪酸の組織内浸潤と局所免疫応答に及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) EB ウイルス感染細胞である AKATA や Daudi 細胞等に種々の歯周病原細菌(菌体や培養上清)を作用させ、活性化時に誘導される ZEBRA や EaD 蛋白の発現を観察することにより、ウイルス再活性化に及ぼす歯周病原細菌の影響を調べる。活性化が認められた場合、実際のウイルス複製をリアルタイム PCR で検出する。培養上清の酪酸濃度はガスクロマトグラフィーにより測定し、ウイルス活性化と酪酸産生菌との関連性を明らかにする。

(2) ^{13}C ラベルをした酪酸 (1 mol/L) をラット歯肉に接種し、頸静脈より継時的に採血後、血中酪酸量を UPLC/MS/MS system により測定する。その後、種々の測定キットを用いて H_2O_2 、SOD 等を測定し酸化ストレスの状態を検討する。

4. 研究成果

(1) 歯周病の原因菌 *Porphyromonas gingivalis* の培養上清が、EBV の再活性化に必須である最早期遺伝子 ZEBRA の発現を転写レベルで誘導した(図1)。細菌の培養上清からは高濃度の酪酸が検出され、その量は EBV 複製能と相関していた。酪酸には HDAC 阻害作用があることが知られているので詳細な分子機構を検討した。その結果、酪酸産生菌の上清はヒストンのアセチル化を促進することにより ZEBRA 発現を転写レベルで活性化した。また、ChIP assay の結果、上清処理により HDAC と転写抑制因子の ZEBRA プロモーターからの遊離と、ヒストンのアセチル化の LTR へのリクルートなどが認められた。一方で、酪酸を除去した培養上清においては認められなかった (Imai et al. Biochimie, 2012)。以上の結果から、酪酸産生菌は ZEBRA プロモーターのヒストンアセチル化を促進することでクロマチン構造を「不活性化型」から「活性化型」に変換し、EBV の転写と複製を促進することがわかった。

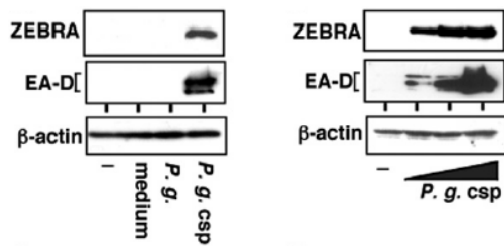


図1 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸による ZEBRA の誘導

(2) ラット歯肉に 13C ラベルをした酪酸を接種し血中酪酸量を UPLC/MS/MS system により測定した結果、90 分後をピークに 120 分まで歯肉から酪酸が検出できた (図 2)。一方で、腸管内接種では腸管周囲静脈から酪酸は全く検出されなかった。また、血中の酸化ストレスマーカーを測定した結果、コントロールラットに比べ、酪酸接種ラットでは H_2O_2 、SOD、およびカタラーゼが上昇していた (Cueno ME et al. Cell Stress Chaperon, 2013)。以上の結果から、腸管では酪酸が腸管粘膜に維持されることなく急速に代謝されるものの、歯周組織内に浸潤した酪酸は、組織内に停滞・維持され、酸化ストレス様に作用することが明らかとなった。酪酸の体内代謝が組織により違うことが判明し、今後の新たな興味深い研究課題として継続的に実験を行っている。

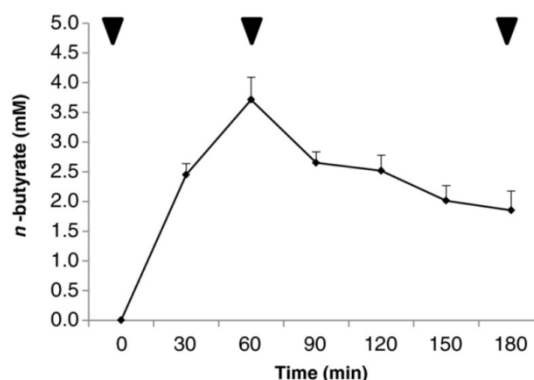


図2 ラット歯肉中の酪酸量の推移

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 13件)

- ① Cueno ME, Imai K, Tamura M, Ochiai K : Butyric acid-induced rat jugular blood cytosolic oxidative stress is associated with SIRT1 decrease. Cell Stress Chaperones, 査読有, vol.19, 2014, 295-298.
DOI: 10.1007/s12192-013-0462-7.
- ② Tsuda H, Zhao N, Imai K, Ochiai K, Yang P, Suzuki N : BIX01294 suppresses osteoclast differentiation on mouse macrophage-like Raw264.7 cells. Bosn J Basic Med Sci, 査読有, vol.13, 2013, 271-275.
<http://www.bjbms.org/archives/2013-4/11-Tsuda.pdf#search>
- ③ Cueno ME, Tamura M, Imai K, Ochiai K : Orally supplemented catechin increases heme amounts and catalase activities in rat heart blood mitochondria: A comparison between middle-aged and young rats. Experimental Gerontology, 査読有, vol.48, 2013, 1319-1322.
DOI: 10.1016/j.exger.2013.08.014.
- ④ Cueno ME, Imai K, Okamoto T, Ochiai K : Overlapping glycosylation sequon influences the glycosylation pattern of a chimeric protein expressed in tomato leaf and callus. Journal of Biotechnology, 査読有, vol.164, 2013, 9-12.
DOI:10.1016/j.jbiotec.2012.12.001
- ⑤ Imai K, Ochiai K : Effect of microbial coinfection with HIV-1 and butyric acid-producing anaerobic bacteria on AIDS progression. J Oral Biosci, 査読有, vol.55, 2013, 55-60.
DOI:10.1016/j.job.2013.03.003
- ⑥ Imai K, Ochiai K, Okamoto T : Microbial interaction between HIV-1 and anaerobic bacteria producing butyric acid: its potential implication in AIDS progression. Future virology, 査読有,

- vol. 7(10), 2012, 1005-1014.
DOI:10.2217/fvl.12.92
- ⑦ Imai K, Yamada K, Tamura M, Ochiai K, Okamoto T : Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. Cell Mol Life Sci. 査読有, vol.69(15), 2012, 2583-2592.
DOI: 10.1007/s00018-012-0936-2.
- ⑧ Tamura M, Ochiai K : Exploring the possible application of catechin (gel) for oral care of the elderly and disabled individuals. JDSR. 査読有, vol. 48, 2012, 126-134.
DOI:10.1016/j.jdsr.2012.02.004
- ⑨ Cueno ME, Imai K, Ochiai K, Okamoto T : Cytokinin dehydrogenase differentially regulates cytokinin and indirectly affects hydrogen peroxide accumulation in tomato leaf. J Plant Physiol. 査読有, vol.169, 2012, 834-838.
DOI:10.1016/j.jplph.2012.01.008.
- ⑩ Imai K, Victriano AF, Ochiai K, Okamoto T : Microbial Interaction of Periodontopathic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* and HIV -Possible Causal Link of Periodontal Diseases to AIDS Progression-. Current HIV Research. 査読有, Vol.10, 2012, 238-244.
doi:10.2174/157016212800618183
- ⑪ Ochiai K, Imai K, Tamura M, Ochiai-kurita T : Butyric acid effects in the development of periodontitis and systemic diseases. J. Oral Biosci. 査読有, vol.53(3), 2011, 213-220.
DOI:10.1016/S1349-0079(11)80004-6
- ⑫ Victoriano AF, Imai K, Togami H, Ueno T, Asamitsu K, Suzuki T, Miyata N, Ochiai K, Okamoto T : Novel histone deacetylase inhibitor NCH-51 activates latent HIV-1 gene expression. FEBS. L. 査読有, vol.685 (7), 2011, 1103-1111.
DOI:10.1016/j.febslet.2011.03.017.
- ⑬ Imai K, Ochiai K : Role of histone modification on the transcriptional regulation and HIV-1 gene expression : Possible mechanisms of periodontal diseases in AIDS progression. J. Oral science. 査読有, vol.53(1), 2011, 1-13.
DOI:10.2334/josnusd.53.1
- [学会発表] (計 12件)
- ① Marni E. Cueno, Kunivasu Ochiai : Periodontal bacterial metabolite induces rat blood apoptotic and pyroptotic caspase activities. 第87回日本細菌学会総会、2014年 3月28日、タワーホール船堀、東京。
- ② 落合 邦康、Marni Cueno : A possible correlation between oral butyric acid and aging. 第 87 回日本細菌学会総会、2014年 3月 28日、タワーホール船堀、東京。
- ③ 神尾 宜昌、今井 健一、田村宗明、Marni Cueno、齋藤夕子、落合 邦康 : 口腔細菌はインフルエンザウイルス感染を促進する、第87回日本細菌学会総会、2014年 3月 28日、タワーホール船堀、東京。
- ④ 今井 健一、神尾 宜昌、落合 邦康 : 口腔細菌のウイルス感染症促進作用-EBV およびインフルエンザ感染に及ぼす影響-、第87回日本細菌学会総会、2014年 3月26日、タワーホール船堀、東京。
- ⑤ 落合邦康 : 歯周病を誘因とする全身疾患、第17回日本腸内細菌学会、2013年6月13日、北里大学コンベンションホール、東京。
- ⑥ 落合邦康、今井健一、落合智子 : 歯周病原細菌代謝産物・酪酸の歯周組織に及ぼす影響と潜伏感染ウイルスの再活性化、第86回 日本細菌学会総会、2013年3月20日、幕張メッセ 国際会議場、千葉。

- ⑦ 今井健一、落合邦康：EBV-歯周病原細菌間相互作用による潜伏感染EBVの再活性化と病態への関与、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月14日、大阪国際会議場、大阪。
- ⑧ Cueno, M.E. K. Imai, and K. Ochiai：Influenza A H1N1 Pathogenesis And Transmissibility Are Structurally Correlated To The Salt Bridge Between The HA1 110-helix And HA2 B-loop. Second isirv AVG conference, 2012 Oct 30, Melia Hotel, Vietnam.
- ⑨ 落合邦康：歯周病原細菌による潜伏感染EBVの再活性化と病態への関与、第55回日本歯周病学会秋季学術大会、2012年9月23日、つくば国際会議場、茨城。
- ⑩ 田村宗明、落合邦康：抗菌ジェルによる要介護者口腔微生物数のコントロール効果、第54回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2012年9月15日、奥羽大学、福島。
- ⑪ 津田啓方、今井健一、落合邦康、鈴木直人：BIX01294は RAW264.7細胞の RANKL 誘導破骨細胞分化を抑制する、第53回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2011年10月2日、長良川国際会議場、岐阜。
- ⑫ K Imai, M Tamura, K Yamada, T Okamoto, K Ochiai：Reactivation of latent HIV-1 infection by butyric acid-producing bacteria involves histone modification. 国際微生物学連合、2011年9月13日、札幌コンベンションセンター、北海道。

〔図書〕(計 1件)

- ① 落合邦康、丸善出版社株式会社、腸内共生系のバイオサイエンス(財団法人日本ビフィズス菌センター編)、2011、101-108。

〔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://www2.dent.nihon-u.ac.jp/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 邦康 (OCHIAI, Kuniyasu)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：50095444

(2) 研究分担者

今井 健一 (IMAI, Kenichi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：60381810

田村 宗明 (TAMURA, Muneaki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30227293

津田 啓方 (TSUDA, Hiromasa)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60325470

(3) 連携研究者

なし