

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861573

研究課題名(和文) 歯周病細菌病原性プロテアーゼによる宿主細胞応答抑制機序とその意義

研究課題名(英文) The role of gingipains from *P. gingivalis* on host cell responses

## 研究代表者

中山 真彰 (Nakayama, Masaaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10579105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は歯周組織の炎症および歯槽骨の吸収により、歯の喪失に繋がる口腔内慢性感染症である。本研究では、歯周病に関連する細菌 *Porphyromonas gingivalis* が産生するプロテアーゼ「ジンジパイン」の宿主上皮細胞に対する作用を調べ、PI3K/Akt経路の不活性化をはじめ、その経路の下流の多様なタンパク質に影響を与えていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Periodontal diseases are chronic oral bacterial infectious diseases which indicate inflammation of periodontal tissues, alveolar bone loss, and, leading to loss of tooth. In this research, *Porphyromonas gingivalis*, which is one of the most major oral pathogens, produces cysteine proteases called as gingipains. The gingipains attenuate PI3 kinase/Akt signaling pathway, and Akt downstream proteins, which are mTOR, GSK3, Bad, PRAS40, and MDM2, are also altered the their level of phosphorylation by gingipains in gingival epithelial cells. Taken together, their activity is disturbed by gingipains in parallel with inactivation of PI3K/Akt.

研究分野：細菌学

キーワード：歯周病原細菌 ジンジパイン 細胞内シグナル伝達 PI3K/Akt経路

### 1. 研究開始当初の背景

*Porphyromonas gingivalis* (以下、*P.gingivalis*)は慢性歯周炎の病巣から高頻度に分離される歯周病で最も関連が深い細菌である。歯周病に関連する細菌の慢性的な感染は、歯周組織の炎症や歯槽骨の破壊をともし歯周病態の発症と形成に寄与している。歯周病は糖尿病や血管疾患など全身性疾患と関連性があるとされており、歯周疾患の理解は関連する全身性疾患との関与を理解する上でも非常に重要である。歯周病は単一の細菌による感染ではなく、混合感染として考えられているため、発症機序や病態の形成機序に統一見解がなされていないと考えられている。またその発症の要因には感染している細菌種だけでなく、宿主の免疫力や口腔内環境などの多様なバランスも重要な要因とされており、複雑な疾患である。そこで、歯周病の病態発症および形成を理解するために、宿主と細菌の感染現象を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

### 2. 研究の目的

歯周病原細菌の感染局所および周縁部では、歯肉上皮細胞の破壊に引き続き、歯根膜や歯槽骨の破壊・吸収が生じ、歯周炎が惹起される。そのため歯周病発症機序の分子基盤の構築のために、我々は歯周病原細菌 *P.gingivalis* と宿主の歯肉上皮細胞との相互作用によって起こる細胞生物学的現象を明らかにすることに着目した。本研究では、*P.gingivalis* が産生する病原性プロテアーゼジンジパインに着目し、宿主細胞の細胞機能制御に重要なシグナル伝達経路 PI3K/Akt 経路に与える影響を調べた。

### 3. 研究の方法

研究方法では、歯肉上皮細胞を用いた細菌感染実験により、ジンジパインによる PI3K/Akt 経路における細胞・分子生物学的アプローチにより分子解析を行ない、歯周病の発症機序における関連性を調べた。培養細胞は、ヒト歯肉上皮細胞 Ca9-22、および正常歯肉上皮細胞 HGEP(CellnTech)を用いた。培養法はそれぞれ 10%ウシ血清含有 MEM およびメーカー指定培地 CnT-24 を用いて培養を行なった。*Pg* は野生株 ATCC33277 (WT) とジンジパイン完全欠損株 (KDP136) を用いて multiplicity of infection (MOI) of 100 になるように感染実験を行った。24 well プレートに  $1 \times 10^5$  個の Ca9-22 細胞と HGEP 細胞に対して MOI of 100 で WT と KDP136 を 0, 1, 2, 4 時間で感染させ、その後細胞溶解液を作製し、Western blotting を行った。それぞれ各種リン酸化特異的抗体にてリン酸化レベルの変化を調べた。また  $1 \times 10^5$  個の細胞に対する WT と KDP136 の細菌数 (MOI of 100) を調製し、終濃度 10 $\mu$ M になるようにジンジパイン特異的阻害剤 (KYT-1/36) で 10 分間処理を行った。その後、Ca9-22 細胞と HGEP 細胞に対して MOI of

100 でジンジパイン阻害剤処理および未処理の WT を 4 時間まで感染させ、細胞溶解液を作製し、Western blot 法を行った。WT および KDP136 の感染、およびジンジパイン阻害剤処理、未処理の WT 感染を行ない、可溶化した細胞溶解液を SDS-PAGE にてタンパク質を分離した。分離後、PVDF 膜に転写し、Akt 下流タンパク質 GSK3, mTOR, Bad, MDM2, 4EBP, RPS6, p70S6K に対する各種リン酸化特異的抗体にて各タンパク質の活性化状態を示すリン酸化レベルの変化を調べた。

### 4. 研究成果

WT 感染では GSK3, mTOR, Bad, MDM2, 4EBP のリン酸化の低下が認められたが、KDP136 の感染ではそれらは認められなかった。p70S6K のリン酸化レベルはいずれの株の感染でも変化しなかった。一方、RPS6 のリン酸化レベルは、WT 感染でのみ上昇し、Akt 以外の経路が活性化していることが示唆された。さらにジンジパイン阻害剤 KYT1/36 (各終濃度 10 $\mu$ M) 処理した WT 感染においても KDP136 感染と同様に各種タンパク質のリン酸化レベルに変化を示さなかった。従って、PI3K/Akt の抑制と同様に、Akt 下流タンパク質のリン酸化変化には、ジンジパインの酵素活性が重要であることが示唆された。以上の結果から、*P.gingivalis* が産生するジンジパインは PI3K や Akt の活性抑制によって脱リン酸化された Akt 下流タンパク質の活性化状態を変化させていることが考えられ、PI3K/Akt 経路が制御する各種タンパク質の生理的機能への影響を調べることが必要であると考えられる。一方で、ジンジパインの作用は PI3K/Akt 経路の攪乱だけでなく、RPS6 のように Akt 経路以外の別経路を活性化するなど多様な作用が示された。今後は、ジンジパインの歯肉上皮細胞に対する詳細な作用機序を解析し、病態発症との因果関係やその意義を明らかにしていく。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1) Yuko Taguchi, Keiko Sato, Hideharu Yukitake, Tetsuyoshi Inoue, Masaaki Nakayama, Mariko Naito, Yoshio Kondo, Konami Kano, Tomonori Hoshino, Koji Nakayama, Shogo Takashiba and Naoya Ohara Involvement of an Skp-like protein, PGN\_0300, in the type IX secretion system of *Porphyromonas gingivalis* *Infection and Immunity*. 2015; 84(1):230-40.

doi: 10.1128/IAI.01308-15. 査読有り

2) Satosu Onozawa, Yuichiro Kikuchi, Kazuko Shibayama, Eitoyo Kokubu, Masaaki Nakayama, Tetsuyoshi Inoue, Keisuke Nakano, Yukinaga Shibata, Naoya Ohara, Koji Nakayama, Kazuyuki Ishihara, Toshiyuki Kawakami and Hiromasa Hasegawa

Role of extracytoplasmic function sigma factors in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis*  
*BMC Oral Health*. 2015; 15:4.

doi: 10.1186/1472-6831-15-4. 査読有り

3) **Masaaki Nakayama**, Tetsuyoshi Inoue, Mariko Naito, Koji Nakayama and Naoya Ohara  
Attenuation of the PI3 kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp  
*The Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290(8):5190-202.

doi: 10.1074/jbc.M114.591610. 査読有り

4) Tetsuyoshi Inoue, **Masaaki Nakayama**, Yuko Taguchi, Konami Kano, Miyuu Ono, Yurika Shimizu, Teruo Kuroda, Naoya Ohara  
Characterization of the tripartite drug efflux pumps of *Porphyromonas gingivalis*  
ATCC 33277  
*New Microbiologica*, 2015; 38(1):97-103.

査読有り

5) Junpei Tagawa, Tetsuyoshi Inoue, Mariko Naito, Keiko Sato, Tomomi Kuwahara, **Masaaki Nakayama**, Koji Nakayama, Takashi Yamashiro, Naoya Ohara

Development of a novel plasmid vector pTI0-1 adapted for electrotransformation of *Porphyromonas gingivalis*

*J Microbiol Methods*. 2014; 105:174-9. 査読有り

〔学会発表〕(計 16 件)

1) **中山真彰**, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也

題名: 歯周病における *P. gingivalis* ジンジパインの重要性

(The significance of *P. gingivalis* gingipains on Periodontal diseases)

学会名: 第 90 回日本細菌学会総会 口頭発表 (Symposium)

場所: 仙台国際センター展示棟 (宮城)

年月: 平成 29 年 3 月 19-21 日

2) **中山真彰**, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也

題名: *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによる PGE2 産生の分子機序

(*Porphyromonas gingivalis* gingipains cause cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin E2 production)

学会名: 第 90 回日本細菌学会総会 ポスター発表

場所: 仙台国際センター展示棟 (宮城)

年月: 平成 29 年 3 月 19-21 日

3) **中山真彰**, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也

題名: *P. gingivalis* ジンジパインの宿主細胞応答を介した病原性機能解析

「若手研究者奨励賞受賞記念講演」

学会名: 第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会 口頭発表

場所: かがわ国際会議場 (香川)

年月: 平成 28 年 10 月 15 日

4) **中山真彰**, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也

題名: ポルフィロモナス・ジンジパリスが産生するジンジパインによる PI3 キナーゼ/Akt 経路抑制の分子機序

「第 28 回歯科基礎医学会学術奨励賞受賞講演・微生物学部門」

学会名: 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 口頭発表

場所: 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌)

年月: 平成 28 年 8 月 24-26 日

5) **中山真彰**, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也

題名: PI3K/Akt 経路に対する *P. gingivalis* ジンジパインの役割

学会名: 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 ポスター発表

場所: 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌)

年月: 平成 28 年 8 月 24-26 日

6) **中山真彰**, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也

題名: *P. gingivalis* ジンジパインによる PI3K/Akt 経路攪乱の分子解析

学会名: 第 89 回日本細菌学会総会

場所: 大阪国際交流センター (大阪) ポスター発表

年月: 平成 28 年 3 月 23-25 日

7) **中山真彰**, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也

題名: *P. gingivalis* ジンジパインによる PI3K/Akt 経路攪乱の分子解析

学会名: 第 68 回日本細菌学会中国・四国支部総会 口頭発表

場所: 岡山大学鹿田キャンパス 地域医療人育成センターおかやま (MUSCAT CUBE) (岡山)

年月: 平成 27 年 10 月 3-4 日

8) **中山真彰**, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也

題名: *P. gingivalis* ジンジパインによる PI3K/Akt 経路の抑制効果とその意義

Attenuation of the PI3 kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp

学会名: 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 ポスター発表

場所: 朱鷺メッセ (新潟コンベンションセンター) (新潟)

年月: 平成 27 年 9 月 11-13 日

9) **中山真彰**, 中山浩次, 大原直也

題名: 歯周病原細菌の感染による免疫応答と破骨細胞分化制御の相関性

学会名: 第 88 回日本細菌学会総会 口頭発表 (Workshop)

場所: 長良川国際会議場 (岐阜)

年月: 平成 27 年 3 月 26-28 日

10) **中山真彰**, 中山浩次, 大原直也  
 題名: 細菌感染による破骨細胞分化への自然免疫応答の重要性  
 学会名: 第 88 回日本細菌学会総会 ポスター発表  
 場所: 長良川国際会議場 (岐阜)  
 年月: 平成 27 年 3 月 26-28 日

11) **中山真彰**, 中山浩次, 瀧井猛将, 大原直也  
 題名: TLR2/MyD88 経路を介した抗酸菌による破骨細胞分化制御  
 学会名: 第 85 回実験結核研究会 口頭発表  
 場所: 長崎ブリックホール (長崎)  
 年月: 平成 27 年 3 月 26 日

12) **中山真彰 (Masaaki Nakayama)**  
 題名: A new aspect of *Porphyromonas gingivalis* infection; Gingipains disturb the host cell PI3K/Akt signaling pathway  
 学会名: 第一回細菌学オープンセミナー The 1st Bacteriology Special Seminar, Division of Bioresource, CZC (口頭発表/English)  
 場所: 北海道大学大学院獣医学研究科講堂 Lecture Hall, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University (北海道・札幌)  
 年月: 2015 年 2 月 5 日 (木) Feb 5<sup>th</sup>, 2015 (Thursday)

13) **中山真彰**, 井上哲圭, 中山浩次, 大原直也  
 題名: 細菌感染による TLR2 を介した破骨細胞分化制御とその意義  
 学会名: 第 67 回日本細菌学会中国・四国支部総会 口頭発表  
 場所: 徳島文理大学 13 号館 4 階大講義室 (徳島)  
 年月: 平成 26 年 10 月 4-5 日

14) **中山真彰**, 井上哲圭, 中山浩次, 大原直也  
 題名: 細菌感染による免疫応答が破骨細胞分化に与える影響  
 学会名: 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 ポスター発表  
 場所: 福岡国際会議場 (福岡)  
 年月: 平成 26 年 9 月 25-27 日

15) **中山真彰**, 井上哲圭, 内藤真理子, 中山浩次, 大原直也  
 題名: *P. gingivalis* ジンジパインのタンパク分解作用による PI3K/Akt 経路への影響  
 学会名: 第 87 回日本細菌学会総会 ポスター発表  
 場所: 東京・船堀ホール  
 年月: 平成 26 年 3 月 26-28 日 (20140326-28)

16) **中山真彰**, 大原直也  
 題名: 細菌感染による TLR2/MyD88 を介した破骨細胞分化への影響  
 学会名: 第 33 回岡山免疫懇話会 口頭発表  
 場所: 岡山・岡山大学基礎研究棟 1 階大学院セミナー室  
 年月: 平成 26 年 3 月 5 日 (20140305)

〔図書〕(計 1 件)

**1) 中山真彰**

財団法人両備櫻園記念財団「生物学に関する試験研究論叢」第 29 集, 2015 年 9 月発行  
 「歯周病原細菌による PI3K/Akt 経路抑制機構の解明と感染における生理的意義」

〔産業財産権〕  
 出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 真彰 (Nakayama Masaaki)  
 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野・助教  
 研究者番号: 10579105

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )

