

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17083

研究課題名(和文)メンブレントラフィックからみた歯周病菌の生体バリア破壊機構の解析

研究課題名(英文)The destructive mechanisms of epithelial barrier function by periodontal bacteria in membrane traffic

研究代表者

竹内 洋輝 (Takeuchi, Hiroki)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40572186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病の細菌学的要因の1つと考えられているPorphyromonas gingivalisの歯周病発症に関わる分子基盤の解析を行った。その結果、P. gingivalisは細胞間結合のうちtight junctionの関連タンパク質であるJunctional Adhesion Molecule-1 (JAM1)を、本菌が産生するプロテアーゼであるGingipain依存的に分解することを発見した。P. gingivalisはJAM1を選択的に分解し、歯肉上皮組織のバリア機能を低下させている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国における歯周病患者の割合は増加しているが、歯周病の病因論には不明な点が多い。歯周病菌Porphyromonas gingivalisが特異的に分解する上皮バリア関連タンパク質を明らかにすることは、歯周病の発症機序を分子生物学的に調べることを可能とする。また、歯肉上皮組織の作成法を確立することは、歯周病の未病の段階でのヒト生体組織の形態学的解析を可能とする。さらに、歯周病の宿主要因を遺伝学的に調べることを可能とする。P. gingivalisの感染機構を明らかにすることは、本菌の宿主への長期感染を制御できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis is a major pathogen in severe and chronic manifestations of periodontal disease, which is one of the most common infections of humans. A central feature of P. gingivalis pathogenicity is dysregulation of innate immunity at the gingival epithelial interface; however, the molecular basis for the P. gingivalis-dependent abrogation of epithelial barrier function remains undetermined. Gingival epithelial cells express JAM1, a tight junction-associated protein, regulates epithelial barrier function. Here we show that the Arg-specific or Lys-specific cysteine proteases (gingipains) secreted by P. gingivalis can specifically degrade JAM1. A P. gingivalis lacking gingipains was impaired in degradation of JAM1. Specific degradation of JAM1 by P. gingivalis provides the molecular basis for a bacterial strategy leading to periodontitis.

研究分野：予防歯科学

キーワード：分子生物学 組織工学 細菌学 歯周病 Porphyromonas gingivalis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 23 年度の歯科疾患実態調査では、高齢になるにつれ歯肉に所見のある者および対照歯のない者が多かった。4 mm 以上の歯周ポケットをもつ者の割合につき前回の平成 17 年度と比較すると、30-60 歳代では若干の低値を示したものの、75 歳以上の高齢者層では平成 23 年度調査の方が高値を示した。

歯周病の発症機序の理解は喫緊の課題であり、主たる歯周病菌 *P. gingivalis* の歯周組織破壊への関与は広く知られている (Amano *et al.*, *Periodontology* 2000, 2010)。*P. gingivalis* が発見された 1979 年から 2016 年までの間に 6688 件以上の *P. gingivalis* 研究論文が発表されており、毎年論文数は増加している。しかし、歯周病治療に寄与するような *P. gingivalis* 感染機構の研究は未だ十分とはいえない。

歯肉を覆う上皮細胞が形成する上皮バリアは、宿主が歯周病菌と拮抗状態を維持するために重要な役割を果たしている。近年の研究から、上皮バリアの破綻が感染症や慢性炎症等の疾患の素因となることが明らかとなっている。また、本研究の対象である *P. gingivalis* は歯周組織を構成する歯肉上皮組織に侵入することにより、局所で長期感染を凶っている可能性がある。しかし、*P. gingivalis* による上皮組織への侵入機構、および本菌の細胞間侵入に対する免疫応答等について不明な点が多い。

これまでの研究では、歯肉溝上皮における細胞間結合装置についてはギャップ結合とデスモゾームが観察され、タイトジャンクションは観察されないことが報告されている。しかし、これら細胞間結合を担う責任遺伝子の分析方法はリアルタイム PCR を用いた研究が主であり、改善の余地があると考えられる。また、細胞間バリア構築タンパク質が制御する選択的物質透過性の生理的・病理的な意義については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では歯周病の原因菌を対象とし、細菌に感染した細胞の上皮バリア機能に焦点を当て、歯周病の慢性化に至る分子基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

宿主細胞は、Immortalized human gingival epithelial (IHGE) 細胞 (Murakami *et al.*, *Journal of Dental Research*, 2002) を用いた。菌株は、*P. gingivalis* ATCC 33277 および KDP136 ($\Delta kgprgpArgpB$: Shi *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 1999) を用いた。歯肉上皮細胞のどの細胞間結合または細胞間接着分子が *P. gingivalis* 感染により分解を受けるか、共焦点顕微鏡およびウェスタンブロットングで網羅的に解析した。歯肉上皮組織は、Cell Accumulation Technique を用い作成した (Nashiguchi *et al.*, *Advanced Materials*, 2011)。

4. 研究成果

これまでの研究により、*P. gingivalis* が腸管上皮の側底側に発現する Occludin や E-cadherin を分解するとの報告がある (Katz *et al.*, *Infection and Immunity*, 2000)。しかし、歯肉上皮細胞では、デンタルプラークに存在する病原細菌に対する感染防御のため、Tight Junction 関連タンパク質が糖鎖修飾を受けた状態で細胞膜表面に発現している可能性がある。また、歯肉上皮は腸管等の消化管上皮と比較し、Tight junction 関連遺伝子である Claudin および Occludin、細胞間接着の責任遺伝子である E-cadherin 等の局在・発現が異なる可能性がある (Belibasakis *et al.*, *Virulence*, 2015)。

そこで、*P. gingivalis* がどの Tight junction 関連タンパク質を分解するか調べるため、IHGE 細胞に *P. gingivalis* ATCC 33277 株または KDP136 株を感染させ、ウェスタンブロッティングにより感染前後の内在性タンパク質の量を比較した (Fig. 1) . その結果、感染後 1 時間において Tight junction 関連遺伝子である Junctional adhesion molecule-1 (JAM1) のタンパク質量の顕著な減少を認め、その減少は *P. gingivalis* が産生するプロテアーゼである Gingipain の欠失によりキャンセルされた . また、*P. gingivalis* の感染により E-cadherin (CDH1) , Desmocollin-2 (DSC2) , または Nectin-1 のタンパク質量に大きな変化は認めなかった . これらの結果から、*P. gingivalis* は Gingipain 依存的に歯肉上皮細胞の JAM1 タンパク質を選択的に分解することが示唆された .

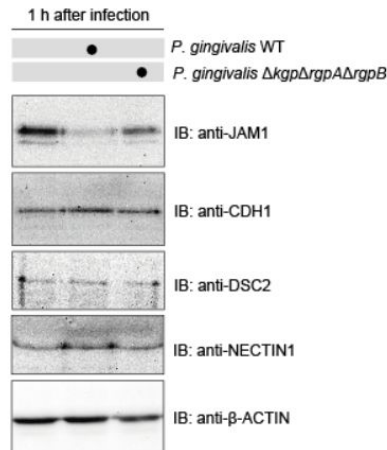


Figure 1. *P. gingivalis* の Gingipain は歯肉上皮細胞の JAM1 タンパク質を分解する.

IHGE 細胞に *P. gingivalis* ATCC 33277 株または KDP136 株を Multiplicity of Infection 100 で 1 時間感染させた . 感染細胞のライセート中の標記タンパク質は、ウェスタンブロッティングにより同定した .

次に、*P. gingivalis* 感染後の JAM1 タンパク質の局在変化を共焦点顕微鏡で観察した . その結果、感染後 1.5 時間において IHGE 細胞縁に存在する JAM1 タンパク質の顕著な減少を認め、その減少は Gingipain の欠失によりキャンセルされた (Fig. 2) . これらの結果は、Fig. 1 で得られた結果を形態学的に支持した .

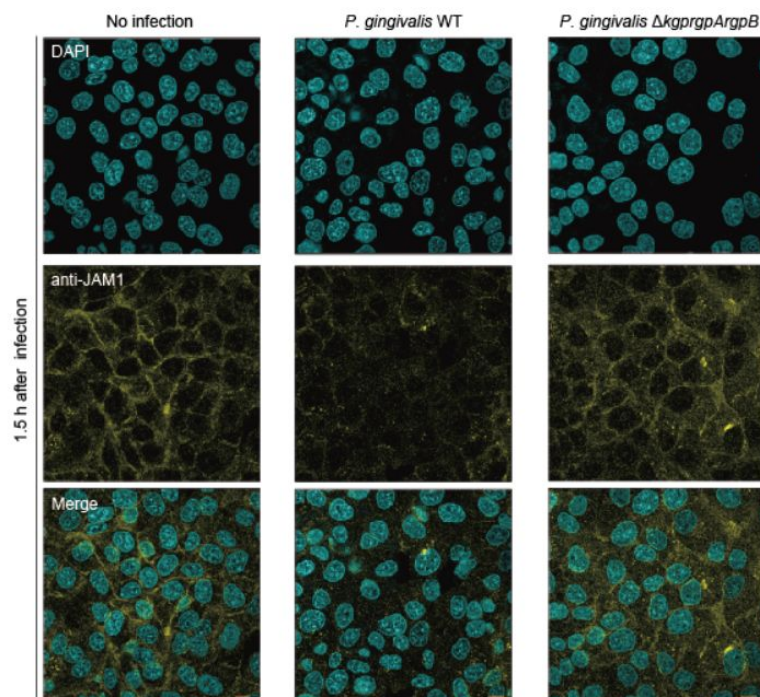


Figure 2. *P. gingivalis* 感染による JAM1 タンパク質の局在変化.

IHGE 細胞に *P. gingivalis* ATCC 33277 株または KDP136 株を Multiplicity of Infection 100 で 1.5 時間感染させた. 感染後, IHGE 細胞を DAPI (シアン) および JAM 抗体 (黄) で染色し, 共焦点顕微鏡で観察した. Bar = 10 μ m.

本菌は, タンパク質のリジン (K) またはアルギニン (R) 部位を切断する Gingipain と呼ばれる強力なタンパク分解酵素を産生する. *P. gingivalis* 感染後の JAM1 タンパク質の減少が, 感染細胞由来の分解機構ではなく Gingipain による分解であることを調べるため, JAM1 アミノ酸配列中の K や R の点変異を行い, 本菌の JAM1 分解への影響をウェスタンブロッティングにより調べた. その結果, JAM1 アミノ酸配列中の 134 番目の K をヒスチジン (H) に, および 234 番目の R を H に置換した変異体で, *P. gingivalis* 感染による JAM1 タンパク質の減少が顕著にキャンセルされた (Fig. 3a,b). これらの結果より, JAM1 タンパク質の K134 および R234 が *P. gingivalis* による同タンパク質の分解に関与することが示唆された. つまり, *P. gingivalis* 由来の Gingipain が JAM1 タンパク質を直接分解している可能性が高い.

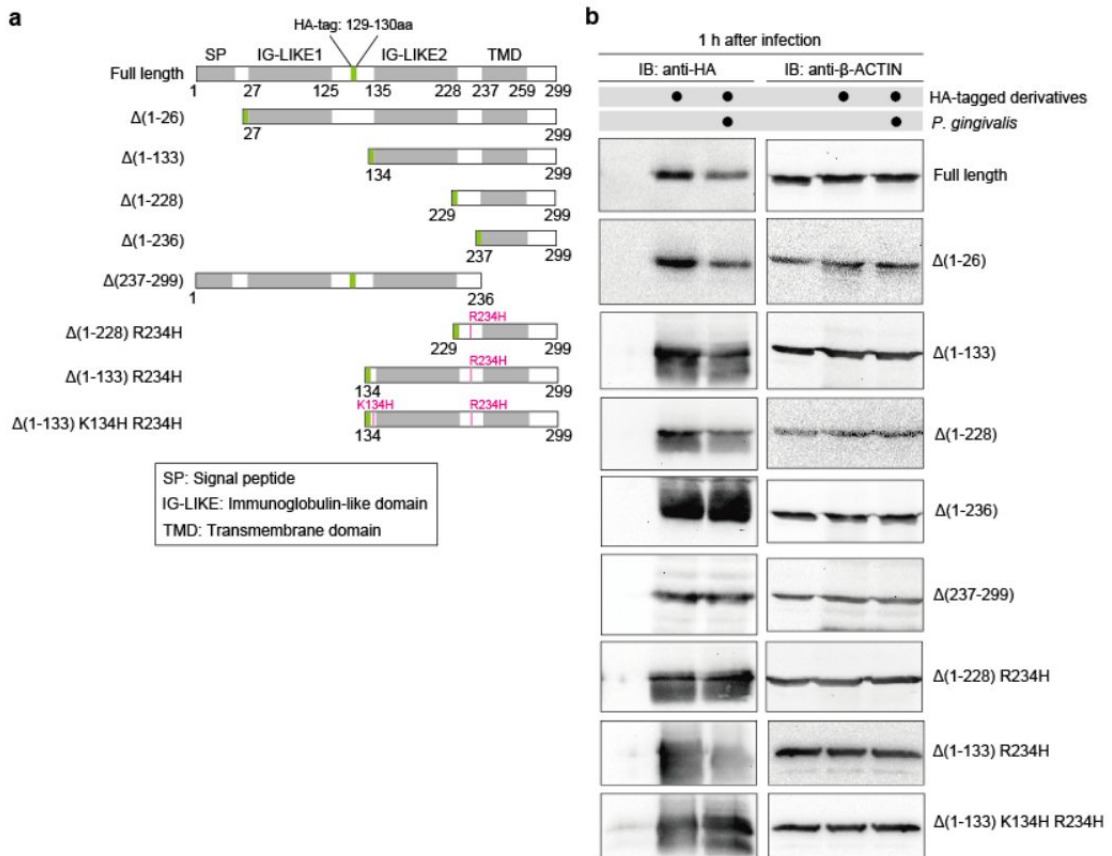


Figure 3. *P. gingivalis* 感染による JAM1 タンパク質の分解に K134 および R234 が関与する.

a. JAM1 変異体の模式図. **b.** IHGE 細胞に *P. gingivalis* ATCC 33277 株を Multiplicity of Infection 100 で 1 時間感染させた. 感染細胞のライセート中の標記タンパク質は, ウェスタンブロッティングにより同定した.

申請者がこれまでの研究により, 歯肉上皮細胞に感染した *P. gingivalis* は 48 時間以内に宿主細胞内から検出されなくなる (Takeuchi *et al.*, Cellular Microbiology, 2011). この結果は, *P. gingivalis* が歯肉上皮細胞内で長期に生存できないことを示し, 本菌の病原性は歯肉上皮細胞細胞間で発揮される可能性が高い. そこで, フィブロネクチンとコラーゲンを変性・薄膜化

し歯肉上皮細胞へコートする細胞集積法を用い、4層程度の重層三次元培養を行った。さらに、上皮粘膜側より *P. gingivalis* を感染させ、その上皮層内局在を側方断面から共焦点顕微鏡で継続的に観察した。その結果、感染後2時間において歯肉上皮組織内のJAM1タンパク質の顕著な減少を認め、その減少はGingipainの欠失によりキャンセルされた (Fig. 4a,b)。また、組織深部でも *P. gingivalis* 感染によりJAM1タンパク質が減少していた。これらの結果より、*P. gingivalis* 由来のGingipainが歯肉上皮組織内のJAM1を分解することが示唆された。

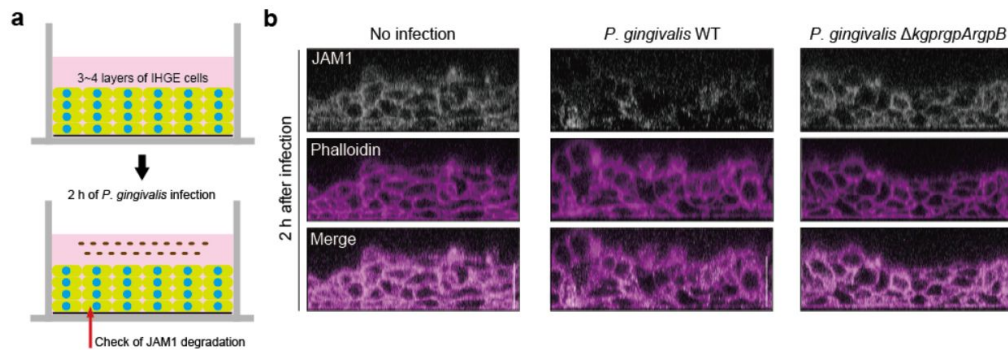


Figure 4. *P. gingivalis* 感染による歯肉上皮組織中のJAM1タンパク質の局在変化。

a. 感染条件の模式図。 **b.** IHGE細胞で作成した歯肉上皮組織に *P. gingivalis* ATCC 33277株またはKDP136株を2時間感染させた。感染後、組織をJAM1抗体(白)およびPhalloidin(マゼンタ)で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。Bar = 30 μm。

本研究により、*P. gingivalis* が分泌するGingipainが歯肉上皮組織のJAM1タンパク質を分解することが明らかとなった。このことは、歯周病菌の感染が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響を分子生物学的に調べることを可能にする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Inaba H, Nomura R, Kato Y, Takeuchi H, Amano A, *et al.*, Adhesion and invasion of gingival epithelial cells by *Porphyromonas gulae*. PLoS One 14: e0213309, 2019, 査読有。

〔学会発表〕(計3件)

Takeuchi H, Amano A., Involvement of Rab4A-related factors in intracellular trafficking of *Porphyromonas gingivalis* in gingival epithelial cells. Pg Melbourne 2017, 2017, Melbourne AU.

竹内 洋輝, 天野 敦雄, *Porphyromonas gingivalis* に感染した歯肉上皮細胞におけるJAM1タンパク質の分解, 第60回歯科基礎医学会, 2018, 福岡県福岡市。

山賀 俊介, 竹内 洋輝, 天野 敦雄, Leukocyte adhesion deficiency-1 責任遺伝子のノックダウンによる歯肉上皮細胞の形態学的解析, 2018年度近畿・中国・四国口腔衛生学会, 2018, 愛媛県松山市。

〔その他〕

研究者詳細 - 竹内 洋輝 - 研究者総覧 - Osaka University

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。