

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19592118
研究課題名 (和文) 細菌感染症によって生じる骨代謝システムの破綻に関する分子機構の解明
研究課題名 (英文) Analysis of molecular mechanism of bone metabolism disruption by bacterial infection
研究代表者 大原 直也 (OHARA NAOYA) 国立感染症研究所・免疫部・室長 研究者番号70223930

研究成果の概要：細菌感染による骨破壊のメカニズムを明らかにする目的で、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* と BCG を用い、その感染による破骨細胞分化への影響を調べた。M-CSF/RANKL で誘導される破骨細胞の分化初期に *P. gingivalis* あるいは BCG が感染するとその分化は抑制されたが、これは破骨細胞と異なる細胞へ分化の方向性が変化したことによることが示唆された。このときに自然免疫系の Toll-like receptor (TLR) からのシグナル以外のシグナルが関与していることが示唆された。インターフェロンの関与は認められなかった。破骨細胞分化後期に細菌が感染した場合には破骨細胞の形成が促進された。この促進には TLR2 あるいは TLR4、その下流の MyD88 からのシグナルが破骨重要であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,300,000	0	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞、マクロファージ、歯周病原細菌、BCG

1. 研究開始当初の背景

歯周病は主に口腔内の病原体によって引き起こされる口腔慢性感染症であり、歯周組織、特に歯槽骨の破壊を引き起こす。また他の感染症、結核症などでも骨の吸収が生じる。歯周病の主たる病原体とされる *Porphyromonas gingivalis* を実験動物の口腔に感染させる、あるいは本菌より精製した LPS を投与する実験により、骨吸収が誘導されるという報告が数多くなされており、本菌が歯周病の特徴的な病態である歯槽骨吸収

の促進因子として働いていることが一般に認められている。この骨吸収の促進は感染により引き起こされる歯周組織における免疫および炎症反応が深く関与しているが、具体的な機序の全体像は解明されていなかった。ところで、骨代謝において免疫分子 RANKL がカギとなる分子であることが明らかにされたことに端を発し、骨代謝の分子レベルでの解析は急速に解析が進められた。そして、免疫分子と骨代謝が密接に関係していることが次々に明らかになっていった。

このように、骨と免疫の接点から細菌感染による骨代謝の変化のメカニズムは解明されてきたものの、従来の免疫学の考えでは整合性のとれない部分が多々あり、さらなる解析が必要と考えられた。最終的には生体での結果が必要であるが、その前に細胞レベルでの理解を十分におこなう必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では細菌が骨代謝に関与する細胞に与える影響を分子レベルで明らかにするとともに、骨代謝に影響を与える菌体成分の探索を行い、歯周疾患における骨吸収メカニズムの解明に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細菌感染によって引き起こされる単球の分化の方向性

骨髄細胞中の単球を M-CSF で分化させたマクロファージを破骨細胞前駆細胞として用いた。次に M-CSF/RANKL により破骨細胞へ分化させた。その分化のさまざまな段階で歯周病原細菌 *P. gingivalis* あるいは BCG を感染させた。細胞表面マーカーの抗体で染色し、感染細胞の分化の方向性を調べた。

(2) 自然免疫系受容体の関与

破骨細胞はその分化段階により微生物の認識に関わる受容体 TLR ファミリーの発現が異なる。細菌感染による破骨細胞形成への影響が TLR ファミリーに依存するかを TLR シグナルのアダプター分子である MyD88 および TRIF 遺伝子欠損マウスの細胞を用いて調べた。

(3) 細菌感染により破骨細胞前駆細胞分化の方向性を決める分子の探索

破骨細胞前駆細胞の各分化段階で菌を感染させた場合に起こる変化をみるために、遺伝子の発現パターンを DNA マイクロアレイを用いて調べた。

(4) 破骨細胞の分化・成熟に影響を及ぼす細菌菌体成分の探索

細菌の菌体成分の中で LPS が破骨細胞の分化に影響を与えることは広く知られている。我々は LPS 以外にも *P. gingivalis* のドメインタンパク質 HbR が破骨細胞の分化を抑制することを明らかにしている。破骨細胞の分化に影響を与える分子が他にも存在する可能性がある。*P. gingivalis* の菌体成分から破骨細胞の分化に影響を与える分子を探索した。

4. 研究成果

(1) 細菌感染によって引き起こされる単球

の分化の方向性

M-CSF/RANKL で誘導される破骨細胞の分化系（6日間培養）に *P. gingivalis* と BCG を感染させ、破骨細胞分化への影響を調べた。破骨細胞の分化初期（培養開始時ないし開始2日後）に *P. gingivalis* あるいは BCG が感染するとその分化は抑制された。破骨細胞分化における細胞内シグナル伝達においては TRAF6、c-fos、NFAT2 が中心的な役割を果たすと考えられるが、非感染細胞において c-fos が 24 時間後、NFAT2 が 48 時間後でその発現量が増加していたのに対し、感染細胞では培養の全期間を通じて、c-fos、NFAT2 ともに発現量の上昇はみられなかった。マクロファージ系細胞で発現している PU.1 および TRAF6 の量は非感染細胞においても、感染細胞においても変化が認められなかった。サイトカイン、ケモカインでは一般的には破骨細胞分化を正に制御する IL-6、MCP-1、RANTES、TNF- α の産生が認められた。これらの分子は感染により発現する分子である。一方 GM-CSF、IL-4、IL-10、Interferon- γ は BCG 感染によっても発現量の上昇はみられなかった。マクロファージ系の細胞に認められる細胞表面抗原では細菌の感染により CD16 (Fc γ R) の発現量は変化しなかったが、CD11b、CD18、MHC classII、CD80、CD86、CD14 の発現量は上昇していた。抗原の処理能、抗原提示能が亢進していることが推測された。なお、ファゴサイトに発現している CD71 (トレンスフェリン受容体) およびインテグリン β 3 の発現量には変化が見られなかった。の発現パターンは *P. gingivalis* あるいは BCG の感染により変化した。これらのことから、分化初期における BCG 感染による破骨細胞分化の抑制は分化の方向性が変化したことによることが示唆された。以上のことから細菌の感染により、破骨細胞から抗原の処理能、抗原提示能の高い細胞に分化の方向性が変化していることが推測された。CD11c、CD40、CD133 に対する抗体を用いて調べたところ、M-CSF 誘導マクロファージ、GM-CSF 誘導マクロファージ、樹状細胞とも異なる細胞に分化していることが示唆された。

培養開始から4日目以降に細菌が感染した場合には破骨細胞の形成が顕著に促進され、個々の破骨細胞の大きさも増加しており、破骨細胞同士の融合も促進された。

(2) 自然免疫系受容体の関与

破骨細胞の前駆細胞である骨髄マクロファージはすべての TLR を発現しており、破骨細胞へ分化していくに従い発現している種類が減少し、成熟破骨細胞では TLR2 と TLR4 のみが発現していることが示されている。破骨細胞形成初期の細菌感染による破骨細胞

形成の抑制は野生型マウスである C57BL/6、MyD88 ノックアウトマウス、TRIF ノックアウトマウス、MyD88/TRIF ダブルノックアウトマウス TLR シグナルのアダプター分子である MyD88 および TRIF 遺伝子欠損マウスの細胞を用いて調べた。

破骨細胞前駆細胞から破骨細胞に分化する途上で細菌が感染した場合、その分化初期では破骨細胞の形成が抑制され、後期では形成が促進される。分化初期における分化の抑制は分化の方向性が変化したことが示唆された。その方向性を調べたところ、M-CSF 誘導型マクロファージ、GM-CSF 誘導型マクロファージ、樹状細胞とは異なる細胞に分化していることが示された。この細胞の遺伝子発現パターンを DNA マイクロアレイで調べたところ、インターフェロンに関連した分子の遺伝子の発現が上昇していた。単球・マクロファージ系細胞は II 型インターフェロンを産生しないため、I 型インターフェロンの影響を考えたが、I 型インターフェロン受容体遺伝子欠損マウスから得た細胞を使用しても野生型マウスの細胞と同じ結果であり、I 型インターフェロンは影響しないことがわかった。次に菌体成分の認識に重要な Toll-like receptor (TLR) からのシグナルの影響を考え、そのアダプター分子である MyD88 と TRIF の遺伝子欠損マウス (KO マウス) の細胞を用いて実験を行なった。分化初期の抑制は MyD88 KO マウス、TRIF KO マウス、MyD88/TRIF KO マウスのどの細胞においても野生型マウスの細胞と差がなかった。しかし、分化後期における破骨細胞の形成促進は TRIF KO マウスの細胞は野生型マウスの細胞と差がなかったが、MyD88 KO マウス、MyD88/TRIF KO マウスの細胞では形成の促進が抑制される傾向にあった。破骨細胞では TLR の中で TLR2 と TLR4 のみが発現しており、これらの受容体からのシグナルが後期における破骨細胞形成促進に重要であることが示唆された。

(4) 破骨細胞の分化・成熟に影響を及ぼす細菌菌体成分の探索

LPS、*P. gingivalis* のドメインタンパク質 HbR 以外の破骨細胞の分化に影響を与える分子を検索したが、本研究期間内に同定することはできなかった。

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 3 件)

- ① Yuichiro Kikuchi, Naoya Ohara, Ohmi Ueda, Kaname Hirai, Yukinaga Shibata, Koji

Nakayama and Setsuo Fujimura. *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative ECF sigma factor shows a mutator phenotype. *Oral Microbiology and Immunology*. 24, 2009. 印刷中. 査読有

- ② Mamiko Yoshimura, Naoya Ohara, Yoshio Kondo, Mikio Shoji, Shinichiro Okano, Yoshio Nakano, Yoshinobu Abiko, Koji Nakayama. Proteome analysis of *Porphyromonas gingivalis* cells placed in a subcutaneous chamber of mice. *Oral Microbiology and Immunology*. 23, 413-418, 2008. 査読有
- ③ Mariko Naito, Hideki Hirakawa, Atsushi Yamashita, Naoya Ohara, Mikio Shoji, Hideharu Yukitake, Keisuke Nakayama, Hidehiro Toh, Fumihiko Yoshimura, Satoru Kuhara, Masahira Hattori, Tetsuya Hayashi, Koji Nakayama. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. *DNA Research*. 15, 215-225, 2008. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 大原直也、岡部真裕子、吉村満美子、中山浩次、小林和夫. BCGにおけるチミジル酸合成酵素ThyXの意義. ワークショップ「抗酸菌感染症研究における新たな視点」. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月.
- ② 岡部真裕子、大原直也、山本三郎、小林和夫. BCG Tokyo 172-I型およびII型におけるsliding能の差異. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月.
- ③ 菊池有一郎、大原直也、上田青海、平井要、柴田幸永、中山浩次、藤村節夫. *Porphyromonas gingivalis* ECFシグマ因子 PG0162 変異株の性状解析. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会. 2008 年 9 月.
- ④ 大原直也、吉村満美子、岡部真裕子、中山浩次、小林和夫. *thyX*遺伝子欠損株の作製による抗酸菌チミジル酸合成酵素の解析. 第 78 回実験結核研究会. 2008 年 4 月
- ⑤ 大原直也、吉村満美子、岡部真裕子、中山浩次、小林和夫. BCGチミジル酸合成酵素遺伝子欠損株の作製. 第 81 回日本細菌学会総会, 2008 年 3 月.
- ⑥ 近藤好夫、吉村満美子、佐藤啓子、大原直也、庄子幹郎、雪竹英治、内藤真理子、藤原卓、中山浩次. *Porphyromonas gingivalis* の TPR ドメイン蛋白質 PG1385 の解析. 第 81 回日本細菌学会総会, 2008

- 年 3 月.
- ⑦ 菊池有一郎、大原直也、上田青海、平井要、柴田幸永、中山浩次、藤村節夫。
Porphyromonas gingivalis ECFシグマ因子群の遺伝子挿入変異株の作製. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2007 年 8 月.
 - ⑧ 内藤真理子、大原直也、庄子幹郎、吉村文信、中山浩次. *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株の全ゲノム塩基配列決定. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会. 2007 年 8 月.

[図書] (計 1 件)

- ① Yoshio Kondo, Mamiko Yoshimura, Naoya Ohara N, Mikio Shoji, Hideharu Yukitake, Mariko Naito, Taku Fujiwara, Koji Nakayama. Involvement of a tetratricopeptide repeat-containing protein in the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. In Interface Oral Health Science 2007, Watanabe W, Okuno O eds., pp.271-272. Springer, Tokyo.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大原 直也 (OHARA NAOYA)
国立感染症研究所・免疫部・室長
研究者番号 7 0 2 2 3 9 3 0

(2) 研究分担者

中山 浩次 (NAKAYAMA KOJI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 8 0 1 5 0 4 7 3
岡部真裕子 (OKABE MAYUKO)
国立感染症研究所・免疫部・研究員
研究者番号 5 0 4 5 5 3 9 1

(3) 連携研究者

中山 浩次 (NAKAYAMA KOJI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 8 0 1 5 0 4 7 3
岡部真裕子 (OKABE MAYUKO)
国立感染症研究所・免疫部・研究員
研究者番号 5 0 4 5 5 3 9 1