

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10116

研究課題名（和文）歯周病の新規治療となりうる宿主指向型miRNA療法の創出にむけた基礎的研究

研究課題名（英文）Basic study on the development of host-directed miRNA therapy as a novel treatment for periodontal disease

研究代表者

齋藤 淳（Saito, Atsushi）

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60266559

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）： *T. denticola*のDNA binding protein遺伝子は、酸素ストレスに対する応答および dentilisinの発現制御に関わっていることが示唆された。*P. gingivalis* HgP44のPep15は、*P. gingivalis* Hgp44と*T. denticola*の共凝集に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病の疾病概念は、単なる細菌感染から生活習慣病、そして多因子性疾患へと変遷しているが、細菌-宿主間の相互作用に及ぼす環境因子の影響についての検討は不足している。本研究は、まず主要な歯周病原細菌間の相互作用の一端を明らかにした。現在行っている研究により、宿主細胞や環境因子との相互作用についても明らかになることが期待され、これらにより、歯周病の新たな予防・治療法開発の足掛かりになると思われる。

研究成果の概要（英文）： It was suggested that the *T. denticola* gene coding for the DNA binding protein plays an important role in the response to oxygen stress and the regulation of the expression of dentilisin.

Pep15 from *P. gingivalis* HgP44 is likely to be involved in the coaggregation with *T. denticola*.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 歯周病原細菌 デンタルプラーク バイオフィルム 宿主細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

従来、歯周病の発症・進展メカニズムの解明に向けて、歯周病原細菌の感染と宿主応答については様々なモデルが検討されてきた。我々は、歯周病原細菌の宿主細胞への侵入が歯周炎、動脈硬化症の発症・進展に及ぼす影響を明らかにすべく一連の研究を行ってきた。その結果、polymicrobial 感染の条件下では、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* は単独感染とは異なるメカニズムでヒト歯肉上皮細胞および大動脈内皮細胞 (HAEC) に侵入すること (Saito et al. FEMS Immunol Med Microbiol 2008)、*P. gingivalis* の宿主細胞侵入は *Fusobacterium nucleatum* の存在下において有意に促進されることを見だし、そのメカニズムについても明らかにした (Saito et al. Microb Pathog 2009, 2012)。

歯周病の疾病概念は、単なる細菌感染から生活習慣病、そして多因子性疾患へと変遷しているが、細菌 - 宿主間の相互作用に及ぼす環境因子の影響についての検討は不足している。喫煙は歯周病の環境面における最大のリスクファクターの一つである。これまで、喫煙が歯周組織の細胞機能や歯周病原細菌による宿主細胞侵入に及ぼす影響については、明らかにされていなかった。そこで我々は、ニコチンおよびタバコ煙濃縮物 (cigarette smoke condensate: CSC) が、ヒト歯肉上皮細胞の機能に及ぼす影響を解明すべく研究に着手した。これまで、CSC は濃度により、歯肉上皮細胞の遊走能に二相性の影響を与えること、これには細胞骨格やインテグリン発現の変化が関与していることを見出し、さらに *P. gingivalis* 感染によりさらに修飾されることを報告した (Imamura et al. J Periodontal Res 2015)。さらに、重度歯周炎に関与する *Treponema denticola* の細胞侵入についても解析を行った (Inagaki et al. Microb Pathog 2016)。また *T. denticola* との付着に関与する *P. gingivalis* Hgp44 のドメインを明らかにした (Yoshikawa et al. Pathog Dis 2018)。

近年、歯周病の発症・進展におけるエピジェネティクスの関与が注目されており、マイクロ RNA (miRNA) による転写後修飾もその一つである。miRNA は宿主細胞において、免疫応答を含めた様々な細胞プロセスを制御している (Schwegmann and Brombacher, Sci Signal 2008)。感染症の発症・進展において、細菌が宿主の miRNA に影響を与えることから、miRNA 制御による治療法が研究されている。歯周病や関連疾患において細菌・環境因子が宿主の miRNA 発現に関わり、病態に影響を及ぼすことが示唆されているが、詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

歯周炎はプラークバイオフィルム中の歯周病原細菌の polymicrobial 感染により生じるが、宿主の応答や環境因子も深く関与し、これらのバランスの乱れが大きく影響する。本研究は歯周炎の発症および進展に重要な細菌 - 環境 - 宿主因子間の相互作用の一端を明らかにし、これを制御することによる新たな治療法の開発を目指すという構想のもと、具体的には次の目的を定めて実施する。

- (1) 細菌因子としての「歯周病原細菌の複数菌感染」、代表的な環境因子である「タバコ煙の暴露」が宿主細胞・組織の機能に及ぼす影響について明らかにする。
- (2) 上記の宿主反応メカニズムを miRNA レベルで解析し、宿主側の標的遺伝子を制御することによる歯周炎の新たな「宿主指向型療法 (Host-Directed Therapy; HDT)」開発のための基礎的知見を得る。

### 3. 研究の方法

まず、主要な歯周病原細菌である *T. denticola* にフォーカスし、この菌が宿主に定着する際に重要である環境ストレス応答について検討した。

*T. denticola* 表層には、dentilisin や Msp などの病原因子が存在する。それぞれの欠損株を用いて、DNA マイクロアレイ解析を行った。Dentilisin 欠損株では、特定の DNA binding protein の発現上昇が認められた。この DNA binding protein が *T. denticola* においてどのような機能を果たしているかについて解明するために、*T. denticola* ATCC 35405 株 (野生株) を供試し、エリスロマイシン耐性遺伝子を用い、相同組み換えにより DNA binding protein の遺伝子欠損株を作成した。細菌の増殖曲線は、TYGVS 培地を用いて培養開始から静止期までの OD<sub>660</sub> を測定することによって評価した。Dentilisin 活性は発色基質 (SAAPNA) を用いて、OD<sub>410</sub> の吸光度により測定した。環境ストレスへの応答については、酸素曝露による生菌数の変化について、ATP 量によって評価した。

続いて *P. gingivalis* と *T. denticola* の相互作用の解析を試みた。*P. gingivalis* Hgp44 のアミノ酸配列 199-316 領域から分割して 15 個の合成ペプチド (Pep1-15) を作製した。これらを用いて *T. denticola* との付着を ELISA にて解析した。また、Pep1-15 を用いて、*P. gingivalis* と *T. denticola* とのバイオフィルム形成に与える影響を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察した。

### 4. 研究成果

*T. denticola* の DNA binding protein 遺伝子の欠損株は、増殖速度においてほとんど影響はみら

れなかったが、静止期の菌数に増加が認められた。Dentilisin 活性は、欠損株において低下が認められた。酸素曝露後の生菌数を測定したところ、欠損株で有意な低下が認められた。これらの結果から、DNA binding protein は、酸素ストレスに対する応答に関わるとともに、dentilisin の発現制御に関わっていることが示唆された。

欠損株の DNA マイクロアレイ解析の結果、本菌の表層タンパク質関連の遺伝子の発現上昇を認めた。qRT-PCR を行い、それら遺伝子の有意な発現上昇を確認した。現在、これらの遺伝子の機能解析を進めている。

*P. gingivalis* と *T. denticola* の相互作用に関しては、ELISA において Pep5、6、7、15 と *T. denticola* の付着は、control (合成ペプチド無添加時) に比較して有意に高かった。CLSM の結果、Pep14 および 15 存在下において、*P. gingivalis* と *T. denticola* によって形成されるバイオフィルムの厚みが control (合成ペプチド無添加時) と比較して有意に減少した。本実験で *T. denticola* への付着を認めた Pep15 の配列は、GTPNPNPNPNPNPGT である。同配列はマウスのフィブリノーゲン、コラーゲン TypeV およびヘモグロビンへの結合性が報告されている。ELISA および CLSM による観察の結果から、この配列は、*P. gingivalis* Hgp44 と *T. denticola* の共凝集に関与することが示唆された。現在、これらの細菌と宿主細胞との相互作用について、また喫煙がそれに及ぼす影響について解析を行っている。

現在、Pep1-15 を介した細菌間の物理的な結合により、バイオフィルム形成にどのような変化が生じるかを検討すべく、網羅的な遺伝子解析を実施している。

miRNA 発現の解析については、十分な知見を得るに至らなかったため、今後、継続して検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakane Saki, Imamura Kentaro, Hisanaga Rio, Ishihara Kazuyuki, Saito Atsushi	4. 巻 56
2. 論文標題 Systemic administration of cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA 4) Ig abrogates alveolar bone resorption in induced periodontitis through inhibition of osteoclast differentiation and activation: An experimental investigation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 972 ~ 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hajishengallis G, Hasturk H, Lambris JD, ..., Saito A, Sculean A, Stavropoulos A, Tonetti M, Yancopoulos D.	4. 巻 42
2. 論文標題 C3-targeted therapy in periodontal disease: moving closer to the clinic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Immunology	6. 最初と最後の頁 856 ~ 864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.it.2021.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fukasawa T, Kitamura Y, Yamashita K, Asai H, Ishihara K, Saito A
2. 発表標題 Investigating the mechanism of environmental stress response in <i>Treponema denticola</i>
3. 学会等名 The 106th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology and the Japanese Academy of Clinical Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村友里恵, 深澤俊也, 菊池有一郎, 国分栄仁, 齋藤 淳, 石原和幸
2. 発表標題 <i>Treponema denticola</i> の表層病原性成分の遺伝子調節機構の解明
3. 学会等名 第307回東京歯科大学学会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakane S, Imamura K, Ishihara K, Saito A
2. 発表標題 CTLA-4 reduces bone resorption through the inhibition of osteoclast differentiation
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Nov.7-8, 2020, Virtual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今村 健太郎 (Imamura Kentaro) (60755007)	東京歯科大学・歯学部・講師  (32650)	
研究分担者	国分 栄仁 (Kokubu Eitoyo) (70453785)	東京歯科大学・歯学部・講師  (32650)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------