

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18985

研究課題名(和文) 歯周病菌感染がオートファジー制御異常を介して心肥大に与える影響とその機序の解明

研究課題名(英文) Effect of periodontal infection on cardiac hypertrophy through dysregulation of autophagy and its mechanism.

研究代表者

始平堂 由佳 (Shiheido, Yuka)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60791853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに歯周病と心血管疾患の関連性が指摘されているが、その詳しいメカニズムは依然として不明のままである。近年、細胞内分解機構であるオートファジーの制御異常が様々な全身疾患に関与することが報告されている。とりわけ、非分裂細胞である心筋細胞の恒常性を保つのにオートファジーが重要な役割を有していることがわかってきた。申請者はこれまでの研究成果より、オートファジーの制御異常が歯周病と心血管疾患の関わりを解明する鍵を握っているのではないかと考え研究を進めてきた。本年度は、これまでに得られたin vivoおよびin vitroの研究成果をまとめ、論文投稿の準備を進めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究よりオートファジー制御機構が歯周病と心血管疾患とを結びつける因子である可能性を一層高めることができた。さらなる研究を進めることで世界に先駆けてオートファジー制御機構をターゲットとした新規治療法の確立や創薬開発へと発展させることができると考える。

研究成果の概要(英文)：An association between periodontal disease and cardiovascular disease has been suggested, but the detailed mechanism remains unclear. Recently, dysregulation of autophagy, an intracellular degradation mechanism, has been reported to be involved in several systemic diseases. In particular, autophagy has been shown to play an important role in maintaining the homeostasis of cardiomyocytes, which are non-dividing cells. Based on the results of previous studies, the applicant has been investigating the possibility that dysregulation of autophagy may hold the key to elucidating the relationship between periodontal disease and cardiovascular disease.

This year, we were able to synthesize the results of in vivo and in vitro studies obtained to date.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病原細菌 オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内分解機構であるオートファジーの制御異常が様々な疾患に関与することが報告されている。オートファジーは心筋における細胞内タンパクの品質保持と細胞内に侵入する病原体の除去にも機能していることが明らかとなっている。申請者はこれまでに歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) が感染している梗塞心筋では心破裂は頻発し、その原因が心筋細胞におけるマイトファジー(ミトコンドリア選択的オートファジー)の抑制にあることを報告している。申請者はこれまでの研究成果より、オートファジーの制御異常が歯周病と心血管疾患の関わりを解明する鍵を握っているものと考え、「歯周病原細菌の感染がオートファジー制御異常を介して心肥大に与える影響とその機序を解明すること」を目的に本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

歯周病原細菌の感染により心筋のオートファジー制御機構に影響がおよび、心肥大の病態・予後を悪化させるのではないかと、という仮説を検証し、そのメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 心筋細胞内における歯周病原細菌の局在の検討

培養心筋細胞に細胞内 pH 測定試薬でラベルした歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) を培養心筋細胞に植菌し、蛍光顕微鏡で *P.g.* の局在を観察した。

#### 歯周病原細菌の感染による心筋細胞の viability の検討

H9C2 細胞に *P.g.* 野生株、または *P.g.* の病原因子である gingipain を欠損させた *P.g.* gingipain 欠損株を感染させ、細胞生存アッセイにより歯周病原細菌が心筋細胞の生存性に与える影響を検証した。

#### 歯周病原細菌感染によるオートファジー抑制の検討

mRFP-GFP-LC3 アデノウイルスを導入した培養心筋細胞に、*P.g.* 野生株、*P.g.* gingipain 欠損株、または *P.g.* から抽出した gingipain を感染させ、共焦点顕微鏡でオートファゴソームおよびリソソームを検出・定量することでオートファジー抑制を評価した。

#### 歯周病原細菌によるオートファジー抑制の分子メカニズムの検討

オートファゴソームとリソソームの融合関連タンパク VAMP8 の Flag-tagged リコンビナントタンパクを作成し、His-tagged gingipain と反応させ、オートファジー抑制の分子メカニズムを検討した。

### 4. 研究成果

歯周病原細菌 *P.g.* は心筋細胞内に侵入していることが明らかとなった。

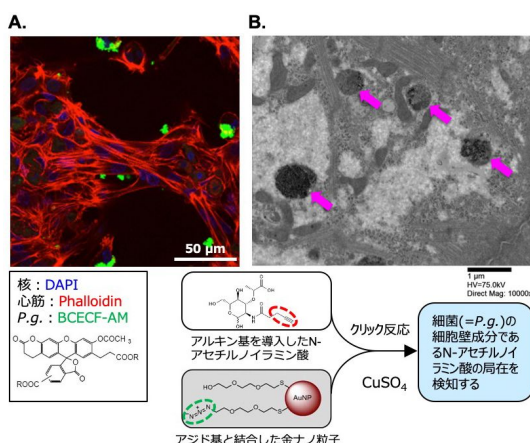


図1. 心筋細胞内に *P.g.* が侵入していることを確認した。

A. 蛍光顕微鏡による観察 B. 透過型電子顕微鏡による観察

*P.g.* 野生株が感染したH9C2細胞では *P.g.* gingipain 欠損株と比較してダメージがより顕著であった。

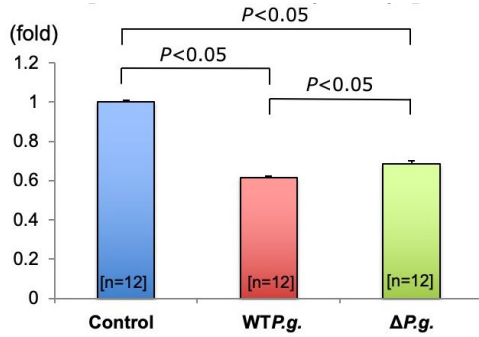


図2. *P.g.* 野生株が感染したH9C2細胞は *P.g.* gingipain欠損株感染細胞と比較してダメージがより顕著であった。WTP.g.: Strain ATCC 33277; Δ*P.g.*: Strain KDP 981 (Gingipain-defective strain), Genotype: *kgp-2::cat rgpA2::cep rgpB2::tetQ*, Cm<sup>r</sup> Amp<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup>

*P.g.* 野生株を感染させた培養心筋細胞では *P.g.* gingipain欠損株と比較してオートファゴソームとリソソームの融合がより阻害されていることがわかった。

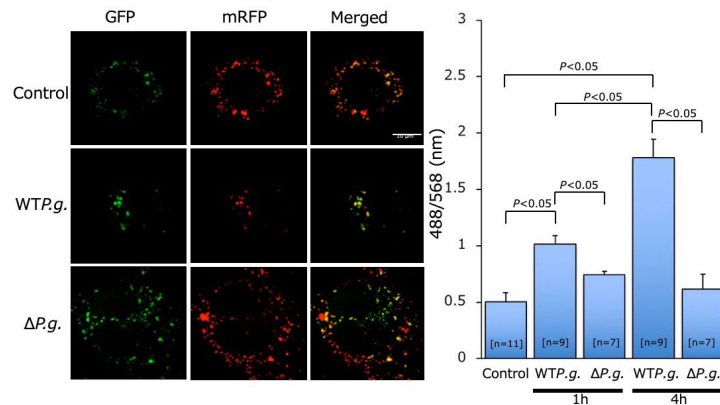


図3. *P.g.* 野生株が感染した培養心筋細胞ではオートファゴソームとリソソームの融合が阻害されていたのに対し、gingipain欠損株では正常に近いautophagy fluxを認めた。

オートファゴソームとリソソームの融合関連タンパクであるVAMP8はgingipain依存性に切断・不活性化されることが明らかとなった。また、gingipain切断部位のアミノ酸を置換したVAMP8変異体を作成してgingipainと反応を添加させたところ、VAMP8-K47Aはgingipainに切断されなかった。これらの結果より、歯周病原細菌*P.g.*が放出する病原因子gingipainは、VAMP8を47番目のリジンで切断し、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害し、オートファジーの抑制を引き起こすことが明らかとなった。

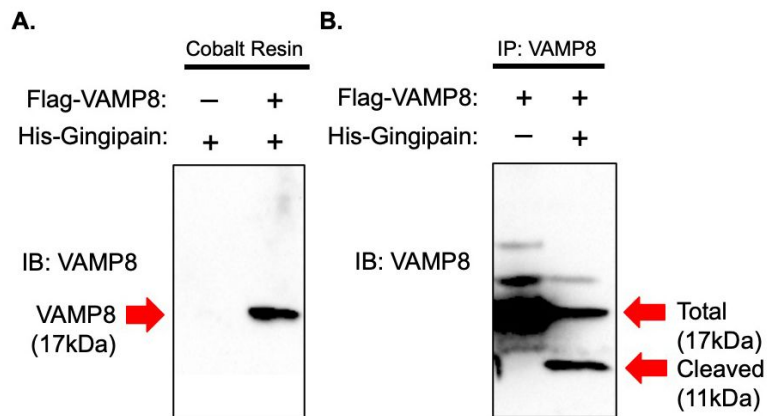


図4. Flag-VAMP8を用いた検討  
A. gingipainはVAMP8に結合する。  
B. VAMP8はgingipain依存性に切断される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Yusuke, Maejima Yasuhiro, Nakagama Shun, Shiheido-Watanabe Yuka, Tamura Natsuko, Sasano Tetsuo	4. 巻 6
2. 論文標題 Rivaroxaban, a Direct Oral Factor Xa Inhibitor, Attenuates Atherosclerosis by Alleviating Factor Xa $\alpha$ 2-Mediated Autophagy Suppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 964 ~ 980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2021.09.010	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 Fukushima T, Yonetsu T, Aoyama N, Tashiro A, Niida T, Shiheido-Watanabe Y, Maejima Y, Isobe M, Iwata T, Sasano T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of Periodontal Disease on Long-Term Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention for De Novo Coronary Lesions in Non-Smokers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tamura N, Maejima Y, Shiheido-Watanabe Y, Nakagama S, Isobe M, Sasano T	4. 巻 -
2. 論文標題 Plasma apolipoprotein C-2 elevation is associated with Takayasu arteritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shiheido-Watanabe Y, Maejima Y, Kasama T, Tamura N, Nakagama S, Ito Y, Hirao K, Isobe M, Sasano T	4. 巻 6
2. 論文標題 Linagliptin, A Xanthine-Based Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Ameliorates Experimental Autoimmune Myocarditis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci	6. 最初と最後の頁 527-542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sano Masataka, Maejima Yasuhiro, Nakagama Shun, Shiheido-Watanabe Yuka, Tamura Natsuko, Hirao Kenzo, Isobe Mitsuaki, Sasano Tetsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps-mediated Beclin-1 suppression aggravates atherosclerosis by inhibiting macrophage autophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.876147	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 Nakagama Shun, Maejima Yasuhiro, Fan Qintao, Shiheido-Watanabe Yuka, Tamura Nastuko, Ihara Kensuke, Sasano Tetsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum selective autophagy alleviates anthracycline-induced cardiotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JACC: CardioOncol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.rs-2056829/v1	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 Kanno Yoshinori, Yonetsu Taishi, Aoyama Norio, Shiheido-Watanabe Yuka, Yoshikawa Hiroshi, Ohmori Mari, Tashiro Akira, Niida Takayuki, Matsuda Yuji, Araki Makoto, Usui Eisuke, Hada Hiroto, Umemoto Tomoyuki, Maejima Yasuhiro, Isobe Mitsuaki, Iwata Takanori, Sasano Tetsuo	4. 巻 30
2. 論文標題 Association between periodontal disease and pericardial adipose tissue in patients with cardiovascular disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Heart Journal Plus: Cardiology Research and Practice	6. 最初と最後の頁 100298 ~ 100298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ahjo.2023.100298	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 Hamaya Rikuta, Yonetsu Taishi, Aoyama Norio, Shiheido Watanabe Yuka, Tashiro Akira, Niida Takayuki, Isobe Mitsuaki, Maejima Yasuhiro, Iwata Takanori, Sasano Tetsuo	4. 巻 50
2. 論文標題 Contribution of periodontal health in cardiovascular secondary prevention: Analyses on hospitalized patients in cardiology units	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 708 ~ 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcpe.13792	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuka Shiheido-Watanabe, Yasuhiro Maejima, Natsuko Tamura, Shun Nakagama, Tetsuo Sasano
2. 発表標題 SNARE Proteins are Critical Factors for Periodontal Pathogen-mediated Aggravation of Myocardial Infarction
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akira Tashiro, Taishi Yonetsu, Norio Aoyama, Yuka Shiheido-Watanabe, Takayuki Niida, Mitsuaki Isobe, Takanori Iwata, Tetsuo Sasano.
2. 発表標題 Association of Periodontitis with Clinical Outcomes after Catheter Ablation for Paroxysmal Atrial Fibrillation
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺（始平堂）由佳、前嶋康浩、田村夏子、中釜瞬、米津太志、笹野哲郎
2. 発表標題 歯周病菌の感染が心筋梗塞マウスモデルの病態に及ぼす影響とその分子機序の解明
3. 学会等名 第262回日本循環器学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka Shiheido-Watanabe, Yasuhiro Maejima, Natsuko Tamura, Shun Nakagama, Tetsuo Sasano
2. 発表標題 Invasion of a periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis, in myocardium causes dysregulation of autophagic machinery through abrogating function of VAMP8
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Natsuko Tamura, Yasuhiro Maejima, Yuka Watanabe, Shun Nakagama, Mitsuaki Isobe, Tetsuo Sasano.
2. 発表標題 MLX Mutation is Associated with Aggravation of Periaortic Brown Adipose Tissue Inflammation-mediated Large Vessel Vasculitis in Mice.
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka Shiheido-Watanabe, Yasuhiro Maejima, Natsuko Tamura, Shun Nakagama, Tetsuo Sasano
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis, a periodontal pathogen, dysregulates autophagy by abrogating autophagosomelysosome fusion in cardiomyocytes
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------